UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

Luis Eduardo Alves Damasceno

**Envolvimento da enzima Piruvato Quinase M2 (PKM2) na
diferenciação de linfócitos Th17 e patogênese da Encefalomielite
Autoimune Experimental**

Ribeirão Preto
2017

Luis Eduardo Alves Damasceno

**Envolvimento da enzima Piruvato Quinase M2 (PKM2) na
diferenciação de linfócitos Th17 e patogênese da Encefalomielite
Autoimune Experimental**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Damasceno, Luis Eduardo Alves

Envolvimento da enzima Piruvato Quinase M2 (PKM2) na diferenciação de linfócitos Th17 e patogênese da Encefalomielite Autoimune Experimental. Ribeirão Preto, 2017.

88 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: José Carlos Farias Alves Filho

1. Linfócitos Th17. 2. Autoimunidade. 3. Imunometabolismo. 4. PKM2.

Nome: Luis Eduardo Alves Damasceno

Título: Envolvimento da enzima Piruvato Quinase M2 (PKM2) na diferenciação de linfócitos Th17 e patogênese da Encefalomielite Autoimune Experimental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho. Instituição: FMRP-USP.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros. Instituição: FCFAR-UNESP Araraquara.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Alexandre Salgado Basso. Instituição: EPM-UNIFESP.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Alessandro dos Santos Farias. Instituição: IB-UNICAMP.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor (LID) do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2016/10280-9).

Aos meus pais, irmão, e toda família
pelo amor e apoio incondicionais.

Agradecimentos

A Deus, em Quem deposito minha fé, pelas oportunidades concedidas e pela força em superar os obstáculos com leveza e tranquilidade nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Luiz Damasceno e Jovineuda Damasceno, os quais me deram a vida e me ensinaram a vivê-la dignamente. Sou grato por todo apoio e incentivo constantes, pelas palavras valiosas e sábias, por todo amor, carinho, educação e compreensão. Amo vocês!

Ao meu irmão Henrique Damasceno, pelo incentivo, apoio, e por acreditar em meu potencial.

À toda minha família, pelo suporte e pelos momentos de aconchego e compreensão.

Aos meus velhos e novos amigos, os quais longe ou perto demonstram companheirismo e incentivo, além de proporcionar alegria e descontração em diversos momentos da minha vida.

Ao meu orientador, professor José Carlos (Zeca) pela atenção, ensinamentos e por ter me recebido em seu grupo com tanta disposição. Obrigado!

Aos demais professores do Laboratório de Inflamação e Dor (LID), Fernando Cunha e Thiago Cunha, pelo auxílio no desenvolvimento desse projeto.

Ao grupo de “Imunoregulação / Imunometabolismo”: Annie, Bruno, Paulo, João Paulo, Paula, Douglas, Flávio, Rafael, Talita, Juliana, Letícia, Dani, Thainá, Gabriel e César pelas discussões científicas e por manterem um clima agradável de trabalho.

Aos demais amigos e colegas do LID: Rafaela, Miriam, Carlos, Camila, Guilherme C., Isaac, Maria Cláudia, Ana Letícia, Marcela, Alexandre M., André Saraiva, Nathália, Lívia, Wagner, Fábio, Paula B., Kalil, Taty, Matheus, Vanessa, Alexandre L., David C., Ana Carolina e Mikhael pelo convívio amigável e cooperativo.

Aos colaboradores deste trabalho: Miriam, Flávio, Rafael e em especial ao Douglas, pela disposição, ensinamentos, boa vontade e dedicação às longas horas de experimento. Obrigado!

Aos técnicos do LID: Katinha, Diva, Ieda, Serginho, Giu, Marquinhos, Vagner e Inês pelo apoio técnico.

Aos professores e discentes da Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (IBA), pelas contribuições científicas.

À Ana Cristine, secretária do IBA, pelo apoio e solicitude.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado (Processo nº 2016/10280-9), além do apoio financeiro proveniente do *Center for Research in Inflammatory Diseases* (CRID), os quais foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Don't dream it, be it!

The Rocky Horror Picture Show

DAMASCENO, LEA. **Envolvimento da enzima Piruvato Quinase M2 (PKM2) na diferenciação de linfócitos Th17 e patogênese da Encefalomielite Autoimune Experimental**. 2017. 88. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

RESUMO

Nos últimos anos, um importante destaque tem sido dado aos linfócitos Th17 para o desenvolvimento e manutenção da inflamação associada à autoimunidade. A esclerose múltipla é uma doença autoimune desmielinizante do SNC, cuja patogênese está associada à resposta do padrão Th17. Evidências têm demonstrado que estas células são submetidas a uma reprogramação metabólica após serem ativadas, sendo essa adequação essencial para sua completa diferenciação e aquisição de funções efetoras. A enzima Piruvato Quinase M2 (PKM2) participa da etapa final da glicólise convertendo fosfoenolpiruvato em piruvato. Estudos recentes demonstraram que a fosforilação de PKM2 a torna capaz de translocar para o núcleo, onde adquire um papel no controle da expressão gênica. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o envolvimento da PKM2 na diferenciação de linfócitos Th17, bem como sua participação no desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental (EAE), um modelo animal de esclerose múltipla. Observou-se que durante o processo de diferenciação, os linfócitos Th17 aumentam a expressão gênica de PKM2 bem como a sua forma fosforilada (Y¹⁰⁵). De forma interessante, tanto a inibição farmacológica como a deleção gênica da PKM2 especificamente em linfócitos T promoveram uma redução da diferenciação e expansão da subpopulação Th17, que foi associada com diminuição na expressão de moléculas efetoras e fatores de transcrição chave para o estabelecimento do fenótipo Th17. Em um contexto de resposta autoimune, notou-se que PKM2 é superexpressa nos órgãos linfóides periféricos e sistema nervoso central de animais com EAE, sendo correlacionada com o infiltrado de células inflamatórias. Corroborando com os dados *in vitro*, a deficiência de PKM2 em linfócitos T promoveu redução dos sinais clínicos da EAE, acompanhada de baixa frequência de linfócitos Th17 e menor expressão de moléculas inflamatórias do perfil Th17. Adicionalmente, o tratamento farmacológico com o inibidor da PKM2 atenuou a progressão e gravidade da EAE. Portanto, esses achados implicam um importante papel para PKM2 em doenças autoimunes por regular o desenvolvimento e função de linfócitos Th17.

Palavras-chave: Linfócitos Th17. Autoimunidade. PKM2.

DAMASCENO, LEA. **Involvement of the enzyme Pyruvate Kinase M2 (PKM2) in the differentiation of Th17 lymphocytes and pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis.** 2017. 88. Master's dissertation. Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2017.

ABSTRACT

Over the past few years, an important highlight has been given to Th17 lymphocytes for the development and maintenance of autoimmunity-associated inflammation. Multiple sclerosis is a CNS demyelinating autoimmune disease that is associated to Th17-mediated response. Some evidences have demonstrated that those cells undergo metabolic reprogramming after being activated, which is essential for their complete differentiation and acquisition of effector functions. The enzyme Pyruvate kinase M2 (PKM2) participates at the final step of glycolysis by converting phosphoenolpyruvate into pyruvate. Recent studies have demonstrated that PKM2 phosphorylation allows its translocation into the nucleus, where it plays a role in controlling gene expression. Thus, the aim of this study was to evaluate the involvement of PKM2 in Th17 lymphocytes differentiation, as well as its role in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model for multiple sclerosis. It was perceived that during differentiation process, Th17 lymphocytes increase PKM2 gene expression, and also its phosphorylated form (Y¹⁰⁵). Interestingly, both pharmacological inhibition and T-lymphocyte-specific PKM2 gene deletion promoted a reduction in differentiation and expansion of Th17 subpopulation, being associated to diminished expression of effector molecules and key transcription factors for the establishment of Th17 phenotype. In the context of an autoimmune response, it was noticed that PKM2 is overexpressed in peripheral lymphoid organs and central nervous system of EAE-bearing mice, which was correlated with the inflammatory cell infiltration. Corroborating with *in vitro* data, the deficiency of PKM2 in T lymphocytes led to a reduction of EAE clinical score along with low Th17 frequency and diminished expression of Th17-related inflammatory molecules. Additionally, pharmacological treatment with the PKM2 inhibitor attenuated EAE progression and severity. Therefore, these findings imply an important role for PKM2 in autoimmune diseases by regulating the development and function of Th17 lymphocytes.

Keywords: Th17 lymphocytes. Autoimmunity. PKM2.

Lista de figuras

Figura 1. Metabolismo no desenvolvimento e diferenciação de linfócitos T	19
Figura 2. Modulação da atividade catalítica de PKM2.)	22
Figura 3. Funções não-glicolíticas da PKM2 no núcleo	24
Figure 4. A expressão de <i>Pkm2</i> está aumentada em linfócitos Th17	43
Figura 5. Células T CD4 ⁺ produtoras de IL-17 apresentam maior expressão de PKM2	44
Figura 6. A fosforilação do resíduo Y ¹⁰⁵ da PKM2 é aumentada durante a diferenciação de linfócitos Th17	45
Figura 7. Presença de PKM2 no núcleo de células Th17	46
Figura 8. A inibição farmacológica de PKM2 reduz a diferenciação de linfócitos para o perfil Th17	48
Figura 9. Construção do animal <i>knockout</i> condicional CD4 ^{Cre} <i>Pkm2</i> ^{fllox/fllox}	49
Figura 10. Ausência de PKM2 não altera a frequência de linfócitos T CD4, CD8 e populações de células T CD4 <i>naïve</i> ou ativadas, em condições de homeostase	50
Figura 11. Células T CD4 ⁺ deficientes de PKM2 não apresentam alterações na capacidade proliferativa	50
Figura 12. A deleção gênica de <i>Pkm2</i> compromete a diferenciação de linfócitos para o fenótipo Th17	51
Figura 13. A deficiência de PKM2 em linfócitos Th17 reduz a expressão gênica de moléculas associadas ao seu fenótipo.....	52
Figura 14. A deficiência de PKM2 em linfócitos T CD4 ⁺ não prejudica a diferenciação para os fenótipos Th1 e iTreg	53
Figure 15. Aumento da expressão de <i>Pkm2</i> está associado à inflamação autoimune observada na EAE	55
Figura 16. Animais com EAE apresentam aumento da expressão de PKM2 na medula espinal..	56
Figura 17. A expressão de PKM2 e PKM2 fosforilada está elevada no SNC de animais com EAE	57
Figura 18. A expressão de PKM2 em linfócitos T é importante para o desenvolvimento do EAE	58
Figura 19. A deficiência de PKM2 em linfócitos T reduz a frequência de linfócitos Th17 <i>in vivo</i> e sua responsividade ao antígeno <i>in vitro</i>	59

Figura 20. A expressão de genes relacionados ao fenótipo Th17 e patogênese da EAE é amplamente reduzida na medula espinal de animais $CD4^{Cre}Pkm2^{flox/flox}$ imunizados	60
Figura 21. Linfócitos T $CD4^{+}$ deficientes de <i>Pkm2</i> isolados do SNC de animais com EAE apresentam baixa expressão de marcadores Th17.....	61
Figura 22. O tratamento com o inibidor farmacológico da PKM2 (shikonin) atenua o desenvolvimento da EAE..	62
Figura 23. O tratamento com o inibidor da PKM2 reduz a frequência de linfócitos Th17 <i>in vivo</i> e diminui a resposta antígeno-específica <i>in vitro</i>	63
Figura 24. Inibição farmacológica da PKM2 reduz a expressão de genes relacionados com o desenvolvimento da doença no SNC	64
Figura 25. A expressão gênica de marcadores do perfil Th17 está reduzida em células T $CD4^{+}$ isoladas do SNC de animais com EAE tratados com shikonin	65

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1	Imunometabolismo	15
1.2	Regulação metabólica de linfócitos T	16
1.2.1	Ativação	16
1.2.2	Diferenciação	19
1.3	Aspectos gerais da Piruvato Quinase M2.....	20
1.4	PKM2 e regulação da resposta imune.....	24
1.5	Imunopatogênese da Esclerose Múltipla.....	25
1.6	Linfócitos Th17 na Esclerose Múltipla	27
2.	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo geral.....	31
2.2	Objetivos específicos	31
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1	Animais	33
3.2	Ferramenta farmacológica	33
3.3	Cultura de linfócitos T CD4.....	33
3.4	Marcação de superfície ou intracelular para citometria de fluxo	34
3.5	Indução da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE).....	35
3.6	Resposta antígeno-específica por reestimulação com MOG ₃₅₋₅₅ <i>in vitro</i>	36
3.7	Mensuração de citocinas por ELISA.....	36
3.8	Western blotting	37
3.9	Isolamento de leucócitos infiltrantes do SNC	37
3.10	Extração de mRNA e conversão em cDNA	38
3.11	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)	39
3.12	Imunofluorescência.....	40
3.13	Análise histopatológica	41
3.14	Análise estatística	41
4.	RESULTADOS	42
4.1	A expressão da enzima glicolítica Piruvato Quinase M2 (PKM2) é aumentada durante a diferenciação de linfócitos Th17	43
4.2	A inibição farmacológica de PKM2 causa redução na geração de linfócitos Th17 <i>in vitro</i>	46
4.3	Deficiência específica de PKM2 em linfócito T limita sua diferenciação para o fenótipo Th17, mas não para Th1 ou iTreg <i>in vitro</i>	48
4.4	A expressão de PKM2 aumenta durante o curso da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)	53
4.5	A deleção específica de PKM2 em linfócitos T atenua o desenvolvimento da EAE e reduz a gravidade da doença	57
4.6	O tratamento com o inibidor de PKM2 é capaz de reduzir os sinais clínicos da EAE.....	62
5.	DISCUSSÃO	66
6.	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS.....	77
	ANEXOS.....	87

1. Introdução

1.1 Imunometabolismo

O metabolismo celular é responsável pela geração de energia e biossíntese de macromoléculas, permitindo a manutenção das funções biológicas. As necessidades bioenergéticas das células são supridas por vias metabólicas interconectadas, como a glicólise, que ocorre no citosol, e o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA; *tricarboxylic acid cycle*) e fosforilação oxidativa (OXPHOS; *oxidative phosphorylation*), restritas à mitocôndria (NELSON; COX, 2013). Os processos metabólicos são altamente regulados por uma série de enzimas e cofatores, cujas funções refletem críticas mudanças no ambiente em que as células se encontram.

Em condições de normóxia, cada molécula de glicose que entra na célula através de transportadores específicos (GLUTs) é convertida em duas moléculas de piruvato na via glicolítica, as quais podem ser oxidadas no TCA para geração de NADH e FADH₂, coenzimas importantes para geração de ATP e NAD⁺ via OXPHOS. Além disso, o catabolismo de ácidos graxos e aminoácidos (ex. glutamina) também leva à formação de acetil-coenzima A (acetil-CoA), que pode entrar no TCA e produzir mais NADH. Logo, em condições aeróbicas o metabolismo oxidativo é favorecido para geração de ATP. Alternativamente, em ambiente hipóxico, o piruvato pode ser convertido a lactato (e NAD⁺) pela lactato desidrogenase (LDH) em um processo que minimiza a quantidade de ATP produzida a partir de uma molécula de glicose, sendo denominado de glicólise anaeróbica (NELSON; COX, 2013). Embora estas vias, juntamente com a β -oxidação (FAO; *fatty acid oxidation*), síntese de ácidos graxos (FAS; *fatty acid synthesis*) e metabolismo de aminoácidos (AA) culminem em diferentes produtos finais, todas são reguladas por sinalizações intracelulares que as interligam para suprir as necessidades bioenergéticas da célula (GANESHAN; CHAWLA, 2014).

Com o intuito de manter a homeostase, o sistema imunológico continuamente percebe e responde à potenciais ameaças ao organismo, o que demanda um alto custo energético. Embora os primeiros estudos envolvendo o metabolismo de células imunológicas datem mais de 30 anos, os quais analisam basicamente a necessidade de alguns metabólitos para estas células, apenas nos últimos anos têm-se de fato evidenciado que distintas vias metabólicas estão implicadas na geração e função de células do sistema imunológico, e consequentemente na regulação da resposta imune frente à diferentes condições patológicas (ALONSO; NUNGESTER, 1956; ARDAWI,

1991; O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016; OREN et al., 1963).

No geral, células em estado de quiescência utilizam o metabolismo oxidativo (ex. OXPHOS) a fim de se obter níveis energéticos necessários para manutenção fisiológica basal. No início do século XX, o pesquisador Otto Warburg descobriu que alguns tipos de células tumorais, mesmo na presença de oxigênio, produzem mais lactato por meio da glicólise, o que dá suporte à altas taxas de proliferação. Anos mais tarde, Warburg observou que leucócitos estimulados também se tornam altamente glicolíticos (MACINTYRE; RATHMELL, 2013; VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; WARBURG; GAWEHN; GEISSLER, 1958). Nesse sentido, a ativação de células do sistema imunológico por citocinas, antígenos e fatores de crescimento bem como o balanço da disponibilidade de nutrientes induz uma reprogramação metabólica na qual a célula passa a depender e priorizar a via glicolítica como fonte primária de energia mesmo na presença de oxigênio. Esse processo, também conhecido como glicólise aeróbica (ou efeito de Warburg), direciona mudanças na expressão de uma variedade de genes para dar suporte a proliferação e aquisição de suas funções efectoras (O'SULLIVAN; PEARCE, 2015).

Logo, a possibilidade de se encontrar alvos farmacológicos em vias metabólicas de células do sistema imunológico envolvidas em desordens inflamatórias e autoimunes gerou um enorme interesse dos cientistas pela área do imunometabolismo.

1.2 Regulação metabólica de linfócitos T

1.2.1 Ativação

Os linfócitos T são componentes essenciais para indução e expressão da imunidade adaptativa, além disso o desenvolvimento destas células é altamente regulado e envolve diferentes etapas de proliferação e seleção. Os linfócitos T são originados a partir de progenitores derivados de células tronco hematopoiéticas (HSC; *hematopoietic stem cell*) que migram da medula óssea para o timo, onde maturam (KOCH; RADTKE, 2011).

Estes precursores, denominados de timócitos (DN1-duplo-negativos), recebem sinais de sobrevivência (Notch1; IL-7) e passam por diferentes etapas de proliferação, culminando na expressão dos co-receptores CD4 e CD8 (DP-duplo-positivos)

(MAILLARD et al., 2006; RATHMELL et al., 2001). Em seguida, rearranjam o locus gênico V(D)J do receptor de antígeno (TCR; *T-Cell Receptor*) por recombinação somática, o que leva a geração de TCRs funcionais que garantem a diversidade e especificidade da resposta. Nas etapas finais da maturação ocorrem a seleção positiva, que garante a restrição ao MHC próprio e expressão de apenas CD4 ou CD8 (SP-simples positivo), bem como a seleção negativa de células que reconheçam antígenos próprios com alta afinidade e avides como um mecanismo de autotolerância (GERMAIN, 2002; KOCH; RADTKE, 2011). Logo, células T *naïve* maduras migram do timo para a periferia apresentando um estado quiescente, as quais utilizam OXPHOS/FAO para geração de ATP e manter proliferação homeostática (**Figura 1**) (MURANSKI; CHMIELOWSKI; IGNATOWICZ, 2000; PEARCE et al., 2013).

Estas células recirculam entre os órgãos linfoides secundários até que sejam ativadas. Esta ativação depende de células apresentadoras de antígeno (APC; *Antigen-presenting cells*) para interação TCR↔MHC-peptídeo e ligação de moléculas coestimuladoras (ex. CD28↔CD80/CD86), o que induz uma intensa proliferação celular, conhecida como expansão clonal (CHEN; FLIES, 2013; HUPPA; DAVIS, 2003). Este processo requer uma rápida geração de energia e intermediários da via glicolítica para biossíntese de aminoácidos, lipídios, nucleotídeos etc., bem como para replicação do conteúdo celular (**Figura 1**). Assim, estas células passam a priorizar a glicólise aeróbica, que embora seja menos eficiente na geração de ATP, é uma importante fonte de moléculas intermediárias que dão suporte ao anabolismo necessário para proliferação. Por exemplo, a glicose-6-fosfato produzida no início da glicólise, pode entrar na via das pentoses fosfato (PPP) para síntese de nucleotídeos. Além disso, a glicólise aeróbica auxilia na manutenção do balanço NAD⁺/NADH, o que intensifica ainda mais esse processo (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; WANG; GREEN, 2012) .

O aumento da taxa glicolítica dos linfócitos T após ativação é, em parte, regulado pela via de sinalização PI3K/Akt-mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*). O sensor mTOR compõe dois complexos de sinalização, mTORC1 e mTORC2, os quais interagem com diferentes proteínas adaptadoras (LAPLANTE; SABATINI, 2012; LINKE et al., 2017). Os sinais coestimulatórios em células T, bem como ligação de fatores de crescimento como a IL-2 em seu receptor, ocasiona o recrutamento e ativação da PI3K, que leva ao recrutamento de PDK-1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*), que juntamente com o mTORC2 fosforila akt. Essa via culmina na

ativação de mTORC1, que medeia diversos processos biológicos, incluindo a glicólise aeróbica via aumento da expressão de GLUT-1 na membrana, bem como por ampliar a expressão de genes glicolíticos como HIF-1 α (*Hipoxia-inducible fator 1 α*) e c-Myc (DÜVEL et al., 2010; MACINTYRE et al., 2014; MACIOLEK; ALEX PASTERNAK; WILSON, 2014; WAICKMAN; POWELL, 2012).

O HIF-1 α está geralmente expresso em condições de baixos níveis de oxigênio, entretanto sua expressão é aumentada em linfócitos T ativados e regula positivamente a glicólise aeróbica através do aumento da expressão gênica de enzimas glicolíticas (PALAZON et al., 2014; PALMER et al., 2015; SEMENZA, 2012). Nesse sentido, HIF-1 α aumenta a expressão de PDK1 (*Pyruvate dehydrogenase kinase*), que inibe a atividade da PDH (*Pyruvate dehydrogenase*), uma importante enzima para conversão de piruvato à acetil-CoA e manutenção do metabolismo oxidativo mitocondrial (KIM et al., 2006). O c-Myc exerce um papel similar em regular positivamente a expressão gênica de enzimas da via glicolítica (*Glut1*, *Hk2*, *Ldha* etc.), mas também é capaz de dar suporte à glutaminólise (MACIVER; MICHALEK; RATHMELL, 2013). Neste caso, o AA glutamina é submetido à reações anapleróticas para produção de α -cetoglutarato (α KG), um intermediário do TCA, onde é metabolizado em citrato e utilizado na síntese de lipídios durante a expansão clonal (WANG et al., 2011).

Figura 1. Metabolismo no desenvolvimento e diferenciação de linfócitos T. Células-tronco hematopoiéticas passam por diferentes etapas de maturação para se tornarem linfócitos T maduros. Quando deixam o timo e migram para a periferia, estes linfócitos T naïve dependem principalmente da OXPHOS para sustentar suas necessidades energéticas. Nos órgãos linfóides periféricos, estas células são ativadas por APCs via ligação do TCR, coestimulação e citocinas que funcionam como fatores de crescimento. Esse conjunto de sinais é importante para indução da expansão clonal e reprogramação metabólica celular, as quais passam a realizar maiores taxas de glicólise e também de OXPHOS. Após o processo de ativação, o metabolismo glicolítico é priorizado para diferenciação de células T efetoras (Th1, Th2 e Th17), enquanto que OXPHOS/FAO direciona a diferenciação de células T reguladoras (Treg). Adaptado de Buck, O'Sullivan & Pearce (2015).

1.2.2 Diferenciação

Após ativação, os linfócitos T CD4⁺ podem adquirir diferentes fenótipos efetores (Tef) de acordo com o *milieu* de citocinas do microambiente. Por exemplo, a presença de IL-12 pode auxiliar a polarização destas células para o fenótipo Th1, que estão envolvidas na erradicação de patógenos intracelulares; a IL-4 condiciona a célula a um perfil Th2, que desempenha importante função em quadros alérgicos e infecção por helmintos; além disso, IL-6 e TGF- β promove diferenciação de células Th17, as quais atuam contra infecções fúngicas e por bactérias extracelulares, bem como

medeiam autoimunidade (ZHOU; CHONG; LITTMAN, 2009). Contrariamente, a combinação de fraca interação TCR:MHC-peptídeo mais a presença de TGF- β e IL-2, podem gerar células com características supressora, denominadas de células T reguladoras (Treg). Além da sinalização evocada por estas citocinas, diversas vias metabólicas podem influenciar na aquisição das características funcionais dessas células durante a diferenciação (**Figura 1**) (ALMEIDA et al., 2016).

Nesse sentido, tem sido amplamente demonstrado que a via PI3K/akt-mTOR favorece a geração de células Tefs em detrimento de Tregs. Isso corrobora com a ideia de que estas células priorizam a via glicolítica para aumentar a biossíntese de moléculas importantes para suas funções efetoras, enquanto que Tregs parecem depender da OXPHOS/FAO para suprir suas necessidades bioenergéticas e funcionais (DELGOFFE et al., 2011; FRAUWIRTH KA, RILEY JL, HARRIS MH, PARRY RV, RATHMELL JC, 2002). Células Th17 são altamente dependentes da glicólise para sua geração e manutenção. Assim, HIF-1 α , que atua como molécula *downstream* da sinalização via mTOR, é importante para diferenciação Th17, uma vez que além de aumentar a taxa glicolítica da célula, induz a expressão de ROR γ t, principal fator de transcrição para o comprometimento com o perfil Th17. Concomitantemente, HIF-1 α medeia a degradação de FoxP3, fator de transcrição de Tregs (DANG et al., 2011; IKEJIRI et al., 2012; SHI et al., 2011). Desta forma, a reprogramação metabólica é capaz de modular o desenvolvimento e controle das respostas imunes mediada por linfócitos T.

Entretanto, existem várias moléculas envolvidas nestas vias metabólicas que, embora tenham grande potencial em regular o desenvolvimento e função destas células, ainda não foram exploradas quanto ao seu papel neste processo. Por exemplo, a enzima glicolítica piruvato quinase M2 (PKM2) foi inicialmente descrita por dar suporte à proliferação de células tumorais, e mais recentemente, observou-se que ela pode estar envolvida na regulação da resposta inflamatória mediada por células do sistema imunológico (ALVES-FILHO; PÅLSSON-MCDERMOTT, 2016).

1.3 Aspectos gerais da Piruvato Quinase M2

A piruvato quinase (PK) é uma enzima que regula a etapa final da via glicolítica, catalisando a transferência de fosfato a partir do fosfoenolpiruvato (PEP) para molécula de ADP, o que culmina na geração de piruvato e ATP (NELSON; COX,

2013). Existem quatro isoformas da PK em mamíferos (L, R, M1 e M2), as quais podem estar presentes em diferentes tipos celulares. As isoformas L e R são codificadas pelo gene *pklr* e possuem distribuição no fígado e eritrócitos, respectivamente, enquanto que as isoformas de PK M1 e M2 são derivadas de um *splicing* alternativo do pré-mRNA do gene *Pkm*. Neste caso, a transcrição do éxon 9 ou éxon 10 do *Pkm* dará origem às respectivas proteínas PKM1 ou PKM2 (NOGUCHI et al., 1987; NOGUCHI; INOUE; TANAKA, 1986). O fator de transcrição c-Myc tem um papel na regulação desse *splicing* por aumentar a expressão de ribonucleoproteínas (hnRNPs), as quais se ligam no éxon 9, impedindo a expressão de PKM1 e favorecendo a transcrição do éxon 10 no transcrito final, com subsequente aumento na expressão de PKM2 (DAVID et al., 2010).

Estruturalmente, a PK é composta por monômeros que apresentam três domínios (A, B e C) e um pequeno domínio N terminal. O *splicing* alternativo do gene *pkm* codifica cadeias de 56 aminoácidos, sendo que a diferença em 22 posições entre as isoformas PKM1 e PKM2 conferem a esta última a formação do domínio C, por meio do qual ocorre a regulação alostérica pela frutose-1,6-bifosfato (FBP), um intermediário da glicólise (DOMBRAUCKAS; SANTARSIERO; MESECAR, 2005; NOGUCHI; INOUE; TANAKA, 1986).

A expressão de PKM1 é característica de tecidos de grande demanda bioenergética, como o músculo esquelético, além disso, tal isoforma possui maior afinidade para o seu substrato PEP e não é regulada alostericamente, além de não ser submetida a modificações pós-traducionais, como a fosforilação. Por outro lado, a PKM2 é altamente expressa em células embrionárias, células tumorais e células do sistema imunológico em proliferação (IMAMURA; TANAKA, 1972; NETZKER et al., 1992). Estudos com células tumorais humanas mostram que o *switching* da expressão da PKM2 para PKM1 leva a uma redução da produção de lactato e aumento do metabolismo oxidativo, indicando que tal isoforma é importante para a glicólise aeróbica (CHRISTOFK et al., 2008).

Diferente da PKM1, que constitutivamente apresenta-se na forma de tetrâmero ativo e estável, a PKM2 pode além de tetrâmero, se apresentar na forma dimérica, que é menos ativa e com baixa atividade catalítica. Nesse sentido, a FBP promove a manutenção da conformação tetramérica da PKM2, e na sua ausência a atividade catalítica desta enzima na via glicolítica é amplamente reduzida. Além da FBP, a PKM2 pode ser alostericamente ativada por serina e SAICAR, um intermediário da

síntese de purinas (**Figura 2**) (ANASTASIOU et al., 2012; ASHIZAWA et al., 1991).

Embora a dimerização da PKM2 leve ao comprometimento de sua função catalítica na via glicolítica, esta modificação promove o acúmulo e redirecionamento de carbonos derivados dos intermediários glicolíticos para biossíntese de moléculas importantes para proliferação celular (ISRAELSEN; VANDER HEIDEN, 2015; LUO; SEMENZA, 2012). Nesse sentido, tem-se demonstrado que modificações pós-traducionais na PKM2 desencadeadas por estímulos mitogênicos e oncogênicos são capazes de induzir uma mudança conformacional da PKM2 tetramérica para dimérica (**Figura 2**). Por exemplo, a acetilação do resíduo K⁴³³ da PKM2 pela acetiltransferase p300, bem como a oxidação de C³⁵⁸ por ROS causam desestabilização da sua conformação tetramérica (ANASTASIOU, 2011; LV et al., 2013). A sinalização *downstream* à ativação de FGFR1 (*Fibroblast growth factor receptor type 1*) leva à fosforilação da PKM2 no resíduo Y¹⁰⁵, previne sua regulação por FBP e promove sua dimerização (HITOSUGI et al., 2009). Similarmente, ativação de EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) gera uma cascata de sinalização que culmina na fosforilação da S³⁷ na PKM2 (YANG et al., 2012a).

Figura 2. Modulação da atividade catalítica de PKM2. O esquema mostra ativadores e inibidores endógenos que regulam a atividade de PKM2, a qual é enzimaticamente ativa apenas na forma tetramérica. A regulação alostérica é alcançada a partir da estabilização ou desestabilização do tetrâmero. O intermediário da glicólise FBP (frutose-1,6-bisfosfato), serina e SAICAR são capazes de ativar PKM2 mantendo-a em uma conformação tetramérica. A atividade de PKM2 pode ser inibida quando fosforilação de resíduo tirosina promove a liberação de FBP da PKM2, causando sua dimerização. Outras modificações pós-traducionais como acetilação e oxidação podem inibir a atividade catalítica de PKM2. Adaptado de Dayton, Jacks & Heiden (2016).

A dimerização da PKM2 facilita sua translocação para o núcleo, onde passa a exercer funções não-glicolíticas (**Figura 3**). Tem sido demonstrado que PKM2 no núcleo é capaz de interagir com HIF-1 por um processo que requer atividade de PHD3 (*prolyl hydroxylase 3*), a qual se liga e hidroxila PKM2. Logo, a PKM2 recruta p300 e promove transativação de genes alvos do HIF-1, inclusive de *Pkm2*, o que gera um *loop* de retroalimentação positiva entre PKM2 e HIF-1 (LUO et al., 2011). Além disso, PKM2 parece interagir com o resíduo fosforilado Y³³³ da β -catenin, e auxiliar a transcrição de genes associados com proliferação, ciclo celular, inflamação etc. Nesse contexto, PKM2 associada à β -catenina, pode ligar-se e fosforilar histonas H3 (Thr¹¹) nas regiões promotoras dos genes alvos (*Ccnd1* e *Myc*), removendo deacetilases e permitindo acetilação das histonas (resíduo K⁹). Concomitantemente, c-Myc promove aumento do balaço PKM2/PKM1 por regular o *splicing* alternativo do gene *Pkm* (YANG et al., 2011, 2012b).

Adicionalmente, a PKM2 dimérica pode atuar como proteína quinase e fosforilar diretamente o fator de transcrição STAT3, o qual pode ser ativado por citocinas inflamatórias como a IL-6. Para sua função quinase, a PKM2 utiliza o PEP como doador de fosfato e fosforila o resíduo Y⁷⁰⁵ do STAT3, aumentando sua atividade transcricional (GAO et al., 2012).

Figura 3. Funções não-glicolíticas da PKM2 no núcleo. Modificações pós-traducionais na PKM2 facilita sua dimerização. PKM2 hidroxilada pela PHD3 interage com HIF-1 e p300, auxiliando a ligação de HIF-1 em regiões promotoras de seus genes alvo. PKM2 pode também atuar como proteína quinase, a qual é capaz de fosforilar STAT3 e aumentar sua atividade transcricional. Ativação de EGFR, por exemplo, pode levar a translocação de PKM2 para o núcleo e ligar-se a β -catenina, as quais juntas forma um complexo para promover a expressão de genes do c-Myc e ciclina D1. Adaptado de Tamada, Suematsu & Saya (2012).

Notavelmente, a mudança conformacional da PKM2 contribui para expressão de diversos genes que suportam a proliferação mediada pela glicólise aeróbica, mas também de genes que estão envolvidos com a resposta inflamatória. Embora a maioria dos estudos com PKM2 sejam relacionados a células tumorais, é esperado que as atividades transcricional e quinase desta molécula também modulem a diferenciação de células do sistema imunológico, e, portanto, refletir na função efetora destas células.

1.4 PKM2 e regulação da resposta imune

A piruvato quinase M2 é conhecida por regular a glicólise aeróbica em células tumorais, e mais recentemente, observou-se que esta molécula também é um potencial alvo para se entender como o metabolismo celular pode afetar o desenvolvimento e função de células envolvidas no processo inflamatório. Entretanto, poucos trabalhos têm demonstrado essa associação.

Nesse contexto, Yang e colaboradores (2014) têm demonstrado um papel da PKM2 na regulação da resposta imune inata via efeito de Warburg. PKM2 foi capaz de interagir e ativar HIF-1 α , e a subsequente transcrição de genes necessários para reprogramação metabólica durante ativação de macrófagos. Por meio da inibição farmacológica, silenciamento e deleção gênica de PKM2 em macrófagos, foi observado que o estabelecimento do perfil inflamatório (M1), bem como a liberação de HMGB1 (*High-mobility group box 1*), uma molécula associada ao dano que medeia resposta imune inata, pode ser mediada pela PKM2. Além disso, estas estratégias conferiram maior proteção à camundongos submetidos à endotoxemia por LPS (lipopolissacarídeo) e modelo de sepse letal (CLP; *Cecal Ligation Puncture*) (YANG et al., 2014b).

O mesmo grupo demonstrou ainda que PKM2 é capaz de ativar os inflamassomas NLRP3 e AIM2, sensores da imunidade inata. Esses complexos

funcionam como plataformas para ativação de caspase-1 ou -11 e secreção de citocinas inflamatórias (ex. IL-1 β e IL-18), as quais são amplamente produzidas por macrófagos durante a sepse. Portanto, demonstrou-se que a inibição ou deficiência de PKM2 nestas células promoveu maior resistência de camundongos à sepse de forma comparável a animais *knockout* para ambos os inflamassomas, sendo esta proteção associada com redução dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (XIE et al., 2016).

A participação da PKM2 também foi evidenciada em macrófagos isolados de pacientes com doença arterial coronariana (CAD). A aterosclerose formada pela deposição de colesterol é considerada uma síndrome inflamatória crônica, caracterizada pela migração de monócitos para o espaço subendotelial. Tais células se diferenciam em macrófagos com fenótipo pró-inflamatório M1, os quais produzem citocinas, fatores de crescimento, ROS e enzimas, além de facilitar necrose (SHIRAI et al., 2016; STÖGER et al., 2012). Relatou-se que o alto consumo de glicose pelos macrófagos promoveu geração de altas taxas de ROS, causando a oxidação e dimerização da PKM2. Logo, a PKM2 dimérica foi capaz de migrar para o núcleo, no qual atuando com proteína quinase foi capaz de fosforilar STAT3 no resíduo Y⁷⁰⁵. O aumento da atividade transcricional de STAT3 em macrófagos potencializa a produção de citocinas inflamatórias IL-6 e IL-1 β , envolvidas na patogênese da aterosclerose. Utilizando um ativador que força a tetramerização da PKM2, impedindo sua translocação para o núcleo, reduziu consideravelmente os níveis de citocinas inflamatórias produzidos por estes macrófagos, corroborando com a ideia de que PKM2 é importante para a função efetora destas células (SHIRAI et al., 2016).

Logo, os dados acima sugerem um papel regulador da PKM2 na função de macrófagos M1, células da imunidade inata. Os linfócitos Th17, células inflamatórias inerentes à imunidade adaptativa, também promovem altas taxas de glicólise durante ativação e diferenciação (BINGER; CÔRTE-REAL; KLEINWIETFIELD, 2017; GANESHAN; CHAWLA, 2014). Entretanto, o papel regulador da PKM2 na diferenciação e resposta efetora destas células permanece obscuro.

1.5 Imunopatogênese da Esclerose Múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune crônica do sistema nervoso central (SNC) caracterizada por inflamação, desmielinização e neurodegeneração e

resulta na incapacidade progressiva para a maioria dos indivíduos afetados (RANSOHOFF; HAFLER; LUCCHINETTI, 2015). Metade dos pacientes necessitam de auxílio à mobilidade dentro de 20 anos após o diagnóstico e, eventualmente desenvolvem fadiga, distúrbios motores, sensoriais, visuais, bem como déficit cognitivo (TRAPP; NAVE, 2008). Segundo o MSIF (*Multiple Sclerosis International Federation*), de 2008 a 2013 houve um aumento de 10% no número de indivíduos portadores da doença, totalizando cerca de 2.3 milhões de pessoas afetadas no mundo. A doença geralmente surge em indivíduos entre 20 e 40 anos de idade, principalmente do sexo feminino, e apresenta um elevado custo aos sistemas de saúde (ASCHERIO; MUNGER; LÜNEMANN, 2012; MARIK et al., 2007).

A EM pode ser dividida em quatro diferentes subtipos de acordo com a manifestação clínica: I) remitente-recorrente (EM-RR); II) progressivo-primária (EM-PP); III) progressivo-secundária (EM-SP); IV) progressivo-recorrente (EM-PR). A EM-RR é frequente em 85% dos afetados, os quais apresentam episódios aleatórios e recorrentes acompanhados de déficits neurológicos, como perda de visão e paralisia, seguido por um período de remissão, mas que depois de anos podem evoluir naturalmente para forma EM-SP, caracterizada por pouca melhora após os ataques e declínio neurológico contínuo e irreversível. A EM-PP compreende cerca de 10-15% dos casos e geralmente os sintomas neurológicos iniciam um pouco mais tarde na vida dos pacientes, os quais não apresentam episódios de recorrência e/ou remissão, mas sim progressão da doença. A EM-PR é a forma mais rara da doença (~5% dos casos), e apresenta-se de forma similar à EM-PP com piora crônica dos déficits neurológicos, entretanto é possível observar raros episódios de recorrência (AKTAS; KIESEIER; HARTUNG, 2010; TRAPP; NAVE, 2008).

A etiologia da EM permanece pouco compreendida, mas muitas evidências sugerem que esteja relacionada à fatores genéticos e ambientais. Nesse sentido, variação alélica do haplótipo HLA-DR2 (*Human Leucocyte Antigen DR2*), principalmente o alelo HLADRB1*1501, tem sido observada em pacientes com MS, sendo associada à expressão de moléculas HLA de classe II que podem facilmente associar-se à peptídeos próprios. Os fatores ambientais que favorecem a EM incluem, baixos níveis de vitamina D, fumo e infecção pelo vírus Epstein-Barr, principalmente em caso de manifestação de mononucleose (O'GORMAN; LUCAS; TAYLOR, 2012; SOSPEDRA et al., 2006).

Embora de origem desconhecida, a EM é uma doença imuno-mediada, caracterizada por autoimunidade. Nos estágios iniciais da doença, células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas CD11c⁺ (DCs) apresentam autoantígenos (TCR $\leftrightarrow$ MHC-peptídeo) derivados da mielina à células T *naïve* autoreativas que escaparam do processo de seleção negativa do timo, sendo então primadas nos órgãos linfóides periféricos (CHASTAIN et al., 2011; HEMMER; SELTER, 2013). As células T autoreativas ativadas, juntamente com células da imunidade inata recrutadas, migram para o parênquima do Sistema Nervoso Central (SNC) a partir de vasos meníngeos, atravessando a Barreira Hemato-Encefálica (BHE) ou através do plexo coróide, por onde estas células atingem o líquido cerebrospinal (CSF) (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015).

Os linfócitos T no SNC são então reativados por APCs residentes, como macrófagos, DCs e linfócitos B e induzem a produção secundária de metaloproteinases que facilitam o rompimento da BHE, além de uma miríade de citocinas e quimiocinas que promovem recrutamento de monócitos inflamatórios e neutrófilos para o local (LEGROUX; ARBOUR, 2015; WU; ALVAREZ, 2011). Células residentes ativadas, como micróglia e astrócitos juntamente com células do infiltrado (DCs, macrófagos, linfócitos B etc.) promovem desmielinização, lesões neuro-axonais e danos em oligodendrócitos (ODC) por meio da produção de ROS, mediadores solúveis (complemento e citocinas) e auto-anticorpos ou por contato célula-célula (FRIESE; SCHATTLING; FUGGER, 2014). Logo, essa cascata de componentes inflamatórios no SNC acarreta na interrupção da sinalização neuronal, refletindo no surgimento de déficits neurológicos característicos da esclerose múltipla.

1.6 Linfócitos Th17 na Esclerose Múltipla

Os linfócitos T CD4⁺ estão implicados tanto na gênese da EM, como em sua progressão. Por algum tempo os linfócitos Th1 foram considerados as principais células patogênicas no modelo animal de esclerose múltipla, a Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), uma vez que era possível encontrar células T secretoras de IFN- γ no SNC (ANDO et al., 1989).

A IL-12 é um heterodímero composto pelas subunidades p40 e p35, sendo importante citocina para polarização de linfócitos Th1 (ZHOU; CHONG; LITTMAN, 2009). Nesse sentido, estudos prévios demonstraram que a deficiência de IL-12p40

em camundongos gerava resistência ao desenvolvimento da EAE (BECHER; DURELL; NOELLE, 2002; SEGAL; DWYER; SHEVACH, 1998). Entretanto, observou-se posteriormente que animais IL12p35^{-/-} eram suscetíveis a EAE (GRAN et al., 2002). Mais tarde, descobriu-se que subunidade IL-12p40 é compartilhada com outras proteínas da família IL-12, incluindo a citocina IL-23, que é formada pelas subunidades IL12p40 e IL23p19. Hoje, sabe-se que esta citocina é importante para a manutenção do fenótipo Th17, bem como sua patogenicidade (LANGRISH et al., 2005; OPPMANN et al., 2000). Neste sentido, notou-se que a deficiência da subunidade IL-23p19 em camundongos induzidos com EAE foi suficiente para prevenir o desenvolvimento da doença (CUA et al., 2003). Portanto, atualmente os linfócitos Th17 são considerados importantes células iniciadoras da resposta auto-reativa na EAE.

Além da EM/EAE, a subpopulação Th17 tem sido associada à patogênese de diversas doenças autoimunes por produzir IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 e TNF- α (YANG et al., 2014a). Neste sentido, observou-se que o desenvolvimento da EAE foi suprimida em animais IL-17^{-/-}, denotando uma importância desta citocina em um contexto de autoimunidade (KOMIYAMA et al., 2006). Em pacientes acometidos pela EM, observaram-se níveis aumentados de IL-17 no fluído cerebrospinal (CSF) e em lesões ativas (espécime de tecido cerebral), os quais foram associados a uma maior frequência de linfócitos Th17 no SNC (BABALOO et al., 2015; TZARTOS et al., 2008). Adicionalmente, notou-se um aumento de células CD4⁺IL-17⁺ circulantes em pacientes com EM ativa (DURELLI et al., 2009).

A diferenciação de linfócitos Th17 requer uma interação cooperativa das vias de sinalização mediada pelas citocinas IL-6 e TGF- β , o que leva a ativação sustentada de STAT3 e subsequente expressão do principal fator de transcrição dessa linhagem celular, o ROR γ t, mas também de ROR α (BETTELLI et al., 2006; HIRAHARA et al., 2010; MANGAN et al., 2006; VELDHOFEN et al., 2006). Juntamente com STAT3, esses fatores de transcrição são capazes de ligar-se à região promotora de *Il17*, levando a expressão de diversos genes inflamatórios associados ao fenótipo da linhagem Th17 (DURANT et al., 2010; IVANOV et al., 2006; YANG et al., 2008).

Durante a diferenciação de Th17, o receptor para IL-23 (IL-23R) passa a ser amplamente expresso na membrana plasmática, sendo a sinalização *downstream* à interação IL23/IL-23R importante para manutenção e expansão destas células (GAFFEN et al., 2014; KORN et al., 2009). Além disso, tem sido demonstrado que a

IL-23 induz a aquisição de um perfil patogênico nos linfócitos Th17, principalmente por promover a expressão de citocinas adicionais como o GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating fator*). Neste caso, o GM-CSF tem um papel no desenvolvimento, ativação e migração de células mielóides produtoras de IL-23, IL-6 e outros mediadores inflamatórios para o SNC durante a fase inicial da doença. Esse processo sustenta um *loop* de retroalimentação positiva que mantém o perfil patogênico de linfócitos Th17 na EAE (CROXFORD et al., 2015; EL-BEHI et al., 2011; HIROTA et al., 2011; SONDEREGGER et al., 2008).

Embora o exato papel dos diferentes fatores que contribuem para a patogênese da EM/EAE ainda não esteja totalmente compreendido, é notável que os linfócitos Th17 são importantes células que medeiam o desenvolvimento e progressão da neuroinflamação autoimune observada nesta patologia.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o envolvimento da Piruvato Quinase M2 (PKM2) na diferenciação de linfócitos Th17 e na patogênese da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE).

2.2 Objetivos específicos

- I. Analisar o perfil de expressão da PKM2 em linfócitos Th17 diferenciados *in vitro*;
- II. Determinar a importância da PKM2 para a geração de células Th17 por meio da inibição farmacológica ou deleção gênica de PKM2 *in vitro*;
- III. Analisar a expressão de PKM2 durante a EAE;
- IV. Determinar a importância da expressão de PKM2 em linfócitos T na patogênese da EAE por meio do uso de animais *knockout* condicionais;
- V. Determinar o efeito da inibição farmacológica da PKM2 na progressão da EAE.

3. Material e métodos

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos selvagens da linhagem C57BL/6 (WT; *Wild-Type*) provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo – *Campus* Ribeirão Preto (USP/RP). Animais *knockout* condicionais $CD4^{Cre}Pkm2^{flox/flox}$ também foram utilizados. O sistema Cre-LoxP possibilita a deleção do gene alvo em grupo específico de células por meio da inserção de sítios loxP flanqueando o gene (ou segmento), que são reconhecidos e clivados pela recombinase Cre. Nesse sentido, os animais $CD4^{Cre}Pkm2^{flox/flox}$ foram gerados por meio do cruzamento entre camundongos $Pkm2^{flox/flox}$ (sítios LoxP flanqueiam éxon 10) e $CD4^{Cre}$ (apenas células T expressam a recombinase Cre), ambos obtidos da The Jackson Laboratory. *Littermates* com os genótipos $CD4^{Cre}$ ou $Pkm2^{flox/flox}$ foram utilizados como controle, sendo estes considerados WT. A criação dos animais foi conduzida no biotério do Departamento de Clínica Médica (USP/RP). Os animais para experimentação foram acondicionados no biotério do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, com temperatura ambiente 23-25°C, ciclo claro-escuro de 12 horas e acesso livre à comida e água. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com o protocolo nº 098/2016.

3.2 Ferramenta farmacológica

Shikonin (*Sigma-Aldrich*), um inibidor da PKM2, foi utilizado em experimentos *in vitro* e *in vivo* (CHEN et al., 2011). *In vitro*, shikonin foi adicionado às culturas de linfócitos T nas concentrações de 0.3, 1 e 3 μ M. *In vivo*, animais submetidos à EAE foram tratados diariamente com shikonin na dose de 4 mg.kg⁻¹ (s.c.) a partir do 5º dia após imunização até o pico da doença.

3.3 Cultura de linfócitos T CD4

Para obtenção de células T *naïve* $CD4^{+}CD25^{-}$, o baço e linfonodos dos animais C57BL/6, $CD4^{Cre}Pkm2^{flox/flox}$ ou controle ($CD4^{Cre}$) foram removidos e processados em *cell strainer* (100 μ m) em RPMI 1640 incompleto (RPMI-I). As células obtidas foram posteriormente centrifugadas (450g, 8 min, 4°C) e ressuspensas em RPMI 1640

completo (RPMI-C; 10% de soro bovino fetal, 200 mM de L-glutamina, 10.000 unidades de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina e 55 μ M de β -mercaptoetanol). Foram então colocadas em garrafa de cultura, e deixadas na estufa (37°C, 5% CO₂ e 8% de umidade) por 30 minutos, para descartar células aderentes (ex. macrófagos e células dendríticas). As células em suspensão foram coletadas e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Foram em seguida incubadas com o *kit* para separação de linfócitos T CD4⁺ por 10 minutos (CD4⁺ T Cell Isolation Kit - *Miltenyi Biotec*), o qual é composto por um *cocktail* de anticorpos conjugados à biotina para marcadores de diversos fenótipos celulares, mas não para CD4⁺. Em seguida, as células foram incubadas com *MicroBeads* magnéticas anti-biotina por mais 10 minutos. Foram então centrifugadas, ressuspendidas em 500 μ L de PBS 1x e separadas negativamente pelo aparelho (AutoMacs pro Separator - *Miltenyi Biotec*). As células T CD4⁺ foram coletadas, centrifugadas, marcadas com anti-CD25 (α CD25-PE – *BD Bioscience*) e incubadas por 10 minutos. Em seguida, foram centrifugadas e incubadas sob as mesmas condições, com *MicroBeads* Anti-PE (*Miltenyi Biotec*), e selecionadas positivamente por meio do AutoMacs. Logo, células que expressam CD4 mas não CD25 (*naïve*) foram coletadas. Alíquotas das amostras foram coletadas para avaliar a pureza de separação das células CD4⁺CD25⁻ por citometria de fluxo, sendo que em todos os experimentos a pureza foi $\geq 90\%$. As células foram deixadas em cultura em RPMI-C na presença de estímulos de proliferação (anti-CD3 e anti-CD28, *BD Biosciences*; 1 μ g/mL) durante 96 horas (37°C, 5% CO₂), em condições polarizantes para linfócitos Th17: 2,5 ng/mL de TGF- β e 20 ng/mL de IL-6 com ou sem 20 ng/mL de IL-23; ou Treg: 3 ng/mL de TGF- β . Em ensaios com inibição farmacológica de PKM2, shikonin foi adicionado à cultura de células nas concentrações já mencionadas.

3.4 Marcação de superfície ou intracelular para citometria de fluxo

Células polarizadas *in vitro*, ou células isoladas de animais submetidos à EAE foram estimulados com 12-myristato-13-acetato (PMA- 50 ng/mL – *Sigma Aldrich*), ionomicina (500 ng/mL – *Sigma Aldrich*) e inibidor de transporte proteico (GolgiStop™ Monensin 1,5 μ L/mL – *BD Biosciences*) por 4 horas sob as condições de 37° C e 5% CO₂ em RPMI-C. A marcação extracelular foi realizada com anti-CD4 (1:200; *BD Biosciences*) e com marcador de viabilidade celular (1:3000; Dye fixable viability – *eBioscience*), por 10 minutos. As células foram centrifugadas (450G, 8 min, 4° C) e

fixadas utilizando Cytofix/Cytoperm (*BD Biosciences*) por 10 minutos, seguido de centrifugação. Estas foram então permeabilizadas com Perm/Wash buffer (*BD Biosciences*) e marcadas com anticorpos monoclonais IL-17A (1:200) ou IFN- γ (1:200) por 15 minutos. Para Tregs, utilizou-se kit de permeabilização específico (*Transcription Factor Staining Buffer Set; eBioscience*), seguido de marcação com anti-FoxP3 (1:200), sem prévia estimulação. Todas as incubações foram realizadas em temperatura ambiente. As células foram centrifugadas, ressuspensas em PBS 1x e adquiridas no citômetro de fluxo (FACSVerse™ – *BD Biosciences*). A análise dos dados foi realizada usando o software FlowJo® X. Para ensaio de proliferação, linfócitos T CD4⁺CD25⁻ foram isolados e marcados com *Cell Proliferation Dye eFluor 670* (5 μ M), e em seguida ressuspensas em meio RPMI-C com estímulo policlinal (anti-CD3/anti-CD28) na presença ou ausência de IL-2. Após 4 dias, estas células foram adquiridas no citômetro de fluxo e a proliferação celular avaliada a partir do decaimento da fluorescência do *proliferation dye*.

3.5 Indução da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)

EAE foi induzida em camundongos machos com 10 semanas de idade. Os animais foram imunizados por via subcutânea (s.c.) com emulsão contendo 300 μ g do antígeno peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (glicoproteína da mielina de oligodendrócitos) em CFA (adjuvante completo de Freund; *Sigma-Aldrich*) suplementado com 5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA, *Difco*) em ambos os lados dos flancos traseiros. Adicionalmente, cada animal recebeu 200 ng de toxina *pertussis* (PTx; *Sigma-Aldrich*) em 200 μ L de solução salina por via intraperitoneal (i.p.) nos dias 0 e 2 após imunização. Os animais foram imunizados sob anestesia com isoflurano (2%). Os sinais clínicos da EAE foram monitorados diariamente como descrito previamente com modificações (STROMNES; GOVERMAN, 2006), seguindo os parâmetros: 0 = sem sinais clínicos; 0.5 = cauda parcialmente flácida; 1.0 = cauda flácida; 1.5 = perda da coordenação motora; 2 = paresia (fraqueza) dos membros posteriores; 2.5 = paralisia parcial dos membros posteriores; 3.0 = paralisia total dos membros posteriores; 3.5 = paralisia total dos membros posteriores e fraqueza de membros anteriores; 4.0 = para paralisia unilateral de membros anteriores; 4.5 = paralisia total de membros anteriores; e 5.0 = moribundo.

3.6 Resposta antígeno-específica por reestimulação com MOG₃₅₋₅₅ *in vitro*

Animais foram imunizados conforme descrito anteriormente. Células do baço e linfonodos drenantes foram isoladas e reestimuladas *in vitro* (3×10^5 células/poço) com MOG₃₅₋₅₅ (50 µg/mL) em RPMI-C por 96h (37° C; 5% CO₂). Em seguida, o sobrenadante foi coletado para quantificação dos níveis de IL-17A, GM-CSF e IFN-γ por ELISA.

3.7 Mensuração de citocinas por ELISA

Os níveis de IL-17A, IL-22, GM-CSF e IFN-γ murinos em sobrenadante de culturas de linfócitos T CD4⁺ foram determinados por meio do método imunoenzimático (ELISA; *enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando *kits* DuoSet ELISA Development Systems (R&D Systems) de acordo com as recomendações do fabricante. Placas de microtitulação com 96 poços foram recobertas com 50 µL/poço dos anticorpos específicos (*capture*), anti-IL-17A, anti-IL-22, anti-GM-CSF e anti-IFN-γ, os quais foram diluídos em PBS e incubados *overnight* a 4° C. As placas foram lavadas com PBS/T (PBS + 0,05% de Tween-20), seguido de bloqueio com 100 µL de PBS contendo BSA 1% (2h; T.A.). Após lavagem com PBS/T, tanto as amostras de interesse como as recombinantes da curva-padrão de IL-17A (4000 pg/mL), GM-CSF (4000 pg/mL) ou IFN-γ (4000 pg/mL) foram adicionadas à placa e incubadas (2h; T.A.). Após esse período, as placas foram lavadas e adicionou-se 50 µL de anticorpo biotinilado específico (*detection*) para cada citocina por 2 horas. As placas foram lavadas e o conjugado estreptavidina-peroxidase (1 : 40) foi adicionado a cada poço e incubado por 1 hora (T.A.). Posteriormente, as placas foram lavadas e 100µL do substrato TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) foi adicionado. A densidade ótica foi medida a 630 nm no espectrofotômetro SpectraMAX 190 Microplate Reader (*Molecular Devices*) e os dados foram analisados usando o software SoftMax Pro 5. A concentração de citocinas contidas nas amostras foi calculada a partir da curva-padrão com 11 pontos obtidos por diluição seriada. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.8 Western blotting

Células T CD4⁺ foram coletadas e resuspendidas em solução RIPA Buffer[®] com *cocktail* de inibidor de protease e fosfatase (*Thermo scientific*). Para coleta da medula espinal, os animais foram perfundidos com PBS 1x e o tecido armazenado em RIPA Buffer[®] com inibidor de protease e fosfatase e posteriormente processados com homogenizador (Polytron[®]). Alíquotas das amostras foram coletadas para dosagem de proteínas pelo método de BCA (*Bicinchoninic Acid Protein Assay; Sigma Aldrich*). Amostras contendo 20 µg de proteína foram incubados com tampão de amostras (2x Laemmli Sample Buffer; *Bio-Rad*) na proporção de 1:1, a 95°C durante 10 min, para desnaturação. Posteriormente, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida de 10% na presença de SDS (SDS-PAGE) para separação por eletroforese (Mini-Protean II Electrophoresis Cell, *Bio-Rad*). As proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose 0.2 µm (*Amersham Pharmacia Biotech*), utilizando o sistema de transferência Trans Blot Turbo (*Bio-Rad*). Após transferência, as membranas foram lavadas em água deionizada e o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado pela incubação das membranas com TBST (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween20 0,05%) com 5% de leite em pó desnatado ou BSA por 1 h. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBST e incubadas com anticorpos primários pPKM2, PKM2 ou PKM1 (1:1000; *Cell Signalling*) *overnight* a 4°C, sob leve agitação. Anticorpos secundários anti-rabbit ou anti-mouse (1:5000; *Cell Signaling*) conjugados a HRP foram adicionados e incubados por 1h à temperatura ambiente sob lenta agitação. Logo, as membranas foram novamente lavadas com TBST por 30 minutos. Para revelar as membranas, foi utilizado substrato Luminata (*Millipore*) para a detecção por quimiluminescência utilizando o equipamento ChemiDocTM XRS com o software ImageLab 3.0 (*Bio-Rad*). β-actina foi utilizada como controle endógeno.

3.9 Isolamento de leucócitos infiltrantes do SNC

Animais foram perfundidos com PBS 1x para coleta do tecido do SNC. O tecido de cada animal foi então colocado em tubo com solução de digestão contendo collagenase tipo II (1 mg/mL; *Millipore*) e DNase I (15 µg; *Sigma-Aldrich*) por 30-40 minutos, 37°C, sob agitação (300rpm). Após digestão, as amostras foram

homogeneizadas e transferidas para tubos *falcon* contendo 5 mL de PBS 1x, e então centrifugados (280G, 5 min, T.A.). Para isolamento de células mononucleares foram utilizados diferentes gradientes de *percoll* (G&E Healthcare). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspensionado em solução *percoll* 70% (em PBS 1x), seguido dos gradientes 37% (em meio Hanks) e 30% (em PBS 1x). Os tubos foram centrifugados à 500 G por 30 minutos, T.A., aceleração = 1 e desaceleração = 0. O anel formado por células mononucleares foi coletado e centrifugado (280G, 5 min, T.A.). Células mononucleares obtidas pelo gradiente de *percoll* foram ressuspensionadas em PBS 1x e incubadas com *kit* de seleção positiva por *beads* magnéticas contra CD4 (L3T4-MicroBeads; *Miltenyi Biotec*), de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram então levadas ao aparelho AutoMacs para isolamento de células T CD4⁺. A pureza da seleção foi analisada por citometria de fluxo. As células T CD4⁺ obtidas foram utilizadas para ensaio de RT-qPCR.

3.10 Extração de mRNA e conversão em cDNA

A extração de RNA total da cultura de linfócitos T e de células T CD4⁺ isoladas do SNC foi realizada utilizando *kit* de extração RNeasy Mini Kit 250 (*Qiagen*) de acordo com as instruções de fabricante. Para extração de RNA total de tecido do SNC, as medulas espiniais foram coletadas em tubos contendo 500 µL de TRIzol® reagente (*Invitrogen*TM) e processadas com homogenizador (IKA T 10). Em cada tubo foram adicionados 200 µL de clorofórmio (*Merck*) e 100 µL de água ultra-pura (*Sigma-Aldrich*). As amostras foram agitadas no vórtex e centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (RNA) foi coletada e transferida para outro tubo contendo 500 µL de isopropanol (*Merck*) gelado. As amostras foram agitadas (vórtex) e incubadas *overnight* a -20°C. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante descartado cuidadosamente. O resíduo de RNA foi lavado com 500 µL de álcool etílico 80% e 500 µL álcool etílico absoluto, sucessivamente. Em cada lavagem as amostras foram vortexadas e centrifugadas a 7000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA foi ressuspensionado em água ultra-pura (*Sigma-Aldrich*). Em ambos protocolos, a concentração de RNA foi determinada por meio da densidade ótica (260 nm) utilizando o aparelho NanoDropTM (*ThermoFisher Scientific*). A conversão de mRNA à cDNA foi realizada utilizando o *kit* de transcrição reversa High-

Capacity (*Applied Biosystems*TM). A quantidade de 500 ng de RNA total extraídos a partir de lisado de células T CD4⁺ ou de tecido do SNC foi utilizada para cada reação, as quais foram conduzidas de acordo com as recomendações do fornecedor.

3.11 Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)

A PCR quantitativa em tempo real foi realizada por meio do aparelho stepOne Plus Real-Time PCR System, usando o sistema de fluorescência SYBR-green[®] Master Mix (*Applied Biosystems*TM). Cada PCR em tempo real foi feita com volume final de 10 µL, contendo: 5 µL de SYBR-green[®] + 0,25 µL de primer *forward* (ou *sense*) + 0,25 µL primer *reverse* (ou *anti-sense*) + 3,5 µL de água ultra-pura + 1 µL da amostra de cDNA. As placas contendo as amostras e os reagentes mencionados foram submetidas ao seguinte protocolo de ciclagem: 1 ciclo de 95 °C (10 min) + 40 ciclos de 95°C (15 seg) e 60° C (1 min). A curva de dissociação (curva de *melting*) foi obtidas em três etapas, 15 segundos à 95 °C, 1 minuto à 60 °C e mais 15 segundos à 95 °C, para verificar se apenas um produto foi amplificado. Amostras que tiveram mais de um pico foram excluídas. Os resultados foram analisados através do método comparativo de “cycle threshold” (CT) ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Os níveis de expressão relativa dos genes alvos foram normalizados com base na expressão de *Gapdh* como controle endógeno. A expressão gênica foi baseada na quantidade de vezes que aumentou em relação às células *fresh* ou ao grupo *naïve* (calibradores). Nenhum dos primers utilizados produziu amplificação no branco, ou apresentou mais de um pico na curva de *melting*. Além disso, todos apresentaram eficiência maior que 90%. As sequências dos pares de primers utilizados estão demonstradas na tabela a seguir:

Tabela 1. Sequência dos pares de primers utilizados

GENE	FORWARD (SENSE)	REVERSE (ANTI-SENSE)
<i>Rora</i>	5'-TCTCCCTGCGCTCTCCGCAC-3'	5'-TCCACAGATCTTGCATGGA-3'
<i>Rorc</i>	5'-GAGTTTGCCAAGCGGCTTT-3'	5'-TCCATTGCTCCTGCTTTCAGT-3'
<i>Il23r</i>	5'-GCCAAGAAGACCATTCCTCA-3'	5'-TCAGTGCTACAATCTTCTCAGAGGACA-3'
<i>Il17a</i>	5'-GCTCCAGAAGGCCCTCAG-3'	5'-CTTCCCTCCGCATTGACA-3'
<i>Il21</i>	5'-TCATTGACCTCGTGGCCC-3'	5'-ATCGTACTTCTCCACTTGCAATCC-3'
<i>Il22</i>	5'-CAGCTCCTGTACATCAGCGGT-3'	5'-AGGTCCAGTCCCCAATCGCCT-3'
<i>Csf2</i>	5'-TTTACTTTTCTGGGCATTG-3'	5'-TAGCTGGCTGTCATGTTCAA-3'
<i>Ccr6</i>	5'-ACGCACAGTAAGGTCATC-3'	5'-GTAGGGCTTGAGATGATG-3'
<i>Ifng</i>	5'-TGCATCTTGGCTTTGCAGCTTCTCCTCATGGC-3'	5'-TGGACCTGTGGGTTGTTGACCTCAAACCTGGC-3'
<i>Tbx21</i>	5'-CCACCTGTTGTGGTCCAAGTT-3'	5'-CATTGCGCGTCTTGCTTAG-3'
<i>Glut1</i>	5'-ATGGATCCCAGCAGCAAG-3'	5'-CCAGTGTTATAGCCGAAC-3'
<i>Hk2</i>	5'-TGATCGCCTGCTTATTCACGG-3'	5'-AACCGCCTAGAAATCTCCAGA-3'
<i>Ldha</i>	5'-CATTGTCAAGTACAGTCCACACT-3'	5'-TTCCAATTACTCGGTTTTTGGGA-3'
<i>Hif1a</i>	5'-ACCTTCATCGGAACTCC-3'	5'-CTGTAGGCTGGGAAAAG-3'
<i>Pkm1</i>	5'-GCTGTTTGAAGAGCTTGTGC-3'	5'-TTATAAGAGGCCTCCACGCT-3'
<i>Pkm2</i>	5'-TCGCATGCAGVACCTGATT-3'	5'-CCTCGAATAGCTGCAAGTGGA-3'
<i>Gapdh</i>	5'-CATCTTCTTGTGCAGTGCCA-3'	5'-CGGCCAAATCCGTTTAC-3'

3.12 Imunofluorescência

Os animais foram anestesiados com 2% de isoflurano, e perfundidos com PBS 1x, seguido de paraformaldeído 4% (PFA; pH 7,3-7,4). As medulas espinais foram coletadas e fixadas em paraformaldeído (PFA) à 4%. O material foi acondicionado em uma solução de sacarase 30% em PBS 1x por no mínimo 72h. Em seguida, os tecidos foram alocados em meio para congelamento Tissue-Tek® O.C.T.™ (*Sakura Finetek*), congeladas em gelo seco e estocadas a -70°C. Os cortes (secções) foram confeccionados em criostato (Leica CM1850, Alemanha) com espessura de 20 µm e então estocados PBS 1x (2 mL). As lâminas foram incubadas em metanol P.A (10 min; 20 °C), lavadas 3 vezes por 5 min em PBS 1x e incubadas em uma solução de PBS suplementada com glicina (0,1 M; 30 min). Outra incubação foi realizada utilizando PBS contendo 2% de BSA e 0,2% de Triton X100. Nesta etapa, o anticorpo purificado anti-PKM2 (1:200; *Abcam*) foi adicionado e mantido *overnight* a 4 °C, seguido de lavagem. Posteriormente, o corte foi incubado com anticorpo secundário por 2 horas. Em seguida, o *dye* fluorescente para marcação de mielina FluoroMyelin (*ThermoFisher Scientific*) foi incubado de acordo com as instruções do fabricante. Para imunofluorescência de células, os linfócitos T obtidos a partir das culturas foram coletados, fixados, permeabilizados em lâminas. Posteriormente, os preparados foram incubados com anticorpos primários anti-PKM2 e anti-CD4 (1:200; *Biolegend*), seguidos da adição de anticorpos secundários conjugados à fluoróforo. Por fim, as

lamínulas foram introduzidas nas lâminas juntamente com o meio de montagem *Prolong[®] gold antifade reagent* com DAPI (marcação nuclear). As imagens foram captadas por microscópio confocal *Leica TCS SP5* e analisadas no software *ImageJ*.

3.13 Análise histopatológica

Os animais foram eutanasiados e perfundidos por via intracardíaca com PBS 1x seguido de PFA 4%. Medula espinal foi removida, dissecada e incubada *overnight* em PFA 4%. Em seguida, o tecido do SNC foi embebido em parafina, embocado e então seccionado (5-7 μ m). Posteriormente, os cortes foram preparados em lâminas e corados com Hematoxilina e Eosina (HE; *Sigma-Aldrich*), de acordo com as especificações do fabricante, para análise de infiltrado de células inflamatórias.

3.14 Análise estatística

Foi utilizado análise de variância ANOVA de uma via (*one way*), seguido do teste (*post-hoc*) de Tukey para comparação entre os diferentes grupos. ANOVA de duas vias (*two way*), seguindo do teste de Bonferroni, foi utilizada para avaliação do curso temporal do escore clínico da EAE entre os grupos. Para se comparar dois grupos de variáveis não-pareadas, utilizou-se o teste t de *student*. Os dados foram expressos como Média $\pm$ E.P.M., sendo representativos de 2-3 experimentos independentes. Experimentos *in vivo* foram realizados com n=8 animais por grupo. Diferenças estatísticas foram consideradas quando $P < 0,05$. As análises estatísticas e confecção gráfica foram realizadas através do programa estatístico *GraphPad Prism 7.0*.

4. Resultados

4.1 A expressão da enzima glicolítica Piruvato Quinase M2 (PKM2) é aumentada durante a diferenciação de linfócitos Th17

A capacidade de gerar e manter uma resposta inflamatória autoimune é uma das características dos linfócitos Th17. Após ativação, essa subpopulação celular passa por uma readequação do seu perfil metabólico para dar suporte à aquisição de suas funções efetoras (BARBI, 2013). Esse processo é mediado pela glicólise aeróbica, na qual a PKM2 está envolvida e tem sido vista como um potencial regulador da resposta imune inata (PALSSON-MCDERMOTT et al., 2015; XIE et al., 2016).

Na tentativa de avaliar o papel da PKM2 na regulação da imunidade adaptativa, mais especificamente no desenvolvimento e função de linfócitos Th17, buscou-se inicialmente avaliar o perfil de expressão gênica desta enzima durante o processo de ativação e diferenciação destas células. Neste sentido, notou-se que o estímulo de TCR (anti-CD3) e moléculas co-estimuladoras (anti-CD28) *per se* foram capazes de aumentar a expressão de PKM2 em linfócitos (Th0). De forma interessante, quando as células receberam o estímulo policlonal (anti-CD3/anti-CD28) e foram cultivadas em condições polarizantes para o fenótipo Th17 (IL-6 e TGF- β), a expressão de PKM2 foi ainda maior quando comparada aos linfócitos Th0 (**Figura 4A**).

Figure 4. A expressão de *Pkm2* está aumentada em linfócitos Th17. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻ provenientes de animais C57BL/6 foram isolados e cultivados sob condições polarizantes para Th17. As células foram coletadas em diferentes momentos (12, 24, 48 e 72h), sendo extraído o RNA e realizado o qPCR para *Pkm2*. A) Avaliação da expressão de *Pkm2* em comparação com células fresh, Th0 ou Th17 em 48h. Os resultados foram obtidos por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. B) Avaliação temporal da expressão de *Pkm2* em linfócitos Th17. Foi utilizado o grupo fresh como calibrador para a análise, sendo os resultados analisados através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$, com correção da expressão gênica realizada pela expressão de *Gapdh*. Os resultados foram obtidos por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni. Dados estão expressos em Média $\pm$ E.P.M. **P < 0,01 ***P < 0,001 ****P < 0,0001.

As enzimas PKM1 e PKM2 são as duas principais isoformas da piruvato quinase, as quais são codificadas pelo mesmo gene *Pkm*. Logo, analisou-se também a expressão de PKM1 em linfócitos Th17 em processo de diferenciação. Notavelmente, a expressão de PKM1 manteve-se igual durante todo o curso temporal, enquanto que a expressão gênica de PKM2 aumentou gradativamente, atingindo um pico em torno de 48 horas após exposição das células T CD4⁺ à estímulos de ativação e diferenciação para Th17 (**Figura 4B**).

Em seguida, avaliou-se também a expressão destas enzimas em linfócitos Th17 a nível de proteína. Observou-se por citometria de fluxo que células Th17 (CD4⁺IL-17⁺) expressam mais PKM2 que células CD4⁺ não produtoras de IL-17. De forma interessante, a adição da citocina IL-23 à cultura, que é importante para expansão e manutenção do fenótipo Th17, causou um aumento na expressão de PKM2 (**Figuras 5A e B**).

Figura 5. Células T CD4⁺ produtoras de IL-17 apresentam maior expressão de PKM2. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻ provenientes de animais C57BL/6 foram isolados e cultivados sob condições polarizantes para Th17 na ausência (A) ou presença de IL-23 (B). Em seguida, as células foram estimuladas com PMA (50 ng/mL), Ionomicina (500 ng/mL) e um inibidor do transporte proteico (*Golgi Stop-Monensin*, 1,5 µl/mL) por 4 horas. As células foram marcadas com um marcador de viabilidade (Fixable viability Dye) e os anticorpos anti-CD4 e anti-IL-17, além de anticorpo PKM2 conjugado à FITC. Os dados foram adquiridos no aparelho FACSVerse (BD Biosciences) e analisados por meio do programa Flowjo X. Isotipo (células sem marcação) está representado em cinza nos histogramas. Gráfico de barra representa o aumento na média de intensidade de fluorescência (MFI) de PKM2-FITC. Dados expressos Média ± E.P.M. *P < 0,05 ***P < 0,001 tendo sido analisados através da ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey.

Por *western blotting*, não foi observado mudanças significativas na expressão de PKM1, corroborando com o fato desta enzima ser constitutiva e não ser passível de regulação. Por outro lado, a expressão proteica de PKM2 foi ampliada durante a diferenciação de linfócitos Th17 e de forma interessante, a sua forma fosforilada (resíduo Y¹⁰⁵) passou a ser expressa a partir de 48 horas após ativação, alcançando uma alta expressão em 72 horas, quando já se observa uma significativa população de linfócitos com o fenótipo Th17 estabelecido (**Figura 6**).

Figura 6. A fosforilação do resíduo Y¹⁰⁵ da PKM2 é aumentada durante a diferenciação de linfócitos Th17. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻ foram cultivados sob o estímulo policlonal (anti-CD3/anti-CD28) na ausência (Th0) ou presença (Th17) de TGF-β (2,5 ng/ml) e IL-6 (20 ng/ml). As células foram coletadas em tampão RIPA e analisada PKM2 em sua forma total e fosforilada, bem como a expressão de PKM1 durante a diferenciação de linfócitos Th17 por *Western Blot*.

Tem sido demonstrado que modificações pós-traducionais da PKM2, como a fosforilação, promove uma desestabilização da sua conformação tetramérica e facilita sua dimerização, tornando-a apta a realizar funções não-glicolíticas no núcleo (YANG; LU, 2015). Nesse sentido, evidenciou-se a presença de PKM2 no núcleo de células Th17, mas não em células T CD4⁺ que não foram cultivadas em condições polarizantes para este fenótipo (Th0) (**Figura 7**). Logo, o aumento da fosforilação de PKM2, juntamente com sua presença no núcleo de células Th17 sugerem uma função para PKM2 na regulação gênica deste fenótipo celular.

Figura 7. Presença de PKM2 no núcleo de células Th17. Linfócitos T $CD4^+CD25^-$ foram cultivados sob o estímulo policlonal (anti-CD3/anti-CD28) na ausência (Th0) ou presença (Th17) de TGF- β (2,5 ng/mL) e IL-6 (20 ng/mL). As células foram coletadas, fixadas e permeabilizadas em lâminas. As células foram incubadas com anticorpos primários contra CD4 e PKM2 (*overnight*; 4°C). Anticorpos secundários conjugados à fluoróforos foram adicionados. Lâminulas foram montadas com meio de montagem contendo DAPI (marcador nuclear). Imagens foram adquiridas em microscópio confocal e analisadas no software *ImageJ*.

4.2 A inibição farmacológica de PKM2 causa redução na geração de linfócitos Th17 *in vitro*

Shikonin foi descrito como um potente inibidor da PKM2 em células tumorais e macrófagos (CHEN et al., 2011; YANG et al., 2014b). Sabendo que os níveis de expressão de PKM2 e fosfo-PKM2 estão aumentados durante a diferenciação de linfócitos Th17, avaliou-se qual a consequência da inibição farmacológica de PKM2 sobre a geração destas células.

Shikonin foi adicionado à culturas de linfócitos T $CD4^+$ em diferentes concentrações (0.3, 1 e 3 μ M), juntamente com os estímulos policlonais e de diferenciação para Th17. Após 96 horas, notou-se que a inibição de PKM2 levou a uma diminuição na população de células produtoras de IL-17A, principalmente quando estas células foram expostas à maior concentração de shikonin (**Figura 8A**). Adicionalmente, a quantificação dos níveis de IL-17A no sobrenadante das culturas revelou que na presença do inibidor da PKM2 a produção desta citocina foi reduzida (**Figura 8B**).

A sinalização desencadeada por IL-6 e TGF- β é suficiente para geração de células produtoras de IL-17, no entanto, sabe-se que a presença de IL-23 favorece a manutenção e expansão de células com fenótipo Th17 (GAFFEN et al., 2014; KORN et al., 2009). Logo, analisou-se o efeito do shikonin em sua concentração mais eficaz (3 μ M) sobre a geração de linfócitos Th17 após adição de IL-23. Como esperado, a presença desta citocina causou um aumento significativo na frequência de células Th17 (**Figura 8C**). Embora as células mesmo na presença de shikonin tenham tido aumento da diferenciação de Th17 após adição de IL-23, é notável que a população de células produtoras de IL-17A ainda é bastante reduzida quando comparada com células que não foram expostas ao inibidor (**Figura 8C**). No geral, a inibição de PKM2 levou a uma redução na geração de linfócitos Th17 bem como na manutenção do seu fenótipo.

Figura 8. A inibição farmacológica de PKM2 reduz a diferenciação de linfócitos para o perfil Th17. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻ provenientes de animais C57BL/6 foram isolados e cultivados sob condições polarizantes para Th17 na ausência ou presença de Shikonin (0,3, 1 ou 3 µM), um inibidor de PKM2, por 96 horas. Após esse período, as células foram estimuladas com PMA (50 ng/mL), Ionomicina (500 ng/mL) e um inibidor do transporte proteico (*Golgi Stop-Monensin*, 1,5 µl/mL) por 4 horas. A) as células foram marcadas com um marcador de viabilidade (Fixable viability Dye) e os anticorpos anti-CD4 e anti-IL-17. Os dados foram adquiridos no aparelho FACS Verse (BD Biosciences) e analisados por meio do programa *Flowjo* X. B) Foi avaliada por ELISA a produção de IL-17 no sobrenadante da cultura. C) A população de células Th17 cultivadas na presença de IL-23, citocina que auxilia na manutenção dessa linhagem, também foi reduzida após adição de shikonin em um segundo *round* de tratamento. Os resultados estão expressos em Média ± E.P.M. **P < 0,01 ***P < 0,001 ****P < 0,0001 tendo sido analisados através da ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

4.3 Deficiência específica de PKM2 em linfócito T limita sua diferenciação para o fenótipo Th17, mas não para Th1 ou iTreg *in vitro*.

Para confirmar a consequência da inibição da PKM2 sobre a diferenciação de linfócitos Th17, bem como descartar qualquer possível efeito *off-target* do shikonin, utilizou-se o sistema Cre-LoxP para geração de camundongos *knockout* condicionais para PKM2 (**Figura 9**). Nessa estratégia, formou-se casais com genótipos *Pkm2*^{flox/flox} e CD4^{Cre} e após sucessivos cruzamentos foi possível obter animais *knockout* condicionais (CD4^{Cre}*Pkm2*^{flox/flox}), dos quais apenas os linfócitos T são deficientes de PKM2.

Para avaliar se a deficiência de PKM2 *per se* poderia gerar alguma alteração nas populações de linfócitos T do animal em condições de homeostase, células do timo, linfonodos e baço foram coletadas para caracterização fenotípica. Com isso, observou-se que a proporção de células T CD4⁺ e CD8⁺ no timo, bem como na periferia não apresentaram alterações. Adicionalmente, células T ativadas (CD62L^{low}CD44^{high}) ou *naïve* (CD62L^{high}CD44^{low}) isoladas dos animais CD4^{Cre}*Pkm2*^{flox/flox} também mantiveram-se similares quando comparadas com células obtidas de *littermates* controle (**Figura 10A e B**).

A ausência de PKM2 em linfócitos T CD4⁺ dos animais *knockout* condicionais foi validada por meio da análise de expressão gênica e protéica (**Figura 11A**). Os linfócitos T CD4⁺ deficientes de PKM2 não apresentaram alterações em sua capacidade proliferativa após estimulação do TCR na ausência ou presença de IL-2, uma importante citocina para proliferação de linfócitos T CD4⁺ (**Figura 11B**).

Figura 9. Construção do animal *knockout* condicional $CD4^{Cre}Pkm2^{floxed/floxed}$. Animais de *background* C57BL/6 $Pkm2^{floxed/floxed}$ e $CD4^{Cre}$ foram obtidos da Jackson Laboratories, e foram cruzados entre si para geração de animais *knockout* condicionais $CD4^{Cre}Pkm2^{floxed/floxed}$. Nestes animais, a transcrição do gene que codifica a molécula CD4 leva a expressão da Cre recombinase, à qual reconhece as regiões loxP presentes nas delimitações do éxon 10 do gene *pkm*, responsável pela expressão de PKM2. Logo, a Cre recombinase é capaz de clivar e deletar especificamente essa sequência, impedindo a expressão da PKM2 nesta célula. Adaptado de The Jackson Laboratory.

Figura 10. Ausência de PKM2 não altera a frequência de linfócitos T CD4, CD8 e populações de células T CD4 *naïve* ou ativadas, em condições de homeostase. Para caracterização fenotípica dos animais *knockout* condicionais, foram obtidos o baço, linfonodos (inguinais, cervicais e axilares) e timo de camundongos WT ($Pkm2^{flox/flox}$ e $CD4^{Cre}$) ou *knockout* condicional ($CD4^{Cre} Pkm2^{flox/flox}$), sendo posteriormente realizada as marcações extracelulares para caracterização fenotípica com anticorpos A) anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 ou B) anti-CD4, anti-CD62L e anti-CD44. Os dados foram adquiridos no aparelho FACS Verse (*BD Biosciences*) e analisados por meio do software *Flowjo X*.

Figura 11. Células T $CD4^+$ deficientes de PKM2 não apresentam alterações na capacidade proliferativa. Linfócitos T $CD4^+CD25^-$ provenientes de animais $CD4^{Cre}$ ou $CD4^{Cre} Pkm2^{flox/flox}$ foram isolados. A) A deficiência de PKM2 nestas células foi validada por qPCR e *western blotting*; Dado de qPCR expresso como Média $\pm$ E.P.M e analisado por teste t de student, **** $P < 0,0001$. Estas células foram marcadas com *Cell Proliferation Dye eFluor 670* (5 μ M). B) As células foram cultivadas na presença anti-CD3/anti-D28 com ou sem adição de IL-2 por 96 horas. As células foram então marcadas com anti-CD4 e avaliado o decaimento do *proliferation dye* por citometria de fluxo (FACSVerse; *BD Biosciences*) e analisados por meio do programa *Flowjo X*.

Células T $CD4^+$ *naïve* destes animais foram cultivadas sob condições polarizantes para o fenótipo Th17. Notou-se que a deficiência de PKM2 em linfócitos T $CD4^+$ causou uma redução na geração de células produtoras de IL-17 sem apresentar alterações na capacidade proliferativa (**Figura 12A**). Na presença de IL-23 a

população de linfócitos Th17 foi mantida e expandida, entretanto, mesmo nestas condições observou-se que a ausência de PKM2 interferiu negativamente na diferenciação destas células para o fenótipo Th17 (**Figura 12B**). Além disso, a produção e secreção de IL-17 por estas células foi analisada e notou-se que células *knockout* produziram baixos níveis de IL-17 (**Figura 12C**). Estes resultados inferem que PKM2 possui um papel regulador na diferenciação e expansão de linfócitos da linhagem Th17.

Figura 12. A deleção gênica de *Pkm2* compromete a diferenciação de linfócitos para o fenótipo Th17. A) Linfócitos T CD4⁺CD25⁻ provenientes de animais CD4^{Cre} ou CD4^{Cre}Pkm2^{flox/flox} foram isolados, marcados com *Cell Proliferation Dye eFluor 670* (5μM) e cultivados sob condições polarizantes para Th17. B) Células Th17 CD4^{Cre} ou CD4^{Cre}Pkm2^{flox/flox} foram diferenciadas na presença ou ausência de IL-23. Em ambos os casos, após 96 horas, as células foram estimuladas com PMA (50 ng/mL), Ionomicina (500 ng/mL) e um inibidor do transporte proteico (*Golgi Stop-Monensin*, 1,5 μL/mL) por 4 horas, seguida de marcação com marcador de viabilidade (Fixable viability Dye) e anticorpos anti-CD4 e anti-IL-17. Os dados foram adquiridos no aparelho FACS Verse (*BD Biosciences*) e analisados por meio do programa *Flowjo X*. C) Foi avaliada por ELISA a produção de IL-17 no sobrenadante das

culturas. Os resultados estão expressos como Média $\pm$ E.P.M, tendo sido analisados por meio de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. **P < 0,01 ***P < 0,001 ****P < 0,0001.

A redução na diferenciação de células Th17 causada pela ausência de PKM2 foi acompanhada ainda por menor expressão gênica de *Il17a*, *Il22* e *Il21*, responsáveis pela expressão de citocinas padrão dessa linhagem celular (**Figura 13**). De forma interessante, as células *knockout* diferenciadas apresentaram uma menor expressão dos genes codificadores dos fatores de transcrição *Ror α* (*Rora*) e *Roryt* (*Rorc*), essenciais para completa diferenciação e função efetora do fenótipo Th17 (**Figura 13**). Logo, esses achados indicam que a deficiência de PKM2 pode interferir na resposta Th17 por modular negativamente a expressão de moléculas associadas com a função efetora destas células, incluindo fatores que contribuem para sua diferenciação.

Figura 13. A deficiência de PKM2 em linfócitos Th17 reduz a expressão gênica de moléculas associadas ao seu fenótipo. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻ provenientes de animais CD4^{Cre} ou CD4^{Cre}Pkm2^{flox/flox} foram isolados e cultivados sob condições polarizantes para Th17, sendo as células coletadas para avaliação da expressão gênica (qPCR) de citocinas produzidas por linfócitos Th17 (72h) e fatores de transcrição assinatura de linfócitos Th17 (48h). Foi utilizado o grupo *fresh* como calibrador para a análise, sendo os resultados analisados através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$, com correção da expressão gênica realizada pela expressão de *Gapdh*. Dados expressos por *heat map* foram normalizados e expressos por escore Z; a intensidade da cor é proporcional à expressão de cada gene.

Embora células T efetoras do fenótipo Th1 também apresentem um perfil inflamatório, observou-se que a ausência de PKM2 não prejudicou a geração dessa subpopulação de linfócitos T CD4⁺ *in vitro* (**Figura 14A**). Sabe-se que as linhagens de linfócitos Th17 e Tregs compartilham o requerimento da sinalização via TGF- β para diferenciação, mas que desempenham funções antagônicas na resposta imune (EISENSTEIN; WILLIAMS, 2009). Nesse sentido, linfócitos T deficientes para PKM2 também foram cultivados sob condições polarizantes para iTreg, e observou-se que a ausência de PKM2 não interferiu na expressão do fator de transcrição FoxP3, principal

marcador fenotípico de Tregs (**Figura 14B**). Estes achados sugerem que o papel regulador de PKM2 parece ser restrito à linhagem Th17 e independente da via de sinalização desencadeada por TGF- β .

Figura 14. A deficiência de PKM2 em linfócitos T CD4⁺ não prejudica a diferenciação para os fenótipos Th1 e iTreg. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻ provenientes de animais CD4^{Cre} ou CD4^{Cre}Pkm2^{flox/flox} foram isolados e cultivados sob condições polarizantes para (A) Th1 (IL-12; 20 ng/mL) ou (B) iTreg (TGF- β ; 3 ng/mL). Após 96h, as células Th1 foram estimuladas com PMA (50 ng/mL), Ionomomicina (500 ng/mL) e um inibidor do transporte proteico (*Golgi Stop-Monensin*, 1,5 μ L/mL) por 4 horas. Posteriormente, as células foram marcadas com um marcador de viabilidade (Fixable viability Dye) e os anticorpos anti-CD4, anti-IFN- γ ou anti-FoxP3. Os dados foram adquiridos no aparelho FACS Verse (*BD Biosciences*) e analisados por meio do programa *Flowjo X*. Os resultados estão expressos em Média $\pm$ E.P.M., tendo sido analisados através de teste t; ns: não significativo.

4.4 A expressão de PKM2 aumenta durante o curso da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune mediada especialmente por linfócitos Th17 auto reativos à mielina presente no SNC, a qual forma camadas (bainha) ao redor de fibras nervosas e facilita a transmissão do impulso elétrico (JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011). O modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) tem sido extensivamente utilizado para se entender os mecanismos da neuroinflamação autoimune observada na EM em humanos (MCCARTHY; RICHARDS; MILLER, 2012). Como modelo padrão mais frequentemente utilizado, a EAE é induzida por meio da imunização de camundongos

com emulsão (água : óleo) composta por CFA e um autoantígeno derivado da mielina, como a glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG₃₅₋₅₅), além de injeção com toxina pertussis. Neste trabalho, os resultados obtidos *in vitro* demonstraram que a ausência de PKM2 causou uma redução na diferenciação de células Th17, e consequentemente menor expressão de moléculas associadas a sua função efetora. Logo, buscou-se investigar se o papel da PKM2 na regulação do fenótipo Th17 poderia contribuir para o desenvolvimento e patogênese da EAE, na qual sabidamente os linfócitos Th17 medeiam a resposta autoimune.

Inicialmente foi realizada uma análise da expressão de genes associados ao perfil Th17 e à patogênese da EAE nos linfonodos drenantes e baço, bem como na medula espinal (SNC) durante o curso temporal da doença (**Figura 15A**). Como esperado, a expressão de genes relacionados com a resposta inflamatória aumentou nos órgãos linfoides periféricos a partir do 10º dia após imunização, o que coincide com o início da EAE. Na medula espinal, que é o foco da resposta autoimune, estes genes passaram a ser regulados positivamente por volta do 15º dia, que corresponde ao pico da doença, período em que se evidencia infiltrado de células no local (**Figura 15B**). De forma interessante, o gene da PKM2 teve sua expressão aumentada durante o curso da doença. Nos linfonodos e baço a expressão de PKM2 começou a aumentar desde o início da resposta gerada pela imunização, enquanto que no SNC a sua expressão iniciou-se apenas a partir do momento em que células inflamatórias infiltraram a medula espinal, evidenciando sua relação com a inflamação desencadeada pela resposta autoimune (**Figuras 15B e C**).

Figure 15. Aumento da expressão de *Pkm2* está associado à inflamação autoimune observada na EAE. Animais C57BL/6 foram imunizados com 300 µg de MOG₃₅₋₅₅ por via subcutânea em conjunto com Adjuvante Completo de Freund (CFA; 5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA) e receberam tratamento com toxina pertussis (200 ng/animal, via i.p.) nos dias 0 e 2 após a imunização. O baço, linfonodos drenantes (inguinais) e a medula espinal foram removidos nos dias 0, 5, 10, 15 e 20, após a imunização, como indicado nas flechas do gráfico (A) que representa o escore clínico da doença. Em seguida, realizou-se a extração do RNA total, conversão a cDNA seguido de qPCR para diversos alvos, sendo a expressão gênica representada por *heat map* (B); Os dados foram separados por tempo e normalizados por escore Z; a intensidade da cor é proporcional à expressão de cada gene. O curso temporal da expressão gênica de *Pkm2* foi também expressa em gráfico de barras (C). Dados foram expressos como Média ± E.P.M e analisados através de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey. *P < 0,05 ***P < 0,001 ****P < 0,0001.

Durante o pico da doença, observou-se um grande infiltrado de células inflamatórias que migraram da periferia para o SNC. Por imunofluorescência, notou-se uma alta expressão de PKM2 co-localizando com as células infiltrantes dos sítios de desmielinização (**Figura 16**). O aumento da expressão proteica de PKM2 foi confirmada por *western blotting*, o qual também revelou que a forma fosforilada de PKM2 (Y^{105}) é amplamente expressa na medula espinal de animais com EAE. Além disso, observou-se que quanto maior a gravidade da doença, maior é a fosforilação de PKM2, como demonstrado pelos escores clínicos descritos na imagem (**Figura 17**). Esses resultados sugerem que a expressão de PKM2 observada no SNC de animais com EAE é confinada às células inflamatórias recrutadas para o local da lesão. Como mencionado previamente, a fosforilação de PKM2 (Y^{105}) está correlacionada com sua dimerização, o que possibilita o desempenho de suas funções não-glicolíticas.

Figura 16. Animais com EAE apresentam aumento da expressão de PKM2 na medula espinal.

Animais C57BL/6 foram imunizados com 300 µg de MOG₃₅₋₅₅ por via subcutânea em conjunto com Adjuvante Completo de Freund (CFA; 5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA) e receberam tratamento com toxina pertussis (200 ng/animal, via i.p.) nos dias 0 e 2 após a imunização. A medula espinal foi retirada 15 dias após a imunização e avaliado o infiltrado de células inflamatórias por coloração hematoxilina e eosina-HE (à esquerda) e a expressão de PKM2 por imunofluorescência (à direita). Marcação para PKM2 está representada em vermelho, mielina em verde (Fluoromyelin) e núcleo (DAPI) em azul.

Figura 17. A expressão de PKM2 e PKM2 fosforilada está elevada no SNC de animais com EAE. Animais C57BL/6 foram imunizados com 300 µg de MOG₃₅₋₅₅ por via subcutânea em conjunto com Adjuvante Completo de Freund (CFA; 5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA) e receberam tratamento com toxina pertussis (200 ng/animal, via i.p.) nos dias 0 e 2 após a imunização. A medula espinal foi retirada 15 dias após a imunização e avaliada a expressão de PKM2 e pPKM2 por *Western Blotting* (à esquerda). A quantificação dos níveis de proteína (à direita) foi obtida pela razão de PKM2 ou pPKM2 por β-actina (normalizador endógeno). U.A.: unidades arbitrárias; Os dados são representativos de animais submetidos a EAE e os respectivos escores clínicos estão descritos nas imagens. Dados expressos como Média ± E.P.M. e analisados por teste t de student, **P < 0,01.

4.5 A deleção específica de PKM2 em linfócitos T atenua o desenvolvimento da EAE e reduz a gravidade da doença

Para confirmar a hipótese de que a PKM2 tem um papel regulador na geração de linfócitos Th17, e consequentemente no desenvolvimento de uma resposta autoimune, imunizou-se animais CD4^{Cre}Pkm2^{flox/flox} com MOG₃₅₋₅₅ em CFA para indução da EAE e avaliado os sinais clínicos da doença. Notou-se que os animais deficientes de PKM2 em linfócitos T apresentaram um desenvolvimento mais brando da EAE comparado ao grupo controle (CD4^{Cre} ou Pkm2^{flox/flox}) (**Figura 18A**). Corroborando com estes achados, observou-se uma drástica redução do infiltrado de células inflamatórias na medula espinal dos animais *knockout* condicionais (**Figura 18B**).

Figura 18. A expressão de PKM2 em linfócitos T é importante para o desenvolvimento do EAE. Animais do grupo controle (CD4^{Cre} ou Pkm2^{flox/flox}) ou CD4^{Cre} Pkm2^{flox/flox} foram imunizados com 300 µg de MOG₃₅₋₅₅ por via subcutânea em conjunto com Adjuvante Completo de Freund (CFA; 5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA) e receberam tratamento com toxina pertussis (200 ng/animal, via i.p.) nos dias 0 e 2 após a imunização. A) avaliação do escore clínico da doença. Os dados foram analisados através da ANOVA de duas vias, seguido do teste de Bonferroni. Os resultados estão expressos em Média ± E.P.M. ****P < 0,0001. B) A medula espinal foi removida para avaliação do infiltrado de células inflamatórias por coloração hematoxilina-eosina-HE.

Uma vez que o foco deste trabalho foi entender o papel da PKM2 em células Th17, buscou-se em seguida avaliar a população de células produtoras de IL-17 nos linfonodos drenantes da imunização. Observou-se que os animais com EAE e deficientes de PKM2 em células T apresentaram uma menor frequência de células IL-17⁺ em relação aos animais com EAE do grupo controle, enquanto que a população de Tregs (FoxP3⁺) não foi alterada (**Figura 19A**). Células provenientes destes linfonodos e baço foram reestimuladas *in vitro* com MOG₃₅₋₅₅ para avaliar a resposta de células T antígeno-específicas por meio da produção citocinas. Assim, observou-se que células isoladas de animais CD4^{Cre} Pkm2^{flox/flox} foram menos responsivas ao antígeno MOG₃₅₋₅₅, produzindo níveis mais baixos de citocinas do perfil patogênico de Th17 (IL-17 e GM-CSF), quando comparadas com células dos animais controle (**Figura 19B, C e D**).

Figura 19. A deficiência de PKM2 em linfócitos T reduz a frequência de linfócitos Th17 *in vivo* e sua responsividade ao antígeno *in vitro*. Animais do grupo controle (CD4^{Cre} ou *Pkm2*^{flox/flox}) ou CD4^{Cre}*Pkm2*^{flox/flox} foram imunizados com 300 µg de MOG₃₅₋₅₅ por via subcutânea em conjunto com Adjuvante Completo de Freund (CFA; 5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA) e receberam tratamento com toxina pertussis (200 ng/animal, via i.p.) nos dias 0 e 2 após a imunização. A) Células provenientes dos linfonodos drenantes foram estimuladas com PMA (50 ng/mL), ionomicina (500 ng/mL) e um inibidor do transporte protéico (*Golgi Stop* – *Monensin*, 1,5 µl/mL) por 4h. Após esse período, foi realizado a marcação extracelular com anticorpo αCD4 e intracelular com αIL-17. Marcação intracelular de FoxP3 foi realizada sem prévia estimulação. Os dados foram adquiridos no aparelho FACSVerse (BD Biosciences) e analisados no programa *FlowJo* X. Para ensaio de *recall*, células (3x10⁵/poço) do baço e linfonodos foram reestimuladas *in vitro* com MOG₃₅₋₅₅ (50 µg/mL) por 96h, sendo o sobrenadante coletado para quantificação de B) IL-17A e C) GM-CSF e D) IFN-γ por ELISA. Os resultados estão expressos em Média ± E.P.M., tendo sido analisados através da ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. **P < 0,01 ****P < 0,0001. ND: não detectado.

No pico da doença, foi avaliada a expressão de genes associados à resposta inflamatória na medula espinal de animais submetidos a EAE. Foi observado que em relação ao grupo controle acometido pela EAE, os animais que eram deficientes de PKM2 em linfócitos T apresentaram menor expressão gênica de moléculas associadas a resposta mediada pelo perfil Th17, como as citocinas IL-17, GM-CSF e IFN- γ , be, como o receptor de quimiocina CCR6, abundantemente expresso em linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17 (**Figura 20**).

Figura 20. A expressão de genes relacionados ao fenótipo Th17 e patogênese da EAE é amplamente reduzida na medula espinal de animais CD4^{Cre}Pkm2^{flox/flox} imunizados. Animais controle ou CD4^{Cre}Pkm2^{flox/flox} foram imunizados com 300 μ g de MOG₃₅₋₅₅ por via subcutânea em conjunto com Adjuvante Completo de Freund (CFA; 5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA) e receberam tratamento com toxina pertussis (200 ng/animal, via i.p.) nos dias 0 e 2 após a imunização. Tecido do SNC (medula espinal) foi coletado, RNA total extraído e convertido à cDNA. Realizou-se em seguida qPCR para avaliação da expressão gênica de *Il17a*, *Csf2*, *Il22*, *Ccr6*, *Ifng* e *Pkm2*. Foi utilizado amostra de SNC do grupo *naïve* como calibrador, sendo os resultados analisados através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$, com correção da expressão gênica realizada pela expressão de *Gapdh*. Os resultados estão expressos em Média $\pm$ E.P.M. Expressão gênica foi analisada separadamente entre os grupos através da ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. *P < 0,05 **P < 0,01 ***P < 0,001 ****P < 0,0001.

Além disso, células T CD4⁺ foram isoladas do SNC de animais CD4^{Cre}Pkm2^{flox/flox} e controles no pico da doença e avaliou-se a expressão de genes relacionados a função efetora de linfócitos Th17. De forma interessante, notou-se que os linfócitos T

CD4 dos animais *knockout* condicionais apresentaram baixa expressão gênica de *Il17a* e *Csf2*, os quais transcrevem citocinas assinatura de um perfil patogênico de linfócitos Th17, importantes para o desenvolvimento da EAE (EL-BEHI et al., 2011; KOMIYAMA et al., 2006). O receptor de IL-23 tem sido descrito por sua função em manter e expandir linfócitos Th17 e aumentar sua patogenicidade, e nesse sentido, observou-se uma baixa expressão do gene *Il23r* nas células T CD4⁺ deficientes para PKM2 infiltrantes do SNC. Ainda, estas células apresentaram menor expressão de *Rorc* e *Rora*, genes de fatores de transcrição cruciais para desenvolvimento de linfócitos Th17, bem como para a produção de suas citocinas inflamatórias (**Figura 21**).

Figura 21. Linfócitos T CD4⁺ deficientes de *Pkm2* isolados do SNC de animais com EAE apresentam baixa expressão de marcadores Th17. EAE foi induzida em animais controle (CD4^{Cre} ou *Pkm2*^{flox/flox}) ou CD4^{Cre}*Pkm2*^{flox/flox}. SNC foi isolado e digerido em solução contendo collagenase II (1 mg/mL) e DNase I (15 µg). Células mononucleares foram isoladas por percoll (70%, 37% e 30%). Os leucócitos foram coletados, e células T CD4⁺ foram isoladas por MicroBeads magnéticas anti-CD4 no aparelho AutoMACS, e em seguida feito um *pool* de células T CD4⁺ dos animais de cada grupo. A pureza da separação de células T CD4⁺ foi avaliada por citometria de fluxo (à esquerda). RNA total do lisado celular foi extraído e convertido à cDNA, e qPCR realizado para análise da expressão gênica de *Pkm2*, *Il17a*, *Il21*, *Csf2*, *Ifng*, *Il23r*, *Rora*, *Rorc* e *Tbx21*. Os resultados analisados através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$, com correção da expressão gênica realizada pela expressão de *Gapdh*. O grupo *naïve* utilizado como calibrador para a análise se refere à células CD45⁺ (leucócitos) isoladas do SNC, uma vez que células CD4⁺ não são normalmente encontradas no SNC em condições de homeostase. Os dados foram separados por grupo experimental, normalizados por escore Z e expressos por *heat map*; a intensidade da cor é proporcional à expressão de cada gene.

Os resultados até aqui demonstram que a ausência de PKM2 em linfócitos T culmina em uma baixa resposta efetora mediada por células Th17 *in vivo* no modelo de EAE, corroborando com os dados *in vitro* que demonstram uma menor diferenciação e expansão dessa subpopulação celular quando a PKM2 está ausente ou inibida farmacologicamente.

4.6 O tratamento com o inibidor de PKM2 é capaz de reduzir os sinais clínicos da EAE

Em uma abordagem terapêutica, camundongos C57BL/6 foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ em CFA para indução da EAE e tratados com shikonin (4 mg.kg^{-1}) a partir do 5º dia após imunização e monitorados para o surgimento dos sinais clínicos da doença. No dia correspondente ao pico da doença, observou-se que os animais que foram submetidos ao tratamento diário com o inibidor da PKM2 mostraram-se resistentes à progressão da doença quando comparado ao controle (**Figura 22A**). Observou-se ainda que a quantidade de células inflamatórias infiltrantes no SNC foi amplamente reduzida (**Figura 22B**).

Figura 22. O tratamento com o inibidor farmacológico da PKM2 (shikonin) atenua o desenvolvimento da EAE. Animais C57BL/6 foram imunizados com 300 µg de MOG₃₅₋₅₅ por via subcutânea em conjunto com Adjuvante Completo de Freund (CFA; 5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA) e receberam tratamento com toxina pertussis (200 ng/animal, via i.p.) nos dias 0 e 2 após a imunização. O grupo controle foi tratado com veículo (sol. salina) e o outro com Shikonin (4 mg.kg^{-1} ; via s.c.). A) O escore clínico foi avaliado. B) O infiltrado inflamatório no SNC foi analisado por coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Resultados expressos em Média $\pm$ E.P.M e analisados através da ANOVA de duas vias, seguido do teste de Bonferroni. ****P < 0,0001.

Além disso, corroborando com resultados anteriores, a inibição da PKM2 em animais com EAE causou uma menor frequência de células produtoras de IL-17, mas não de células Tregs, nos linfonodos drenantes e baço (**Figura 23A**). Em ensaio de reestimulação *in vitro* com MOG₃₅₋₅₅, observou-se que as células provenientes dos linfonodos drenantes e baço de animais com EAE tratados com shikonin foram menos eficientes em produzir citocinas inflamatórias do perfil Th17 patogênica (IL-17 e GM-CSF), as quais são importantes para a patogênese da EAE (**Figura 23B, C e D**).

Figura 23. O tratamento com o inibidor da PKM2 reduz a frequência de linfócitos Th17 *in vivo* e diminui a resposta antígeno-específica *in vitro*. Animais C57BL/6 foram imunizados com 300 µg de MOG₃₅₋₅₅ por via subcutânea em conjunto com Adjuvante Completo de Freund (CFA; 5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA) e receberam tratamento com toxina pertussis (200 ng/animal, via i.p.) nos dias 0 e 2 após a imunização. Os animais receberam tratamento com Shikonin (4 mg.kg⁻¹; via s.c) diariamente, a partir do 5º dia após a imunização. A) As células provenientes dos linfonodos drenantes foram estimuladas com PMA (50 ng/mL), ionomicina (500 ng/mL) e um inibidor do transporte proteico (Golgi Stop – Monensin, 1,5 µl/mL) por 4h. Após esse período, foi realizado a marcação extracelular com anticorpo αCD4 e intracelular com αIL-17. Marcação intracelular de FoxP3 foi realizada sem prévia estimulação. Os dados foram adquiridos no aparelho FACSVerse (BD Biosciences) e analisados no programa FlowJo X. Para ensaio de *recall*, células (3x10⁵/poço) do baço e linfonodos drenantes de animais com EAE controle ou tratados foram reestimuladas *in vitro* com MOG₃₅₋₅₅ (50 µg/mL) por 96h, sendo o sobrenadante coletado para quantificação de B) IL-17A e C) GM-

CSF e D) IFN- γ por ELISA. Os resultados estão expressos em Média $\pm$ E.P.M., tendo sido analisados através da ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. **P < 0,01 ****P < 0,0001.

A análise da expressão gênica na medula espinal de animais com EAE tratados com shikonin evidenciou ainda que os genes associados a inflamação desencadeada por linfócitos Th17 estavam amplamente reduzidos, o que corrobora com a redução dos sinais clínicos da EAE nestes animais (**Figura 24**). De forma curiosa, a expressão da própria *Pkm2* foi negativamente regulada, o que suporta a ideia de que o aumento da expressão de PKM2 está associada com a resposta inflamatória, e neste caso, à migração de células inflamatórias para o local. Adicionalmente, células T CD4⁺ da medula espinal de animais com EAE tratados com shikonin foram isoladas e observou-se que a expressão gênica de marcadores do perfil Th17, incluindo *Il17a*, *Csf2*, *Il23r*, *Rora* e *Rorc* estava amplamente reduzida (**Figura 25**). Portanto, os dados aqui descritos sugerem um papel da PKM2 em regular a diferenciação e expansão de linfócitos Th17 e desta forma, contribuir para o desenvolvimento da EAE.

Figura 24. Inibição farmacológica da PKM2 reduz a expressão de genes relacionados com o desenvolvimento da doença no SNC. Animais C57BL/6 foram imunizados com 300 μ g de MOG₃₅₋₅₅ por via subcutânea em conjunto com Adjuvante Completo de Freund (CFA; 5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA) e receberam tratamento com toxina pertussis (200 ng/animal, via i.p.) nos dias 0 e 2 após a imunização. Os animais receberam tratamento com Shikonin (4 mg.kg⁻¹, s.c.) diariamente, a partir do 5º dia após a imunização. Tecido do SNC (medula espinal) foi coletado, RNA total extraído e convertido à cDNA. Realizou-se em seguida qPCR para avaliação da expressão gênica de *Il17a*, *Csf2*, *Il22*, *Ccr6*, *Ifng* e *Pkm2*. Foi utilizado amostra de SNC do grupo *naïve* como calibrador para a análise, sendo os resultados analisados através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$, com correção da expressão gênica realizada pela expressão de *Gapdh*. Os resultados estão expressos em Média $\pm$ E.P.M. Expressão gênica foi analisada separadamente entre os grupos através da ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey. *P < 0,05 **P < 0,01 ***P < 0,001.

Figura 25. A expressão gênica de marcadores do perfil Th17 está reduzida em células T CD4⁺ isoladas do SNC de animais com EAE tratados com shikonin. EAE foi induzida em animais C57BL/6 e foram tratados com veículo (sol. salina) ou shikonin na dose de 4 mg/mg. SNC foi isolado e digerido em solução contendo collagenase II (1 mg/mL) e DNase I (15 µg). Células mononucleares foram isoladas por percoll (70%, 37% e 30%). Os leucócitos foram coletados, e células T CD4⁺ foram isoladas por MicroBeads magnéticas anti-CD4 no aparelho AutoMACS, e em seguida feito um *pool* de células T CD4⁺ dos animais de cada grupo. A pureza da separação de células T CD4⁺ foi avaliada por citometria de fluxo (histograma acima). RNA total do lisado celular foi extraído e convertido à cDNA, e qPCR realizado para análise da expressão gênica de *Il17a*, *Csf2*, *Ifng*, *Il23r*, *Rorc*, *Rora* e *Tbx21*. Os resultados analisados através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$, com correção da expressão gênica realizada pela expressão de *Gapdh*. O grupo *naïve* utilizado como calibrador para a análise se refere à células CD45⁺ (leucócitos) isoladas do SNC, uma vez que células CD4⁺ não são normalmente encontradas no SNC em condições de homeostase. Os dados foram separados por grupo experimental e normalizados por escore Z; a intensidade da cor é proporcional à expressão de cada gene.

5. Discussão

A inflamação, associado à resposta imune, demanda altas taxas energéticas das células que a orquestram. Este processo envolve uma mudança de estado metabólico basal para um estado altamente ativo, conhecido por glicólise aeróbica, que suporta o crescimento e diferenciação destas células e produção de moléculas pro-inflamatórias (GABER; STREHL; BUTTGEREIT, 2017).

A piruvato quinase (PK) é uma enzima que regula a etapa final da via glicolítica, catalisando a transferência de fosfato do fosfoenolpiruvato (PEP) para ADP, gerando então uma molécula de piruvato e ATP (YANG; LU, 2015). Diversos trabalhos têm mostrado que alterações na conformação da isoforma PKM2, mas não PKM1, a torna capaz de mediar a proliferação de células tumorais por vias não-glicolíticas (HITOSUGI et al., 2009), e mais recentemente têm-se atribuído a esta molécula um papel regulador da função efetora de macrófagos M1 no contexto de doenças inflamatórias, incluindo a sepse (XIE et al., 2016; YANG et al., 2014b) e aterosclerose (SHIRAI et al., 2016).

Entretanto, ainda é obscuro seu papel no desenvolvimento de desordens autoimunes, que são em grande parte mediadas por células Th17 autoreativas. Nesse sentido, a Esclerose Múltipla (EM) é uma das doenças autoimunes, cuja fisiopatologia está associada com a resposta efetora de linfócitos Th17 (BABALOO et al., 2015). Portanto, neste trabalho buscou-se investigar se a PKM2 poderia exercer um papel regulador na diferenciação de linfócitos Th17 e consequentemente, modular sua resposta autoreativa à mielina do SNC utilizando o modelo animal padrão da doença, a Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), a qual compartilha características clínicas e patológicas com a EM.

Os linfócitos T quando ativados rapidamente passam por uma expansão clonal, a qual requer um maior engajamento com a via glicolítica para geração de ATP em um curto período de tempo, mas principalmente para produção de biomoléculas essenciais na formação de constituintes intracelulares. Nesse contexto, a estimulação do TCR *per se* é capaz de aumentar a expressão de genes relacionados com a glicólise, como o do transportador de glicose GLUT1 (GERRIETS; RATHMELL, 2012). No presente trabalho, demonstrou-se que a sinalização via TCR em linfócitos T ativados com estímulo policlonal (α CD3/ α -CD28) *in vitro*, foi capaz de aumentar a expressão gênica de PKM2 quando comparado com células T em repouso. De forma curiosa, as vias de sinalização envolvidas na diferenciação direcionada ao perfil Th17, induzida por meio da adição de IL-6 e TGF- β na cultura, levaram a um aumento ainda

maior da expressão dessa enzima. O curso temporal das expressões gênicas de PKM1 e PKM2 em linfócitos Th17 em diferenciação revelou ainda que diferente da PKM1, cuja expressão permanece constante durante todo o processo, a expressão do gene da PKM2 (*Pkm*; éxon 10) é gradativamente aumentada. Observou-se também que a expressão proteica de PKM2, mas não de PKM1, também foi aumentada em linfócitos T CD4⁺ em processo de diferenciação para Th17. Esses dados corroboram com a ideia de que dependendo da situação em que a célula se encontra (repouso ou ativada) a expressão de PKM2 é passível de ser modulada, enquanto PKM1 é constitutivamente expressa (IQBAL et al., 2014).

Vários grupos têm demonstrado que células com perfil inflamatório, como os linfócitos Th17, são altamente dependentes da via glicolítica para diferenciação e aquisição de suas funções efetoras (MICHALEK et al., 2011; SHI et al., 2011). Durante a ativação dos linfócitos T, a ligação da molécula CD28 com moléculas co-estimulatórias expressas por APCs levam a ativação da via de sinalização PI3K-Akt-mTOR, a qual promove diminuição de OXPHOS e aumento significativo da glicólise nestas células (FRAUWIRTH KA, RILEY JL, HARRIS MH, PARRY RV, RATHMELL JC, 2002). Nesse contexto, estudos com células tumorais revelam que esta via de sinalização é capaz de mediar a glicólise aeróbica e aumentar a expressão de PKM2 (SUN et al., 2011), o que explica o fato de a ativação policlonal *per se* em linfócitos T ter promovido aumento da expressão dessa enzima.

A via de mTOR (mTORC1) leva ainda a uma regulação positiva de HIF-1 α , importante fator para manutenção da glicólise aeróbica e que também coopera para expressão de PKM2 (DÜVEL et al., 2010; HUDSON et al., 2002; LUO et al., 2011). Em linfócitos Th17, o sinergismo da sinalização via IL-6 e TGF- β é essencial para ativação de STAT3, importante fator de transcrição para expressão de *Rora* e *Rorc*, mas também para estabilização de HIF-1 α (DANG et al., 2011). Portanto, parece que a ativação de TCR/co-estimulação somada à sinalização via STAT3 e HIF-1 α pode regular o aumento da expressão de PKM2 em linfócitos Th17 comparado àqueles que receberam apenas o estímulo policlonal.

De forma interessante, o *western blotting* evidenciou que linfócitos Th17 em diferenciação também aumentaram drasticamente a expressão de PKM2 fosforilada no resíduo Y¹⁰⁵. Hitosugi e seus colaboradores (2009) demonstraram que FGFR1 é capaz de fosforilar PKM2 no resíduo Y¹⁰⁵ e causar a dissociação da FBP do sítio de

regulação alostérica. Essa modificação pos-traducional interfere negativamente na atividade glicolítica da PKM2 por facilitar sua dimerização. Ainda, Hitosugi e colaboradores (2009) mostraram que a substituição do resíduo Y105F impediu a fosforilação de PKM2, a qual permaneceu na conformação tetramérica com alta atividade glicolítica (HITOSUGI et al., 2009). Embora a conversão tetrâmero→dímero torne a PKM2 cataliticamente inativa, a PKM2 dimérica pode translocar para o núcleo e atuar como proteína quinase e transativador transcricional de genes associados a proliferação e inflamação (YANG; LU, 2015). Uma vez que a fosforilação de PKM2 (Y¹⁰⁵) foi maior nas células em diferenciação para Th17, além de ter sido evidenciado a presença de PKM2 no núcleo destas células, não é surpresa que a forma dimérica dessa enzima possa ter um papel regulador a nível nuclear na geração e função efetora dessa subpopulação de linfócitos T com perfil altamente inflamatório. Entretanto, no contexto de linfócitos Th17, ainda é desconhecida a proteína quinase que promove a fosforilação de PKM2.

Nos últimos anos, diferentes estudos demonstraram que PKM2 na sua forma dimérica favorece a tumorigênese por promover a glicólise aeróbica. Nesse sentido, tem-se notado uma intensa busca por moléculas que possam bloquear o crescimento tumoral mediado pela PKM2. Em pesquisa desenvolvida por Chen e seu grupo (2011), demonstrou-se que shikonin, uma naftoquinona isolada de *Lithospermum erythrorhizon*, é capaz de reduzir o crescimento tumoral por inibir a PKM2, sem afetar a atividade de PKM1 (CHEN et al., 2011). Nesse sentido, ao adicionar shikonin em diferentes concentrações sobre culturas de linfócitos Th17, notou-se uma redução na diferenciação e manutenção do fenótipo destas células, que foi corroborada por baixos níveis de IL-17 secretada no meio. Logo, a presença do shikonin parece impedir a PKM2 de desempenhar suas funções não-glicolíticas no núcleo. Embora shikonin seja considerado um potente inibidor da PKM2, seu mecanismo de inibição da PKM2 ainda não está totalmente claro, podendo eventualmente apresentar efeitos *off-target*.

O uso de sistemas de recombinação, como Cre-LoxP, permite a supressão de genes de interesse em um particular tipo de célula ou tecido. Neste trabalho, utilizou-se esta estratégia para geração de camundongos deficientes de *Pkm2* (*Pkm*; éxon 10) exclusivamente em linfócitos T por meio de cruzamentos entre animais *Pkm2*^{flox/flox} e CD4^{Cre} e suas sucessivas gerações. Estes animais apresentaram-se viáveis e não demonstraram qualquer diferença entre as populações linfocitárias em condições homeostáticas, quando comparados a animais que expressavam normalmente *Pkm2*.

Além disso, células T CD4⁺ deficientes de PKM2 não apresentaram qualquer alteração na capacidade proliferativa. Por outro lado, notou-se que a diferenciação e expansão destes linfócitos T CD4⁺ deficientes de PKM2 direcionada ao fenótipo Th17 foi reduzida, acompanhada de baixa produção de IL-17 e regulação negativa da expressão gênica de moléculas relacionadas à sua função efetora.

A aquisição do perfil Th17 ocorre através de um processo que envolve simultaneamente a sinalização via IL-6 e TGF- β , ambas culminando na ativação de STAT3 (CHEN; LAURENCE; O'SHEA, 2007). O receptor de IL-6 (IL-6R) é constitutivamente expresso na membrana de linfócitos T CD4⁺ *naïve*, mas após ativação do TCR e ligação de IL-6 ao IL-6R há uma diminuição da expressão da subunidade IL-6 α do receptor o que torna a ativação de STAT3 transiente e limitada. Logo, TGF- β por meio do seu receptor é capaz de manter a expressão de IL-6 α , além de manter ativação sustentada de STAT3 por inibir fosfatases induzidas pela sinalização de IL-6R (KORN et al., 2009). A presença de ambas citocinas são necessárias para geração de linfócitos Th17, uma vez que na ausência de IL-6 e em altas concentrações, o TGF- β *per se* promove geração de Tregs (ZHOU et al., 2008). Nesse sentido, células T CD4⁺ deficientes de PKM2 não apresentaram alterações na diferenciação de Tregs (FoxP3⁺), indicando que o aumento da fosforilação de PKM2 observado em células polarizadas para Th17 provavelmente resulta da ativação do TCR somada à cascata de sinalização desencadeada por IL-6/IL-6R.

A ativação de STAT3 em linfócitos Th17 é necessária para indução de ROR γ t e ROR α , os quais são essenciais para transcrição de genes relacionados ao perfil Th17, como *Il17a* (YANG et al., 2008). Durante a diferenciação, os linfócitos Th17 também aumentam a expressão de IL-23R, cuja cascata de sinalização potencializa a ativação de STAT3 (YANG et al., 2007). Nesse contexto, os resultados aqui apresentados mostraram que os linfócitos Th17 deficientes de PKM2 apresentaram uma menor expressão gênica de *Rorc* e *Rora*, o que corrobora com a reduzida diferenciação e menor produção de IL-17 observada.

Como mencionado, a fosforilação de PKM2 causa uma desestabilização da sua conformação, facilitando sua dimerização. Diferentes grupos têm observado um papel não-glicolítico da PKM2 dimérica, incluindo a de proteína quinase. Gao e colaboradores (2012) demonstraram que PKM2 nuclear ativa diretamente STAT3 via fosforilação do resíduo Y⁷⁰⁵, promovendo aumento da sua atividade transcricional de

genes relacionados com proliferação. Sabe-se que STAT3 fosforilado (Y^{705}) é importante para transcrição gênica dos fatores de transcrição $Ror\gamma t$ e $Ror\alpha$ e subsequente aquisição do fenótipo Th17 (YANG et al., 2007, 2008). Assim, é possível que a PKM2 quando fosforilada (Y^{105}) forme dímeros, os quais podem translocar para o núcleo e manter a fosforilação de STAT3 (Y^{705}), favorecendo a diferenciação e manutenção de linfócitos Th17 funcionais. De forma interessante, demonstrou-se neste trabalho que a deficiência de PKM2 em linfócitos T $CD4^+$ não prejudicou a diferenciação em células T efectoras do perfil Th1, as quais não dependem da expressão de STAT3 para aquisição do fenótipo. Esse dado corrobora com o possível papel da PKM2 na manutenção da ativação de STAT3 e consequentemente do fenótipo da linhagem Th17.

Além da função quinase, a PKM2 no núcleo pode atuar como transativador gênico. HIF-1 α é altamente expresso em linfócitos Th17 e tem sido positivamente associado com a diferenciação dessas células por ativar a transcrição de *Rorc*. Além disso, HIF-1 α é capaz de recrutar p300 para formar um complexo com $ROR\gamma t$ na região promotora de genes como *Il17a*, auxiliando a polarização para Th17 (DANG et al., 2011; SHI et al., 2011). A expressão de HIF-1 α nestas células pode ser regulada positivamente por uma via dependente da atividade de STAT3 (DANG et al., 2011). Nesse sentido, tem sido demonstrado que além de fosforilar STAT3, a PKM2 pode interagir com HIF-1 α no núcleo e potencializar sua atividade de transcrição gênica, que inclui o próprio gene *Pkm2* (LUO et al., 2011). De uma forma global, é notável que existe um *feedback loop* entre PKM2-STAT3-HIF-1 α que, possivelmente, regula de forma positiva o programa genético de linfócitos em diferenciação para o perfil Th17. Entretanto, estudos adicionais necessitam ser conduzidos para se confirmar o exato mecanismo pelo qual PKM2 medeia esse processo.

Notavelmente, os resultados *in vitro* demonstraram uma importância da PKM2 na geração de linfócitos Th17. Sabendo que estas células são capazes de mediar a neuroinflamação autoimune observada na Esclerose Múltipla e Encefalomielite Autoimune Experimental, buscou-se avaliar se a PKM2 está envolvida na patogênese dessas desordens.

Na EM/EAE, os linfócitos Th17 passam a migrar para o SNC por volta do 10º dia após imunização secretando IL-17, a qual induz a produção quimiocinas (ex. CCL2, CCL20, CXCL1, CXCL2, CXCL8 etc.) e citocinas como IL-6 por células do tecido local,

além de produzir GM-CSF. Essa miríade de mediadores inflamatórios são responsáveis pelo recrutamento de células mielóides, incluindo neutrófilos e monócitos inflamatórios (LAROCHELLE; ALVAREZ; PRAT, 2011). A barreira hematoencefálica (BHE) é uma estrutura de proteção do SNC e consiste de células endoteliais especializadas unidas por extensas junções oclusivas, formando assim capilares com permeabilidade seletiva (ABBOTT et al., 2010). A IL-17 pode agir em receptores (IL-17R) expressos em células endoteliais da BHE e promover a produção de ROS, além de induzir a produção de mediadores, como as metaloproteinases da matriz (MMPs), pelas células do infiltrado, influenciando assim na perda da integridade da BHE (JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011). Isso facilita a entrada de células inflamatórias no parênquima do SNC, culminando na destruição da mielina.

Em uma análise global da expressão gênica durante o curso da doença, observou-se um grande aumento na expressão de *Pkm2* tanto nos órgãos linfóides periféricos, como no foco inflamatório (SNC), concomitante à expressão de genes inflamatórios relacionados ao perfil Th17 e patogênese da EAE. Notou-se ainda uma alta expressão proteica de PKM2 co-localizada com o infiltrado de células inflamatórias na medula espinal. De forma curiosa, a forma fosforilada de PKM2 (resíduo Y¹⁰⁵) também estava altamente expressa na medula espinal, sugerindo que a fosforilação/dimerização de PKM2 está relacionada com o papel pró-inflamatório das células infiltrantes do SNC, incluindo linfócitos Th17, ao longo do desenvolvimento da EAE.

Sabe-se que os linfócitos T CD4⁺ são as células que iniciam a resposta inflamatória autoreativa que culmina na desmielinização observada na EM/EAE. Como mencionado anteriormente, a IL-23 abundantemente produzida por APCs de origem mielóide, possui importante papel na expansão do fenótipo Th17 (MCGEACHY et al., 2009). Assim, a sinalização desencadeada pela IL-23/IL-23R em linfócitos Th17 gera uma reprogramação genética que a torna altamente patogênica (EL-BEHI et al., 2011; HIROTA et al., 2011). A patogenicidade dessa célula é marcada pela produção e secreção de GM-CSF, uma vez que esta citocina é importante no desenvolvimento e ativação de células mielóides, como os monócitos inflamatórios, que atuam no processo de desmielinização (EL-BEHI et al., 2011; SHIOMI; USUI, 2015; YANG et al., 2009). A sinalização via IL23R também leva a expressão de Tbet (*Tbx21*) e produção de IFN- γ por linfócitos Th17 de assinatura patogênica (LEE et al., 2012).

Nesse cenário, os animais *knockout* condicionais com EAE apresentaram menor

gravidade da doença, que foi associada a uma reduzida frequência de linfócitos Th17 e a uma resposta antígeno-específica insuficiente, uma vez que estas células produziram baixos níveis de IL-17, GM-CSF e IFN- γ quando expostas ao antígeno MOG₃₅₋₅₅ *in vitro*. Por outro lado, a população de Tregs (FoxP3⁺) nos órgãos linfóides periféricos não foi alterada pela deficiência de PKM2 em linfócitos T, corroborando com o fato de que a ausência de PKM2 não interferiu na diferenciação de Tregs *in vitro*, como demonstrado previamente neste trabalho. A deficiência específica de PKM2 causou ainda uma reduzida expressão de genes associados ao perfil Th17 no SNC dos animais, incluindo genes de citocinas assinatura da linhagem e do receptor de quimiocina CCR6 (*Ccr6*), amplamente expresso em linfócitos Th17. Confirmou-se ainda que linfócitos T CD4⁺ isolados do SNC de animais *knockout* condicionais acometidos pela EAE, de fato, apresentam uma baixa expressão gênica de marcadores associados ao fenótipo Th17 e sua patogenicidade, como as citocinas IL-17A (*Il17a*) e GM-CSF (*Csf2*), além dos fatores de transcrição Ror γ t (*Rorc*), Ror α (*Rora*) e Tbet (*Tbx21*). Estes achados podem explicar a reduzida gravidade da EAE observada nos animais CD4^{Cre}*Pkm2*^{flox/flox}.

O tratamento com inibidor da PKM2, o shikonin, tem sido recentemente empregado em estudos utilizando modelos animais de doenças inflamatórias. Nestes trabalhos, demonstrou-se que o tratamento com o inibidor foi capaz de reduzir a produção de mediadores inflamatórios por macrófagos ou prevenir a ativação de inflamassomas, aumentando a sobrevivência de animais à endotoxemia ou sepse (XIE et al., 2016; YANG et al., 2014b). Portanto, buscou-se avaliar no presente trabalho se o tratamento com inibidor da PKM2 atenuaria a progressão da EAE. Os animais tratados com shikonin apresentaram uma forte resistência ao desenvolvimento da doença, sendo associada à redução de linfócitos Th17 e baixa expressão de genes inflamatórios na medula espinal. Além disso, a reestimulação antigênica *in vitro* destas células induziu apenas uma branda resposta, refletindo em uma menor produção de IL-17, GM-CSF e IFN- γ . Os linfócitos T CD4⁺ isolados do SNC dos animais tratados ainda apresentaram menor expressão de genes associados à patogenicidade do perfil Th17. Por se tratar de uma inibição global, as células da imunidade inata como macrófagos, neutrófilos e monócitos inflamatórios, que contribuem para a desmielinização e são conhecidas por terem um perfil altamente inflamatório e glicolítico, eventualmente são afetadas pela inibição da PKM2, logo, isso

pode explicar a drástica redução dos sinais clínicos observada.

Os resultados descritos demonstram claramente que as abordagens envolvendo a inibição farmacológica de PKM2 ou sua deleção gênica específica em linfócitos T reduzem a diferenciação, expansão e expressão de moléculas efetoras características da subpopulação Th17. Em um contexto de doença autoimune, observou-se que essas abordagens foram capazes de reduzir os sintomas da Encefalomielite Autoimune Experimental, na qual os linfócitos Th17, em especial, medeiam a patogênese. Entretanto, embora sejam muitas as evidências de que PKM2 interage com moléculas conhecidamente envolvidas na diferenciação e função dos linfócitos Th17, como STAT3 e HIF-1 α , é necessário conduzir investigações adicionais para desvendar os exatos mecanismos pelos quais a PKM2 regula positivamente o desenvolvimento e função destas células.

6. Conclusão

O estudo demonstrou que a Piruvato Quinase M2 (PKM2) possui um papel regulador no processo de diferenciação de linfócitos Th17, por um mecanismo ainda desconhecido. Foi evidenciado ainda que o papel da PKM2 na geração destas células culmina em uma eficiente resposta efetora mediada por linfócitos Th17 na patogênese da Encefalomielite Autoimune Experimental, o modelo animal padrão da Esclerose Múltipla. Portanto, a PKM2 tem se mostrado um potencial alvo farmacológico para o tratamento de doenças inflamatórias autoimunes.

Referências

- ABBOTT, N. J. et al. Structure and function of the blood-brain barrier. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 1, p. 13–25, 2010.
- AKTAS, O.; KIESEIER, B.; HARTUNG, H. P. Neuroprotection, regeneration and immunomodulation: broadening the therapeutic repertoire in multiple sclerosis. **Trends in Neurosciences**, v. 33, n. 3, p. 140–152, 2010.
- ALMEIDA, L. et al. Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. **Seminars in Immunology**, v. 28, n. 5, p. 514–524, 2016.
- ALONSO, D.; NUNGESTER, W. J. Comparative study of host resistance of guinea pigs and rats v. the effect of pneumococcal products on glycolysis and oxygen uptake by polymorphonuclear leucocytes. **Journal of Infectious Diseases**, v. 99, n. 2, p. 174–181, 1956.
- ALVES-FILHO, J. C.; PÅLSSON-MCDERMOTT, E. M. Pyruvate kinase M2: A potential target for regulating inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. APR, p. 1–7, 2016.
- ANASTASIOU, D. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive Oxygen Species contributes to cellular Antioxydant responses. **Science**, v. 334, n. December, p. 1278–1283, 2011.
- ANASTASIOU, D. et al. Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis. **Nature Chemical Biology**, v. 8, n. 10, p. 839–847, out. 2012.
- ANDO, D. G. et al. Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. **Cellular Immunology**, v. 124, n. 1, p. 132–143, 1989.
- ARDAWI, M. S. M. Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by lungs of the rat. **Biochimie**, v. 73, n. 5, p. 557–562, 1991.
- ASCHERIO, A.; MUNGER, K. L.; LÜNEMANN, J. D. The initiation and prevention of multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 8, n. 11, p. 602–612, nov. 2012.
- ASHIZAWA, K. et al. An in Vitro Novel Mechanism of Regulating the Activity of Pyruvate Kinase M2 by Thyroid Hormone and Fructose 1,6-Bisphosphate. **Biochemistry**, v. 30, n. 29, p. 7105–7111, 1991.
- BABALOO, Z. et al. The role of Th17 cells in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: Interleukin-17A and interleukin-17F serum levels. **Immunology Letters**, v. 164, n. 2, p. 76–80, 2015.
- BARBI, J. Metabolic control of the Treg / Th17 axis. v. 4, n. 1, p. 52–77, 2013.
- BECHER, B.; DURELL, B. G.; NOELLE, R. J. JCI - Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 4, p. 493–497, 2002.

- BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235–238, 2006.
- BINGER, K. J.; CÔRTE-REAL, B. F.; KLEINWITFELD, M. Immunometabolic Regulation of Interleukin-17-Producing T Helper Cells: Uncoupling New Targets for Autoimmunity. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAR, p. 1–7, 21 mar. 2017.
- CHASTAIN, E. M. L. et al. The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 2, p. 265–274, 2011.
- CHEN, J. et al. Shikonin and its analogs inhibit cancer cell glycolysis by targeting tumor pyruvate kinase-M2. **Oncogene**, v. 30, n. 42, p. 4297–4306, 2011.
- CHEN, L.; FLIES, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 4, p. 227–242, 2013.
- CHEN, Z.; LAURENCE, A.; O'SHEA, J. J. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 6, p. 400–408, 2007.
- CHRISTOFK, H. R. et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. **Nature**, v. 452, n. 7184, p. 230–233, 2008.
- CROXFORD, A. L. et al. The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2+ Monocytes and Licenses Autoimmunity. **Immunity**, v. 43, n. 3, p. 502–514, 2015.
- CUA, D. J. et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. **Nature**, v. 421, n. 6924, p. 744–748, 2003.
- DANG, E. V. et al. Control of TH17/Treg balance by hypoxia-inducible factor 1. **Cell**, v. 146, n. 5, p. 772–784, 2011.
- DAVID, C. J. et al. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. **Nature**, v. 463, n. 7279, p. 364–368, 2010.
- DELGOFFE, G. M. et al. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. **Nature Immunology**, v. 12, n. 4, p. 295–303, 2011.
- DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 9, p. 545–558, 2015.
- DOMBRAUCKAS, J. D.; SANTARSIERO, B. D.; MESECAR, A. D. Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis. **Biochemistry**, v. 44, n. 27, p. 9417–9429, 2005.
- DURANT, L. et al. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell

- pathogenicity and homeostasis. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 605–615, 2010.
- DURELLI, L. et al. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon- β . **Annals of Neurology**, v. 65, n. 5, p. 499–509, 2009.
- DÜVEL, K. et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. **Molecular Cell**, v. 39, n. 2, p. 171–183, 2010.
- EISENSTEIN, E. M.; WILLIAMS, C. B. The Treg/Th17 cell balance: A new paradigm for autoimmunity. **Pediatric Research**, v. 65, n. SUPPL. 5, p. 26–31, 2009.
- EL-BEHI, M. et al. The encephalitogenicity of TH17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. **Nature Immunology**, v. 12, n. 6, p. 568–575, 2011.
- FRAUWIRTH KA, RILEY JL, HARRIS MH, PARRY RV, RATHMELL JC, ET AL. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. **Immunity**, v. 16, p. 769–777, 2002.
- FRIESE, M. A.; SCHATTLING, B.; FUGGER, L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 4, p. 225–238, 2014.
- GABER, T.; STREHL, C.; BUTTGEREIT, F. Metabolic regulation of inflammation. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 5, p. 267–279, 2017.
- GAFFEN, S. L. et al. The IL-23–IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 9, p. 585–600, 2014.
- GANESHAN, K.; CHAWLA, A. Metabolic Regulation of Immune Responses. **Annual Review of Immunology**, v. 32, n. 1, p. 609–634, 2014.
- GAO, X. et al. Pyruvate Kinase M2 Regulates Gene Transcription by Acting as a Protein Kinase. **Molecular Cell**, v. 45, n. 5, p. 598–609, 2012.
- GERMAIN, R. N. T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 5, p. 309–322, 2002.
- GERRIETS, V. A.; RATHMELL, J. C. Metabolic pathways in T cell fate and function. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 4, p. 168–172, 2012.
- GRAN, B. et al. IL-12p35-Deficient Mice Are Susceptible to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Evidence for Redundancy in the IL-12 System in the Induction of Central Nervous System Autoimmune Demyelination. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 12, p. 7104–7110, 2002.
- HEMMER, B.; SELTER. Update on immunopathogenesis and immunotherapy in multiple sclerosis. **ImmunoTargets and Therapy**, v. 2, n. April, p. 21, 2013.
- HIRAHARA, K. et al. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in

- Th17 cell differentiation. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 21, n. 6, p. 425–34, 2010.
- HIROTA, K. et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. **Nature Immunology**, v. 12, n. 3, p. 255–263, 2011.
- HITOSUGI, T. et al. Tyrosine Phosphorylation Inhibits PKM2 to Promote the Warburg Effect and Tumor Growth. **Science Signaling**, v. 2, n. 97, p. ra73-ra73, 17 nov. 2009.
- HUDSON, C. C. et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 20, p. 7004–14, 2002.
- HUPPA, J. B.; DAVIS, M. M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 12, p. 973–983, 2003.
- IKEJIRI, A. et al. Dynamic regulation of Th17 differentiation by oxygen concentrations. **International Immunology**, v. 24, n. 3, p. 137–146, 2012.
- IMAMURA, K.; TANAKA, T. Multimolecular Forms of Pyruvate Kinase from Rat and Other Mammalian Tissues. **Journal of Biochemistry**, v. 71, n. 6, p. 1043–1051, 1972.
- IQBAL, M. A. et al. Pyruvate kinase M2 and cancer: An updated assessment. **FEBS Letters**, v. 588, n. 16, p. 2685–2692, 2014.
- ISRAESEN, W. J.; VANDER HEIDEN, M. G. Pyruvate kinase: Function, regulation and role in cancer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 43, p. 43–51, 2015.
- IVANOV, I. I. et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121–1133, set. 2006.
- JADIDI-NIARAGH, F.; MIRSHAFIEY, A. Th17 Cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 74, n. 1, p. 1–13, 2011.
- KIM, J. W. et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 3, p. 177–185, 2006.
- KOCH, U.; RADTKE, F. Mechanisms of T Cell Development and Transformation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, n. 1, p. 539–562, 2011.
- KOMIYAMA, Y. et al. IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 1, p. 566–573, 2006.
- KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 485–517, 2009.

- LANGRISH, C. L. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 2, p. 233–240, 2005.
- LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274–293, 2012.
- LAROCHELLE, C.; ALVAREZ, J. I.; PRAT, A. How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? **FEBS Letters**, v. 585, n. 23, p. 3770–3780, 2011.
- LEE, Y. et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. **Nature Immunology**, v. 13, n. 10, p. 991–999, 2012.
- LEGROUX, L.; ARBOUR, N. Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 528–546, 2015.
- LINKE, M. et al. mTORC1 and mTORC2 as regulators of cell metabolism in immunity. **FEBS Letters**, p. 1–15, 2017.
- LUO, W. et al. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. **Cell**, v. 145, n. 5, p. 732–744, 2011.
- LUO, W.; SEMENZA, G. L. Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 11, p. 560–566, nov. 2012.
- LV, L. et al. Mitogenic and Oncogenic Stimulation of K433 Acetylation Promotes PKM2 Protein Kinase Activity and Nuclear Localization. **Molecular Cell**, v. 52, n. 3, p. 340–352, 2013.
- MACINTYRE, A. N. et al. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 1, p. 61–72, 2014.
- MACINTYRE, A. N.; RATHMELL, J. C. Activated lymphocytes as a metabolic model for carcinogenesis. **Cancer & Metabolism**, v. 1, n. 1, p. 5, 2013.
- MACIOLEK, J. A.; ALEX PASTERNAK, J.; WILSON, H. L. Metabolism of activated T lymphocytes. **Current Opinion in Immunology**, v. 27, n. 1, p. 60–74, 2014.
- MACIVER, N. J.; MICHALEK, R. D.; RATHMELL, J. C. Metabolic Regulation of T Lymphocytes. **Annual Review of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 259–283, 2013.
- MAILLARD, I. et al. The requirement for Notch signaling at the β -selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-T cell receptor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 10, p. 2239–2245, 2006.
- MANGAN, P. R. et al. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231–234, 2006.

- MARIK, C. et al. Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis: a role for innate immunity? **Brain**, v. 130, n. 11, p. 2800–2815, 5 abr. 2007.
- MCCARTHY, D. P.; RICHARDS, M. H.; MILLER, S. D. Mouse Models of Multiple Sclerosis: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Theiler's Virus-Induced Demyelinating Disease. **Methods Mol Biol**, v. 900, p. 381–401, 2012.
- MCGEACHY, M. J. et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17–producing effector T helper cells in vivo. **Nature Immunology**, v. 10, n. 3, p. 314–324, 2009.
- MICHALEK, R. D. et al. Cutting Edge: Distinct Glycolytic and Lipid Oxidative Metabolic Programs Are Essential for Effector and Regulatory CD4+ T Cell Subsets. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 6, p. 3299–3303, 2011.
- MURANSKI, P.; CHMIELOWSKI, B.; IGNATOWICZ, L. Mature CD4+ T cells perceive a positively selecting class II MHC/peptide complex in the periphery. **J Immunol**, v. 164, n. 6, p. 3087–3094, 2000.
- NELSON, D.; COX, M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. Sixth edit ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2013.
- NETZKER, R. et al. Cell cycle-associated expression of M2-type isozyme of pyruvate kinase in proliferating rat thymocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 9, p. 6421–6424, 1992.
- NOGUCHI, T. et al. The L- and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 29, p. 14366–14371, 1987.
- NOGUCHI, T.; INOUE, H.; TANAKA, T. The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 29, p. 13807–13812, 1986.
- O'GORMAN, C.; LUCAS, R.; TAYLOR, B. Environmental risk factors for multiple sclerosis: A review with a focus on molecular mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 9, p. 11718–11752, 2012.
- O'NEILL, L. A. J.; KISHTON, R. J.; RATHMELL, J. A guide to immunometabolism for immunologists. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 553–565, 2016.
- O'SULLIVAN, D.; PEARCE, E. L. Targeting T cell metabolism for therapy. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 2, p. 71–80, 2015.
- OPPMANN, B. et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity**, v. 13, n. 5, p. 715–725, 2000.
- OREN, R. et al. Metabolic patterns in three types of phagocytizing cells. **The Journal of cell biology**, v. 17, p. 487–501, 1963.

- PALAZON, A. et al. HIF Transcription Factors, Inflammation, and Immunity. **Immunity**, v. 41, n. 4, p. 518–528, 2014.
- PALMER, C. S. et al. Glucose metabolism regulates T cell activation, differentiation, and functions. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JAN, p. 1–6, 2015.
- PALSSON-MCDERMOTT, E. M. et al. Pyruvate kinase M2 regulates hif-1 α activity and il-1 β induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. **Cell Metabolism**, v. 21, n. 1, p. 65–80, 2015.
- PEARCE, E. L. et al. Fueling Immunity: Insights into Metabolism and Lymphocyte Function. **Science**, v. 342, n. 6155, p. 1242454–1242454, 11 out. 2013.
- RANSOHOFF, R. M.; HAFLER, D. A.; LUCCHINETTI, C. F. Multiple sclerosis—a quiet revolution. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. 3, p. 134–142, 2015.
- RATHMELL, J. C. et al. IL-7 Enhances the Survival and Maintains the Size of Naive T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 12, p. 6869–6876, 2001.
- SEGAL, B. M.; DWYER, B. K.; SHEVACH, E. M. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. **The Journal of experimental medicine**, v. 187, n. 4, p. 537–46, 16 fev. 1998.
- SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. **Cell**, v. 148, n. 3, p. 399–408, 2012.
- SHI, L. Z. et al. HIF1 α –dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of T_H 17 and T_{reg} cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 7, p. 1367–1376, 2011.
- SHIOMI, A.; USUI, T. Pivotal roles of GM-CSF in autoimmunity and inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.
- SHIRAI, T. et al. The glycolytic enzyme PKM2 bridges metabolic and inflammatory dysfunction in coronary artery disease. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 3, p. 337–354, 2016.
- SONDEREGGER, I. et al. GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6–dependent Th17 cell development and survival. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 10, p. 2281–2294, 2008.
- SOSPEDRA, M. et al. Redundancy in Antigen-Presenting Function of the HLA-DR and -DQ Molecules in the Multiple Sclerosis-Associated HLA-DR2 Haplotype. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 3, p. 1951–1961, 2006.
- STÖGER, J. L. et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 225, n. 2, p. 461–468, 2012.
- STROMNES, I. M.; GOVERMAN, J. M. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. **Nature Protocols**, v. 1, n. 4, p. 1810–1819, 2006.

- SUN, Q. et al. Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 10, p. 4129–4134, 2011.
- TRAPP, B. D.; NAVE, K.-A. Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder? **Annual Review of Neuroscience**, v. 31, n. 1, p. 247–269, jan. 2008.
- TZARTOS, J. S. et al. Interleukin-17 Production in Central Nervous System-Infiltrating T Cells and Glial Cells Is Associated with Active Disease in Multiple Sclerosis. **The American Journal of Pathology**, v. 172, n. 1, p. 146–155, 2008.
- VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 2009.
- VELDHOEN, M. et al. Signals mediated by transforming growth factor- β initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. **Nature Immunology**, v. 7, n. 11, p. 1151–1156, 2006.
- WAICKMAN, A. T.; POWELL, J. D. mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function. **Immunological Reviews**, v. 249, n. 1, p. 43–58, 2012.
- WANG, R. et al. The Transcription Factor Myc Controls Metabolic Reprogramming upon T Lymphocyte Activation. **Immunity**, v. 35, n. 6, p. 871–882, 2011.
- WANG, R.; GREEN, D. R. Metabolic checkpoints in activated T cells. **Nature Immunology**, v. 13, n. 10, p. 907–915, 2012.
- WARBURG, O.; GAWEHN, K.; GEISLER, A. [Metabolism of leukocytes]. **Z Naturforsch**, v. 13B, p. 515–516, 1958.
- WU, G. F.; ALVAREZ, E. The Immunopathophysiology of Multiple Sclerosis. **Neurologic Clinics**, v. 29, n. 2, p. 257–278, 2011.
- XIE, M. et al. PKM2-dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. **Nature Communications**, v. 7, p. 13280, 2016.
- YANG, J. et al. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 10, p. 493–500, 2014a.
- YANG, L. et al. PKM2 regulates the Warburg effect and promotes HMGB1 release in sepsis. **Nature Communications**, v. 5, p. 4436, jan. 2014b.
- YANG, W. et al. Nuclear PKM2 regulates β -catenin transactivation upon EGFR activation. **Nature**, v. 478, n. 7375, p. 118–122, 2011.
- YANG, W. et al. ERK1/2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect. **Nature Cell Biology**, v. 14, n. 12, p. 1295–1304, 2012a.

- YANG, W. et al. PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis. **Cell**, v. 150, n. 4, p. 685–696, 2012b.
- YANG, W.; LU, Z. Pyruvate kinase M2 at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 9, p. 1655–1660, 2015.
- YANG, X. O. et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 13, p. 9358–9363, 2007.
- YANG, X. O. et al. T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors ROR α and ROR γ . **Immunity**, v. 28, n. 1, p. 29–39, jan. 2008.
- YANG, Y. et al. T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 7, p. 1549–1564, 2009.
- ZHOU, L. et al. TGF- β -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. **Nature**, v. 453, n. 7192, p. 236–240, 2008.
- ZHOU, L.; CHONG, M. M. W.; LITTMAN, D. R. Plasticity of CD4⁺ T Cell Lineage Differentiation. **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 646–655, 2009.

Anexos

Anexo 1. Aprovação do comitê de ética em experimentação animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Envolvimento da enzima Piruvato Quinase M2 (PKM2) na diferenciação de linfócitos Th17 e patogênese da encefalomielite autoimune experimental*”, registrado com o número **098/2016**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 27 de junho de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 198 camundongos C57Bl/6 machos pesando 22g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 72 camundongos CD4-Cre+/PKM2fl/fl machos pesando 22g e 72 camundongos CD4-Cre+/PKM2wt/wt machos pesando 22g oriundos do Biotério do Departamento de Clínica Médica de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 27/06/2016 a 17/07/2021.

We certify that the Protocol nº 098/2016, entitled “*Involvement of the enzyme Pyruvate Kinase M2 (PKM2) in the differentiation of Th17 lymphocytes and pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 06/27/2016. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 198 male C57Bl/6 mice weighing 22g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo; 72 male CD4-Cre+/PKM2fl/fl mice weighing 22g and 72 male CD4-Cre+/PKM2wt/wt mice weighing 22g from the Animal House of Department of Internal Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 07/17/2021.

Ribeirão Preto, 27 de junho de 2016

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP