

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA**

LORENA CARLA OLIVEIRA DA COSTA

**Expressão da proteína 1 de maturação induzida por linfócitos B
(BLIMP-1) na pele e a sua participação na resposta Th17 na
psoríase**

**Ribeirão Preto
2023**

LORENA CARLA OLIVEIRA DA COSTA

**Expressão da proteína 1 de maturação induzida por linfócitos B
(BLIMP-1) na pele e a sua participação na resposta Th17 na
psoríase**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientadora: Profa. Dra. Cacilda da Silva
Souza

“Versão corrigida”

**Ribeirão Preto
2023**

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.

Costa, Lorena Carla Oliveira da
Expressão da proteína 1 de maturação induzida por linfócitos B
(BLIMP-1) na pele e a sua participação na resposta Th17 na psoríase.
Ribeirão Preto, 2023.

127 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Doutorado Direto, apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica
Médica, Divisão de Dermatologia.

Orientadora: Souza, Cacilda da Silva.

1. Psoríase. 2. Proteína BLIMP-1. 3. Proteína 1 de Maturação
induzida por Linfócitos B. 4. Fator 1 de Ligação ao Domínio I
Regulador Positivo. 5. Gene PRDM1. 6. Fatores de Transcrição. 7.
Citocinas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Lorena Carla Oliveira da Costa

Título: Expressão da proteína 1 de maturação induzida por linfócitos B (BLIMP-1) na pele e sua participação na resposta Th17 na psoríase.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Cacilda da Silva
Souza

Aprovado em: 23/02/2023

Banca Examinadora

Profa. Dra. Cacilda da Silva Souza

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Maria Carolina de Oliveira Rodrigues

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -Universidade de São Paulo

Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Renata Ferreira Magalhães

Instituição: Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

DEDICATÓRIA

Ao Imaculado Coração de Maria, e à Santíssima Trindade.

Aos meus queridos avós (*in memoriam*), Gessy e Francisco, Maria e Raimundo, de bendita memória;

Aos meus amados pais, Wilson e Maria Eneide;

À minha linda irmã, Olívia;

Ao meu querido tio, Tio Carlos;

E a todos os meus pacientes.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Cacilda da Silva Souza, minha especial gratidão, por ser valiosa referência profissional e humanística, e importante ponto de apoio e sustentação, especialmente nos momentos mais desafiadores deste percurso;

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, pela co-orientação e acolhimento em seu laboratório;

À Bióloga Dra. Cristiane Milanezi, pelas orientações, amizade, incentivo e paciência;

Ao Prof. Dr. Luiz Gustavo Gardinassi, pela generosa contribuição científica, bondade e dedicação a esse trabalho; ao Prof. Dr. José Carlos Alves Filho, à Profa. Dra. Leandra Naira Zambelli Ramalho e à Profa. Dra. Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos, pela contribuição científica e acolhimento em seus laboratórios;

Ao Flavio Protásio Vera e à Deisy Mara da Silva, pela contribuição com os exames histopatológico e de imunofluorescência; à Paula Barbim Donate Yabuta, pelo auxílio nas análises de dados;

Ao Emerson Quirino de Oliveira e à Ana Cristine Silva Ferreira, pelo auxílio na área administrativa,

À Olívia Oliveira da Costa, ao Dustin Paul Wilson Henry e ao João Lucas Dourado do Val pela contribuição na área de informática e formatação;

À Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, onde cursei Medicina e à Faculdade de Medicina de Marília - FAMEMA, onde conclui a Residência Médica em Dermatologia;

Aos funcionários, estudantes, residentes, médicos assistentes, colaboradores e professores do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto;

Aos pacientes do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, que generosamente participaram e permitiram a realização deste estudo;

Ao Programa de Pós-graduação em Clínica Médica, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e à Universidade de São Paulo e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001;

A todos os meus amigos e familiares_ meus queridos sabem quem são_, os quais longe ou perto, contribuíram com seu carinho, conselhos, orações e apoio nesse caminho de acervo acrisolamento e intangível aprendizado, aos meus amigos-família *pets*, Dynah (*in memorian*), Lolão (*in memorian*), Winnie e Cora Coralinda.

À Santa Teresinha do Menino Jesus e da Sagrada face e ao meu Anjo da Guarda.

A todos, muito obrigada, paz e bem!

Este estudo foi apoiado pelo Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias (CRID), Fundo de Apoio à Dermatologia do Estado de São Paulo – Sebastião Sampaio – (FUNADERSP), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*"Porque onde está o teu tesouro, lá também está teu coração."
(Mt 6, 21)*

*"A fé e a razão são como as duas asas com as quais o espírito humano se eleva à
contemplação da verdade."
(São João Paulo II)*

"Não existem doenças, existem doentes."

RESUMO

COSTA, L.C.O. **Expressão da proteína 1 de maturação induzida por linfócitos B (BLIMP-1) na pele e sua participação na resposta Th17 na psoríase.** 2023. Tese (Doutorado Direto em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A proteína 1 de maturação induzida por linfócitos do fator B de transcrição (Blimp-1) está implicado na diferenciação de células T helper 17 (Th17). O presente estudo buscou investigar a expressão da proteína Blimp-1, gene do domínio regulatório positivo 1 (*PRDM1*) e genes de citocinas na psoríase (PsO) relacionados ao programa inflamatório Th17. Amostras de pele afetada (PA-PsO) e pele não afetada (PNA-PsO) de pacientes foram usadas para avaliar a expressão gênica e proteica por PCR quantitativo de transcrição reversa (RT-qPCR), e microscopia confocal com imunofluorescência, respectivamente; e os dados transcriptômicos foram acessados para análises de expressão gênica diferencial. Os transcritos de *PRDM1* e *IL17A* foram elevados ($p < 0,001$) em PA-PsO comparada à PNA-PsO ($n = 34$). A microscopia confocal mostrou expressão da proteína Blimp-1 nos queratinócitos de todas as camadas da epiderme na PA-PsO, mas não na PNA-PsO. A análise bioinformática do conjunto de dados de transcriptoma público GSE13355 mostrou aumento da expressão gênica de *PRDM1*, transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (*STAT3*), *IL12B*, *TNF*, *IL17A*, *IL6*, *IL1B*, *IL22* e *IL10* ($p < 0,001$) em PA-PsO em comparação com pele normal (PNC) e PNA-PsO. A expressão gênica de *PRDM1* se correlacionou positivamente ($p < 0,0001$) com as expressões gênicas de *IL17A* ($r = 0,7$), *IL1B* ($r = 0,67$), *IL12B* ($r = 0,6$), *IL6* ($r = 0,59$), *IL22* ($r = 0,53$), *IL23A* ($r = 0,47$), *IL21* ($r = 0,47$), *IL27* ($r = 0,34$), *IL23R* ($r = 0,32$), S100 proteína de ligação ao cálcio A9 ($r = 0,63$) e lipocalina 2 ($r = 0,50$), e negativamente com as expressões de *TGFB1* ($r = -0,28$) e *RORC* ($r = -0,60$). O Blimp-1 parece desempenhar um papel crítico na patogênese da desregulação da PsO envolvendo o eixo inflamatório IL-23/Th17. Tal conhecimento pode acelerar o desenvolvimento de novos tratamentos.

Palavras-Chaves: Psoríase, BLIMP1, Proteína 1 de Maturação induzida por Linfócitos B, Fator 1 de Ligação Domínio I Regulador Positivo, PRDM1, Inflamação, Citocinas

ABSTRACT

COSTA, L.C.O. **Expression of B lymphocyte-induced maturation protein 1 (BLIMP-1) in the skin and its participation in the Th17 response in psoriasis.** 2023. Tese (Doutorado Direto em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Transcriptional factor B lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp-1) is implicated in T helper 17 (Th17) cell differentiation. This study investigated expression of the Blimp-1 protein, positive regulatory domain 1 (*PRDM1*), and cytokine genes in psoriasis (PsO). Affected (AS-PsO) and non-affected skin (nAS-PsO) samples were used to assess gene and protein expressions by reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR), and immunofluorescence confocal microscopy, respectively; the normalized public transcriptomic data permitted differential gene expression analyses. On RT-qPCR, *PRDM1* and *IL17A* transcripts showed higher expression in AS-PsO than in nAS-PsO (n = 34) ($p < 0.001$; $p < 0.0001$, respectively). Confocal microscopy showed Blimp-1 protein expression in epidermal layer keratinocytes in AS-PsO, but not in nAS-PsO. Bioinformatic analysis of the transcriptomic dataset GSE13355 corroborated the increased *PRDM1*, signal transducer and activator of transcription 3 (*STAT3*), *IL12B*, *TNF*, *IL17A*, *IL6*, *IL1B*, *IL22*, and *IL10* gene expression in AS-PsO, when compared to normal skin and nAS-PsO ($p < 0.001$). *PRDM1* expression correlated positively ($p < 0.0001$) with that of *IL17A* ($r = 0.7$), *IL1B* ($r = 0.67$), *IL12B* ($r = 0.6$), *IL6* ($r = 0.59$), *IL22* ($r = 0.53$), *IL23A* ($r = 0.47$), *IL21* ($r = 0.47$), *IL27* ($r = 0.34$), *IL23R* ($r = 0.32$), S100 calcium binding protein A9 ($r = 0.63$), and lipocalin 2 ($r = 0.50$), and negatively with that of *TGFB1* ($r = -0.28$) and *RORC* ($r = -0.60$). Blimp-1 may be critical in the pathogenesis of PsO dysregulation involving the IL-23/Th17 inflammatory axis. This knowledge may accelerate the development of new treatments.

Keywords: Psoriasis, BLIMP1, B Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1, Positive Regulatory Domain I-Binding Factor 1, PRDM1, Inflammation, Cytokines

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos imunopatogênicos na psoríase.....	40
Figura 2 - Análise de PCR quantitativa em tempo real de genes selecionados na pele afetada e pele não afetada de pacientes com psoríase.	70
Figura 3 - Análise de imunofluorescência confocal da psoríase.....	71
Figura 4 - Expressão gênica de domínio regulatório positivo 1 (PRDM1), codificadores de fatores de transcrição e de proteínas imunes na psoríase (PsO).....	73
Figura 5 - Expressão gênica de codificadores de citocinas indutoras envolvidas no programa inflamatório das células Th17.	74
Figura 6 - Expressão gênica de codificadores citocinas efetoras e receptores associados ao eixo IL-23/Th17 na psoríase.....	75
Figura 7 - Expressão gênica de codificadores de citocinas potencialmente envolvidas na expressão do BLIMP-1.).....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Primers e sondas RT-qPCR pré-validadas e empregadas no estudo.....	66
Tabela 2 - Dados demográficos e clínicos do grupo estudado.....	69
Tabela 3 - Comparação entre a expressão gênica na pele afetada e não afetada de pacientes com psoríase e pele normal de controles	77
Tabela 4 - Correlação entre a expressão gênicas do <i>PRDM1</i> , fatores de transcrição, citocinas e proteínas imunes na psoríase	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critérios utilizados para a classificação da psoríase	45
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Antes de Cristo
ADAMTSL5	<i>Metalloprotease domain containing thrombospondin type 1 motif-like 5</i> / Desintegrina e metaloprotease com domínio trombospondina tipo 1 motivo-5
AhR	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i> / Receptor aril-hidrocarboneto
AMPs	<i>Antimicrobial peptides</i> / Peptídeos antimicrobianos
ANOVA	Análise de variância
AP-1	<i>Activator protein-1</i> / Proteína ativadora-1
Aps	Artrite psoriásica
ASDAS	<i>Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score</i> / Escore de atividade da Espondilite Anquilosante
AS-PsO	<i>Affected skin-Psoriasis</i> / Pele Afetada pela Psoríase
B2M	Beta 2-microglobulina
BASDAI	<i>Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index</i> / Índice de Atividade da Doença de Espondilite Anquilosante do Banho
Bcl-6	<i>B-cell lymphoma 6</i>

Blimp-1	<i>B lymphocyte-induced maturation protein-1</i> / Proteína 1 de maturação induzida por linfócitos B
BrdU	Nucleotídeo sintético 5-bromo-2-deoxiuridina
BSA	<i>Body surface area</i>
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CARD14	<i>Caspase Recruitment Domain Family Member 14</i>
CASPAR	<i>Classification for Psoriatic Arthritis</i> / Classificação de Artrite Psoriásica
Cat#	número de catálogo
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i>
CCR	Receptor de quimiocina
CD	<i>Cluster of differentiation</i> / Grupamento de diferenciação
cDNA	DNA complementar
C / EBP-b	Proteína de ligação do potenciador CCAAT beta
CKO	<i>Conditional Knockout</i> / <i>Knockout</i> condicional
c-Maf	<i>Musculoaponeurotic fibrosarcoma</i>

C-myc	Referência ao gene c-MYC que codifica uma proteína que desempenha papel na regulação do ciclo celular
CNS	Conselho Nacional de Saúde
Cq.	<i>Quantification cycle</i>
Csf2	<i>Colony Stimulating Factor 2</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DAMPs	<i>Damage-associated molecular pattern</i> / Padrão moleculares associado a danos
DAPI	Dicloridrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DAS28	<i>28-joint Disease Activity Score</i>
DC	Depois de Cristo
DCs	<i>Dendritic cells</i> / Células dendríticas
DCV	Doenças cardiovasculares
DEPC	Dimetilpirocarbonato
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DII	Doença inflamatória intestinal
DLQI	<i>Dermatology Life Quality Index</i> / Índice de Qualidade de Vida em Dermatologia

DNA	<i>Deoxyribonucleic acid / Ácido desoxirribonucleico</i>
DNase	Deoxyribonuclease
Dusp16	<i>Dual Specificity Phosphatase 16</i>
Ebi3	Subunidade da citocina IL-27 e IL-35
EDC	Complexo de diferenciação epidérmica
ERAP1	<i>Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration / Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos</i>
Fos	Proto-oncogene Fos
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GATA3	Do inglês, GATA binding protein 3
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating fator / Fator estimulador de colônia de granulócitos</i>
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating fator / Fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos</i>
GSE	<i>Gene set enrichment</i>

GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i> / Estudos de Associação Ampla do Genoma
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> / Vírus da imunodeficiência humana
HLA	<i>Human Leukocyte Antigens</i> / Antígenos leucocitários humanos
IC	Intervalo de confiança
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IL-23R	Receptor de interleucina 23
IL-27R	Receptor de interleucina 27
IL-6gp130	Subunidade gp130 da IL-6
IRF4	Fator regulador de interferon 4
JAK	Janus Kinase / Janus quinase
K	Citoqueratina

LCE	<i>Late cornified envelope</i> / Envelope cornificado tardio
LL-37	Porção C-terminal da catelicidina humana / alternativamente conhecido como CAMP
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> / Complexo principal de histocompatibilidade
MnCl ₂	Cloreto de Manganês
nAS-PsO	<i>Non-affected skin</i> / Pele não-afetada pela psoríase
Nfat5	Fator nuclear das células T ativadas 5
NF-κB	<i>Nuclear factor-kappa B</i> / Fator nuclear-kappa B
NOD	<i>Nonobese diabetic</i>
NS	Não significativa
OMiCC	OMics Compendia Commons
p19	Subunidade p19 da citocina IL-23
p28	Subunidade p28 da citocina IL-27
p300	Histona acetiltransferase p300
p40	Subunidade p40 da citocina IL-23 e IL-12

PA-PsO	Pele Afetada pela Psoríase
PASI 90	Redução de 90% do valor de PASI
PASI	<i>Psoriasis Area Severity Index</i> / Índice de gravidade de psoríase por área
PAX5	Paired Box 5
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> / Reação em cadeia da polymerase
pDCs	Células dendríticas plasmocitoides
PGA	<i>Physician Global Assessment</i> / Avaliação global do médico
PNA-PsO	Pele Não Afetada pela Psoríase
PNC	Pele Normal de Controles saudáveis
<i>PRDM1</i>	Domínio regulatório positivo da proteína 1
<i>Prdm1^{fl/fl}Rosa-YFP^{fl}Dick^{cre}</i>	Referência ao camundongo nocaute condicional flanqueado em homozigose (<i>floxed/floxed</i>) para <i>Prdm1</i> (<i>Blimp-1</i>), e as demais manipulações gênicas, como se segue:
<i>Rosa-YFP</i>	Referência à geração de camundongos com expressão gene repórter <i>Rosa-YFP</i> (<i>Yellow Fluorescent Protein</i>) inserida no <i>locus Rosa</i> . O <i>locus Rosa26</i> [Gt(ROSA)26Sor], é um sítio genético específico localizado no cromossomo

6 do camundongo e considerado um dos locais ideais onde os *knock-ins* de interesse podem ser direcionados.

Cre

Referência à expressão da recombinase *Cre* (*Cyclization Recombinase protein*). A fim de inativar seletivamente os genes de uma maneira específica do tecido. Nas linhagens de camundongos transgênicos *Cre* a recombinase *Cre* é expressa sob o controle de um promotor específico do tecido.

Dlck^{Cre}

Distal-Ick é um promotor ativado após a seleção positiva de timócitos e conduz a recombinação mediada por *Cre* especificamente no compartimento de células T maduras periféricas.

Cd4cre

Referência à expressão da recombinase *Cre* em células T que expressam CD4 durante estágios sequenciais do seu desenvolvimento em tecidos linfoides.

Lckcre

Referência ao camundongo transgênico *Lck-Cre*, que usa o promotor proximal do gene *Lck* (linfócito proteína tirosina quinase), que é expresso pela primeira vez no início do desenvolvimento do timócito no estágio duplo negativo.

PRRs

Receptores de reconhecimento padrão

PSORS

Psoriasis susceptibility / suscetibilidade à psoríase

pTreg

Células T regulatórias periféricas

RNA

Ribonucleic acid / Ácido ribonucleico

RNAm

RNA mensageiro

RNAr	RNA ribossômico
ROR γ t	<i>RAR-Related Orphan receptor-γt</i>
<i>Rora</i>	<i>RAR-Related Orphan Receptor A</i>
<i>Rorc.</i>	<i>RAR- Related Orphan Receptor C</i>
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RR	Razões de risco
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription - Quantitative Polymerase Chain Reaction/</i> Transcrição reversa da Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RWA	<i>RNA wash solution</i>
S100	<i>Calcium binding protein /</i> Proteína ligadora de cálcio
SBD	Sociedade Brasileira de Dermatologia
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription /</i> Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição
T-bet	T-box expressed in T cells
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCR	Receptor de células T
Thf	<i>T helper</i> foliculares
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i> / Fator de transformação do crescimento beta
Th	T helper / T auxiliares
TLR	<i>Toll like receptor</i> / Receptores tipo toll
TNF-a	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> / Fator de Necrose Tumoral alfa
Tr1	T reguladoras 1
Treg	T regulatórias
UTI	Unidade de terapia intensiva
UVA	Ultravioleta A

LISTA DE SÍMBOLOS

>	Maior
<	Menor
+	Mais/Positivo
-	Menos/Negativo
=	Igual
%	Porcentagem/ Por cento
:	Razão/ Relação
α	<i>Alpha</i> / Alfa
β	<i>Beta</i> / Beta
γ	<i>Gamma</i> / Gama
nº/ #	Número
TM	<i>Trade mark</i> / Marca registrada
Mm	Milímetro
mL	Mililitros
G	Unidades de Gravidade

° C	Graus Celsius
Nm	Nanômetro
µL	Microlitros
-ΔΔCt	- Delta Delta Ct
R	Coeficiente de Correlação de Spearman
vs / x	Versus
P	Nível descritivo ou probabilidade de significância
R ²	Coeficiente de determinação

SUMÁRIO

Capítulo 1: Introdução.....	26
1.1 Epidemiologia, aspectos clínicos e histopatológicos da Psoríase	27
1.1.1 Epidemiologia.....	27
1.1.2 Aspectos Clínicos.....	28
1.1.2.1 Psoríase Vulgar.....	28
1.1.2.2 Psoríase Gotada	29
1.1.2.3 Psoríase Pustulosa Generalizada.....	29
1.1.2.4 Pustulose palmoplantar.....	30
1.1.2.5 Psoríase Eritrodérmica.....	30
1.1.2.6 Psoríase Invertida	31
1.1.2.7 Doença das unhas (onicodistrofia psoriática)	31
1.1.3 Aspectos histopatológicos	32
1.3 Comorbidades da psoríase.....	34
1.4 Etiopatogenia da Psoríase.....	37
1.4.1 Fatores genéticos.....	37
1.4.2. Sistema Imune e Psoríase	39
1.4.2.1 Circuitos imunológicos celulares e moleculares na psoríase	40
1.4.2.2 Autoantígenos e autoimunidade para psoríase.....	41
1.4.2.3 Desequilíbrio de citocinas e quimiocinas na psoríase.....	42
1.5 Bases terapêuticas da psoríase	44
1.6 Blimp-1 e o gene codificador <i>PRDM1</i>	47
1.6.1 Aspectos gerais da proteína Blimp-1.....	48
1.6.2 Funções essenciais do Blimp-1 na regulação e produção de citocinas	48
1.6.3 Blimp-1 na homeostase das células T.....	51
1.6.4 Blimp-1 na homeostase dos queratinócitos.....	56
Capítulo 2: Objetivos.....	59
2.1- Objetivos gerais:.....	60
2.2- Objetivos específicos:.....	60
3.1 Amostra do estudo	69

3.2 RT-qPCR	69
3.4 Microscopia de fluorescência confocal	70
3.2 Análise bioinformática de banco de transcriptoma público	72
Capítulo 4: Discussão	79
4.1 A participação do Blimp-1 na psoríase	80
4.2 A expressão de Blimp-1 em queratinócitos	80
4.3 O predomínio do eixo IL-23/Th17 na psoríase	81
4.4 IL-23 e IL-23R na geração de células patogênicas Th17 na psoríase.....	83
4.5 Combinação de IL-23, IL-6, IL-21 e outras citocinas na diferenciação de células Th17	84
4.6 Fatores de transcrição na diferenciação de células Th17	85
4.7 Blimp-1, STAT3 e citocinas na geração de células Th17 patogênicas	86
4.9 Blimp-1 exerce funções regulatórias ou conduz o programa inflamatório Th17 na psoríase?.....	88
4.10 As vias de ação do TGF-beta na indução de ROR-gammat.....	90
4.11 Participação de Blimp-1 e TGF-beta nos distúrbios inflamatórios e proliferativos ..	91
Capítulo 5: Conclusão.....	94
Referências Bibliográficas	96
Anexos.....	115
Anexo A	116
Anexo B	118
Anexo C	120
Artigo Publicado.....	121

Capítulo 1: Introdução

1.1 Epidemiologia, aspectos clínicos e histopatológicos da Psoríase

1.1.1 Epidemiologia

A psoríase é uma doença cutânea imunomediada, que afeta aproximadamente 2-3% da população adulta, ou mais de 125 milhões de pessoas em todo o mundo (NATIONAL PSORIASIS FOUNDATION-STATISTICS). A psoríase pode começar em qualquer idade, no entanto, existem dois picos: aos 20-30 anos e aos 50-60 anos (HENSELER; CHRISTOPHERS, 1985). É reconhecida como uma doença de pele com impacto significativo na qualidade de vida e no bem-estar emocional dos pacientes acometidos (KIMBALL; JACOBSON; WEISS; VREELAND *et al.*, 2005). Prurido é um sintoma frequente e perturbador na psoríase (LEBWOHL; BACHELEZ; BARKER; GIROLOMONI *et al.*, 2014). Incapacidade funcional decorrente da psoríase é comparável ou ainda maior com aquela observada em outras doenças graves, incluindo câncer, depressão e doenças cardíacas (RAPP; FELDMAN; EXUM; FLEISCHER *et al.*, 1999).

Dados recentes da Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD) estimam a prevalência da psoríase no Brasil em 1,31%, sendo 1,15% em mulheres e 1,47% em homens ($p=0,22$). Identificou-se um aumento da prevalência de psoríase ($p<0,01$) quanto à faixa etária, sendo mais prevalente entre maiores de 60 anos, 2,29% (IC 95% 1,71 a 2,84%), na população brasileira (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2020).

É uma morbidade caracterizada por períodos de exacerbação e atenuação do quadro clínico, e recorrências ao longo da vida de um paciente e, sem tratamento, uma remissão espontânea é improvável (MENTER; GOTTLIEB; FELDMAN; VAN VOORHEES *et al.*, 2008). A etiologia da psoríase ainda não é totalmente elucidada, e é considerada multifatorial, envolvendo fatores ambientais e genéticos (KAVLI; FØRDE; ARNESEN; STENVOLD, 1985; LIU; KRUEGER; BOWCOCK, 2007). Fatores desencadeantes não específicos, como o estresse (provavelmente um dos gatilhos mais comuns), trauma leve (fenômeno de Koebner), drogas (lítio, interferon-alfa, antimaláricos, e outros), e infecções (estreptocócica e virais, como HIV) podem desencadear ou agravar processos inflamatórios, que levam ao desenvolvimento da doença (GRIFFITHS; BARKER, 2007; RAYCHAUDHURI; MAVERAKIS; RAYCHAUDHURI, 2014).

Por fim, a interação patogênica entre queratinócitos e células imunes infiltrantes da pele levam à hiperproliferação dos queratinócitos e formação das placas psoriásicas (DAND; MAHIL; CAPON; SMITH *et al.*, 2020; NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009).

1.1.2 Aspectos Clínicos

Há várias ferramentas propostas para avaliar a gravidade da doença, a maioria é baseada na aplicação de escores levando-se em conta a extensão do acometimento e a intensidade do eritema, da infiltração e da descamação. Dentre estes sistemas, os mais utilizados são o índice de gravidade de psoríase por área (PASI, *Psoriasis Area Severity Index*) e a avaliação global do médico (PGA- *Physician Global Assessment*). Vale ressaltar, que é também útil a aplicação do questionário de Índice de Qualidade de Vida em Dermatologia (DLQI), compreendido de dez perguntas que avalia como a doença está afetando o bem-estar e a qualidade de vida dos pacientes com psoríase (FINLAY; KHAN, 1994).

Um dermatologista deve ser capaz de diagnosticar a psoríase em placas e outras variantes clínicas da doença avaliando as características morfológicas e distribuição das lesões. Salvo exceções, o exame histopatológico, nem quaisquer exames de sangue específicos são necessários para o diagnóstico de psoríase. No entanto, as alterações histopatológicas e imunohistoquímicas da psoríase são características e, em algumas situações, como nos quadros mais graves, as correlações clínico-patológicas são úteis para o diagnóstico da psoríase (RAYCHAUDHURI; MAVERAKIS; RAYCHAUDHURI, 2014).

1.1.2.1 Psoríase Vulgar

A psoríase em placas, ou psoríase vulgar, é a forma mais comum da doença, sendo responsável por 80–90% dos casos (NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009). As lesões são placas bem delimitadas, eritematosas e escamosas, e frequentemente têm a distribuição em áreas extensoras (cotovelos, joelhos, couro cabeludo, região sacral, e sulco interglúteo). As placas variam em tamanho e os pacientes podem apresentar apenas algumas lesões ou doença amplamente generalizada. As lesões costumam ser distribuídas simetricamente. A doença leve a moderada, classificada como envolvendo menos de 10% da área de superfície corporal, representa aproximadamente 80% dos casos de psoríase em placas. O restante dos pacientes tem doença moderada a grave e pode ter envolvimento de grande extensão da superfície corporal (MENTER; GOTTLIEB; FELDMAN; VAN VOORHEES *et al.*, 2008).

A psoríase palmoplantar é caracterizada por placas eritematosas descamativas na distribuição acral. A psoríase palmoplantar pode ser uma entidade isolada ou pode coexistir no contexto da psoríase em placas (RAPOSO; TORRES, 2016).

1.1.2.2 Psoríase Gotada

A psoríase gotada é caracterizada pelo início agudo de pápulas lenticulares eritematosas e descamativas, sobre o tronco e extremidades. As características morfológicas típicas são: lesões na forma de gotículas ('*gota*'), geralmente menores de 1 cm de tamanho, monomórficas e no mesmo estágio de evolução (KRISHNAMURTHY; WALKER; GROPPER; HOFFMAN, 2010). Psoríase gotada frequentemente afeta crianças e adolescentes após um episódio de infecção estreptocócica ou infecção do trato respiratório superior, e corresponde a menos de 2% dos casos de psoríase (MENTER; GOTTLIEB; FELDMAN; VAN VOORHEES *et al.*, 2008). Geralmente, a doença é autolimitada, mas uma certa porcentagem de indivíduos pode progredir para psoríase crônica em placas (KRISHNAMURTHY; WALKER; GROPPER; HOFFMAN, 2010). Pacientes que apresentam recuperação completa de um episódio de psoríase gotada, ainda têm um risco significativamente maior de desenvolver psoríase em placas no futuro (MARTIN; CHALMERS; TELFER, 1996).

1.1.2.3 Psoríase Pustulosa Generalizada

A psoríase pustulosa generalizada é caracterizada pela formação de pústulas estéreis em base eritematosa, que são disseminadas e podem ser generalizadas. A etiologia permanece obscura; entretanto, a administração de certos medicamentos, incluindo interrupção abrupta dos corticosteróides sistêmicos é um dos fatores causais (GRIFFITHS; BARKER, 2007). A psoríase pustulosa generalizada pode seguir um curso leve e crônico ou aparecer de forma aguda e generalizada (tipo von Zumbusch). As pústulas podem coalescer e envolver todo o tegumento, incluindo áreas da mucosa (VARMAN; NAMIAS; SCHULMAN; PIZANO, 2014). Dado o envolvimento generalizado, esses pacientes podem perder a função protetora da pele. A perda da função termorreguladora da pele pode causar febre ou hipotermia. Pacientes com psoríase pustulosa generalizada

aguda geralmente atendem aos critérios da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) na sua apresentação, e esses casos graves requerem internação na unidade de queimados ou unidade de terapia intensiva (UTI). O tratamento da psoríase pustulosa generalizada com agentes de ação rápida como a ciclosporina pode reduzir a necessidade de hospitalização (GRIPP; CARVALHO; CURSI; SOUZA, 2012; VARMAN; NAMIAS; SCHULMAN; PIZANO, 2014).

1.1.2.4 Pustulose palmoplantar

Contrariamente à forma generalizada, a psoríase pustulosa pode ser limitada às palmas das mãos e plantas dos pés, conhecida como pustulose palmoplantar. Essa forma clínica da doença é caracterizada por erupções recorrentes de pústulas estéreis nas superfícies palmar e plantar (RAPOSO; TORRES, 2016). Embora essa forma não represente risco de vida, como na psoríase pustulosa generalizada, é uma condição debilitante, sendo comum que os pacientes se queixem de dor intensa ocasionada pelas fissuras e, particularmente limitações para as suas atividades. Pacientes com psoríase palmoplantar têm pior qualidade de vida do que pacientes com extenso envolvimento do tronco (PETTEY; BALKRISHNAN; RAPP; FLEISCHER *et al.*, 2003). A pustulose palmoplantar geralmente se apresenta entre 30 e 40 anos de idade, e as lesões palmares geralmente precedem o envolvimento plantar em alguns meses (YAMAMOTO, 2009). A maioria dos pacientes é do sexo feminino, com uma proporção de mulheres para homens de 9: 1. A pustulose palmoplantar também está altamente associada ao tabagismo, com 95% dos pacientes com história pregressa ou atual de tabagismo (GRIFFITHS; BARKER, 2007). Aproximadamente 25% dos pacientes com psoríase palmoplantar também terão diagnóstico de psoríase crônica em placas, embora estudos genéticos sugerem que sejam entidades distintas (ASUMALAHTI; AMEEN; SUOMELA; HAGFORSEN *et al.*, 2003).

1.1.2.5 Psoríase Eritrodérmica

A psoríase eritrodérmica é outra forma de psoríase potencialmente fatal associada à perda da função da pele. Além de ser uma das formas mais graves de psoríase, é também uma das mais raras, afetando apenas 1% dos pacientes com psoríase (FARBER; NALL, 1993). Ainda que haja história prévia de psoríase, é importante considerar outras

causas possíveis da eritrodermia. Na psoríase eritrodérmica, a pele de toda a superfície corporal está inflamada, eritematosa e descamativa. Embora a psoríase eritrodérmica possa se desenvolver a partir do agravamento crônico e progressivo da psoríase em placas, essa condição pode ocorrer repentinamente em pacientes sem história prévia de psoríase, em cerca de 20% dos casos (MENTER; GOTTLIEB; FELDMAN; VAN VOORHEES *et al.*, 2008; MURPHY; KERR; GRANT-KELS, 2007). É comum a ocorrência de precipitação por descontinuação rápida de corticosteróides sistêmicos ou tópicos, infecções, exposição excessiva ao sol ou luz ultravioleta e medicamentos antimaláricos (LISI, 2007). Como na psoríase pustulosa generalizada, a perda das funções termorregulatórias e de barreira da pele pode causar febre, hipotermia, perda de fluidos, desidratação e choque (GRIPP; CARVALHO; CURSI; SOUZA, 2012; MENTER; GOTTLIEB; FELDMAN; VAN VOORHEES *et al.*, 2008). Os pacientes também apresentam alto risco de sepse e até morte, especialmente sepse estafilocócica (GREEN; PRYSTOWSKY; COHEN; COHEN *et al.*, 1996; GRIPP; CARVALHO; CURSI; SOUZA, 2012).

1.1.2.6 Psoríase Invertida

A psoríase inversa, também conhecida como psoríase intertriginosa ou flexural, afeta de 3 a 7% dos pacientes com psoríase (SYED; KHACHEMOUNE, 2011). Envolve as dobras cutâneas, incluindo as axilas, as regiões genitais e as regiões inframamárias e inguinais. O rosto também pode estar envolvido. Essas lesões são menos propensas a serem escamosas devido à alta umidade nessas áreas e se apresentam principalmente como placas eritematosas brilhantes (MENTER; GOTTLIEB; FELDMAN; VAN VOORHEES *et al.*, 2008). Podem ocorrer fissuras e infecções bacterianas ou fúngicas sobrepostas. Histologicamente, não há diferença entre psoríase inversa e em placa e, portanto, as duas são diferenciadas apenas na apresentação clínica (SYED; KHACHEMOUNE, 2011). Notavelmente, os pacientes com psoríase com envolvimento palmar têm aproximadamente cinco vezes mais probabilidade de ter psoríase invertida (FRANSSON; STORGÅRDS; HAMMAR, 1985).

1.1.2.7 Doença das unhas (onicodistrofia psoriática)

A psoríase ungueal pode ocorrer em todos os subtipos de psoríase. As unhas das mãos estão envolvidas em aproximadamente 50% de todos os pacientes com psoríase e unhas dos pés em 35% dos pacientes. Essas alterações incluem "pitting", onicólise, hiperqueratose subungueal, e o sinal da mancha de óleo. Até 90% dos pacientes com artrite psoriásica pode ter alterações ungueais. De resposta clínica mais lenta, o controle da psoríase ungueal pode ser um desafio terapêutico significativo (MENTER; GOTTLIEB; FELDMAN; VAN VOORHEES *et al.*, 2008).

1.1.3 Aspectos histopatológicos

Frente à possibilidade do diagnóstico clínico da psoríase, o exame histopatológico é dispensável para a extensa maioria dos casos. No entanto, é recomendada para os quadros graves e generalizados, como a psoríase pustulosa e eritrodérmica. Em outras situações, caso uma biópsia seja considerada necessária, características marcantes podem ser observadas (RAYCHAUDHURI; MAVERAKIS; RAYCHAUDHURI, 2014). A condição se caracteriza por epiderme hiperproliferativa, que apresenta elevação do índice mitótico dos queratinócitos basais, seguido por maturação prematura dos queratinócitos na camada espinhosa e retenção dos núcleos na camada córnea. Em decorrência da atividade exacerbada da epiderme na doença, há uma redução do tempo de *turnover* da camada basal a espinhosa, de 50 dias na pele normal para 5 dias na pele psoriásica (LI; LI; HOU; LIU *et al.*, 2015).

Os achados histopatológicos clássicos da psoríase em placas incluem: hiperqueratose (espessamento da camada córnea), paraqueratose (presença de queratinócitos nucleados na camada córnea), hipogranulose (diminuição ou perda da camada granulosa), acantose (espessamento da camada espinhosa), vascularização dilatada e tortuosa, e um infiltrado leucocítico (LISI, 2007). A histologia da pele não envolvida será normal (GRIFFITHS; BARKER, 2007).

Hiperproliferação e diferenciação prejudicada de queratinócitos são as duas características principais dentre os achados cutâneos das placas psoriásicas. Histologicamente, o espessamento epidérmico (hiperqueratose) apresenta alongamento das cristas epidérmicas (RAYCHAUDHURI; MAVERAKIS; RAYCHAUDHURI, 2014). A acantose psoriasiforme é caracterizada por cristas epidérmicas alongadas que se espessam em direção à ponta. Os capilares das papilas dérmicas interdigitantes são dilatados e tortuosos. Finos feixes de colágeno fibrilar também podem ser vistos nas

papilas. A placa epidérmica suprapapilar é afinada, particularmente no estrato espinhoso e estrato granuloso (MURPHY; KERR; GRANT-KELS, 2007).

A diferenciação terminal da epiderme começa na camada granulosa, porém esta camada está ausente nas áreas subjacentes à paraqueratose na pele com psoríase. O estrato córneo, portanto, se desenvolve a partir de queratinócitos que não se submetem à diferenciação normal, levando ao achado de paraqueratose (retenção aberrante de núcleos no estrato córneo) (LOWES; BOWCOCK; KRUEGER, 2007). Ortoceratose (hiperceratose sem paraqueratose) também é frequentemente observada, alternando com áreas de paraqueratose. Outro achado relacionado à hiperproliferação inclui aumento de mitoses na camada basal e suprabasal (MURPHY; KERR; GRANT-KELS, 2007). Um infiltrado leucocitário mononuclear pode ser visto na epiderme e derme consistindo predominantemente de linfócitos (RAYCHAUDHURI; MAVERAKIS; RAYCHAUDHURI, 2014).

Dentre os achados na psoríase, dois principais marcadores histológicos são focos de neutrófilos no estrato córneo paraqueratótico, os "microabscessos de Munro", e as micropústulas neutrofilicas espongiiformes na camada espinhosa da epiderme, denominadas "pústulas espongiiformes de Kogoj" (LOWES; BOWCOCK; KRUEGER, 2007). Microabscessos de Munro são comumente encontrados, e podem ser vistos em 75% dos casos. Tais achados, junto com capilares dérmicos dilatados e tortuosos, são diagnósticos para psoríase, especialmente quando combinado com os demais detalhes histopatológicos supracitados (MURPHY; KERR; GRANT-KELS, 2007).

É importante notar que o exame histopatológico pode variar dependendo do estágio em que a lesão é biopsiada, e os achados histológicos típicos, como descritos acima, podem não ser encontrados em todos os casos de psoríase. Por exemplo, a biópsia de uma lesão inicial pode mostrar predominantemente alterações dérmicas, incluindo um infiltrado linfocítico perivascular leve, juntamente com dilatação e mínima tortuosidade da vasculatura, em um fundo de um leve edema e espongiose (MURPHY; KERR; GRANT-KELS, 2007). Uma vez que a lesão evolui, outras mudanças podem ser vistas, incluindo hiperplasia epidérmica leve, montículos de paraqueratose, vasculatura dérmica superficial ectásica, exocitose neutrofilica e microabscessos de Munro com hipogranulose (MURPHY; KERR; GRANT-KELS, 2007).

A hiperplasia epidérmica e alongamento das cristas epidérmicas e, em menor extensão, pelo edema dérmico e infiltrado inflamatório, irão causar o espessamento e a elevação da placa de psoríase vulgar. A descamação pluriestratificada e prateada é um resultado da paraqueratose confluyente. A combinação de capilares dérmicos ectásicos

superficiais e afinamento epidérmico suprapapilar é responsável pela aparência eritematosa da lesão psoriásica e do sinal de Auspitz (pontos de sangramento na remoção das escamas) (MURPHY; KERR; GRANT-KELS, 2007).

1.2 Histórico da Doença

A primeira descrição reconhecível de psoríase é atribuída a Celsus (25 AC-45 DC), quase 2.000 anos atrás. A doença foi descrita sob o título de impetigo (da palavra latina ímpeto, atacar). Galeno (133-200 DC) é creditado como o primeiro a usar o termo psoríase, derivada da palavra grega '*psora*', coceira, no entanto, provavelmente estivesse descrevendo o eczema seborreico - '*Erupção escamosa das pálpebras e dos cantos dos olhos associada a escamação com intenso prurido e escoriações da região escrotal*' (GLICKMAN, 1986). Hipócrates atribuiu às erupções escamosas, incluindo a psoríase, o termo '*lopoi*' (de lepo, em escama). Assim, primordialmente, pode-se inferir, que várias nomenclaturas foram atribuídas à um grupo de dermatoses de diferentes etiologias, em que se incluía a psoríase (ROMITI; MARAGNO; ARNONE; TAKAHASHI, 2009).

Até o século XVIII, a psoríase estava associada à hanseníase, e em 1809, Willan foi o primeiro a descrever com maior precisão a psoríase e suas várias manifestações, mas a diferenciação entre as duas doenças foi realizada por Hebra em 1841 (FRY, 1988). Após 100 anos do reconhecimento da psoríase como uma entidade clínica definitiva, a sua histologia foi descrita, e os termos acantose e paraqueratose foram introduzidos por Auspitz (1835-1886), nome atribuído à descrição do "orvalho sanguíneo" observado na curetagem metódica de Brocq da placa psoriásica. Na técnica da curetagem da placa, nota-se o destacamento de várias camadas de escamas esbranquiçadas (sinal da vela), seguida de resistência (sinal da membrana de Duncan) até o surgimento de pontos sangrantes (sinal de Auspitz). O fenômeno de Koebner, '*uma das observações clínicas mais significativas feitas na psoríase*' foi descrito em 1872 (FRY, 1988). Já Bourdillon, em 1888, descreveu características da artropatia psoriásica que reconhecemos hoje (O'NEILL; SILMAN, 1994).

1.3 Comorbidades da psoríase

Estudos recentes têm identificado que a abundância de produtos inflamatórios no sangue é proveniente das lesões cutâneas, o que leva à hipótese que algumas comorbidades sistêmicas, como obesidade, diabetes, trombose e aterosclerose, possam

resultar diretamente de um circuito imune ligado à inflamação cutânea. Reciprocamente, as moléculas inflamatórias e os hormônios produzidos em tais condições podem influenciar na patogênese da psoríase por promover um *status* pró-inflamatório (LOWES; RUSSELL; MARTIN; TOWNE *et al.*, 2013; LOWES; SUÁREZ-FARIÑAS; KRUEGER, 2014).

A psoríase é igualmente prevalente em ambos os sexos, e considerada uma doença inflamatória sistêmica imunomediada (KORMAN, 2020) associada a diferentes comorbidades (TAKESHITA; GREWAL; LANGAN; MEHTA *et al.*, 2017). Dentre as comorbidades clássicas, estão incluídas: artrite psoriásica (APs), doença inflamatória intestinal (DII), síndrome metabólica (hipertensão, obesidade, diabetes, hiperlipidemia), doenças cardiovasculares (DCV), distúrbios psicológicos e psiquiátricos (especialmente depressão) e uveíte (OLIVEIRA; ROCHA; DUARTE, 2015). Há ainda aquelas consideradas como comorbidades emergentes na psoríase: doenças hepáticas crônicas, como hepatite e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), linfomas, doença pulmonar obstrutiva crônica, disfunção sexual, apneia obstrutiva do sono (AOS), osteoporose e até doença de Parkinson (OLIVEIRA; ROCHA; DUARTE, 2015).

Um estudo brasileiro mostrou que a síndrome metabólica pode atingir pouco mais de 40% dos pacientes com psoríase, sem significância entre gêneros ($p = 0,14$). A elevação do PASI aumentou o risco para síndrome metabólica. Após avaliação global do risco, 51,1% foram reclassificados com risco cardiovascular alto-intermediário, prevalecendo as mulheres (52,2%). Proteína C-reativa foi elevada em cerca seis vezes na amostra geral de pacientes, foi superior naqueles com síndrome metabólica ($p = 0,05$), HAS ($p = 0,004$) e risco cardiovascular alto-intermediário ($p < 0,001$); e foi positivamente correlacionada ao escore de risco de Framingham ($p < 0,001$; $r = 0,60$), risco cardiovascular em 10 anos ($p < 0,001$; $r = 0,58$) e idade ($p = 0,001$; $r = 0,35$) (PASCHOAL; SILVA; CARDILI; SOUZA, 2018). Os autores concluem que a psoríase, síndrome metabólica, hipertensão arterial sistêmica e o envelhecimento compartilham da elevação da proteína C-reativa, o que implicaria em ônus adicional para aumento do risco cardiovascular e alerta para intervenções efetivas na psoríase (PASCHOAL; SILVA; CARDILI; SOUZA, 2018).

Até um terço (cerca de 30%) dos pacientes com psoríase desenvolve artrite psoriásica (APs) durante o curso da doença; hoje, o termo “doença psoriásica” é usado, incluindo a psoríase cutânea e a APs (MEASE; ARMSTRONG, 2014). Todavia, as regiões de suscetibilidade genética para psoríase vulgar e artrite psoriásica são parcialmente compartilhadas, mas não idênticas, o que indica a diferença entre as enfermidades (MARTÍNEZ-BORRA; GONZÁLEZ; SANTOS-JUANES; SÁNCHEZ DEL RIO *et al.*, 2003).

APs é uma poliartropatia inflamatória soronegativa com idade de início entre 30 e 55 anos, afeta igualmente homens e mulheres e envolve as articulações periféricas (artrite), esqueleto axial (espondilite), inserção de tendões e ligamentos no osso (entesite), e inflamação de dedos inteiros (dactilite) (GLADMAN, 2015). Na maioria dos casos, a APs aparece anos após o início da psoríase cutânea – entre 5 a 10 anos para que as manifestações ocorram (GLADMAN, 2015). Os sintomas inespecíficos tornam o diagnóstico desafiador e estima-se que a prevalência de APs não detectada entre pacientes com psoríase cutânea esteja entre 10% e 15% (VILLANI; ROUZAUD; SEVRAIN; BARNETCHE *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, várias ferramentas para medir com maior precisão a atividade da doença e questionários de autoavaliação do paciente tem sido propostos para o diagnóstico da APs (TUCKER; COATES; HELLIWELL, 2019). Dentre esses, encontram-se os critérios de CASPAR (*Classification for Psoriatic Arthritis*), e o DAS28 (*28-joint Disease Activity Score*) (PREVOO; VAN 'T HOF; KUPER; VAN LEEUWEN *et al.*, 1995; SALAFFI; CIAPETTI; CAROTTI; GASPARINI *et al.*, 2014) para classificação de artrite periférica. Já para classificar a artrite axial, são indicados o BASDAI (*Bath Ankylosing Spondylitis Activity Index*) e o ASDAS (*Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score*) (TUCKER; COATES; HELLIWELL, 2019).

Os estudos são concordantes nos achados de que o atraso no diagnóstico de APs com mais de 1 ano aumentou o risco de pior função física (TILLET; JADON; SHADDICK; CAVILL *et al.*, 2013), e os pacientes que obtiveram cuidados de saúde adequados nos primeiros 2 anos do início dos sintomas de APs tiveram doença menos grave e menor progressão radiográfica do que aqueles observados com 2 anos ou mais após o início dos sintomas (GLADMAN, 2015). Ainda, Mease *et al.* (2019) observaram um atraso no diagnóstico em uma amostra de pacientes dos EUA com APs, com um tempo médio desde o início dos sintomas até o diagnóstico estabelecido de 1,2 anos, e aproximadamente um terço dos pacientes com atraso de mais de 4 anos (MEASE; LIU; SIEGEL; RICHMOND *et al.*, 2019).

Um estudo transversal, multicêntrico e observacional realizado em países da Europa Ocidental e Oriental, Oriente Médio, América Latina e Ásia, incluindo 1.483 pacientes com suspeita ou diagnóstico estabelecido de APs que visitavam rotineiramente um dermatologista, reumatologista, ou médico não reumatologista/não dermatologista mostrou que não houve diferença significativa no tempo médio desde o início dos sintomas inflamatórios musculoesqueléticos até o diagnóstico de APs entre os pacientes acompanhados por reumatologistas e dermatologistas (6,0 versus 3,9 meses)

(BOEHNCKE; HORVÁTH; DALKILIÇ; LIMA *et al.*, 2020). No Brasil, um estudo com pacientes avaliados por um reumatologista ou dermatologista indicou que independentemente do cenário, os pacientes tiveram um atraso no diagnóstico de APs, 173,6 versus 146,1 meses ($p= 0,556$), mas sem diferenças estatísticas para as especialidades Reumatologia e Dermatologia, respectivamente (DA SILVA SOUZA; GOLDENSTEIN-SCHAINBERG; ALVARENGA ANTI LODUCA LIMA; SPELLING GORMEZANO *et al.*, 2022).

1.4 Etiopatogenia da Psoríase

A interação entre fatores ambientais desencadeantes em indivíduos geneticamente predispostos inicia uma cascata de eventos que congregam tanto mecanismos da imunidade inata, quanto adaptativa, e culmina com o desenvolvimento e a ativação da doença (RAYCHAUDHURI; MAVERAKIS; RAYCHAUDHURI, 2014).

Sabe-se hoje que a psoríase não é exclusivamente uma doença dependente de células T, mas que os queratinócitos desempenham um papel fundamental no desencadeamento dos estágios iniciais da patogênese e na perpetuação da inflamação crônica na psoríase, em uma interação mútua com as células T (BENHADOU; MINTOFF; DEL MARMOL, 2019; LANGLEY; KRUEGER; GRIFFITHS, 2005; PASQUALI; SRIVASTAVA; MEISGEN; DAS MAHAPATRA *et al.*, 2019).

1.4.1 Fatores genéticos

A psoríase tem um relevante componente genético, demonstrado por estudos que mostraram maior incidência de psoríase (vulgar ou APs) em gêmeos monozigóticos comparados aos dizigóticos (BATAILLE; LENS; SPECTOR, 2012; LØNNBERG; SKOV; DUFFY; SKYTTHE *et al.*, 2016) e em parentes de primeiro e segundo grau de pacientes com psoríase, comparados à população em geral (CHANDRAN; SCHENTAG; BROCKBANK; PELLETT *et al.*, 2009; NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009). Os estudos de ligação e associação genética compreendendo amplos conjuntos de dados de caso-controle revelaram variantes de suscetibilidade conhecidas como polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que estão ligados à psoríase (STRANGE; CAPON; SPENCER;

KNIGHT *et al.*, 2010; TSOI; SPAIN; KNIGHT; ELLINGHAUS *et al.*, 2012). O alelo HLA-Cw*06:02 do antígeno leucocitário humano (HLA) é considerado o principal determinante genético da psoríase (CAPON, 2017). Está presente na região de suscetibilidade à psoríase-1 (PSORS1), uma região que inclui genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Isso contribui com aproximadamente 40-50% da hereditariedade da psoríase (FENG; SUN; SOLTANI-ARABSHAHI; BOWCOCK *et al.*, 2009; OKADA; HAN; TSOI; STUART *et al.*, 2014). Já os alelos HLA-B estão associados a um maior risco de desenvolver APs; em particular HLA-B* 27 (BOWES; ASHCROFT; DAND; JALALI-NAJAFABADI *et al.*, 2017), enquanto HLA-Cw*06:02 tem menor risco de associação para esta condição (BOWES; ASHCROFT; DAND; JALALI-NAJAFABADI *et al.*, 2017; CARDILI; DEGHAIDE; MENDES-JUNIOR; DONADI *et al.*, 2016).

Aproximadamente 36 *loci* de suscetibilidade genômica foram associados à psoríase, alguns deles (*PSORS1*, *PSORS2* e *PSORS4*) com maior contribuição para a doença dentre outros (CAPON, 2017). Mutações do gene *CARD14*, localizado na região *PSORS2* no cromossomo 17 (17q25.3), são responsáveis pelo efeito pró-inflamatório aumentado de NF-κB e a superexpressão de genes em queratinócitos que foram associados à psoríase (JORDAN; CAO; ROBERSON; PIERSON *et al.*, 2012). No entanto, apesar da predisposição genética comprovada na psoríase, a ligação entre os gatilhos ambientais, as alterações da expressão gênica e a heterogeneidade genética ainda não está totalmente esclarecida (PIVARCSI; STÄHLE; SONKOLY, 2014). A maioria dos genes de suscetibilidade identificados em estudos de associação do genoma (GWAS-*Genome Wide Association Studies*) estão relacionados à imunidade adaptativa (citocinas, receptores de citocinas e vias inflamatórias), enquanto alguns estão relacionados à imunidade inata, funções dos queratinócitos e barreira cutânea, sugerindo que a predisposição envolva a pele e o sistema imunológico (DUFFIN; KRUEGER, 2009; TSOI; SPAIN; KNIGHT; ELLINGHAUS *et al.*, 2012). Dentre os genes relacionados à pele, estão os genes do envelope cornificado tardio (LCE), parte do complexo de diferenciação epidérmica (EDC), envolvido na diferenciação terminal da epiderme (HENRY; TOULZA; HSU; PELLERIN *et al.*, 2012; MARENHOLZ; ZIRRA; FISCHER; BACKENDORF *et al.*, 2001). Uma vez localizado na camada cornificada da epiderme, os genes *LCE* codificam proteínas estruturais, que podem estar envolvidas na função de barreira física (CANDI; SCHMIDT; MELINO, 2005), e potencialmente ter papel como peptídeos antimicrobianos (NIEHUES; TSOI; VAN DER KRIEKEN; JANSEN *et al.*, 2017). Estudos genômicos em descendentes europeus revelou uma associação entre psoríase e a deleção comum dos genes do LCE3C e LCE3B. O agrupamento LCE é conhecido por estar na região cromossômica 1q21.3, onde

o locus *PSORS4* foi identificado (DE CID; RIVEIRA-MUNOZ; ZEEUWEN; ROBARGE *et al.*, 2009).

1.4.2. Sistema Imune e Psoríase

Tanto o sistema imune inato, quanto o adaptativo desempenham papéis fundamentais na iniciação e manutenção da psoríase (CAI; FLEMING; YAN, 2012). Um dos principais agentes da imunidade inata são os queratinócitos, que podem responder a diferentes sinais de alarme e recrutar células T para a pele, as quais são essenciais na manutenção da atividade da doença (ALBANESI; MADONNA; GISONDI; GIROLOMONI, 2018; LOWES; SUÁREZ-FARIÑAS; KRUEGER, 2014). Os queratinócitos produzem peptídeos antimicrobianos (AMPs- *antimicrobial peptides*), como LL-37 (catelicidina derivada de humano), defensinas e proteínas S100 e, uma vez lesionados ou submetidos a um *feedback* inflamatório negativo de certas citocinas, podem produzir altas doses das quimiocinas CCL20 e CXCL8 / interleucina (IL)-8. O CCL20 tem como objetivo recrutar células dendríticas mieloides (mDCs) e células T helper (Th)-17 na pele da psoríase, enquanto a IL-8 / CXCL8 funciona como quimiotático para neutrófilos para o local da lesão (LOWES; SUÁREZ-FARIÑAS; KRUEGER, 2014; MARTIN; TOWNE; KRICORIAN; KLEKOTKA *et al.*, 2013). Fatores de transcrição fundamentais em lesões de psoríase são adenosina monofosfato cíclico (cAMP), Janus quinase (JAK), fator nuclear-κB (NF- κB), proteína ativadora-1 (AP-1), e proteína de ligação do potenciador CCAAT beta (C / EBP-b). Estes aumentam a expressão de citocinas pró-inflamatórias após a modulação da produção de TNF-alfa e IL-17, sustentando a alça de inflamação na epiderme afetada dos pacientes com psoríase (GREB; GOLDMINZ; ELDER; LEBWOHL *et al.*, 2016). Uma representação simplificada dos mecanismos imunopatogênicos na psoríase é ilustrada na Figura 1.

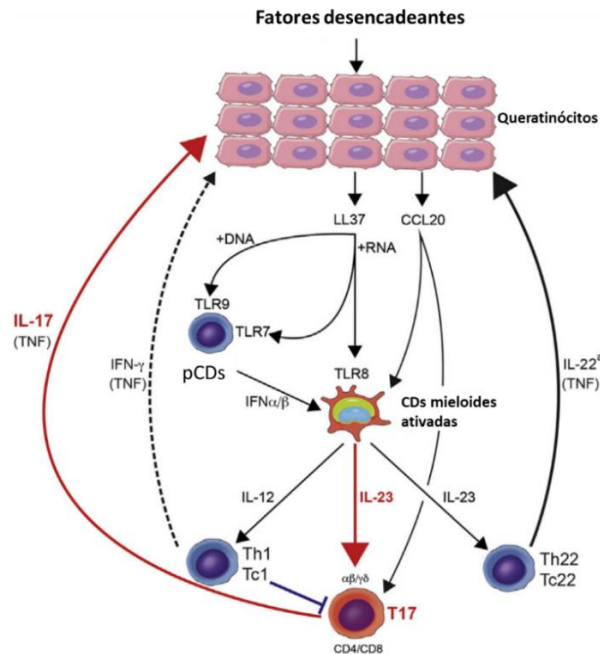


Figura 1 - Mecanismos imunopatogênicos na psoríase. Adaptado de Kim e Krueger, 2015.

1.4.2.1 Circuitos imunológicos celulares e moleculares na psoríase

Os queratinócitos ativados liberam complexos de auto-DNA e auto-RNA no compartimento extracelular, que ativam as células dendríticas plasmocitoides (pDCs) e iniciam a produção de IFN-alfa (NESTLE; CONRAD; TUN-KYI; HOMEY *et al.*, 2005). A presença de IFN-alfa leva à ativação e maturação de DCs que circulam nos linfonodos onde apresentam um suposto antígeno para as células T virgens; por sua vez, as DCs ativadas produzem IL-23 e IL-12, que estimulam as populações de células T auxiliares CD4 + Th1 e Th17 (LOWES; RUSSELL; MARTIN; TOWNE *et al.*, 2013). A IL-23 provinda das DCs inflamatórias ativa as células Th17 para produzir IL-17A e IL-17F, que conduzem as respostas dos queratinócitos (LOWES; RUSSELL; MARTIN; TOWNE *et al.*, 2013). Uma vez ativados, os queratinócitos podem produzir abundantemente mediadores inflamatórios, incluindo IL-8 / quimiocina CXCL8, MCP-1 / CCL2, CXCL1, CXCL2 e CXCL3 e CCL20 (PERERA; DI MEGLIO; NESTLE, 2012). Essas quimiocinas atraem leucócitos, como neutrófilos, DCs e células CCR6+ Th17; ainda, CXCL9, CXCL10 e CXCL11 também são produzidos e recrutam células Th1 circulantes adicionais, que expressam o receptor 3 da quimiocina CXC (CXCR3+) e o receptor 4 da quimiocina CC (CCR4+), e as células Th17, que expressam CCR4 e CCR6 na derme e epiderme. As citocinas derivadas das células T

atuam nos queratinócitos epidérmicos como indutores proximais desses circuitos inflamatórios (PERERA; DI MEGLIO; NESTLE, 2012).

1.4.2.2 Autoantígenos e autoimunidade para psoríase

Os autoantígenos podem compreender as quimiocinas liberadas por células nativas que iniciam ou mantêm um estado patológico contra o próprio organismo (BENHADOU; MINTOFF; DEL MARMOL, 2019). É estabelecido que a colonização de bactérias na pele psoriásica resulta na produção de superantígenos e ativação de receptores de células T (BOEHNCKE; DRESSEL; ZOLLNER; KAUFMANN, 1996). Adicionalmente, sequências similares entre peptídeos do estreptococo M e queratina humana, como a queratina 17, sugerem que proteínas da queratina possam funcionar como autoantígenos (GUDMUNSDOTTIR; SIGMUNSDOTTIR; SIGURGEIRSSON; GOOD *et al.*, 1999).

Mais recentemente, tem sido descrito o mecanismo de autoantígenos na ativação de vias autoimunes na psoríase. Prinz *et al.* (2017) demonstraram que o principal alelo de risco de psoríase HLA-Cw* 06:02 confere suscetibilidade à psoríase pela promoção da autoimunidade específica dos melanócitos por meio da apresentação de ADAMTSL5 (*A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-like 5*), autoantígeno gerado por ERAP1 (*Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1*). Além do ADAMTSL5, o peptídeo antimicrobiano LL37 (alternativamente conhecido como CAMP) foi encontrado com expressão aumentada em queratinócitos de lesões de psoríase, bem como em células imunes associadas à psoríase (por exemplo, macrófagos e células dendríticas) (PRINZ, 2017). Ainda, o LL37 tem a capacidade de converter o próprio DNA inerte em estruturas condensadas e complexadas aos AMPs, ativando o TLR9 e TLR7, que permitem às células dendríticas plasmocitoides detectar o DNA viral e microbiano (evento que não ocorre em condições normais). Isso resulta na produção de IFN-alfa, que fornece estímulos internos para células dendríticas e células T, levando ao desenvolvimento final de placas psoriásicas. Uma vez que representa uma via inflamatória única, que é normalmente usada em respostas imunes antivirais, o LL37 foi proposto como um autoantígeno da psoríase, responsável por desencadear o ciclo de *feedback* inflamatório (KIM; KRUEGER, 2015; LANDE; BOTTI; JANDUS; DOJCINOVIC *et al.*, 2014).

1.4.2.3 Desequilíbrio de citocinas e quimiocinas na psoríase

Citocinas como IL-12 e IL-23, ambas liberadas por células dendríticas e macrófagos, induzem a polarização de várias células T CD4 + que, por sua vez, produzem algumas das citocinas críticas na psoríase: as interleucinas IL-17A, -17F e -22, interferon-gama (IFN-gama) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), (LOWES; SUÁREZ-FARIÑAS; KRUEGER, 2014). A IL-23 é uma citocina pró-inflamatória composta por duas subunidades, p19 e p40, sendo a subunidade p40 compartilhada com IL-12. No entanto, a IL-23 e IL-12 possuem receptores e efeitos diferentes. IL-12 induz o desenvolvimento de células Th1, que produzem IFN-gama, e a IL-23 está envolvida na diferenciação de células Th17 em um contexto pró-inflamatório e especialmente na presença de TGF- β e IL-6. As células Th17 ativadas produzem IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-22, TNF-alfa e GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*). Macrófagos inflamatórios expressam IL-23R e são ativados por IL-23 para produzir IL-1, TNF- α e a própria IL-23 (DUVALLET; SEMERANO; ASSIER; FALGARONE *et al.*, 2011).

IL-23 é expressa principalmente pelos macrófagos e DCs, e o receptor para IL-23 (IL-23R) é encontrado nas células T de memória, células NK (*natural killer*), macrófagos, DCs e células T *naive* após ativação por TGF-beta e IL-6 (PARHAM; CHIRICA; TIMANS; VAISBERG *et al.*, 2002). Estudos estabeleceram que o gene IL-23R está associado a suscetibilidade a psoríase, porém algumas variantes desse gene são mais expressas em grupos controle saudáveis, e especula-se proteção concomitante para doença intestinal inflamatória e psoríase (CAPON; DI MEGLIO; SZAUB; PRESCOTT *et al.*, 2007).

Na psoríase, há acentuado aumento da expressão de IL-23 em comparação com a pele normal. Em pacientes com psoríase, a IL-23 atua também através do receptor de quimiocina CCR6, causando inflamação e a produção de IL-22. IL-22 é membro da família IL-10 produzida por células Th17 ativadas e desempenha um papel crucial nos distúrbios dos queratinócitos na psoríase (HEDRICK; LONSDORF; SHIRAKAWA; RICHARD LEE *et al.*, 2009).

IL-17A é produzida por células T CD4+ que são polarizadas por citocinas IL-1beta e IL-6 em células Th17, e também pelo subconjunto de células T CD8+ Tc17 (BLAUVELT; CHIRICOZZI, 2018). Essa citocina atua nos queratinócitos, levando a um aumento da expressão de CCL20, CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL6 e CXCL8, e demonstrou desempenhar um papel no recrutamento de células dendríticas mieloides (mDC), células Th17 e neutrófilos à lesão psoriásica. Ainda, a IL-17A induz a produção de AMPs (como b-defensina-2, proteína S100A7, A8, A9) e citocinas pró-inflamatórias, além de produzir fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF). Estes, por sua vez,

podem ajudar a sustentar as respostas imunológicas na pele, bem como a inflamação e o desenvolvimento de placas na psoríase (KIM; KRUEGER, 2015; LOWES; SUÁREZ-FARIÑAS; KRUEGER, 2014). A IL-17A também tem papel na proteção da pele contra infecções por *Staphylococcus aureus*, infecções fúngicas, infecções gastrointestinais por *Escherichia coli*, e tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) (ISAILOVIC; DAIGO; MANTOVANI; SELMI, 2015; MENGESHA; CONTI, 2017).

IL-17F (também conhecida como CANDF6 ou ML1), compartilha o mesmo *locus* e receptores que IL-17A, com a qual é co-regulada e muitas vezes co-expressa (AKIMZHANOV; YANG; DONG, 2007). Níveis elevados de citocina IL-17F foram encontrados na pele com lesões com psoríase em comparação com pele não afetada e saudável bem como no soro dos pacientes com psoríase (SODERSTROM; BERSTEIN; ZHANG; VALDEZ *et al.*, 2017). Outros membros da família IL-17 incluem IL-17C que, juntamente com IL-17A e IL-17F, tem a maior expressão na pele afetada de pacientes com psoríase (JOHNSTON; FRITZ; DAWES; DIACONU *et al.*, 2013), provavelmente fornecendo uma pequena contribuição para a inflamação que ocorre na psoríase.

IL-22, membro da família IL-20 e produzida por células Th22, e em parte por células Th17, inibe a diferenciação epidérmica, levando a um distúrbio da barreira cutânea, e induz a expressão gênica pró-inflamatória e a ativação de queratinócitos humanos. Ligada a seus receptores IL-22R1 / IL-10R2 ativa a via JAK / STAT3, contribui para a estimulação de respostas inflamatórias (BONIFACE; BERNARD; GARCIA; GURNEY *et al.*, 2005; LOWES; SUÁREZ-FARIÑAS; KRUEGER, 2014). Ainda, a ativação desta via por IL-22 leva a uma redução nos níveis de expressão de marcadores de diferenciação de queratinócitos, tais como filagrina, loricrina, involucrina e membros de citoqueratina classe I / II, tais como queratina 1 (KRT1) e queratina 10 (KRT10) (BONIFACE; BERNARD; GARCIA; GURNEY *et al.*, 2005).

O IFN-gama ativa uma via de sinalização que foi considerada a principal peça na patogênese da psoríase vulgar e atualmente, o IFN-gama foi redefinido como mais relevante para a fase de iniciação da doença (KRYCZEK; BRUCE; GUDJONSSON; JOHNSTON *et al.*, 2008). Ele pertence à família do interferon tipo II e pode ser produzido pelas células Th1, mas também pelas células Th17 e NK (HASSAN-ZAHRAEE; WU; GORDON, 1998). Além disso, uma população de células T co-produtoras de IL-17A e IFN-gama foi identificada na pele afetada da psoríase (LOWES; KIKUCHI; FUENTES-DUCULAN; CARDINALE *et al.*, 2008).

O TNF-alfa, membro da superfamília do TNF, e armazenado principalmente por mastócitos e macrófagos ativados na pele, também pode ser produzido por células T CD4+,

células NK, neutrófilos e queratinócitos (BASHIR; SHARMA; WERTH, 2009). O gene que codifica o TNF-alfa está localizado no cromossomo 6, próximo ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) (VASSALLI, 1992). Ainda, evidências de um potencial sinergismo entre IFN-gama e TNF-alfa na aterogênese inflamatória foram comprovadas (MEHTA; TEAGUE; SWINDELL; BAUMER *et al.*, 2017), fornecendo uma justificativa para o antagonismo duplo de citocinas, uma vez que a psoríase e a aterosclerose compartilham muitos mecanismos inflamatórios subjacentes semelhantes.

Outro membro da família IL-12, a IL-27, é composta pela subunidade Ebi3, que também é encontrado na IL-35 e interage com IL-6gp130, IL-27p28 e IL-27R-alfa. IL-27 é produzida pelas DCs, macrófagos, e células B. Ativa células Th1 e inibe as células Th2 (DUVALLET; SEMERANO; ASSIER; FALGARONE *et al.*, 2011).

Coletivamente, as citocinas IL-17, IFN-gama, IL-22 e TNF-alfa podem causar proliferação de queratinócitos, bem como produção de quimiocinas, citocinas e peptídeos antimicrobianos, agindo de forma independente ou exercendo um efeito sinérgico. Isso se torna uma alça autoamplificadora, onde esses produtos atuam de volta nas DCs, células T e neutrófilos para perpetuar o processo inflamatório cutâneo (HARPER; GUO; RIZZO; LILLIS *et al.*, 2009).

1.5 Bases terapêuticas da psoríase

A compreensão desses inúmeros avanços deve preceder um sumário das bases terapêuticas da psoríase, que progressivamente acompanharam a evolução dos conhecimentos envolvendo a doença. No passado, as terapêuticas estavam centradas no controle da proliferação dos queratinócitos. Ainda que o metotrexato tenha sido proposto e aprovado como terapêutica pelos seus efeitos antiproliferativos entre as décadas de 60 e 70, respectivamente, foi apenas na década de 90 que a sua ação anti-inflamatória e imunossupressora foi considerada como central no controle da psoríase. Sem dúvida, o uso da ciclosporina na imunomodulação dos linfócitos T para o controle da doença corroborou essa mudança de paradigma até a revolucionária chegada da terapêutica imunobiológica. contra as citocinas envolvidas no eixo da inflamação da doença psoriásica, que abrange o sistema tegumentar e o osteoarticular e as repercussões sistêmicas.

A psoríase pode ser classificada por diversos critérios, tais como gravidade, morfologia, extensão do envolvimento cutâneo, distribuição ou sítio anatômico das lesões, ou ainda, idade do início e padrão de estabilidade (Quadro 01). Em geral, a decisão

terapêutica se baseia em critérios de gravidade, extensão do envolvimento cutâneo e no impacto da qualidade de vida, em conjunto ou isoladamente. Ainda na prática, ou nos estudos clínicos, os parâmetros de mensuração de gravidade são úteis para avaliação da resposta clínica aos tratamentos adotados (FREDRIKSSON; PETTERSSON, 1978; RAYCHAUDHURI; MAVERAKIS; RAYCHAUDHURI, 2014; SALGADO-BOQUETE; CARRASCOSA; LLAMAS-VELASCO; RUIZ-VILLAVARDE *et al.*, 2021).

Quadro 1 - Critérios utilizados para a classificação da psoríase

Critério de Classificação	Fenótipo clínico
1. Idade do início	Psoríase tipo I — idade de início antes dos 40 anos
	Psoríase tipo II — idade de início após os 40 anos
2. Nível de gravidade de acordo com BSA ou PASI	Psoríase leve 5% BSA; PASI <10
	Psoríase moderada 5%–10% BSA, PASI > 10
	Psoríase grave 10% BSA, PASI >10
	Psoríase localizada e psoríase disseminada
3. Padrão de distribuição das lesões	Invertida, flexural, seborreica
4. Morfologia	Em placas, gotada, eritrodérmica, pustulosa, rupióide
5. Sítio anatômico	Em couro cabeludo, palmoplantar, genital, ungueal, genital
6. Estágio de desenvolvimento	Psoríase estável
	Psoríase eruptiva instável

Adaptado de Raychaudhuri 2014; BSA, *body surface area*; PASI, *Psoriasis Area Severity Index*

As terapias tópicas (corticosteroides, análogos da vitamina D e inibidores da calcineurina) são usadas isoladamente para o tratamento da psoríase leve sem APs, ou em associação às terapêuticas sistêmicas indicadas para os pacientes com psoríase moderada a grave, que são geralmente tratados com fototerapia, metotrexato, retinoides ou medicamentos biológicos (MROWIETZ; KRAGBALLE; REICH; SPULS *et al.*, 2011; TORSEKAR; GAUTAM, 2017). A fototerapia artificial envolve o uso de ultravioleta (UV) B ou psoraleno mais UVA (PUVA), e a sua eficácia leva 50% a 70% dos pacientes a atingir pelo menos 75% de melhora do PASI após 4-6 semanas. Os mecanismos de ação da fototerapia são múltiplos: promoção de apoptose de células inflamatórias, estimulação da

produção de citocina IL-10 anti-inflamatória, com supressão de células Th17 e Th2 e ativação de células T reguladoras (TARTAR; BHUTANI; HUYNH; BERGER *et al.*, 2014).

As terapêuticas sistêmicas convencionais para a psoríase incluem os retinóides, utilizados desde os anos 80. São análogos da vitamina A com a capacidade de inibir a proliferação e a diferenciação das células epidérmicas. Desse grupo, a acitretina é utilizada isoladamente ou em combinação com a radiação UVA (SBIDIAN; MAZA; MONTAUDIÉ; GALLINI *et al.*, 2011), em homens e mulheres em idade não reprodutiva, pelos seus efeitos teratogênicos.

Dentre outras terapêuticas sistêmicas convencionais, estão o metotrexato, análogo sintético do ácido fólico que regula negativamente as principais citocinas e quimiocinas envolvidas na inflamação da psoríase, tais como IL-17, IL-22, IL-23 e CCL20 (CARRETERO; PUIG; DEHESA; CARRASCOSA *et al.*, 2010); e a ciclosporina, que atua inibindo a atividade das células T por meio da inibição da calcineurina, uma fosfatase que promove a expressão da citocina pró-inflamatória IL-2 (AMOR; RYAN; MENTER, 2010). Outras terapêuticas sistêmicas utilizadas em alguns países são os fumaratos e o apremilaste (MROWIETZ; KRAGBALLE; REICH; SPULS *et al.*, 2011).

O avanço dos conhecimentos sobre a imunopatogênese da psoríase possibilitou o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos e o uso de agentes biológicos (ou biológicos). A introdução dos inibidores de TNF-alfa modificou radicalmente as perspectivas de tratamento da psoríase, e foi possível atingir melhora de 75% do PASI por volta da semana 16 de tratamento, enquanto na era pré-biológica média era PASI 50.

Produtos biológicos são drogas que possuem como alvo seletivo moléculas específicas e são produzidas em sistemas vivos, como células (RIZVI; CHAUDHARI; SYED, 2015). A indicação do uso dos bloqueadores de TNF-alfa para o tratamento da artrite reumatóide (AR) foi rapidamente expandida para a artrite psoriásica e psoríase, devido à sua capacidade de atuar no eixo IL-23 / IL-17A e reduzir os efeitos inflamatórios pela regulação negativa de IL-17A e / ou sua via de sinalização (ZABA; SUÁREZ-FARIÑAS; FUENTES-DUCULAN; NOGRALES *et al.*, 2009).

Em 2004, um antagonista de TNF-alfa, o etanercepte (uma proteína de fusão humana recombinante) foi o primeiro agente biológico aprovado pela agência regulatória americana (FDA) para tratar a psoríase (MEASE; GOFFE; METZ; VANDERSTOEP *et al.*, 2000), e em seguida, o infliximabe (2006), um anticorpo quimérico monoclonal, previamente aprovado para doença inflamatória intestinal (1998) e artrite reumatóide (1999). Progressivamente, outros bloqueadores do TNF-alfa foram incorporados ao tratamento da

psoríase e APs, como adalimumabe e, mais recentemente o certolizumabe pegol (LI; PEREZ-CHADA; MEROLA, 2019).

Logo, vieram os antagonistas biológicos da IL-23: ustequinumabe (anticorpo monoclonal contra a subunidade- β (p40) compartilhada pelas citocinas IL-12 e IL-23, que inibe as vias de sinalização a jusante (incluindo IL-17) (O'NEILL; KALB, 2009); assim como outras citocinas do eixo IL-23/Th17: os antagonistas biológicos da IL-17 ou seu receptor, secuquinumabe, ixequizumabe (anticorpos monoclonais anti-IL-17A) e brodalumabe (anticorpo monoclonal anti-IL-17RA) (GREB; GOLDMINZ; ELDER; LEBWOHL *et al.*, 2016).

Os mais novos produtos biológicos para o tratamento da psoríase por meio do direcionamento das subunidades p19 específicas para a citocina IL-23 são risanquizumabe (HAUGH; PRESTON; KIVELEVITCH; MENTER, 2018), guselcumabe (aprovado pela FDA em 2016) (MACHADO; TORRES, 2018), tildraquizumabe que, assim como o ustequinumabe, requer doses de injeção de acompanhamento a cada 12 semanas (GALLUZZO; D'ADAMIO; BIANCHI; TALAMONTI, 2017), e miriquizumabe (REICH; RICH; MAARI; BISSONNETTE *et al.*, 2019).

Uma meta-análise em rede mostrou que, em termos de atingir o PASI 90, o infliximabe, e todos os biológicos anti-IL17 (ixequizumabe, secuquinumabe, bimequizumabe e brodalumabe); e os biológicos anti-IL23 (risanquizumabe e guselcumabe, mas não tildraquizumabe) foram significativamente mais eficazes em alcançar PASI 90 comparados ao ustequinumabe e os agentes anti-TNF alfa: adalimumabe, certolizumabe e etanercepte (SBIDIAN; CHAIMANI; AFACH; DONEY *et al.*, 2020). Ainda, as razões de risco (RR), por classe de droga, foram menores para os anti-IL-23, 0,95 (IC 95% 0,59-1,52), anti-IL-12/23, 1,18 (IC 95% 0,72-1,94) e anti-IL-17, 1,28 (IC 95% 0,88-1,85) e maiores para os anti-TNF-alfa, 1,68 (IC 95% 1,11-2,54) (AFACH; CHAIMANI; EVRENOGLOU; PENSO *et al.*, 2021).

Os atuais tratamentos biológicos tornaram possível o clareamento total ou quase total da pele em curto período e com bom nível de segurança, no entanto, a despeito do seu controle adequado com uso dessas terapias alvo, a elucidação de outras vias envolvidas, ou ainda, a origem dos distúrbios imunológicos causais da doença psoriásica, pode trazer luz para propostas de novos tratamentos.

1.6 Blimp-1 e o gene codificador *PRDM1*

1.6.1 Aspectos gerais da proteína Blimp-1

A proteína 1 de maturação induzida por linfócitos B (Blimp-1) foi descrita como um fator de repressão transcricional pertencente à família *zinc finger motif* (domínio dedos de zinco) codificado pelo gene do domínio regulatório positivo 1 (*PRDM1*), e inicialmente caracterizado como regulador negativo da expressão do gene β -interferon (IFN-beta) (KELLER; MANIATIS, 1991). Posteriormente, outras funções principais do Blimp-1 foram identificadas, a de regulação do desenvolvimento de plasmócitos e a de diferenciação de linfócitos B secretores de imunoglobulina (SHAPIRO-SHELEF; LIN; MCHEYZER-WILLIAMS; LIAO *et al.*, 2003; TURNER; MACK; DAVIS, 1994), como também a do controle da diferenciação da linhagem mieloide (CHANG; ANGELIN-DUCLOS; CALAME, 2000), e de células T auxiliares (Th) CD4+ (CIMMINO; MARTINS; LIAO; MAGNUSDOTTIR *et al.*, 2008).

A expressão do Blimp-1 é dinâmica nas células germinativas primordiais, e é crítica para o desenvolvimento embrionário do camundongo (CHANG; CATTORETTI; CALAME, 2002; OHINATA; PAYER; O'CARROLL; ANCELIN *et al.*, 2005; ROBERTSON; CHARATSI; JOYNER; KOONCE *et al.*, 2007). A geração de mutantes com perda de função *Prdm1* por deleção do gene é letal no desenvolvimento embrionário em camundongos (VINCENT; DUNN; SCIAMMAS; SHAPIRO-SHALEF *et al.*, 2005), corroborando que o Blimp-1 regula diversos destinos celulares no embrião e desempenha papéis críticos em várias linhagens hematopoiéticas.

1.6.2 Funções essenciais do Blimp-1 na regulação e produção de citocinas

Martins e colaboradores (2006) demonstraram as funções essenciais do Blimp-1 em células T, tais como: *i*) timócitos deficientes em Blimp-1 apresentaram sobrevivência diminuída e camundongos deficientes em Blimp-1 tiveram mais células T efectoras periféricas; *ii*) camundongos sem Blimp-1 desenvolveram colite grave tão cedo quanto 6 semanas de idade, e células T reguladoras deficientes em Blimp-1 foram defeituosas em bloquear o desenvolvimento da colite; e *iii*) a expressão de mRNA do Blimp-1 aumentou substancialmente em resposta à estimulação do receptor de células T (TCR). Em comparação com as células T CD4+ do tipo selvagem, as células T CD4+ deficientes em

Blimp-1 proliferaram mais e produziram excesso de IL-2 e interferon-gama, mas reduziram a produção de IL-10 após estimulação do TCR. Coletivamente, tais achados enfatizaram uma função crítica do Blimp-1 no controle da homeostase e ativação das células T (MARTINS; CIMMINO; SHAPIRO-SHELEF; SZABOLCS *et al.*, 2006).

Em conjunto, Blimp-1 regula a transcrição de fatores que controlam ou promovem a expressão de citocinas responsáveis pela manutenção da homeostase das células T, tais como a IL-10, IL-2, IFN-gama e IL-21 (CRETNEY; XIN; SHI; MINNICH *et al.*, 2011; NEUMANN; HEINRICH; NEUMANN; JUNGHANS *et al.*, 2014).

Blimp-1 regula a expressão de IL-2 e IFN-gama em células T

Os trabalhos de Wang e colaboradores (2008) demonstraram uma ligação potencial entre a produção de IL-4, Blimp-1 e IL-2, sugerindo que Blimp-1 pode desempenhar um papel importante no controle da produção de IL-2 em células T ativadas e na imunidade de células T adaptativas (WANG; VAN PANHUYS; HU-LI; KIM *et al.*, 2008). A deleção de Blimp-1 nas células T resultou em menor expressão de IL-10, além do aumento de IL-2 e de interferon-gama (IFN- γ) (KALLIES; HAWKINS; BELZ; METCALF *et al.*, 2006; MARTINS; CIMMINO; SHAPIRO-SHELEF; SZABOLCS *et al.*, 2006). Ainda, uma relação de *feedback* negativo entre IL-2 e Blimp-1 foi observada, a sinalização de IL-2 induz a transcrição de *Prdm1* (gene codificador do Blimp-1), e por sua vez, o Blimp-1 reprime a transcrição do gene *Ii2* em células T (GONG; MALEK, 2007).

Os autores ainda demonstraram que IL-4 inibe a produção de IL-2 em células T CD4 *naïve* ativadas tanto *in vitro* como *in vivo*, e Blimp-1 foi dramaticamente induzido quando as células T foram estimuladas na presença de IL-4. A supressão de IL-2 mediada por IL-4 foi anulada em células T CD4 deficientes em Blimp-1, sugerindo que Blimp-1 é um mediador subjacente da supressão de IL-2 quando células T CD4 virgens são ativadas na presença de IL-4 (WANG; VAN PANHUYS; HU-LI; KIM *et al.*, 2008).

Blimp-1 promove a expressão de IL-10 em subpopulações de células

Diversos outros estudos mostram que o Blimp-1 promove a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, por células T CD4⁺ (células T efetoras e reguladoras), células Treg, células T CD8⁺, DCs, macrófagos e células B (MOORE; DE WAAL MALEFYT; COFFMAN; O'GARRA, 2001). Há ainda uma população de células T efetoras produtoras de IL-10 (IL-10⁺ IFN- γ ⁺ produtores duplos) definida como células T reguladoras 1 (Tr1), responsáveis pela plasticidade ou reprogramação das células T (KEMP; LEVIN; STEIN, 2010). Células T CD4⁺ deficientes em Blimp-1 produzem menos IL-10 (KALLIES; HAWKINS; BELZ; METCALF *et al.*, 2006; MARTINS; CIMMINO; SHAPIRO-SHELEF; SZABOLCS *et al.*, 2006), e o uso de um inibidor do receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1) em camundongos *knockout* condicional (CKO) para Blimp-1 resultou em aumento na frequência de células Th1 e Th17 produtoras de IL-10 e dos níveis de IL-10 (FU; LIN; YEH; WANG *et al.*, 2015).

IL-12 e IL-27 parecem usar vias diferentes para induzir Blimp-1, IL-12 por sinalização através de STAT4, e IL-27 por sinalização através de STAT1/3. A co-expressão dessas citocinas torna provável que ambas as citocinas sinergizem na promoção da expressão de IL-10 dependente de Blimp-1 em células Th1 *in vivo* (NEUMANN; HEINRICH; NEUMANN; JUNGHANS *et al.*, 2014; NEUMANN; SCHEFFOLD; RUTZ, 2019).

No modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) no camundongo, a autoimunidade do sistema nervoso central (SNC) é regulada pelo equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e IL-10 induzida por Blimp1. Células Th17 pré-comprometidas respondem a IL-27 e IL-12 regulando positivamente o Blimp1, e adotando um fenótipo semelhante das células Tr-1, caracterizado pela produção de IL-10 e IFN- γ . Consequentemente, as células T efetoras deficientes em Blimp-1 não produzem IL-10, e a deficiência na função das células Tr-1 leva a EAE provocada por células Th17 no camundongo. A IL-23 neutraliza os efeitos mediados por IL-27 e IL-12 no desenvolvimento de Tr-1, reforçando o fenótipo pró-inflamatório das células Th17. Assim, o equilíbrio dos sinais de IL-23 *versus* IL-12/IL-27 em células T efetoras CD4(+) determina se a inflamação do tecido é perpetuada ou resolvida (HEINEMANN; HEINK; PETERMANN; VASANTHAKUMAR *et al.*, 2014).

No modelo experimental de infecção por *Toxoplasma gondii*, Blimp-1, induzido por IL-12 de forma dependente de STAT4, tem um papel crítico no controle da expressão de IL-10 em células Th1. A deficiência de Blimp-1 levou a inflamação excessiva durante a infecção por *T. gondii* e aumento da mortalidade. A produção de IL-10 a partir de células Th1 foi estritamente dependente de Blimp-1, mas foi ainda aumentada pela função sinérgica do fator de transcrição c-Maf (*musculoaponeurotic fibrosarcoma*), um regulador

transcricional de IL-10 induzido por múltiplos fatores. A expressão de Blimp-1 foi amplamente induzida por IL-27 em células T efetoras, mas antagonizada pelo fator de crescimento transformador (TGF)-beta. O bloqueio efetivo da produção de IL-10 por células Th1 ocorre quando o TGF-beta desloca a regulação de IL-10 de uma via dependente de Blimp-1 para uma via independente de Blimp-1, que envolve células Tr1 induzidas por IL-27. Portanto, a regulação de IL-10 em células Th depende de vários programas de transcrição que integram diversos sinais do ambiente para ajustar a expressão desta citocina imunossupressora crítica (NEUMANN; HEINRICH; NEUMANN; JUNGHANS *et al.*, 2014).

Blimp-1 e o fator regulador de interferon 4 (IRF4) mostraram-se indispensáveis na cooperação para regular a expressão de IL-10 e do receptor de quimiocina C-C 6 (CCR6) em células T regulatórias efetoras (Treg) (CRETNEY; XIN; SHI; MINNICH *et al.*, 2011). Adicionalmente, Kwon e colaboradores (2009) evidenciaram a relação da resposta de IL-21 a jusante de *Prdm1* que se liga aos fatores de transcrição STAT3 e IRF4, que são necessários para a expressão ideal de *Prdm1*. A IL-21 é uma citocina pleiotrópica que induz a expressão do fator de transcrição Blimp-1, que por sua vez regula a diferenciação das células plasmáticas e a homeostase das células T (KWON; THIERRY-MIEG; THIERRY-MIEG; KIM *et al.*, 2009).

No entanto, contrariamente, Liu e colaboradores sugeriram uma relação negativa entre Blimp-1 e IL-21 com base de que a superexpressão de Blimp-1 em células T suprime o diabetes autoimune, enquanto as células T deficientes em Blimp-1 contribuem para a colite em camundongos NOD, e uma correlação inversa entre PRDM1 e IL21 na doença de Crohn. Além disso, a intervenção dessa alça de retroalimentação pelo bloqueio de IL-21, com administração de IL-21R.Fc ou deleção do receptor de IL-21, atenuou a colite mediada por deficiência de Blimp-1 e reforçou o circuito entre Blimp-1 e IL-21 na regulação de autoimunidade (LIU; FU; CHIEN; HSU *et al.*, 2022).

Notadamente, o Blimp-1 regula a produção de citocinas pelas células T por meio de uma via complexa e coordenada por diversos programas de transcrição, dependendo dos vários estímulos no ambiente circundante.

1.6.3 Blimp-1 na homeostase das células T

As células T CD4⁺ virgens podem se diferenciar em diferentes linhagens efetoras, incluindo células Th1, Th2, Th17 e Treg, as quais expressam fatores de transcrição específicos de linhagem (como T-bet, GATA3, receptor órfão relacionado ao ácido retinóico (ROR) γ t ou Foxp3- *forkhead box P3*), respectivamente, a depender do ambiente de estimulação e o meio específico de citocinas (O'SHEA; PAUL, 2010).

Blimp-1 desempenha papéis críticos no desenvolvimento embrionário, na diferenciação de células plasmáticas, e na imunidade, particularmente, na regulação da diferenciação de células Th. A falta de Blimp-1 em células T CD4⁺ e CD8⁺ leva a defeitos funcionais intrínsecos. Camundongos com deleção específica de Blimp-1 em células T (camundongos Blimp-1-CKO) desenvolvem uma resposta inflamatória fatal no cólon como demonstrado pelos estudos de Salehi e colaboradores (2012), como detalhado a seguir.

Salehi e colaboradores (2012) evidenciaram que Blimp-1 é necessário para restringir a produção da citocina inflamatória IL17 por células Th *in vivo*. Camundongos Blimp-1-CKO apresentaram maior número de células TCR β +CD4⁺ produtoras de IL17 em órgãos linfoides e na mucosa intestinal. A análise da expressão de Blimp-1 no nível de célula única durante a diferenciação de Th revelou que a expressão de Blimp-1 é induzida em Th1 e Th2, mas reprimida por TGF β em células Th17. Coletivamente, os resultados descritos pelos autores estabeleceram um novo papel para Blimp-1 na regulação da produção de IL17 *in vivo*. Os autores ainda demonstraram que a expressão de mRNA de Blimp-1 em células cultivadas foi mais proeminente e precoce em condições Th1 comparada à Th2, e em ambas as condições comparadas com as células cultivadas em condições neutras (SALEHI; BANKOTI; BENEVIDES; WILLEN *et al.*, 2012). Em contraste, as células cultivadas sob condições Th17 não expressaram o Blimp-1, ou apenas 5% dessas células expressaram Blimp-1 em 7,5 dias após a estimulação. A expressão de mRNA de Blimp-1 durante a diferenciação das subpopulações Th revelou que o Blimp-1 foi induzido em células Th1 e Th2, mas suprimido em células Th17 pelo fator de crescimento transformador (TGF)- β (SALEHI; BANKOTI; BENEVIDES; WILLEN *et al.*, 2012).

A proteína e o mRNA Blimp-1 são mais altamente expressos em Th2 células em comparação com células Th1, e Blimp-1 atenua a produção de IFN em células CD4 ativadas sob condições não polarizantes. Cimmino e colaboradores (2008) sugeriram que Blimp-1 atua em células Th2 para reforçar a sua diferenciação reprimindo genes Th1 críticos. Em células T CD4⁺, o Blimp-1 inibe a diferenciação Th1 e se opõe à formação de células T *helper* foliculares (Thf) (CIMMINO; MARTINS; LIAO; MAGNUSDOTTIR *et al.*, 2008).

A imunidade eficaz mediada por células B e as respostas de anticorpos geralmente requerem a ajuda de células T CD4+. Células Thf, subconjunto distinto de células T efectoras CD4+, fornece esse auxílio. A expressão do fator de transcrição Bcl6 em células T CD4+ é necessária e suficiente para a diferenciação *in vivo* de Thf e as células T auxiliam as células B em camundongos. Em contraste, o fator de transcrição Blimp-1, um antagonista de Bcl6, inibe a diferenciação de Thf, prevenindo assim o centro germinativo de células B e as respostas com produção de anticorpos. Esses achados demonstram que as células Thf são necessárias para respostas adequadas de células B *in vivo* e que Bcl6 e Blimp-1 desempenham papéis centrais, mas opostos na diferenciação das células Thf (JOHNSTON; POHOLEK; DITORO; YUSUF *et al.*, 2009). A deleção de Blimp-1 em células T CD4+ aumenta a diferenciação de células Thf (FU; YEH; CHU; YEN *et al.*, 2017). As células Thf e as células T auxiliares periféricas produzem IL-21 e acredita-se que contribuam para a ativação de células B foliculares e extrafoliculares, respectivamente, em doenças autoimunes.

Adicionalmente, Blimp-1 (mRNA) também foi detectado em células Treg (KALLIES; HAWKINS; BELZ; METCALF *et al.*, 2006; MARTINS; CIMMINO; SHAPIRO-SHELEF; SZABOLCS *et al.*, 2006). No modelo animal, Blimp-1 foi expresso no subconjunto de células Foxp3+ Treg com um fenótipo efector na produção de IL-10. No entanto, Blimp-1 parece ser dispensável para a formação de células Tregs efectoras, mas essencial para a sua capacidade de produzir IL-10 (CRETNEY; XIN; SHI; MINNICH *et al.*, 2011).

Coletivamente, vários estudos corroboraram que o Blimp-1 é crítico no controle coordenado da expressão gênica durante o desenvolvimento, diferenciação e função das células T. A expressão de Blimp-1 é principalmente confinada a células T ativadas e é essencial para a produção de interleucina (IL)-10 por um subconjunto de células T reguladoras *forkhead box* (Fox)p3+ com um fenótipo efector. O Blimp-1 também é necessário para induzir a eliminação de células no timo e modula criticamente a ativação e proliferação de células T periféricas. Além disso, o Blimp-1 promove o comprometimento da linhagem Th2 e limita a diferenciação de células Th1, Th17 e Thf (FU; YEH; CHU; YEN *et al.*, 2017).

De interesse especial, vários estudos demonstraram o papel de Blimp-1 na regulação das células Th17 secretoras de IL-17, como o modelo de Salehi e colaboradores (2012) que evidenciaram que o Blimp-1 regula e mantém a homeostase da mucosa intestinal, limitando o número de células Th17 (SALEHI; BANKOTI; BENEVIDES; WILLEN *et al.*, 2012); o modelo de diabetes autoimune nos camundongos NOD (*Non-obese*

diabetic), e que desenvolvem diabetes tipo I por insulinite, (LIN; CHOU; YEH; FU *et al.*, 2013; SALEHI; BANKOTI; BENEVIDES; WILLEN *et al.*, 2012); e o modelo de camundongos deficientes em Blimp-1 que desenvolveram respostas Th1 e Th17 exacerbadas e a elevada suscetibilidade à EAE (LIN; YEH; CHEN; CHIOU *et al.*, 2014), como detalhado a seguir.

Nos experimentos em modelos de camundongos NOD transgênicos (Tg) nocaute condicional (CKO), nos quais Blimp1 é superexpresso ou deletado em células T, foi possível analisar lado a lado nesses camundongos Tg ou CKO, os mecanismos potenciais da modulação mediada por Blimp-1 no diabetes autoimune. A superprodução de Blimp-1 em células T atenuou a insulinite e a incidência de diabetes nos camundongos NOD. Consistente com esses resultados, o efeito diabetogênico de esplenócitos foi notavelmente prejudicado em camundongos Blimp1-Tg. Além disso, a superprodução de Blimp-1 reprimiu a proliferação e a ativação de linfócitos, e melhorou a função das células Tregs em camundongos NOD. Em contraste, camundongos sem Blimp-1 em células T aumentaram acentuadamente as células Th1 e Th17 e desenvolveram linfócitos altamente proliferativos e ativados. Surpreendentemente, a superexpansão de células Th1 e Th17 em camundongos CKO foi reduzida pela introdução de um transgene Blimp1, reforçando o papel emergente de Blimp-1 na autoimunidade. Os autores concluíram que Blimp-1 orquestra uma modulação específica de células T de autoimunidade afetando a proliferação e ativação de linfócitos, Th1 e a diferenciação de células Th17 e função das células Treg. Os autores ainda demonstraram que Blimp-1 regulou negativamente a diferenciação de Th17 via modulação *Rora* e *Rorc*. A regulação de *Prdm1* foi considerada dependente de IL-21, e controlada pela cooperação entre STAT3 e o fator regulador de interferon 4 (IRF4) (LIN; CHOU; YEH; FU *et al.*, 2013).

Nos camundongos NOD e nocaute condicional (CKO) específico para Blimp-1 em células T também foram empregados no modelo da EAE. A gravidade da EAE foi dramaticamente exacerbada em camundongos CKO, e os números de células T Th1, Th17, IFN- γ +IL-17A+ e IL-21+IL-17A+CD4+ infiltrantes foram aumentados no cérebro e na medula espinhal. Além disso, a proporção de Tregs/efetoras e a produção de IL-10 de Tregs foram reguladas negativamente no sistema nervoso central de camundongos CKO. Conclui-se que Blimp-1 suprime a EAE através da regulação negativa das células Th1 e Th17 e do enfraquecimento das células Treg (LIN; CHOU; YEH; FU *et al.*, 2013; LIN; YEH; CHEN; CHIOU *et al.*, 2014).

Nos camundongos NOD, os níveis de expressão de *Rora* e *Rorc* foram proeminentemente aumentados em células T CKO CD4+ em estado estacionário ou sob

um estado ativado em comparação com os controles, indicando um papel crítico de Blimp-1 na regulação negativa de fatores de transcrição específicos das células Th17. Em contraste, seus transcritos foram regulados negativamente em células T CD4⁺ transgênicas nas mesmas condições comparado aos controles. Além disso, as expressões de *Il17a*, *Il17f*, *Il22* e *Il23r* foram promovidas em níveis muito mais altos em células T CKO CD4⁺ e foram inibidas em níveis significativamente mais baixos em células T CD4⁺ transgênicas em comparação com células de controle, seja em estado estacionário ou em um estado estimulado (LIN; CHOU; YEH; FU *et al.*, 2013; LIN; YEH; CHEN; CHIOU *et al.*, 2014).

Blimp-1 é capaz de se ligar ao menos a um local no gene *Il17a* em células Th2, mas isso não é suficiente para diminuir a transcrição de *Il17a* em células estimuladas sob condições Th17. Entre as possibilidades, uma vez que a expressão de *Il17a* e *Il23r* são ambas reguladas positivamente por *Rorc* (codificando ROR γ t), Blimp-1 também pode regular *Il23r* e *Il17a* indiretamente, agindo como um repressor de *Rorc* (SALEHI; BANKOTI; BENEVIDES; WILLEN *et al.*, 2012).

Considerando o papel de Blimp-1 na função inflamatória das células Th17 ainda a ser explorado, foram fundamentais os trabalhos do grupo de Cua e colegas. Por meio da deleção específica do *Prdm1* em células T periféricas, os autores demonstraram que Blimp-1 é um fator essencialmente regulado por IL-23, e que atua em conjunto com o fator de transcrição mestre ROR γ t para estabilizar e aumentar a função das células Th17.

Notavelmente, Jain e colaboradores buscaram avaliar o mecanismo de como o Blimp-1 regula a imunopatologia mediada por Th17 em um sistema que não é complicado por defeitos de desenvolvimento de células T tímicas, usando um sistema *distal-Lck-Cre* (*Dlckcre*) que promove a deleção de genes durante o estágio tardio do desenvolvimento tímico positivo único (ZHANG; WANG; WEI; BAIMUKANOVA *et al.*, 2005; ZHANG; BEVAN, 2012). Em contraste com os camundongos *Prdm1^{fl/fl} Cd4^{cre}*, os camundongos Blimp-1-CKO (*Prdm1^{fl/fl} RosaYFP^{fl} Dlck^{cre}*) apresentaram número normal de timócitos e não exibiram nenhum sinal de autoimunidade espontânea. Coletivamente, os resultados indicaram que esses camundongos Blimp-1-CKO são camundongos com desenvolvimento normal e que estão completamente livres de inflamação autoimune espontânea. Usando este sistema de geração de camundongos e abordagens de superexpressão mediada por retrovírus, Jain e colaboradores demonstraram que Blimp-1 era um gene alvo direto de IL-23, que desempenha um papel crítico na geração de células Th17 patogênicas, aumentando a expressão de IL-23R, GM-CSF e interferon-gama (IFN-g), enquanto reprime IL-2 (JAIN; CHEN; KANNO; JOYCE-SHAIKH *et al.*, 2016).

Adicionalmente, estudo de associação genômica ampla e de ocupação (revelaram que o Blimp-1 se co-localizou com fatores de transcrição RORgt, STAT-3 e p300 nos *loci* de *Il23r*, *Il17a/f* e *Csf2* (*Colony stimulating factor 2* - fator estimulador de colônia 2) para aumentar a expressão desses genes codificadores. Blimp-1 também se ligou diretamente e reprimiu os *loci* dos genes codificadores *Il2* e *Bcl6*. Em conjunto, os resultados demonstraram que Blimp-1 é um fator de transcrição essencial a jusante de IL-23 que atua em conjunto com RORgt para ativar o programa inflamatório Th17 (JAIN; CHEN; KANNO; JOYCE-SHAIKH *et al.*, 2016).

Coletivamente, Blimp-1 é um gene alvo de IL-23 que desempenha um papel crítico na geração de células Th17 patogênicas. Como um fator de transcrição chave induzido por IL-23 para conduzir a função inflamatória de células Th17, Blimp-1 aumentou a expressão do receptor de IL-23 (IL-23R), fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e IFN- γ nas células T periféricas, enquanto reprime IL-2 em células Th17. (JAIN; CHEN; KANNO; JOYCE-SHAIKH *et al.*, 2016).

A expressão de Blimp-1 é principalmente confinada a células T ativadas e é essencial para a produção de interleucina (IL)-10 por um subconjunto de células T reguladoras *forkhead box* (Fox)p3+ com um fenótipo efetor. Blimp-1 também é necessário para induzir a eliminação de células no timo e modula criticamente a ativação e a proliferação de células T periféricas. Além de promover o comprometimento da linhagem Th2 e limitar a diferenciação de células Th1, Th17 e Thf, Blimp-1 coordena com outros fatores de transcrição a regulação da expressão de IL-2, IL-21 e IL-10 em linfócitos T efetores (FU; YEH; CHU; YEN *et al.*, 2017).

Conclui-se que os achados nos diferentes estudos dependem do modelo experimental utilizado para analisar o mecanismo pelo qual Blimp-1 regula a imunopatologia mediada por Th17, se um modelo que causa defeitos de desenvolvimento de células T tímicas ou aquele de deleção de genes durante o estágio final de desenvolvimento de timócitos únicos positivos que se mantêm nas células T periféricas

1.6.4 Blimp-1 na homeostase dos queratinócitos

Blimp-1 é abundante em vários tecidos epiteliais de camundongos, e mais recentemente foi identificado o seu papel na diferenciação de sebócitos (CHANG;

CATTORETTI; CALAME, 2002; HORSLEY; O'CARROLL; TOOZE; OHINATA *et al.*, 2006). Blimp-1 é especialmente expresso em queratinócitos da camada granulosa, os precursores de corneócitos mais diferenciados (CANDI; SCHMIDT; MELINO, 2005). A deleção epidérmica condicional de *Prdm1*, gene codificador do Blimp-1, causa não apenas diferenciação defeituosa de sebócitos, mas também defeitos graves na diferenciação terminal de queratinócitos epidérmicos, que levam a um atraso na formação da barreira de permeabilidade epidérmica, hiperqueratinização e descamação anormal (MAGNÚSDÓTTIR; KALACHIKOV; MIZUKOSHI; SAVITSKY *et al.*, 2007).

A camada granulosa da epiderme neonatal é expandida e contém grânulos de querato-hialina anormalmente aumentados. Após deleção de gene condicional em camundongos, Magnúsdóttir *et al.* (2007) descreveram o repressor transcricional Blimp-1 como um importante regulador da transição de queratinócitos da camada granulosa para a camada córnea. Dentre os genes desregulados na epiderme do camundongo CKO, incluem aqueles que codificam fatores de transcrição, componentes de transdução de sinal, proteinases e enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos (MAGNÚSDÓTTIR; KALACHIKOV; MIZUKOSHI; SAVITSKY *et al.*, 2007). Mais de 250 genes regulados pelo Blimp-1 na epiderme foram identificados, incluindo quatro alvos diretos da repressão do Blimp-1: *Nfat5*, *Fos*, *Dusp16* e *Prdm-1*. Por exemplo, o NFAT5 (fator nuclear das células T ativadas 5) é expresso de forma ubíqua e normalmente ativado durante o estresse osmótico para restaurar o conteúdo normal de água (NEUHOFER, 2010). Identificar *Nfat5* como um alvo de repressão do Blimp-1 indica que a cornificação envolve a supressão da regulação osmótica normal em células granulosas. Essas observações sugerem o controle transcricional do conteúdo de água celular como pré-requisito para a maturação de queratinócitos granulares em corneócitos. Tais dados também fornecem uma base para futuros estudos moleculares sobre os mecanismos e os distúrbios da cornificação da pele (MAGNÚSDÓTTIR; KALACHIKOV; MIZUKOSHI; SAVITSKY *et al.*, 2007).

O comprometimento da linhagem epidérmica ocorre quando as células-tronco multipotentes são definidas em uma das três linhagens: a epiderme, o folículo piloso e a glândula sebácea (GS). Como e quando uma linhagem se torna especificada permanece desconhecido. Horsley e colaboradores demonstraram a existência de uma população de células progenitoras unipotentes que residem no GS e expressam o repressor transcricional Blimp1. Usando estudos de cultura de células e rastreamento de linhagem genética, os autores demonstraram que as células que expressam Blimp1 estão a montante de outras células da linhagem GS. Blimp1 parece governar a entrada celular na glândula, uma vez que sua perda leva à expressão elevada de c-myc, proliferação celular aumentada e

hiperplasia GS. Os defeitos da GS associados à perda de Blimp1 levaram ao aumento da atividade das células-tronco da protuberância, sugerindo que quando a homeostase normal do GS é perturbada, as células-tronco multipotentes da protuberância podem ser mobilizadas para corrigir esse desequilíbrio (HORSLEY; O'CARROLL; TOOZE; OHINATA *et al.*, 2006).

Por fim, Sellheyer e colaboradores (2010) concluíram que é difícil de conciliar o padrão de expressão com a função do Blimp-1 como um marcador para células progenitoras sebocíticas, mas indica o seu papel fundamental na diferenciação terminal dos sebócitos. Dentro da epiderme interfolicular, sua localização exclusiva na camada granulosa sugere uma função central na homeostase da barreira cutânea em humanos (SELLHEYER; KRAHL, 2010).

Capítulo 2: Objetivos

2.1- Objetivos gerais:

O estudo proposto busca identificar a expressão da proteína Blimp-1 e do gene codificador *PRDM1* na psoríase, e estabelecer relações com a sinalização de citocinas na modulação da resposta Th17.

2.2- Objetivos específicos:

- Analisar a expressão dos transcritos *PRDM1* e *IL17* por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real na pele afetada comparada à pele não afetada dos pacientes com psoríase;
- Identificar a proteína Blimp-1 por microscopia de fluorescência confocal na pele afetada e não afetada nos pacientes com psoríase;
- Realizar análises de bioinformática de banco de dados de transcriptomas públicos da expressão gênica de seleção de citocinas indutoras e efetoras, fatores de transcrição e proteínas imunes envolvidas no programa inflamatório Th17;
- Analisar a presença de correlações entre a expressão gênica do *PRDM1* e dos genes codificadores de citocinas, fatores de transcrição e proteínas imunes envolvidos no eixo IL-23/Th17.

Capítulo 3: Material e Métodos

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Procedimentos gerais

Os participantes do estudo foram convidados e selecionados durante o expediente ordinário do Ambulatório de Psoríase do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP) – Universidade de São Paulo (USP).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCFMRP-USP com processo nº 5666/2016 (ANEXO A). A inclusão dos indivíduos no estudo foi realizada em acordo com as normas estabelecidas pelo CEP do HCFMRP-USP. O trabalho de pesquisa foi conduzido de forma a contemplar as disposições contidas nas resoluções CNS nº 466/2012 sobre a pesquisa envolvendo seres humanos.

A elaboração do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do sujeito da pesquisa foi baseada nas resoluções vigentes, e seguiu as seguintes orientações: linguagem acessível e esclarecimentos do propósito do estudo. Foi assegurada aos participantes a liberdade de opção da não participação no estudo, sem prejuízo, atraso ou interferência no seu seguimento clínico, escolha ou realização do tratamento da sua doença. Os participantes foram esclarecidos verbalmente e por escrito em texto impresso do TCLE acerca da proposta geral do estudo, dos procedimentos para obtenção das amostras, seus riscos e benefícios. Foram asseguradas a confidencialidade dos dados e a desistência da participação a qualquer momento, sem prejuízo para o seguimento médico. Seguida à assinatura, os participantes receberam uma cópia do TCLE.

Os critérios de inclusão foram: *i)* Pacientes com o diagnóstico clínico e/ou histopatológico da doença; *ii)* lesões em atividade; *iii)* a concordância na participação no estudo; *iv)* idade maior ou igual de 18 anos; *v)* ausência de tratamentos sistêmicos.

Os critérios de exclusão foram aqueles contrários aos de exclusão, estar gestante; ter outras condições de saúde que pudessem interferir na análise dos resultados, a critério do investigador, incapacidade, dificuldade ou não concordância em participar do estudo.

Seguida à concordância de participação no estudo, os pacientes foram avaliados em acordo com o índice da área e severidade da psoríase (PASI) e o índice de qualidade de vida dermatológico (DLQI). Esses instrumentos permitiram estratificar a

gravidade da psoríase em leve (PASI inferior a 10) e moderada a grave (PASI igual ou superior a 10) e o impacto na qualidade de vida provocado pela doença (FINLAY, 2005).

3.2 Procedimento de coleta das amostras de pele

Seguida à seleção de indivíduos com o diagnóstico clínico e /ou histopatológico de psoríase vulgar, aceitação na participação do estudo e esclarecimentos, sobre os procedimentos, procedeu-se com a biópsia cutânea. Foram empregadas técnicas padronizadas de assepsia da pele com solução hidroalcolica de digluconato de clorexidine a 2% e de anestesia intumescente com lidocaína a 2% com vasoconstrictor. Em seguida, foram retirados fragmentos com punçador de 4 mm: uma de local da pele com lesão característica clínica mais evidentes da psoríase, e um outro de pele clinicamente normal do paciente, ambas na mesma região corpórea. Os fragmentos de pele afetada (PA-PsO) e pele não-afetada (PNA-PsO) com psoríase dos pacientes foram conservados em frascos estéreis com TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific, Gaithersburg, MD, EUA) para a realização dos ensaios da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR), ou conservados em meio RPMI para análise por microscopia de fluorescência confocal.

Foram coletados fragmentos de PA-PsO e PNA-PsO de 34 pacientes com psoríase vulgar para os ensaios RT-qPCR (n=29) ou imunofluorescência (n=5).

3.3. Reação de imunofluorescência para microscopia confocal

Seções de tecido embebidas em parafina (5 µm de espessura) das amostras de PA-PsO e PNA-PsO foram coradas usando anticorpos primários contra anti-*PRDM1*/Blimp-1 produzidos em camundongos (Abcam, Cambridge, MA, EUA, Cat# ab81961, diluição 1: 200) ou anti-citoqueratina 17 produzidos em coelho (K17) (Abcam, Cat# ab53707, diluição 1:1000). Em seguida, as amostras foram incubadas com os anticorpos secundários durante 30 minutos, anticorpo anti-camundongo produzido em ratos, IgG Alexa Fluor 488 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EUA, Cat# 615-545-214, 1:1000) e anticorpo anti-coelho IgG Alexa Fluor 594 (Jackson ImmunoResearch, Cat# 611-585-215, 1:1000). Os núcleos foram corados com dicloridrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Invitrogen, Renfrewshire, Escócia, Reino Unido, Cat# D1306, 1:1.000). As imagens foram adquiridas usando um Axio Observer com um microscópio LSM 780 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemanha) e analisadas usando o pacote de processamento de imagem Fiji no Image J (plataforma de código aberto).

3.4 Procedimentos para a extração do RNA dos fragmentos da pele

Cada fragmento de PA-PsO ou PNA-PsO foi colocado em 1 mL do kit de purificação TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific, Gaithersburg, MD, EUA) e homogeneizado com o uso do triturador de tecidos (IKA™ T10 Basic, Ultra-Turrax, Staufen, Germany), com auxílio da haste de trituração autoclavada descartável (IKA™ S10D 7G-KS-110, Staufen, Germany), previamente tratada com dimetilpirocarbonato (DEPC), para eliminação de RNase. Seguida a essa etapa inicial, as amostras obtidas foram conservadas a -70° C até o momento da extração de RNA total. Posteriormente, o conteúdo armazenado foi transferido cuidadosamente para tubo Phasemaker™ (Thermo Fisher Scientific, Gaithersburg, MD, EUA), previamente centrifugado em centrífuga Eppendorf 5804R (Hamburg, Germany), a 12000xg. As amostras que apresentaram maior conteúdo de gordura foram centrifugadas por 5 minutos a 12000xg a 4° C e o sobrenadante transferido para um tubo limpo. O material foi incubado por 5 minutos, para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos, e então adicionado 0,2 mL de clorofórmio ao tubo, que foi agitado manualmente por 15 segundos, e a seguir incubado por 2 minutos. Na sequência, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000xg a 4° C, que resultou na formação de uma fase abaixo, de coloração avermelhada, composta por fenol-clorofórmio, e um sobrenadante, incolor. O gel do tubo Phasemaker™ (Thermo Fisher Scientific, Gaithersburg, MD, EUA), formou uma barreira entre a camada superior e a inferior, então foi realizada a transferência do sobrenadante para um tubo Eppendorf de 1,5 mL estéril. A seguir, foi realizada a técnica de purificação do RNA, utilizando-se o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, EUA), que consistiu nas etapas subsequentes descritas a seguir:

- i. Adição de 0,2 mL de etanol a 95% ao lisado sobrenadante e homogeneizado em pipeta;
- ii. Transferência do homogeneizado para o *Spin Basket Assembly* e centrifugação a 12.000xg por 1 minuto, e descarte do eluente.
- iii. Adição de 0,6 mL de RNA *wash solution* (RWA) em etanol, posterior centrifugação a 12.000xg por 1 minuto, e descarte do eluente.
- iv. Colocação de 0,05 mL de mix de incubação de DNase I (composto por 0,04 mL de Yellow Core Buffer; 0,005 mL de MnCl₂ e 0,005 mL de DNase I) sobre a membrana, por 15 minutos, em temperatura ambiente.

- v. Adição de 0,2mL de DNase *stop solution* em etanol e centrifugação a 12.000xg por 1 minuto, e posterior descarte do eluente.
- vi. Adição de 0,6 mL de RWA; centrifugação por 1 minuto e esvaziamento
- vii. Adição de 0,25 mL de RWA; centrifugação por 2 minutos, e transferência de Spin Basket para tubo de eluição;
- viii. Eluição do RNA em 0,045 mL de água nucleasse-free;
- ix. Quantificação da concentração de RNA em cada amostra em espectrofotômetro, a leitura foi realizada em NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer V 3.7.1 (Thermo Fisher Scientific), à 260 nm de absorbância (A_{260}) e armazenado à temperatura de -70°C até síntese do DNA complementar (cDNA).

3.5 Procedimentos para a síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total, com auxílio do High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Primers aleatórios garantem que a síntese de cDNA ocorra de maneira eficaz com todas as moléculas de RNA presentes, inclusive RNAm e RNAr. Em suma, 500 ng de RNA foram diluídos para um volume final de 10 μ L e a essa quantidade foram adicionados 10 μ L de mix de reagentes, previamente homogeneizados conforme as instruções do fabricante: 2 μ L de RT Buffer (10x); 0,8 μ L de dNTP à 100mM; 1 μ L de oligo dT à 50 μ M; 1 μ L da enzima transcriptase reversa; 1 μ L de inibidor de RNase; 4,2 μ L de água livre de endonucleases. Posteriormente, o homogeneizado foi submetido a ciclagem de 25°C por 10 minutos; 37°C por 120 minutos; 85°C por 5 minutos; e resfriado a 4°C e a reação de transcrição realizada em um termociclador Mastercycler™nexus Cyclers Eppendorf (Hamburg, Germany).

3.6 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

Após a síntese de cDNA, a expressão relativa dos genes do sistema de temporização circadiana, dos genes do sistema regulador do balanço energético e controles endógenos foi avaliada por RT-qPCR. O ensaio RT-qPCR foi realizado no sistema StepOne Plus Real-Time PCR (Applied Biosystems™) com Ensaio PrimerTime Std™ qPCR e PrimeTime™Gene Expression Master Mix, um ensaio baseado em sonda. Os iniciadores e a sonda foram providenciados pela IDT (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, USA) em acordo com os seguintes identificadores: *PRDM1* (*positive regulatory domain zinc finger protein 1*- proteína de dedo de zinco do domínio regulatório positivo 1) humano (Hs.PT.56a.39313533.g); *GAPDH* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) humano;

(Hs.PT.39a.22214836); *B2M* (Beta 2-microglobulina) humano (Hs.PT.58v.18759587) (Tabela 1). As reações de RT-qPCR foram feitas em duplicatas, utilizando placas de 96 poços com 1,0 µL do ensaio Ensaio PrimerTime Std™ qPCR (Integrated DNA Technologies) contendo oligonucleotídeos e sondas específicas para cada gene-alvo, 5 µL de tampão Master Mix, 1,0 µL de cDNA diluído (100ng/µL) e 3 µL de água DEPC.

O ciclo de PCR consistiu em 2 minutos a 50° C, um ciclo de desnaturação de 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Os dados foram analisados pelo Software v2.3 StepOnePlus™ com linha de base definida automaticamente e limiar de fluorescência ajustado manualmente usado para determinação dos valores de Cq. As amostras foram normalizadas para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β2-microglobulina (B2M).

Tabela 1- Primers e sondas RT-qPCR pré-validadas e empregadas no estudo

Gene	Id do ensaio IDT ^a	Sequências Humanas de primers e sondas
PRDM1 Humano	Hs.PT.56a.39313533.g	5'-CAGAGTTCATTTTCTCAGTGCTC-3' 5'-GAAAGGCTTCACTACCCTTATCC-3' P:/5'-/56-FAM/TGATGAATC/ZEN/TCACACAAACACAGAGCAGT/3IABkFQ/-3'
IL17 Humano	Hs.PT.58.2545178	5'-TCATCCATCCCCAGTTGATTG -3' 5'-TGATTCTGCCTTCACTATGG -3' P:/5'-/56-FAM/ACCTCATTG/ZEN/GTGTCACTGCTACTGC/3IABkFQ/-3'
GAPDH Humano	Hs.PT.39a.22214836	5'-TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG-3' 5'-ACATCGCTCAGACACCATG-3' P:/5'-/56-FAM/AAGGTCGGA/ZEN/GTCAACGGATTGGTC/3IABkFQ/-3
B2M Humano	Hs.PT.58v.18759587	5'-ACCTCCATGATGCTGCTTAC-3' 5'-GGACTGGTCTTCTATCTCTTGT-3' P:/5'-/56-FAM/CCTGCCGTG/ZEN/TGAACCATGTGACT/3IABkFQ/-3'

Abreviaturas: *PRDM1*, domínio regulatório positivo 1; *GAPDH*, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; *B2M*, Beta 2-microglobulina; *IL17*, Interleucina-17; P, Probe; ^a: IDT Coralville, IA, EUA

As análises dos dados de RT-qPCR em tempo real foram realizadas pelo método Cq comparativo usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A comparação estatística entre as amostras foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.7 Avaliação da expressão gênica e análise de bioinformática

No repositório *Gene Expression Omnibus* (GEO) de acesso público, e que cataloga perfis de expressão gênica de todo o genoma, foi identificado o banco de dados GSE13355 de biópsias de pele de 58 pacientes com psoríase e 64 controles saudáveis,

adquiridos por meio de tecnologia de *microarray*. Dados normalizados e análises de expressão diferencial foram obtidos com a plataforma OMiCC (<https://omicc.niaid.nih.gov/>) (SHAH; GUO; WENDELSDORF; LU *et al.*, 2016). Em seguida, as expressões dos seguintes genes pré-selecionados foram avaliadas: *PRDM1*, *TNF*, *IL23A*, *IL23R*, *IL17A*, *IL17RA*, *TGFB1*, *IL6*, *IL21*, *IL22*, *IL10*, *IL27*, *STAT3*, *RORC*, *S100A9* e *LCN2*. A expressão de cada gene foi posteriormente avaliada por meio da análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Tukey. As correlações foram realizadas com o método de Spearman. As análises estatísticas e gráficos foram gerados usando GraphPad Prism v. 5.03 (San Diego, CA, EUA).

Capítulo 3: Resultados

3.1 Amostra do estudo

Inicialmente, o estudo analisou amostras de 34 pacientes adultos com lesões ativas de PsO vulgar, idade média de $51,12 \pm 14,29$ anos. Os pacientes eram predominantemente do sexo masculino ($n = 25$; 73,5%) (Tabela 2), com a duração de $11,31 \pm 10,82$ anos de doença, com PsO moderada a grave analisada pelo PASI, escore médio de $13,0 \pm 6,69$.

Tabela 2 - Dados demográficos e clínicos do grupo estudado

Variável	Grupo de estudo (N = 34)
Idade (idade, média \pm DP)	51.12 ± 14.29
Sexo	
Masculino, n (%)	25 (73.5)
Feminino, n (%)	9 (26.5)
Duração da doença (anos, média \pm DP)	11.31 ± 10.82
PASI (média \pm DP)	13.0 ± 6.69
DLQI (média \pm DP)	12.75 ± 6.34

Abreviaturas: DP, Desvio-Padrão; PASI, Índice de Área e Gravidade da Psoríase; DLQI, Índice de qualidade de vida em dermatologia

3.2 RT-qPCR

O ensaio RT-qPCR mostrou aumento na expressão de mRNA de *PRDM1* ($p < 0,001$) e mRNA de *IL17* ($p < 0,001$) nas amostras de PA-PsO em comparação com a PNA-PsO dos pacientes (Figura 2a-b). Adicionalmente, foi observada uma correlação positiva entre a expressão de *IL17* e *PRDM1* ($r = 0,44$; $p < 0,0005$) (Figura 2c).

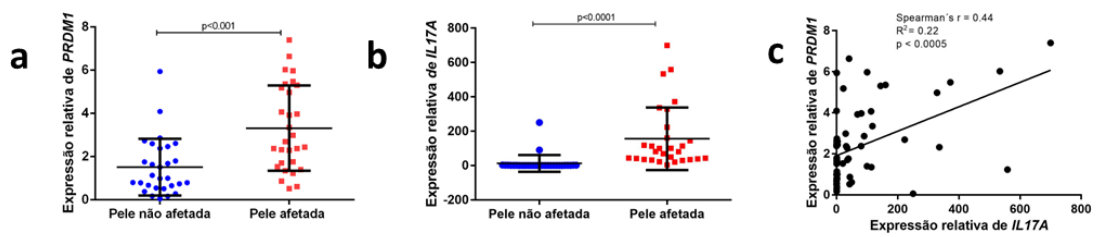


Figura 2 - Análise de PCR quantitativa em tempo real de genes selecionados na pele afetada e pele não afetada de pacientes com psoríase. (a-b) Os transcritos de mRNA de *IL17* e *PRDM1* estão elevados nas amostras de pele afetada (PA-PsO) em relação à pele não afetada (PNA-PsO) de pacientes com psoríase ($n = 34$ para cada). **(c)** Há correlação positiva entre a expressão gênica de *PRDM1* e *IL17* nas amostras. Os transcritos de mRNA foram determinados por RT-qPCR, e os valores médios são representados graficamente após a normalização da expressão usando os genes de referência *GAPDH* e *B2M*. Dados analisados pelo método estatístico Mann-Whitney e teste de correlação de Spearman.

3.4 Microscopia de fluorescência confocal

Histologicamente, acantose, hiperqueratose, paraqueratose e hipogranulose da epiderme, cristas epidérmicas alongadas, e vasos sanguíneos dilatados e contorcidos alcançando as pontas das papilas dérmicas foram observadas nas amostras da PA-PsO.

A análise de imunofluorescência por microscopia confocal de cortes de biópsia de pele confirmou um aumento na expressão da proteína BLIMP-1 nas amostras de PA-PsO em comparação com PNA-PsO dos pacientes. A hiperproliferação (acantose) da epiderme foi notável na PA-PsO, que possui expressões pronunciadas das proteínas citoqueratina 17 (K17) e BLIMP-1. A expressão da proteína BLIMP-1 foi observada ao longo de todas as camadas epidérmicas do queratinócito nas amostras da PA-PsO, mas não nas amostras da PNA-PsO (Figura 3).

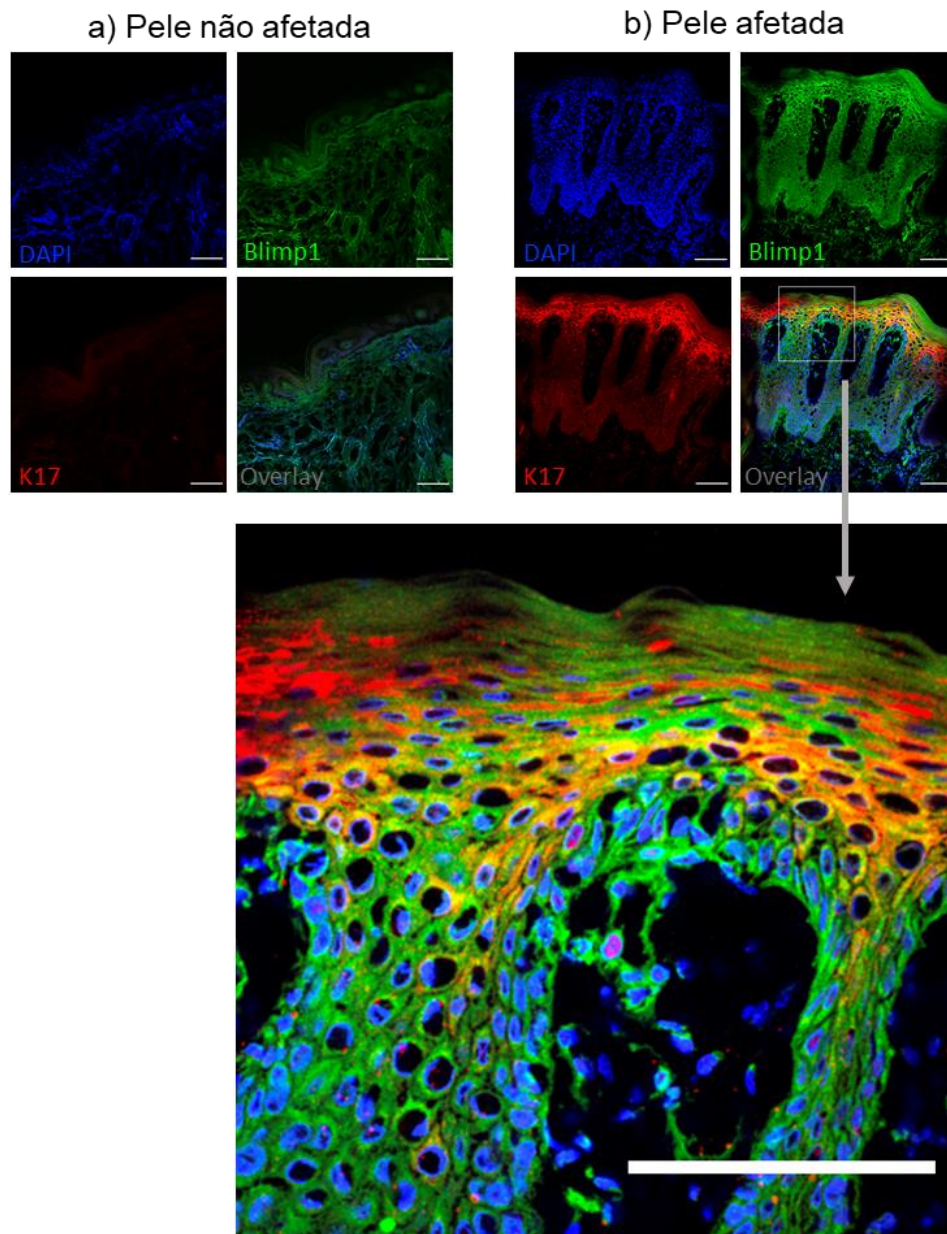


Figura 3 - Análise de imunofluorescência confocal da psoríase. A epiderme da pele afetada pela psoríase apresenta maior expressão de BLIMP-1. **(a)** A análise de imunofluorescência de secções de fragmentos da pele não afetada de pacientes com psoríase (PNA-PsO) mostrou uma menor expressão da proteína BLIMP-1 (vermelho) e DAPI (azul) ao longo de todas as camadas epidérmicas. **(b)** A hiperproliferação (acantose) da epiderme é notável e a expressão da citoqueratina 17 (K17) é pronunciada na pele afetada do paciente com psoríase (PA-PsO). A barra de escala indica 100 μm .

3.2 Análise bioinformática de banco de transcriptoma público

Em seguida, foram realizadas análises por meio de bioinformática do banco de transcriptoma público GSE 13355 (Nair *et al.*, 2009), um repositório de expressão gênica de biópsias da pele de 122 indivíduos, compreendidas em amostras de pele afetada (PA-PsO) e não-afetada (PNA-PsO) de indivíduos com psoríase e de pele normal indivíduos controles (PNC).

Na análise bioinformática, foram selecionados alguns genes de interesse do banco de dados GSE 13355. Primeiramente, buscamos avaliar a expressão de genes codificadores de fatores de transcrição. As amostras de PA-PsO mostraram aumento da expressão gênica de *PRDM1* e *STAT3* em comparação com amostras de PNA-PsO e PNC ($p < 0,001$); mas foi notada uma redução da expressão do gene *RORC* na PA-PsO em comparação com PNA-PsO e PNC ($p < 0,001$) (Figura 4a; Tabela 3). Na avaliação das correlações entre as expressões gênicas de *PRDM1* e os fatores de transcrição, a expressão de *PRDM1* mostrou uma correlação positiva ($p < 0,0001$) com a expressão do gene *STAT3* ($r = 0,65$), mas uma correlação negativa com *RORC* ($r = - 0,60$) pelo coeficiente de correlação de Spearman (Figura 4c; Tabela 4).

Em seguida, a análise da expressão de genes codificadores das proteínas imunes *S100A9* e *LCN2* (Figura 4b; Tabela 3) mostrou aumento da expressão de ambas na PA-PsO (vs PNC; vs PNA-PsO, $p < 0,001$). A expressão de *S100A9* também foi elevada na comparação PNA-PsO vs PNC ($p < 0,01$). Na análise de correlações, a expressão gênica de *PRDM1* mostrou correlações positivas ($p < 0,0001$) com *S100A9* ($r = 0,63$) e *LCN2* ($r = 0,50$), pelo coeficiente de correlação de Spearman (Figura 4d; Tabela 4).

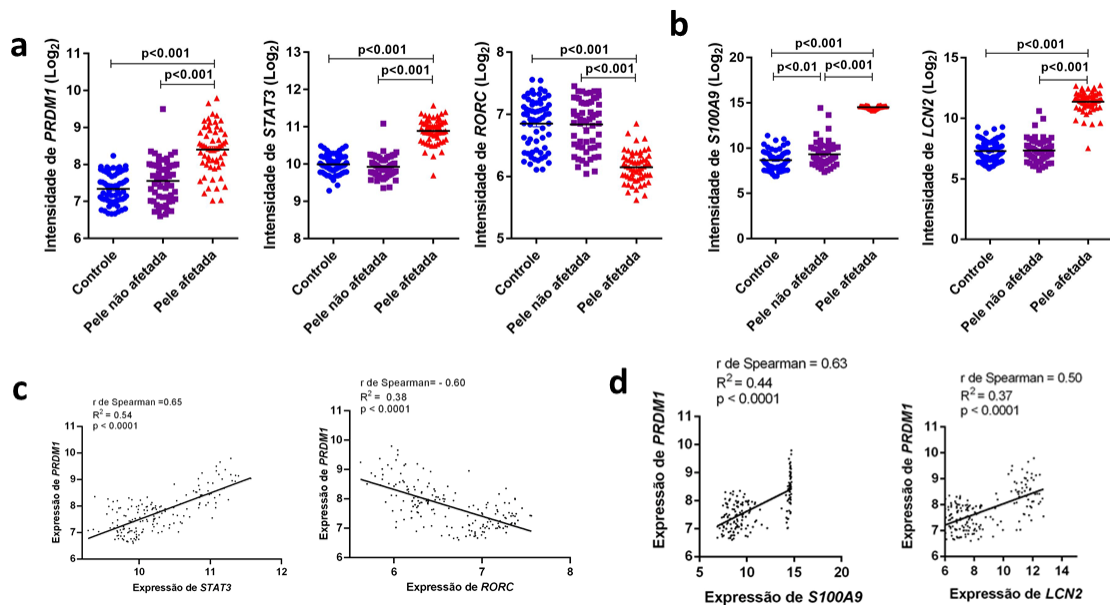


Figura 4 - Expressão gênica de domínio regulatório positivo 1 (PRDM1), codificadores de fatores de transcrição e de proteínas imunes na psoríase (PsO). A análise da expressão de genes (intensidade log₂) selecionados em amostras de pele afetada (PA-PsO) e não afetada (PNA-PsO) de pacientes com PsO (n = 58), e amostras de pele normal de controles (PNC; n = 64) do transcriptoma do banco GSE13355 mostrou expressão aumentada de **(a-b)** *PRDM1*, genes codificadores do transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (*STAT3*), da proteína de ligação ao cálcio *S100A9* (*S100A9*) e da lipocalina 2 (*LCN2*) (p < 0,001) em PA-PsO, mas expressão gênica reduzida do receptor órfão C (*RORC*) relacionado ao receptor de ácido retinóico (p < 0,001) em comparação com PNA-PsO e PNC, por ANOVA. **(c-d)** *PRDM1* mostrou uma correlação positiva (p < 0,0001) com a expressão de *STAT3* (r = 0,65), *S100A9* (r = 0,63) e *LCN2* (r = 0,50), mas uma correlação negativa com *RORC* (r = 0,60) pelo coeficiente de correlação de Spearman.

Na sequência, buscamos avaliar genes codificadores de citocinas indutoras envolvidas no programa inflamatório Th17. Nessa análise, em relação aos genes codificadores das citocinas indutoras da diferenciação e mantenedoras das células Th17 patogênicas, foi observado aumento da expressão gênica de: *TNF*, *IL12B*, *IL1B* e *IL6* na PA-PsO (vs PNC; vs PNA-PsO, p < 0,001); *TGFB1* (fator de crescimento transformador beta-1) na PA-PsO em comparação com a PNA-PsO (p < 0,01); *IL23A* na PA-PsO e PNA-PsO comparada à PNC (p < 0,001; p < 0,05), mas nenhuma diferença entre PA-PsO vs PNA-PsO; e *TGFB1* (PA-PsO vs PNC) (Figura 5; Tabela 3).

A avaliação de correlações da expressão gênica de *PRDM1* mostrou uma correlação positiva (p < 0,0001) com (d) *TNF* (r = 0,58), *IL12B* (r = 0,6); (e) *IL23A* (r = 0,47),

IL1B ($r = 0,67$), (*f*) *IL6* ($r = 0,59$), e negativa ($p < 0,001$) com *TGFB1* ($r = - 0,28$), pelo coeficiente de correlação de Spearman, como observado na Figura 5 e Tabela 4.

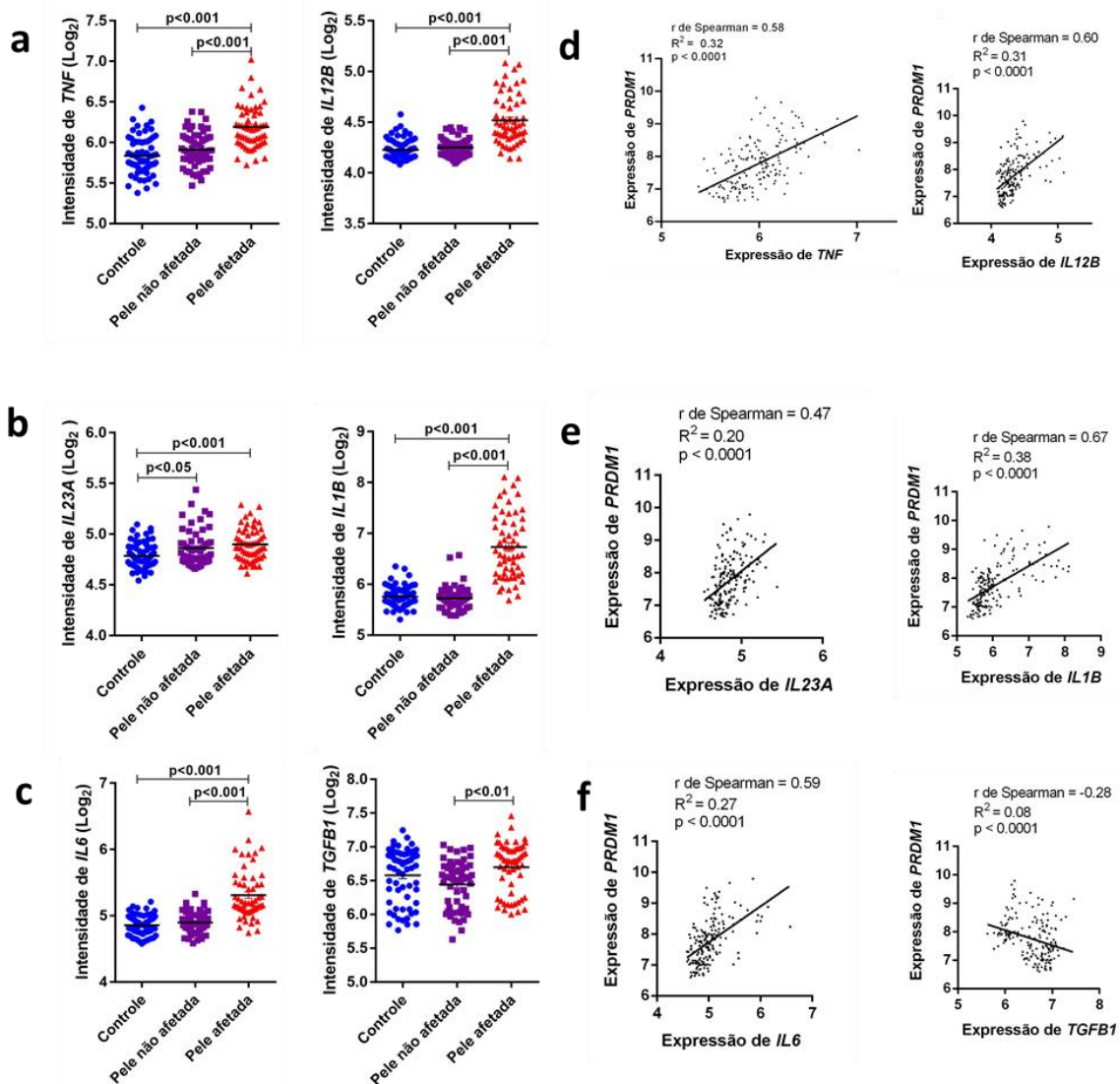


Figura 5 - Expressão gênica de codificadores de citocinas indutoras envolvidas no programa inflamatório das células Th17. A análise da expressão de genes (intensidade \log_2) selecionados em amostras de pele afetada (PA-PsO) e não afetada (PNA-PsO) de pacientes com PsO ($n = 58$), e amostras de pele normal de controles (PNC; $n = 64$) do transcriptoma do banco GSE13355 evidenciou aumento de **(a,b,c)** *IL12B*, fator de necrose tumoral (*TNF*), *IL1B* e *IL6* ($p < 0,001$) na PA-PsO comparadas à PNA-PsO e PNC; *IL23A* (PA-PsO vs PNC, $p < 0,001$; PNA-PsO vs PNC; $p < 0,05$); e *TGFB1* (PA-PsO vs PNA-PsO, $p < 0,01$) analisadas por ANOVA. A expressão gênica de *PRDM1* mostrou correlações positivas ($p < 0,0001$) com **(d)** *TNF* ($r = 0,58$), *IL12B* ($r = 0,6$), **(e)** *IL23A* ($r = 0,47$), *IL1B* ($r = 0,67$), **(f)** *IL6* ($r = 0,59$), e negativa ($p < 0,001$) com *TGFB1* ($r = - 0,28$), analisado com o coeficiente de correlação de Spearman.

Finalmente, foi realizada análise da expressão gênica de codificadores das citocinas efetoras e receptores de interesse e associados ao eixo IL-23/Th17 na psoríase. Foi observado na PA-PsO um aumento da expressão de (a) *IL17A* e *IL22* ($p < 0,001$) (vs. PNC; vs. PNA-PsO), e dos receptores *IL23R* (vs. PNC, $p < 0,001$; vs. PNA-PsO, $p < 0,01$), e *IL17RA* (vs PNA-PsO, $p < 0,01$). A expressão gênica de *PRDM1* mostrou correlação positiva ($p < 0.0001$) com (b) *IL17A* ($r = 0,70$), *IL22* ($r = 0,53$), *IL23R* ($r = 0,32$), mas sem correlação significativa com *IL17RA*, utilizando coeficiente de correlação de Spearman (Figura 6, Tabela 3, Tabela 4).

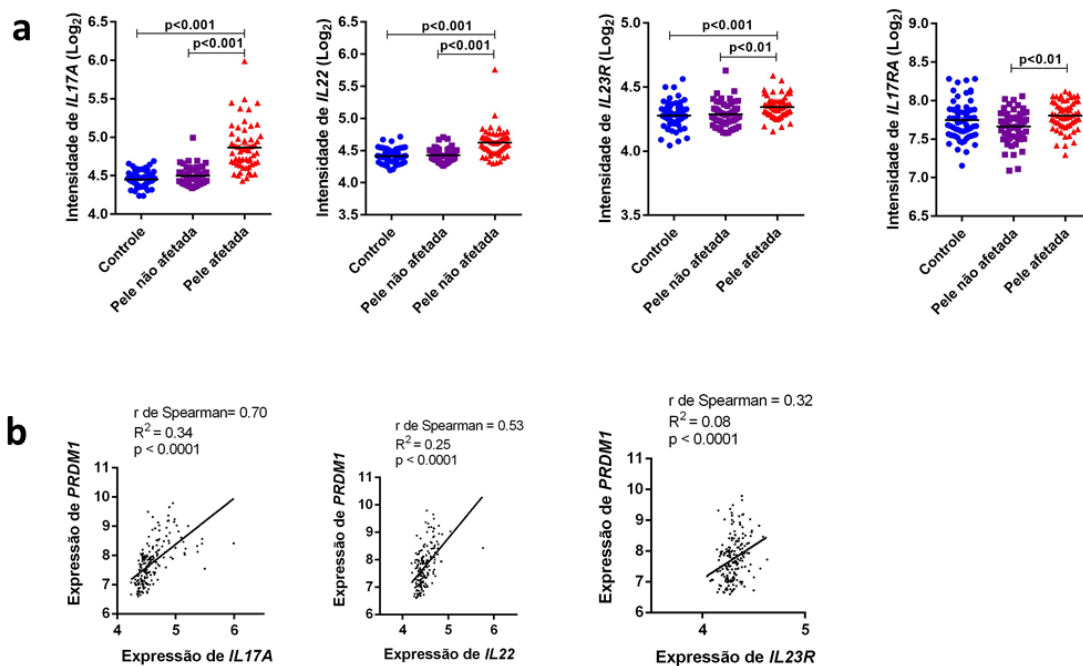


Figura 6 - Expressão gênica de codificadores citocinas efetoras e receptores associados ao eixo IL-23/Th17 na psoríase. Análise da expressão de genes (intensidade log₂) selecionados em amostras de pele afetada (PA-PsO) e não afetada (PNA-PsO) de pacientes com PsO ($n = 58$), e amostras de pele normal de controles (PNC; $n = 64$) do transcriptoma do banco GSE13355 analisados por ANOVA evidenciou **(a)** aumento de *IL17A* e *IL22* ($p < 0.001$) na PA-PsO comparada à PNC e PNA-PsO; *IL23R* (PA-PsO vs PNC, $p < 0.001$; vs PNA-PsO, $p < 0.01$); *IL17RA* (PA-PsO vs PNA-PsO, $p < 0.01$). A expressão gênica de *PRDM1* mostrou correlações positivas ($p < 0.0001$) com **(b)** *IL17A* ($r = 0.7$), *IL22* ($r = 0.53$), *IL23R* ($r = 0.32$), mas sem correlação significativa com *IL17RA*, utilizando coeficiente de correlação de Spearman.

A análise da expressão gênica de codificadores de citocinas potencialmente envolvidas na expressão do BLIMP-1 mostrou aumento de *IL4*, *IL21* e *IL27* na PA-PsO (a-b) comparada à PNC ($p < 0,05$); de *IL10* ($p < 0,001$) (vs PNA-PsO; vs PNC), e não significativa de *IL2*. Houve correlações positivas ($p < 0,0001$) entre a expressão gênica de *PRDM1* e *IL21* ($r = 0,47$), *IL10* ($r = 0,30$) e *IL27* ($r = 0,34$) (Figura 7; Tabela 4).

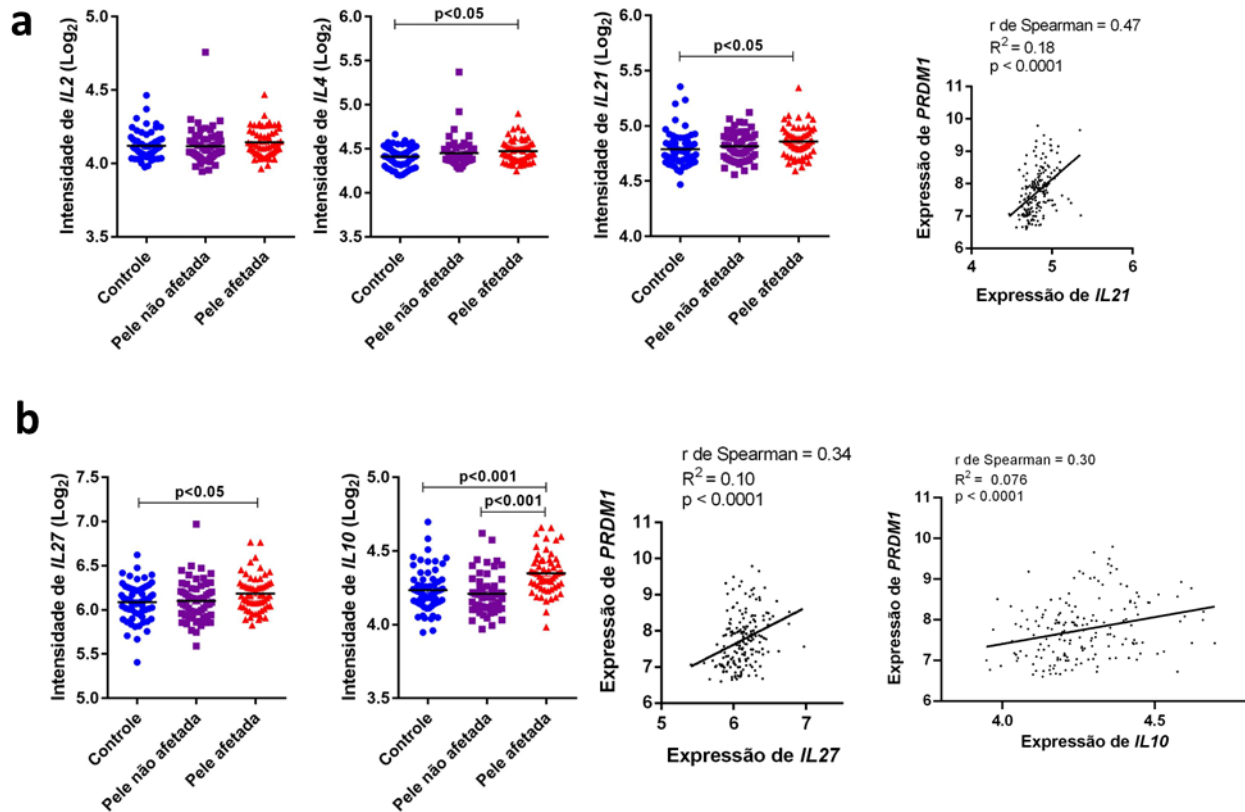


Figura 7 - Expressão gênica de codificadores de citocinas potencialmente envolvidas na expressão do BLIMP-1. A análise da expressão de genes (intensidade log₂) selecionados em amostras de pele afetada (PA-PsO) e não afetada (PNA-PsO) de pacientes com PsO ($n = 58$), e amostras de pele normal de controles (PNC; $n = 64$) do transcriptoma do banco GSE13355 pelo método ANOVA mostrou elevação na PA-PsO de: **(a-b)** *IL4*, *IL21* e *IL27* comparada à PNC ($p < 0,05$); de *IL10* ($p < 0,001$) (vs PNA-PsO; vs PNC), e sem significância de *IL2*. Houve correlações positivas ($p < 0,0001$) entre a expressão gênica de *PRDM1* e *IL21* ($r = 0,47$), *IL10* ($r = 0,30$) e *IL27* ($r = 0,34$).

O conjunto dos resultados apresentados previamente, foram sumariados nas Tabela 3 e Tabela 4, como segue.

Tabela 3 - Comparação entre a expressão gênica na pele afetada e não afetada de pacientes com psoríase e pele normal de controles

Abreviaturas: PA-PsO, pele afetada; PNA-PsO, pele não-afetada de pacientes com psoríase; PNC, pele normal dos controles; (a) Diminuição das expressões do gene *RORC* em PA-PsO vs PNA-PsO e PA-PsO vs PNA ($p < 0,001$); NS, não significativo. O valor de p inferior a 0,05 foi reconhecido como estatisticamente significativo

	PA-PsO x PNC Valor de p	PA-PsO x PNA-PsO Valor de p	PNA-PsO x PNC Valor de p
<i>PRDM1</i>	<0.001	<0.001	Ns
<i>STAT3</i>	<0.001	<0.001	Ns
<i>RORC</i> ^a	<0.001	<0.001	Ns
<i>IL12B</i>	<0.001	<0.001	Ns
<i>TNF</i>	<0.001	<0.001	Ns
<i>IL23A</i>	<0.001	Ns	<0.05
<i>IL23R</i>	<0.001	<0.01	Ns
<i>IL17A</i>	<0.001	<0.001	Ns
<i>IL17RA</i>	Ns	<0.01	Ns
<i>TGFB1</i>	Ns	<0.01	Ns
<i>IL6</i>	<0.001	<0.001	Ns
<i>CCR5</i>	<0.001	<0.001	Ns
<i>IL1B</i>	<0.001	<0.001	Ns
<i>IL10</i>	<0.001	<0.001	Ns
<i>IL21</i>	<0.05	Ns	Ns
<i>IL22</i>	<0.001	<0.001	Ns
<i>IL27</i>	<0.05	Ns	Ns
<i>IL4</i>	<0.05	Ns	Ns
<i>S100A9</i>	<0.001	<0.001	<0.01
<i>LCN2</i>	<0.001	<0.001	Ns

Tabela 4 - Correlação entre a expressão gênica do *PRDM1*, fatores de transcrição, citocinas e proteínas imunes na psoríase

<i>Expressão de correlação do gene PRDM1</i>	r de Spearman	Coefficiente de determinação R²	Valor de p
<i>IL17A</i>	0.70	0.34	< 0.0001
<i>IL1B</i>	0.67	0.38	< 0.0001
<i>IL12B</i>	0.60	0.31	< 0.0001
<i>IL6</i>	0.59	0.27	< 0.0001
<i>IL22</i>	0.53	0.25	< 0.0001
<i>IL21</i>	0.47	0.18	< 0.0001
<i>IL23A</i>	0.47	0.20	< 0.0001
<i>IL23R</i>	0.32	0.08	< 0.0001
<i>IL27</i>	0.34	0.10	< 0.0001
<i>TGFB1</i>	-0.28	0.08	< 0.0001
<i>S100A9</i>	0.63	0.44	< 0.0001
<i>LCN2</i>	0.50	0.37	< 0.0001

Abreviaturas: IL, interleucina; *IL23R*, receptor de interleucina 23; *TGFB1*, fator de crescimento transformador-beta 1; *S100A9*, proteína A9 de ligação ao cálcio S100; *LCN2*, genes de codificação da lipocalina 2. A direção e a força da correlação linear entre as variáveis estudadas foram avaliadas com o coeficiente de correlação de Spearman (r) e o coeficiente de determinação (R²). O valor de p inferior a 0,05 foi reconhecido como estatisticamente significativo.

Capítulo 4: Discussão

4.1 A participação do Blimp-1 na psoríase

O presente estudo indicou consistentes evidências da participação de Blimp-1 na psoríase. Inicialmente, mostrou o aumento da expressão dos transcritos e uma correlação positiva entre *PRDM1* e *IL17* nas amostras de PA-PsO comparadas às de PNA-PsO. Em seguida, a análise da imunofluorescência por microscopia confocal evidenciou a expressão do Blimp-1, codificada pelo gene *PRDM1*, ao longo de todas as camadas da epiderme nas amostras de PA-PsO dos pacientes, mas não nas amostras de PNA-PsO.

Por fim, a análise bioinformática do transcriptoma público-GSE13355 (NAIR; DUFFIN; HELMS; DING *et al.*, 2009) corroborou o aumento da expressão do gene *PRDM1* na PA-PsO em comparação com amostras de PNA-PsO e PNC. Ainda nessa análise, a expressão gênica do *PRDM1* mostrou correlações positivas com a expressão de genes codificadores de citocinas pró-inflamatórias do eixo IL-23/Th17, do fator de transcrição (STAT3) e das proteínas imunes envolvidas na psoríase (*S100A9* e *LCN2*).

O conjunto dos nossos resultados sustenta a hipótese do envolvimento do fator de transcrição Blimp-1 na patogênese da PsO, em particular com componentes do eixo IL-23/Th17. Na sequência, será conduzida uma discussão mais detalhada dos nossos resultados com argumentos baseados na revisão da literatura.

4.2 A expressão de Blimp-1 em queratinócitos

Há estudos que evidenciam uma correlação entre a expressão de Blimp-1 e a diferenciação terminal de queratinócitos de camundongos e humanos. O Blimp-1 é considerado um regulador crítico da transição dos queratinócitos da camada granulosa para a córnea, o que foi verificado após deleção epidérmica condicional de *Prdm1* em camundongos. Essa condição resulta em defeitos na diferenciação terminal de sebócitos e queratinócitos epidérmicos, com retardo na formação da barreira de permeabilidade epidérmica, hiperqueratinização e descamação anormais (MAGNÚSDÓTTIR; KALACHIKOV; MIZUKOSHI; SAVITSKY *et al.*, 2007). Blimp-1 é principalmente expresso na camada granulosa de queratinócitos, os precursores de corneócitos mais diferenciados (CANDI; SCHMIDT; MELINO, 2005). Mais de 250 genes podem estar desregulados na epiderme de camundongos CKO, os quais incluem alvos diretos de repressão Blimp-1, genes dependentes de Blimp-1 para sua expressão apropriada na epiderme e aqueles que codificam fatores de transcrição, componentes de transdução de sinal, proteinases e enzimas envolvidas no metabolismo lipídico (MAGNÚSDÓTTIR; KALACHIKOV;

MIZUKOSHI; SAVITSKY *et al.*, 2007). Estudos futuros sobre os mecanismos de alterações da cornificação da pele podem esclarecer os distúrbios dependentes do Blimp-1 e, particularmente, seu envolvimento nas dermatoses com disfunções epidérmicas, como a PsO.

Entretanto, a imunomarcagem para Blimp-1 foi reduzida em amostras de pele humana de eczema em comparação com a pele normal, que mostrou intensa marcação específica de Blimp-1, nas células da camada granulosa. Apesar dos níveis reduzidos de expressão da proteína Blimp-1, os níveis de expressão de *PRDM1*-mRNA foram elevados em queratinócitos primários humanos e de camundongo, sob estimulação de LPS ou TNF- α (CHIANG; YANG; LIN; HONG *et al.*, 2013). Proteínas, como o Blimp-1, envolvidas na organização da cromatina e na regulação da transcrição tendem a ser produzidas e degradadas muito rapidamente por reagir a um estímulo (DE SOUSA ABREU; PENALVA; MARCOTTE; VOGEL, 2009; SCHWANHÄUSSER; BUSSE; LI; DITTMAR *et al.*, 2011).

Além das alterações histológicas observadas nos cortes da PA-PsO (acantose, hiperqueratose, paraqueratose e hipogranulose da epiderme, cristas epidérmicas alongadas, e vasos sanguíneos dilatados), nossos resultados de imunofluorescência por microscopia confocal confirmaram um aumento na expressão da proteína Blimp-1 nas amostras de PA-PsO em comparação à PNA-PsO. A hiperproliferação (acantose) da epiderme da PA-PsO, evidenciou expressões pronunciadas das proteínas citoqueratina 17 (K17) e Blimp-1. Em particular, a expressão da proteína Blimp-1 foi observada nos queratinócitos ao longo de todas as camadas epidérmicas nas amostras da PA-PsO, mas não nas amostras da PNA-PsO.

Seguida às evidências do envolvimento do Blimp-1 na pele afetada pela PsO, para especular o papel do Blimp-1 na inflamação da pele com PsO, buscamos identificar as expressões dos genes codificadores das citocinas pro-inflamatórias, proteínas imunes e outros fatores de transcrição envolvidos na geração de células Th17 patogênicas, e explorar as suas possíveis relações com o *PRDM1*, gene codificador do Blimp-1 na psoríase.

4.3 O predomínio do eixo IL-23/Th17 na psoríase

Estudos preliminares evidenciaram que as lesões psoriásicas exibiam níveis aumentados de citocinas Th1, como γ -interferon (IFN- γ), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e IL-12, sem o aumento da expressão de citocinas Th2, IL-4, IL-5 e IL-10 (AUSTIN; OZAWA; KIKUCHI; WALTERS *et al.*, 1999; KRUEGER; CALLIS, 2004).

TNF- α é uma citocina fundamental que ativa a via de sinal do fator nuclear (NF)- κ B, afeta a sobrevivência celular e a proliferação, e gera efeitos anti-apoptóticos nos linfócitos e queratinócitos (WILSMANN-THEIS; KOCH; MINDNICH; BONNESS *et al.*, 2013).

Ainda, o TNF- α estimula os queratinócitos a produzir IL-8, que resulta na formação de microabscessos, por meio do recrutamento de neutrófilos, e induz células Th17 a produzir citocinas pró-inflamatórias através da via NF- κ B nas lesões psoriáticas. (KAGAMI; RIZZO; LEE; KOGUCHI *et al.*, 2010). O bloqueio da via NF- κ B interrompe a produção de IL-17A a partir de células T CD4+ (ETTEHADI; GREAVES; WALLACH; ADERKA *et al.*, 1994).

Adicionalmente, a IL-23 é uma citocina heterodimérica composta pelas cadeias IL-23p19 e IL-12p40 (IL-12/23p40), que desempenha papel fundamental na patogênese da psoríase, suas fontes conhecidas são DC, monócitos ativados, macrófagos, células T e células B (OPPMANN; LESLEY; BLOM; TIMANS *et al.*, 2000).

IL-23 se liga ao seu receptor heterodimérico composto pelas subunidades IL-12R β 1 e IL-23R expressas em células T de memória, células T natural killer, monócitos e DC. IL-23 regula o desenvolvimento e a manutenção da população e a expansão das células Th17 (PARHAM; CHIRICA; TIMANS; VAISBERG *et al.*, 2002). Tais funções de IL-23 foram demonstradas através de modelos de camundongos de inflamação relacionada às células CD4+ produtoras de IL-17, a encefalomielite autoimune e a artrite induzida por colágeno, que foram substancialmente aliviadas pela falta de receptores de IL-23 (CUA; SHERLOCK; CHEN; MURPHY *et al.*, 2003; MURPHY; LANGRISH; CHEN; BLUMENSCHHEIN *et al.*, 2003). Seguido ao reconhecimento das células Th17, e a sua implicação em sistemas modelo de autoimunidade, o desenvolvimento e a expansão e manutenção foram associadas à IL-23, uma citocina iniciadora e chave no desenvolvimento da autoimunidade. Os achados preliminares de níveis elevados de citocinas relacionadas a IL-23 e Th17 em lesões cutâneas e no soro de pacientes com psoríase, a associação de variantes do gene IL23R com psoríase e a evidência de um papel funcional das células Th17 na autoimunidade forneceram subsídios e foram seguidos de robustas evidências que suportaram o eixo IL 23/Th17 como central na imunopatogênese da psoríase (BLAUVELT, 2008; CHIRICOZZI; ROMANELLI; VOLPE; BORSELLINO *et al.*, 2018; DI CESARE; DI MEGLIO; NESTLE, 2009).

Em concordância com estes estudos prévios (DI CESARE; DI MEGLIO; NESTLE, 2009), nossos resultados evidenciaram aumento dos transcritos *IL17* e *PRDM1*, por RT-qPCR, e das expressões gênicas de *TNF*, *IL12B*, *IL23A* e *IL17A*, por análise

bioinformática do transcriptoma (GSE 13355), o que configurou o perfil do eixo IL23/Th17 na PsO. Em adição, as correlações positivas das expressões gênicas entre *PRDM1* e *TNF* ($r= 0,58$), *IL12B* ($r= 0,60$), *IL23A* ($r= 0,47$) e *IL17A* (RTqPCR, $r= 0,44$; GSE 13355, $r= 0,70$) indicam o estreito envolvimento do *PRDM1*/Blimp-1 com as citocinas pro-inflamatórias criticamente envolvidas na psoríase.

4.4 IL-23 e IL-23R na geração de células patogênicas Th17 na psoríase

A geração de respostas efetoras por Th17 exige sinalização dependente de IL-23R, e IL-23 promove a diferenciação completa de células T ativadas em células Th17 efectoras (MCGEACHY; CHEN; TATO; LAURENCE *et al.*, 2009).

As células Th17 ativadas aumentam a resposta inflamatória dos queratinócitos, criando um ciclo com *feedback* positivo em torno do eixo IL-23/ Th17, a principal via na PsO. A sinalização adicional por meio do receptor de IL-23 (IL-23R) em células Th17 e a secreção de produtos pró-inflamatórios e proliferativos por diferentes células são essenciais para os mecanismos patológicos da PsO (HIROTA; DUARTE; VELDHOEN; HORNSBY *et al.*, 2011). É bem conhecido que células dendríticas mieloides inflamatórias liberam IL-23 e IL-12, o que promove a manutenção e a sobrevivência do fenótipo de células Th17, e conseqüentemente, a produção de IL-17A e IL-17F pelas células Th17 (JOHNSON-HUANG; LOWES; KRUEGER, 2012; LYNDE; POULIN; VENDER; BOURCIER *et al.*, 2014).

IL-23 opera através de múltiplas vias para gerar células Th17 patogênicas maduras, incluindo a manutenção de genes da assinatura Th17 [*Il17* e *Rorc* - receptor órfão relacionado com RAR (receptor de ácido retinóico)], a indução de genes efetores [*Il22*, fator estimulador de colônia 2 (Csf2) e *lfn3*], e um aumento significativo, por sua própria força de sinal, da regulação positiva da expressão de *Il23r* (CODARRI; GYÜLVÉSZI; TOSEVSKI; HESSKE *et al.*, 2011; EL-BEHI; CIRIC; DAI; YAN *et al.*, 2011; GHORESCHI; LAURENCE; YANG; TATO *et al.*, 2010). Por fim, a IL-23 ainda promove a diferenciação das células Treg em células Th17 (BOVENSCHEN; VAN DE KERKHOF; VAN ERP; WOESTENENK *et al.*, 2011).

Corroborando os estudos anteriores (GROSSMAN; KRUEGER; YOURISH; GRANELLI-PIPERNO *et al.*, 1989; NOCKOWSKI; SZEPIETOWSKI; ZIARKIEWICZ; BARAN, 2004; SHI; CHEN; ZHAO; YU *et al.*, 2019), na análise do transcriptoma (GSE13355), foi observado aumento da expressão gênica do *IL17A* na PA-PsO comparada à PNA-PsO e PNC, e notadamente, a expressão de *IL23*, que não se diferenciou entre a

PA-PsO e PNA-PsO dos pacientes, mas estava aumentada em ambas comparadas à PNC. Já a expressão de *IL23R* estava aumentada na PA-PsO comparada à PNA-PsO e PNC, e a de *IL17R* aumentada na PA-PsO comparada à PNA-PsO, mas não comparada à PNC. A expressão gênica do *PRDM1* mostrou correlação positiva com a expressão de *IL23R* ($r=0,32$), mas sem correlação significativa com a expressão de *IL17R*.

Coletivamente, a correlação positiva entre a expressão gênica de *PRDM1*, *IL23A* ($r=0,47$) e *IL23R* ($r=0,32$) são indicativas de uma relação estreita do Blimp-1 na manutenção das células Th17 patogênicas. No entanto, a falta de correlação com o IL-17R requer futuras investigações.

4.5 Combinação de IL-23, IL-6, IL-21 e outras citocinas na diferenciação de células Th17

Nos queratinócitos, a IL-17 aumentou as expressões de IL-6 e IL-8, citocinas pró-inflamatórias que exacerbam a PsO (FRITZ; KLENOTIC; SWINDELL; YIN *et al.*, 2017). Além disso, IL-1beta juntamente com IL-6 (WILSON; BONIFACE; CHAN; MCKENZIE *et al.*, 2007) ou IL-23 podem induzir a secreção de IL-17A (ACOSTA-RODRIGUEZ; NAPOLITANI; LANZAVECCHIA; SALLUSTO, 2007).

A expressão de Blimp-1 é induzida por IL-21, e ocorre um *feedback* negativo em que IL-21 inibe sua própria produção através da indução de Blimp-1 (FU; YEH; CHU; YEN *et al.*, 2017). A IL-21 pode induzir a diferenciação de células Th17 inibindo a diferenciação de células Treg através da regulação positiva da expressão de ROR- γ t e da regulação negativa da expressão de Foxp3. Ainda, IL-21 pode promover hiperplasia e inflamação epidérmica induzindo um desequilíbrio nas populações de células Th17 e Treg (SHI; CHEN; ZHAO; YU *et al.*, 2019).

IL-21 e IL-21R são altamente expressos na pele afetada e no sangue periférico de pacientes com PsO (CARUSO; BOTTI; SARRA; ESPOSITO *et al.*, 2009). IL-21 causa estímulo proliferativo nos queratinócitos humanos e uma consequente piora da inflamação (CARUSO; BOTTI; SARRA; ESPOSITO *et al.*, 2009). O TGF-beta associado a IL-21 é necessário para a diferenciação das células Th17, a partir das células T *naive* (YANG; ANDERSON; BAECHER-ALLAN; HASTINGS *et al.*, 2008). A combinação de TGF-beta e IL-6 / IL-21, associada à indução e sinalização por IL-23R, proporciona a maturação das células Th17 inflamatórias (MADDUR; MIOSSEC; KAVERI; BAYRY, 2012).

A interleucina-22 (IL-22) é um membro da família de citocinas relacionadas à IL-10, e o receptor de IL-22 é altamente expresso em tecidos, como células epiteliais da

pele e do trato gastrointestinal. IL-22 tem uma natureza dupla, protetora versus inflamatória, na modulação da resposta imune nos tecidos. A sua sinalização leva à ativação de programas proliferativos e/ou apoptóticos (SANJABI; ZENEWICZ; KAMANAKA; FLAVELL, 2009). A IL-22 também induz a expressão de proteínas inflamatórias agudas, mucinas e peptídeos antimicrobianos, que são essenciais para manter a integridade do tecido durante a inflamação. IL-22, produzida principalmente por células Th17, em conjunção com o receptor de IL-22, expresso principalmente em queratinócitos, induzem a hiperplasia da epiderme (OGAWA; SATO; MINAGAWA; OKUYAMA, 2018). Níveis elevados de IL-22 na pele psoriática estão fortemente associados com a regulação positiva do S100A9 e outras proteínas imunes na pele (FRITZ; KLENOTIC; SWINDELL; YIN *et al.*, 2017).

Ainda, em concordância com estudos anteriores (GROSSMAN; KRUEGER; YOURISH; GRANELLI-PIPERNO *et al.*, 1989; NOCKOWSKI; SZEPIETOWSKI; ZIARKIEWICZ; BARAN, 2004; SHI; CHEN; ZHAO; YU *et al.*, 2019), por análise bioinformática do transcriptoma (GSE13355), foi observado aumento nas expressões gênicas na PA-PsO de *IL1B*, *IL6* e *IL22* (versus PNC e PNA-PsO), e de *IL21* (versus PNC) e correlações positivas de *IL1B* ($r= 0,67$), *IL6* ($r= 0,59$), *IL22* ($r= 0,53$) e *IL21* ($r= 0,47$) com a expressão gênica do *PRDM1*. O conjunto desses achados corrobora o microambiente de diferenciação e manutenção das células Th17 inflamatórias/patogênicas, estímulo proliferativo para os queratinócitos, e particularmente, a estreita relação do *PRDM1* com essas citocinas do perfil Th17 na psoríase.

4.6 Fatores de transcrição na diferenciação de células Th17

A diferenciação de células Th17, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, parece exigir a regulação positiva, induzida por TGF- β 1, e do fator de transcrição específico de linhagem única, ROR (receptor órfão relacionado a retinóides) gamat (IVANOV; MCKENZIE; ZHOU; TADOKORO *et al.*, 2006; ZHOU; IVANOV; SPOLSKI; MIN *et al.*, 2007).

O fator de transcrição ROR-gama é expresso em células Tc17 e Th17 (EBERL; LITTMAN, 2003; EBERL; MARMON; SUNSHINE; RENNERT *et al.*, 2004), e induzido em células T CD4+ ativadas sob condições de diferenciação Th17, como a presença de IL-1beta, IL-6, IL-23 e TGF-beta (IVANOV; MCKENZIE; ZHOU; TADOKORO *et al.*, 2006; IVANOV; ZHOU; LITTMAN, 2007; MANEL; UNUTMAZ; LITTMAN, 2008). A diferenciação de células Th17 é regulada por fatores de transcrição, como ROR-gammat, o regulador mestre especificamente expresso por células Th17, assim como os fatores

STAT-3, IRF4 (*interferon regulatory factor 4*) e BATF (*basic leucine zipper transcription factor*, ATF-like) (CIOFANI; MADAR; GALAN; SELLARS *et al.*, 2012). A inibição de ROR-gama tem sido considerada um tratamento potencial para doenças dependentes de Th17, particularmente PsO e artrite psoriática, por meio da indução de tolerância imunológica (DZHAGALOV; ZHANG; HE, 2004; IMURA; UEYAMA; SASAKI; SHIMIZU *et al.*, 2019).

No nosso estudo, por meio da análise bioinformática, foi observado aumento da expressão do *TGFB1* na PA-PsO apenas em comparação com a PNA-PsO, mas sem diferença com a PNC; e a redução da expressão do *RORC* na PA-PsO comparada à PNA-PsO e PNC. A oposição das correlações negativas entre a expressão de *PRDM1* e as expressões de ambas *TGFB1* ($r = -0,28$) e *RORC* ($r = -0,60$), potencialmente relacionadas, necessita ser explorada.

4.7 Blimp-1, STAT3 e citocinas na geração de células Th17 patogênicas

IL-23 parece regular positivamente Blimp-1, de maneira dependente de STAT3, para desempenhar um papel crítico na diminuição da regulação de IL-2 e manutenção da estabilidade das células Th17 patogênicas (JAIN; CHEN; KANNO; JOYCE-SHAIKH *et al.*, 2016). O envolvimento potencializador do Blimp-1 associado a *p300*, *STAT3* e *ROR-gammat* nas proximidades dos *loci* *Il23r*, *Il17f* e *Csf2* prediz que Blimp-1 é um dos reguladores de transcrição recrutados sequencialmente pelos genes envolvidos na geração das células Th17. O Blimp-1 em conjunto com outros fatores de transcrição controla a função patogênica das células Th17 por meio da ativação direta de genes-alvo ou via efeitos indiretos a jusante (JAIN; CHEN; KANNO; JOYCE-SHAIKH *et al.*, 2016; RUTISHAUSER; MARTINS; KALACHIKOV; CHANDELE *et al.*, 2009).

Em alinhamento com os demais resultados, foram observados o aumento da expressão gênica do *STAT3* na PA-PsO (versus PNA-PsO e PNC) e a sua correlação positiva com a expressão do *PRDM1* ($r = 0,65$).

4.8 Expressão de *S100A9* e *LCN2* na psoríase

As proteínas da família S100 são mediadoras-chave na iniciação e manutenção da inflamação, e possuem uma variedade de funções intracelulares e extracelulares. Tais proteínas interagem com múltiplos receptores e transdutores de sinal para regular as vias que governam a inflamação, diferenciação celular, proliferação, metabolismo energético, apoptose, homeostase do cálcio, citoesqueleto celular e

resistência microbiana. Paradoxalmente, várias proteínas da família S100 também podem atuar para resolver a inflamação e promover o reparo tecidual sob certas condições (SREEJIT; FLYNN; PATIL; KRISHNAMURTHY *et al.*, 2020).

Quatorze genes da proteína S100 estão localizados dentro do complexo de diferenciação epidérmica no cromossomo humano 1q21, e 13 proteínas S100 (S100A2, S100A3, S100A4, S100A6, S100A7, S100A8, S100A9, S100A10, S100A11, S100A12, S100A15, S100B e S100P) são expressas na epiderme normal e/ou alterada (ECKERT; BROOME; RUSE; ROBINSON *et al.*, 2004).

S100A8 e S100A9 formam homodímeros e heterodímeros, e são frequentemente co-expressas (TEIGELKAMP; BHARDWAJ; ROTH; MEINARDUS-HAGER *et al.*, 1991). S100A8 e S100A9 estão especificamente ligadas à função imune inata através de sua expressão em células imunes de linhagem mieloide. S100A8 e S100A9 são principalmente derivadas de células mieloides, como monócitos, neutrófilos e macrófagos, sendo que a expressão constitutiva parece estar limitada a neutrófilos e monócitos. A expressão de S100A8/A9 também é observada em células epiteliais e endoteliais ativadas, bem como em queratinócitos (MELLOR; GAGO-LOPEZ; BAKIRI; SCHMIDT *et al.*, 2022; SREEJIT; FLYNN; PATIL; KRISHNAMURTHY *et al.*, 2020).

Em pacientes com psoríase, S100A8 é derivada principalmente de queratinócitos e células mononucleares infiltradas, e S100A9 é derivada de neutrófilos. A elevada expressão de S100A8/A9 na epiderme psoriática induz a ativação do complemento C3/CFB, que leva à ativação descontrolada de imunócitos, angiogênese e hiperproliferação de queratinócitos causando progressão da PsO (SREEJIT; FLYNN; PATIL; KRISHNAMURTHY *et al.*, 2020).

Na epiderme normal, S100A8 e S100A9 são expressas em valores muito baixos níveis, embora a expressão ocasional é observada na camada granulosa. Ambas as proteínas são superexpressas na PsO e estão presentes nas camadas basal, granulosa e espinhosa (BROOME; RYAN; ECKERT, 2003). S100A8 e S100A9 podem ter um papel na promoção e/ou resposta ao estado hiperproliferativo na epiderme. A liberação de S100A8 e S100A9 dos queratinócitos pode iniciar a invasão de células imunes que é ainda propagada pela liberação de S100A8 e S100A9 dos neutrófilos atraídos ao sítio de inflamação (ECKERT; BROOME; RUSE; ROBINSON *et al.*, 2004).

LCN2 é uma proteína armazenada nos grânulos específicos de neutrófilos humanos (KJELDSSEN; BAINTON; SENDELØV; BORREGAARD, 1994). É considerada uma proteína antimicrobiana contra infecção bacteriana pelo sequestro de ferro (FLO; SMITH; SATO; RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Outras funções biológicas bem estabelecidas de

LCN2 incluem regulação de diversos processos celulares, como o crescimento celular e migração/invasão (DING; FANG; TONG; QU *et al.*, 2015; NELSON; ZHAO; GILLILAND; ZAENGLIN *et al.*, 2008; WANG; MA; MENG; WEI *et al.*, 2015). Ainda, pode atuar como mediador pró-inflamatório para aumentar a produção de citocinas críticas, como IL-6, IL-8 e CXCL10, resultando no agravamento das doenças (LIN; LIAO; LEE; HU *et al.*, 2011). Estudos recentes sugeriram que LCN-2 está associada ao acúmulo de células imunes nos locais de inflamação aguda ou crônica (AIGNER; MAIER; SCHWELBERGER; WALLNÖFER *et al.*, 2007; SHASHIDHARAMURTHY; MACHIAH; AITKEN; PUTTY *et al.*, 2013).

No estudo, a análise bioinformática corroborou aumento da expressão gênica de *S100A9* e *LCN2* nas amostras PA-PsO em comparação com PNA-PsO e PNC. Adicionalmente, foram observadas correlações positivas com a expressão do *PRDM1* ($r=0,63$; $r=0,50$, respectivamente). Estes resultados indicam a estreita relação entre a expressão do *PRDM1* e genes codificadores das proteínas envolvidas na regulação de processos inflamatórios e resposta imune (*S100A9*), apoptose e processos de imunidade inata (*LCN2*) (WANG; LIU; LIU; CHEN, 2020) e *PRDM1*, e consistentemente corroboram a participação do Blimp-1 na PsO.

Em concordância, estudos prévios demonstraram que as expressões de *S100A8* e *S100A9* foram elevadas na pele afetada comparadas às da pele não afetada de pacientes com PsO (MADSEN *et al.*, 1992; KERKHOFF *et al.*, 2012). Consistentemente, os níveis séricos de *S100A8/A9* estão elevados na PsO e parecem acompanhar a atividade da doença, sugerindo que essas proteínas *S100* são potenciais mediadores na PsO (KERKHOFF; VOSS; SCHOLZEN; AVERILL *et al.*, 2012).

Shao e cols (2016) demonstraram que tanto os queratinócitos quanto os neutrófilos foram as fontes de *LCN2* na pele lesional de pacientes com PsO. Os resultados desse estudo sugeriram que *LCN2* está envolvida na patogênese da PsO, modulando a função dos neutrófilos (SHAO; CAO; JIN; LI *et al.*, 2016).

4.9 Blimp-1 exerce funções regulatórias ou conduz o programa inflamatório Th17 na psoríase?

Face às controvérsias se o Blimp-1 é necessário apenas para a função regulatória das células Th17, Jain e colegas, deletando *Prdm1* especificamente das células T periféricas, demonstraram que Blimp-1 é um fator crítico e regulado por IL-23, que atua

em conjunto com o fator de transcrição ROR-gammat para estabilizar e aumentar a função das células Th17 (JAIN; CHEN; KANNO; JOYCE-SHAIKH *et al.*, 2016).

Estudos anteriores em modelos de camundongos transgênicos em genes de interesse convergiram para as funções regulatórias do Blimp-1 nas células Th17 e na inflamação.

Camundongos deficientes em Blimp-1 (*Prdm1^{fl/fl}Cd4^{cre}*) tiveram redução no número de timócitos e defeitos nas células das populações Th1, Th2 e Treg (LIN; CHOU; YEH; FU *et al.*, 2013; LIN; YEH; CHEN; CHIOU *et al.*, 2014; SALEHI; BANKOTI; BENEVIDES; WILLEN *et al.*, 2012). Os camundongos Blimp-1-CKO tiveram um aumento de células TCR β +CD4+ produtoras de IL-17 em órgãos linfoides e na mucosa intestinal que mostrou o papel intrínseco do Blimp-1 na restrição da produção de IL-17 (FU; YEH; CHU; YEN *et al.*, 2017).

A expressão de Blimp-1 foi induzida em Th1 e Th2, mas reprimida por TGF-beta em células Th17. A expressão de genes de assinatura Th17, *Il17a*, *Rorc*, *Il23r*, foi regulada positivamente em células T CD4 + ativadas deficientes em Blimp-1, sugerindo que Blimp-1 é necessário para controlar a diferenciação e / ou acúmulo de células Th17 (SALEHI; BANKOTI; BENEVIDES; WILLEN *et al.*, 2012).

A geração de camundongos Blimp-1-CKO através do cruzamento de camundongos *floxed Prdm1* (*Prdm1^{fl/fl}*) com camundongos *Ick-Cre* distal (*Dlck^{cre}*) evita quaisquer defeitos de desenvolvimento de células T tímicas devido à deficiência de *Prdm1* (JAIN; CHEN; KANNO; JOYCE-SHAIKH *et al.*, 2016; MARTINS; CIMMINO; SHAPIRO-SHELEF; SZABOLCS *et al.*, 2006). Além disso, a geração dos camundongos *Prdm1^{fl/fl}RosaYFP^{fl}Dlck^{cre}* permite o rastreamento de células Blimp-1-deletadas. Notavelmente, camundongos deficientes em *Prdm1* nesse sistema não foram capazes de co-expressar fatores GM-CSF e IFN-gama, críticos para a função inflamatória das células Th17 (CODARRI; GYÜLVÉSZI; TOSEVSKI; HESSKE *et al.*, 2011; EL-BEHI; CIRIC; DAI; YAN *et al.*, 2011; GHORESCHI; LAURENCE; YANG; TATO *et al.*, 2010). Ainda, na ausência de Blimp-1, as células Th17 são incapazes de atingir a maturação funcional completa, pois Blimp-1 regulou a expressão de receptores de quimiocinas em células Th17 e o seu tráfego para locais de inflamação. O Blimp-1 parece desempenhar um papel crítico na diferenciação efetora completa das células Th17, o que permite que as células Th17 migrem para o local da inflamação e mediem suas funções patogênicas (JAIN; CHEN; KANNO; JOYCE-SHAIKH *et al.*, 2016).

Outro fator ligado à maturação das células Th17 é a regulação negativa da IL-2 (MCGEACHY; CHEN; TATO; LAURENCE *et al.*, 2009). Blimp-1 pode desempenhar um

papel essencial na diferenciação completa de células Th17 efectoras por controlar a produção de IL-2 em células T ativadas (WANG; VAN PANHUYS; HU-LI; KIM *et al.*, 2008). No modelo animal, há ainda uma relação de *feedback* negativo entre IL-2 e Blimp-1, sendo que a sinalização de IL-2 induz a transcrição de *Prdm1* (gene codificador do Blimp-1), e o Blimp-1 reprime a transcrição do gene *Il2* em células T (GONG; MALEK, 2007).

Além do fator repressor da transcrição, o Blimp-1 também funciona como um fator de transcrição essencial a jusante da IL-23, que se sinergiza com o ROR-gammat para conduzir o programa inflamatório Th17. As evidências coletadas indicam que o Blimp-1 regula a função efectora Th17 mediada por IL-23 principalmente pela amplificação da sinalização de IL-23 por meio da indução da expressão de *Il23r* e simultaneamente aumenta a transcrição de *Il17* e *Csf2* (JAIN; CHEN; KANNO; JOYCE-SHAIKH *et al.*, 2016).

Especulamos que as interações do Blimp-1 com outros cofatores podem ser críticas para a indução e a manutenção da expressão do gene *IL23R* na PsO, mas essas possibilidades necessitam ser exploradas.

4.10 As vias de ação do TGF-beta na indução de ROR-gammat

Vários estudos convergem para a relevância das vias dependentes de TGF-beta na indução da expressão de ROR-gama e diferenciação Th17 (ZHANG, 2018). Alternativamente, a diferenciação Th17 pode ocorrer através de vias independentes de TGF-beta em humanos (ACOSTA-RODRIGUEZ; NAPOLITANI; LANZAVECCHIA; SALLUSTO, 2007).

Em estágios sequenciais, a diferenciação das células Th17 é inicialmente desencadeada pelo efeito combinado de TGF-beta e IL-6/ IL-21; em seguida, a amplificação das células Th17 é impulsionada pela IL-21 produzida pelas próprias células Th17, provavelmente associada ao TGF-beta, e em um terceiro estágio ocorre a estabilização das células Th17 pela IL-23 (KORN; BETTELLI; OUKKA; KUCHROO, 2009). As células Th17 também podem expressar grandes quantidades de TGF-beta, que pode atuar de maneira autócrina para manter as células Th17 (GUTCHER; DONKOR; MA; RUDENSKY *et al.*, 2011). Adicionalmente, TNF-alfa e IL-1beta aumentam a diferenciação das células Th17 mediada por TGF-beta e IL-6 (ZHENG; SUN; JIANG; ZHANG *et al.*, 2014). A combinação sinérgica de TGF-beta mais IL-6/ IL-21 induzem ROR-gammat, que orchestra as expressões IL-17A / IL-17F em células T virgens (KORN; BETTELLI; GAO; AWASTHI *et al.*, 2007; NURIEVA; YANG; MARTINEZ; ZHANG *et al.*, 2007). Embora as células Th17

induzidas por TGF-beta e IL-6 sejam não-patogênicas, a combinação de TGF-beta e IL-6/IL-21 induz IL-23R na superfície em células Th17 em diferenciação (MADDUR; MIOSSEC; KAVERI; BAYRY, 2012), e subsequentemente a sinalização por meio de IL-23R é essencial para a maturação adicional de células Th17 inflamatórias (JAIN; CHEN; KANNO; JOYCE-SHAIKH *et al.*, 2016).

TGF-beta é considerado crítico para a geração de células Th17 e Treg a partir de células T virgens (BETTELLI; CARRIER; GAO; KORN *et al.*, 2006; FANTINI; BECKER; MONTELEONE; PALLONE *et al.*, 2004), enquanto a presença de IL-6 inibe a conversão de células T em Foxp3 + Treg e favorece a imunidade Th17 (HAN; LI; SINGH; WOLF *et al.*, 2012; KORN; MITSDOERFFER; CROXFORD; AWASTHI *et al.*, 2008; VOLPE; SERVANT; ZOLLINGER; BOGIATZI *et al.*, 2008).

Th17 e células Treg induzidas periféricamente (pTreg) compartilham um programa de desenvolvimento desencadeado por TGF-beta, onde na fase intermediária da diferenciação Th17 / pTreg ambos Foxp3 e ROR-gama são co-expressos na mesma célula. Dado o antagonismo entre Foxp3 e ROR-gama, a inibição da atividade de ROR-gama por pequenas moléculas pode desviar a diferenciação de algumas células CD4+ autorreativas recentemente ativadas de um destino de célula Th17 para um destino pTreg (IMURA; UEYAMA; SASAKI; SHIMIZU *et al.*, 2019).

4.11 Participação de Blimp-1 e TGF-beta nos distúrbios inflamatórios e proliferativos

A despeito do papel principal como uma citocina anti-inflamatória, a superexpressão de TGFβ1 nos queratinócitos induz a inflamação da pele, indicando que os mecanismos envolvendo essa citocina parecem ser complexos (HAN; WILLIAMS; SALTER; GARL *et al.*, 2010).

Níveis elevados de TGFβ1 no soro foram correlacionados com a gravidade da PsO humana (FLISIAK; CHODYNICKA; POREBSKI; FLISIAK, 2002). Os camundongos transgênicos K5.TGFβ1 desenvolveram inflamação da pele com semelhanças impressionantes entre a PsO humana. A pele inflamada induzida por TGFβ1 revelou predominantemente citocinas relacionadas com Th1 e Th17. A ativação de células Th1/Th17 e células Treg pelo TGFβ1 regulado reversamente por IL-6 destaca o papel duplo do TGFβ1 na regulação da inflamação, um processo dinâmico, contextual e específico para cada órgão (HAN; WILLIAMS; SALTER; GARL *et al.*, 2010).

TGF-beta e citocinas, como IL-27 e IL-12, induzem a produção de IL-10 a partir de células T efectoras (CHANG; LIU; JIN; ZHANG *et al.*, 2017; STUMHOFER; SILVER; LAURENCE; PORRETT *et al.*, 2007). No entanto, Blimp-1 foi crítico para a expressão de IL-10 a jusante à IL-12 e IL-27, e TGF-beta antagonizou esta via, induzindo a mudança para uma via Blimp-1 independente, e presumivelmente via c-Maf/ AhR, para a expressão de IL-10 por células Th17 e Tr1 (NEUMANN; HEINRICH; NEUMANN; JUNGHANS *et al.*, 2014).

Existem poucos estudos e os achados são contraditórios sobre a deficiência relativa de IL-10 e seu papel na imunopatogênese da PsO. (DOWLATSHAHI; VAN DER VOORT; ARENDS; NIJSTEN, 2013; ISAC; JIQUAN, 2019). Enquanto isso, a regulação positiva do Blimp-1, o aumento das células IL-27, IL-6, TGF-beta e IL-10+Th17 foram observadas no fluido peritoneal da endometriose. Nessa condição, o sistema imunológico falha em remover as células endoteliais e seus detritos, que de forma anormal alcançam locais fora da cavidade uterina. Sob regulação ambiental externa (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina) e local (estrogênio, IL-6 e TGF-beta), IL-27 produzida por macrófagos e células do estroma endometrial induz a produção de IL-10 em células Th17, provavelmente mediada pela interação ROR γ e c-Maf, sob a regulação positiva do Blimp-1 a jusante a IL-27. A IL-27 parece ser um regulador fundamental na tolerância imunológica ao desencadear as células Th17 a produzir IL-10, facilitando a implantação, estimulando a proliferação e a neoangiogênese para a progressão da endometriose (CHANG; LIU; JIN; ZHANG *et al.*, 2017).

O aumento da expressão desse conjunto de genes, *PRDM1*, *IL27*, *IL10*, *IL6*, *IL21*, e *TGFB1* na PA-PsO produz evidências do envolvimento de outras vias ainda pouco elucidadas na inflamação e proliferação do programa Th17.

Uma vez que a sinalização de TGF-beta medeia a produção de IL-10 durante a diferenciação Th17, mas antagoniza a expressão de Blimp-1 (NEUMANN; HEINRICH; NEUMANN; JUNGHANS *et al.*, 2014; SALEHI; BANKOTI; BENEVIDES; WILLEN *et al.*, 2012), os nossos achados de aumento concomitante da expressão dos genes *PRDM1* e *TGFB1* podem ser compensatórios. Ainda, uma correlação negativa significativa entre ambos reforça um mecanismo regulatório, que necessita de mais investigações na PsO.

As limitações deste trabalho são aquelas de uma análise observacional, mas estudos futuros, bem como avaliações funcionais específicas, podem ajudar a esclarecer e corroborar nossos achados.

Frente aos nossos resultados, especulamos que o Blimp-1, como fator de transcrição, mantém estreita relação com STAT3, citocinas pró-inflamatórias críticas do eixo IL-23/Th17 e proteínas imunes envolvidas na PsO. No entanto, os mecanismos detalhados

da interação entre Blimp-1, e os vários componentes desse eixo, citocinas e seus receptores, fatores de transcrição e regulação, em particular, IL-10, IL-27, TGFbeta e o fator de transcrição RORgamat no programa Th17, promovendo uma desregulada e proeminente inflamação e proliferação na PsO, ainda precisam ser elucidados em estudos futuros.

Capítulo 5: Conclusão

Em conclusão, o presente estudo mostrou evidências do envolvimento do Blimp-1 na PsO, indicadas diretamente pelo aumento de expressão do gene *PRDM1* e a expressão da proteína Blimp-1 nos queratinócitos epidérmicos na pele afetada pela PsO, e, portanto, potencialmente relacionada à inflamação e proliferação na PsO.

As correlações positivas obtidas por análise bioinformática (banco GSE13355), entre as expressões gênicas do *PRDM1*, citocinas pro-inflamatórias e proteínas imunes corroboram o seu envolvimento no programa inflamatório Th17 da PsO.

As interações entre o *PRDM1*/Blimp-1, o fator de transcrição RORgamat do programa Th17 e o envolvimento de outras citocinas e vias necessitam ser exploradas na PsO.

Uma melhor compreensão dessas forças antagônicas e desregulação dentro do microambiente imunológico pode acelerar a compreensão da enfermidade e o desenvolvimento de novas abordagens imunoterapêuticas para PsO.

Referências Bibliográficas

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V.; NAPOLITANI, G.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. **Nat Immunol**, 8, n. 9, p. 942-949, Sep 2007.

AFACH, S.; CHAIMANI, A.; EVRENOGLOU, T.; PENSO, L. *et al.* Meta-analysis results do not reflect the real safety of biologics in psoriasis. **Br J Dermatol**, 184, n. 3, p. 415-424, 03 2021.

AIGNER, F.; MAIER, H. T.; SCHWELBERGER, H. G.; WALLNÖFER, E. A. *et al.* Lipocalin-2 regulates the inflammatory response during ischemia and reperfusion of the transplanted heart. **Am J Transplant**, 7, n. 4, p. 779-788, Apr 2007.

AKIMZHANOV, A. M.; YANG, X. O.; DONG, C. Chromatin remodeling of interleukin-17 (IL-17)-IL-17F cytokine gene locus during inflammatory helper T cell differentiation. **J Biol Chem**, 282, n. 9, p. 5969-5972, Mar 2007.

ALBANESI, C.; MADONNA, S.; GISONDI, P.; GIROLOMONI, G. The Interplay Between Keratinocytes and Immune Cells in the Pathogenesis of Psoriasis. **Front Immunol**, 9, p. 1549, 2018.

AMOR, K. T.; RYAN, C.; MENTER, A. The use of cyclosporine in dermatology: part I. **J Am Acad Dermatol**, 63, n. 6, p. 925-946; quiz 947-928, Dec 2010.

ASUMALAHTI, K.; AMEEN, M.; SUOMELA, S.; HAGFORSEN, E. *et al.* Genetic analysis of PSORS1 distinguishes guttate psoriasis and palmoplantar pustulosis. **J Invest Dermatol**, 120, n. 4, p. 627-632, Apr 2003.

AUSTIN, L. M.; OZAWA, M.; KIKUCHI, T.; WALTERS, I. B. *et al.* The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. **J Invest Dermatol**, 113, n. 5, p. 752-759, Nov 1999.

BASHIR, M. M.; SHARMA, M. R.; WERTH, V. P. TNF-alpha production in the skin. **Arch Dermatol Res**, 301, n. 1, p. 87-91, Jan 2009.

BATAILLE, V.; LENS, M.; SPECTOR, T. D. The use of the twin model to investigate the genetics and epigenetics of skin diseases with genomic, transcriptomic and methylation data. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, 26, n. 9, p. 1067-1073, Sep 2012.

BENHADOU, F.; MINTOFF, D.; DEL MARMOL, V. Psoriasis: Keratinocytes or Immune Cells - Which Is the Trigger? **Dermatology**, 235, n. 2, p. 91-100, 2019.

BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, 441, n. 7090, p. 235-238, May 2006.

BLAUVELT, A. T-helper 17 cells in psoriatic plaques and additional genetic links between IL-23 and psoriasis. **J Invest Dermatol**, 128, n. 5, p. 1064-1067, May 2008.

- BLAUVELT, A.; CHIRICOZZI, A. The Immunologic Role of IL-17 in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis. **Clin Rev Allergy Immunol**, 55, n. 3, p. 379-390, Dec 2018.
- BOEHNCKE, W. H.; DRESSEL, D.; ZOLLNER, T. M.; KAUFMANN, R. Pulling the trigger on psoriasis. **Nature**, 379, n. 6568, p. 777, Feb 1996.
- BOEHNCKE, W. H.; HORVÁTH, R.; DALKILIÇ, E.; LIMA, S. A. L. *et al.* Association between clinical specialty setting and disease management in patients with psoriatic arthritis: results from LOOP, a cross-sectional, multi-country, observational study. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, 34, n. 9, p. 2035-2043, Sep 2020.
- BONIFACE, K.; BERNARD, F. X.; GARCIA, M.; GURNEY, A. L. *et al.* IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. **J Immunol**, 174, n. 6, p. 3695-3702, Mar 2005.
- BOVENSCHEN, H. J.; VAN DE KERKHOF, P. C.; VAN ERP, P. E.; WOESTENENK, R. *et al.* Foxp3+ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin. **J Invest Dermatol**, 131, n. 9, p. 1853-1860, Sep 2011.
- BOWES, J.; ASHCROFT, J.; DAND, N.; JALALI-NAJAFABADI, F. *et al.* Cross-phenotype association mapping of the MHC identifies genetic variants that differentiate psoriatic arthritis from psoriasis. **Ann Rheum Dis**, 76, n. 10, p. 1774-1779, Oct 2017.
- BROOME, A. M.; RYAN, D.; ECKERT, R. L. S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis. **J Histochem Cytochem**, 51, n. 5, p. 675-685, May 2003.
- CAI, Y.; FLEMING, C.; YAN, J. New insights of T cells in the pathogenesis of psoriasis. **Cell Mol Immunol**, 9, n. 4, p. 302-309, Jul 2012.
- CANDI, E.; SCHMIDT, R.; MELINO, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 6, n. 4, p. 328-340, Apr 2005.
- CAPON, F. The Genetic Basis of Psoriasis. **Int J Mol Sci**, 18, n. 12, Nov 2017.
- CAPON, F.; DI MEGLIO, P.; SZAUB, J.; PRESCOTT, N. J. *et al.* Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. **Hum Genet**, 122, n. 2, p. 201-206, Sep 2007.
- CARDILI, R. N.; DEGHAIDE, N. S.; MENDES-JUNIOR, C. T.; DONADI, E. A. *et al.* HLA-C and TNF gene polymorphisms are associated with psoriasis in Brazilian patients. **Int J Dermatol**, 55, n. 1, p. e16-22, Jan 2016.
- CARRETERO, G.; PUIG, L.; DEHESA, L.; CARRASCOSA, J. M. *et al.* [Guidelines on the use of methotrexate in psoriasis]. **Actas Dermosifiliogr**, 101, n. 7, p. 600-613, Sep 2010.

CARUSO, R.; BOTTI, E.; SARRA, M.; ESPOSITO, M. *et al.* Involvement of interleukin-21 in the epidermal hyperplasia of psoriasis. **Nat Med**, 15, n. 9, p. 1013-1015, Sep 2009.

CHANDRAN, V.; SCHENTAG, C. T.; BROCKBANK, J. E.; PELLETT, F. J. *et al.* Familial aggregation of psoriatic arthritis. **Ann Rheum Dis**, 68, n. 5, p. 664-667, May 2009.

CHANG, D. H.; ANGELIN-DUCLOS, C.; CALAME, K. BLIMP-1: trigger for differentiation of myeloid lineage. **Nat Immunol**, 1, n. 2, p. 169-176, Aug 2000.

CHANG, D. H.; CATTORETTI, G.; CALAME, K. L. The dynamic expression pattern of B lymphocyte induced maturation protein-1 (Blimp-1) during mouse embryonic development. **Mech Dev**, 117, n. 1-2, p. 305-309, Sep 2002.

CHANG, K. K.; LIU, L. B.; JIN, L. P.; ZHANG, B. *et al.* IL-27 triggers IL-10 production in Th17 cells via a c-Maf/ROR γ t/Blimp-1 signal to promote the progression of endometriosis. **Cell Death Dis**, 8, n. 3, p. e2666, 03 2017.

CHIANG, M. F.; YANG, S. Y.; LIN, I. Y.; HONG, J. B. *et al.* Inducible deletion of the Blimp-1 gene in adult epidermis causes granulocyte-dominated chronic skin inflammation in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 110, n. 16, p. 6476-6481, Apr 2013.

CHIRICOZZI, A.; ROMANELLI, P.; VOLPE, E.; BORSELLINO, G. *et al.* Scanning the Immunopathogenesis of Psoriasis. **Int J Mol Sci**, 19, n. 1, Jan 08 2018.

CIMMINO, L.; MARTINS, G. A.; LIAO, J.; MAGNUSDOTTIR, E. *et al.* Blimp-1 attenuates Th1 differentiation by repression of ifng, tbx21, and bcl6 gene expression. **J Immunol**, 181, n. 4, p. 2338-2347, Aug 2008.

CIOFANI, M.; MADAR, A.; GALAN, C.; SELLARS, M. *et al.* A validated regulatory network for Th17 cell specification. **Cell**, 151, n. 2, p. 289-303, Oct 2012.

CODARRI, L.; GYÜLVÉSZI, G.; TOSEVSKI, V.; HESKE, L. *et al.* ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. **Nat Immunol**, 12, n. 6, p. 560-567, Jun 2011.

CRETNEY, E.; XIN, A.; SHI, W.; MINNICH, M. *et al.* The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. **Nat Immunol**, 12, n. 4, p. 304-311, Apr 2011.

CUA, D. J.; SHERLOCK, J.; CHEN, Y.; MURPHY, C. A. *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. **Nature**, 421, n. 6924, p. 744-748, Feb 13 2003.

DA SILVA SOUZA, C.; GOLDENSTEIN-SCHAINBERG, C.; ALVARENGA ANTI LODUCA LIMA, S. M.; SPELLING GORMEZANO, N. *et al.* Clinical Specialty Setting as Determinant of Management of Psoriatic Arthritis: A Cross-Sectional Brazilian Study. **J Clin Rheumatol**, 28, n. 3, p. 120-125, Apr 01 2022.

DAND, N.; MAHIL, S. K.; CAPON, F.; SMITH, C. H. *et al.* Psoriasis and Genetics. **Acta Derm Venereol**, 100, n. 3, p. adv00030, 01 2020.

DE CID, R.; RIVEIRA-MUNOZ, E.; ZEEUWEN, P. L.; ROBARGE, J. *et al.* Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis. **Nat Genet**, 41, n. 2, p. 211-215, Feb 2009.

DE SOUSA ABREU, R.; PENALVA, L. O.; MARCOTTE, E. M.; VOGEL, C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. **Mol Biosyst**, 5, n. 12, p. 1512-1526, Dec 2009.

DI CESARE, A.; DI MEGLIO, P.; NESTLE, F. O. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. **J Invest Dermatol**, 129, n. 6, p. 1339-1350, Jun 2009.

DING, G.; FANG, J.; TONG, S.; QU, L. *et al.* Over-expression of lipocalin 2 promotes cell migration and invasion through activating ERK signaling to increase SLUG expression in prostate cancer. **Prostate**, 75, n. 9, p. 957-968, Jun 15 2015.

DOWLATSHAHI, E. A.; VAN DER VOORT, E. A.; ARENDS, L. R.; NIJSTEN, T. Markers of systemic inflammation in psoriasis: a systematic review and meta-analysis. **Br J Dermatol**, 169, n. 2, p. 266-282, Aug 2013.

DUFFIN, K. C.; KRUEGER, G. G. Genetic variations in cytokines and cytokine receptors associated with psoriasis found by genome-wide association. **J Invest Dermatol**, 129, n. 4, p. 827-833, Apr 2009.

DUVALLET, E.; SEMERANO, L.; ASSIER, E.; FALGARONE, G. *et al.* Interleukin-23: a key cytokine in inflammatory diseases. **Ann Med**, 43, n. 7, p. 503-511, Nov 2011.

DZHAGALOV, I.; ZHANG, N.; HE, Y. W. The roles of orphan nuclear receptors in the development and function of the immune system. **Cell Mol Immunol**, 1, n. 6, p. 401-407, Dec 2004.

EBERL, G.; LITTMAN, D. R. The role of the nuclear hormone receptor ROR γ in the development of lymph nodes and Peyer's patches. **Immunol Rev**, 195, p. 81-90, Oct 2003.

EBERL, G.; MARMON, S.; SUNSHINE, M. J.; RENNERT, P. D. *et al.* An essential function for the nuclear receptor ROR γ (t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. **Nat Immunol**, 5, n. 1, p. 64-73, Jan 2004.

ECKERT, R. L.; BROOME, A. M.; RUSE, M.; ROBINSON, N. *et al.* S100 proteins in the epidermis. **J Invest Dermatol**, 123, n. 1, p. 23-33, Jul 2004.

EL-BEHI, M.; CIRIC, B.; DAI, H.; YAN, Y. *et al.* The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. **Nat Immunol**, 12, n. 6, p. 568-575, Jun 2011.

ETTEHADI, P.; GREAVES, M. W.; WALLACH, D.; ADERKA, D. *et al.* Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) biological activity in psoriatic skin lesions. **Clin Exp Immunol**, 96, n. 1, p. 146-151, Apr 1994.

FANTINI, M. C.; BECKER, C.; MONTELEONE, G.; PALLONE, F. *et al.* Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. **J Immunol**, 172, n. 9, p. 5149-5153, May 2004.

- FARBER, E. M.; NALL, L. Erythrodermic (exfoliative) psoriasis. **Cutis**, 51, n. 2, p. 79-82, Feb 1993.
- FENG, B. J.; SUN, L. D.; SOLTANI-ARABSHAHI, R.; BOWCOCK, A. M. *et al.* Multiple Loci within the major histocompatibility complex confer risk of psoriasis. **PLoS Genet**, 5, n. 8, p. e1000606, Aug 2009.
- FINLAY, A. Y. Current severe psoriasis and the rule of tens. **Br J Dermatol**, 152, n. 5, p. 861-867, May 2005.
- FINLAY, A. Y.; KHAN, G. K. Dermatology Life Quality Index (DLQI)--a simple practical measure for routine clinical use. **Clin Exp Dermatol**, 19, n. 3, p. 210-216, May 1994.
- FLISIAK, I.; CHODYNICKA, B.; POREBSKI, P.; FLISIAK, R. Association between psoriasis severity and transforming growth factor beta(1) and beta (2) in plasma and scales from psoriatic lesions. **Cytokine**, 19, n. 3, p. 121-125, Aug 2002.
- FLO, T. H.; SMITH, K. D.; SATO, S.; RODRIGUEZ, D. J. *et al.* Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. **Nature**, 432, n. 7019, p. 917-921, Dec 16 2004.
- FRANSSON, J.; STORGÅRDS, K.; HAMMAR, H. Palmoplantar lesions in psoriatic patients and their relation to inverse psoriasis, tinea infection and contact allergy. **Acta Derm Venereol**, 65, n. 3, p. 218-223, 1985.
- FREDRIKSSON, T.; PETTERSSON, U. Severe psoriasis--oral therapy with a new retinoid. **Dermatologica**, 157, n. 4, p. 238-244, 1978.
- FRITZ, Y.; KLENOTIC, P. A.; SWINDELL, W. R.; YIN, Z. Q. *et al.* Induction of Alternative Proinflammatory Cytokines Accounts for Sustained Psoriasiform Skin Inflammation in IL-17C+IL-6KO Mice. **J Invest Dermatol**, 137, n. 3, p. 696-705, 03 2017.
- FRY, L. Psoriasis. **Br J Dermatol**, 119, n. 4, p. 445-461, Oct 1988.
- FU, S. H.; LIN, M. H.; YE, L. T.; WANG, Y. L. *et al.* Targeting tumour necrosis factor receptor 1 assembly reverses Th17-mediated colitis through boosting a Th2 response. **Gut**, 64, n. 5, p. 765-775, May 2015.
- FU, S. H.; YE, L. T.; CHU, C. C.; YEN, B. L. *et al.* New insights into Blimp-1 in T lymphocytes: a divergent regulator of cell destiny and effector function. **J Biomed Sci**, 24, n. 1, p. 49, Jul 2017.
- GALLUZZO, M.; D'ADAMIO, S.; BIANCHI, L.; TALAMONTI, M. Tildrakizumab for treating psoriasis. **Expert Opin Biol Ther**, 17, n. 5, p. 645-657, May 2017.
- GHOESCHI, K.; LAURENCE, A.; YANG, X. P.; TATO, C. M. *et al.* Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. **Nature**, 467, n. 7318, p. 967-971, Oct 2010.
- GLADMAN, D. D. Clinical Features and Diagnostic Considerations in Psoriatic Arthritis. **Rheum Dis Clin North Am**, 41, n. 4, p. 569-579, Nov 2015.

GLICKMAN, F. S. Lepra, psora, psoriasis. **J Am Acad Dermatol**, 14, n. 5 Pt 1, p. 863-866, May 1986.

GONG, D.; MALEK, T. R. Cytokine-dependent Blimp-1 expression in activated T cells inhibits IL-2 production. **J Immunol**, 178, n. 1, p. 242-252, Jan 2007.

GREB, J. E.; GOLDMINZ, A. M.; ELDER, J. T.; LEBWOHL, M. G. *et al.* Psoriasis. **Nat Rev Dis Primers**, 2, p. 16082, 11 2016.

GREEN, M. S.; PRYSTOWSKY, J. H.; COHEN, S. R.; COHEN, J. I. *et al.* Infectious complications of erythrodermic psoriasis. **J Am Acad Dermatol**, 34, n. 5 Pt 2, p. 911-914, May 1996.

GRIFFITHS, C. E.; BARKER, J. N. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. **Lancet**, 370, n. 9583, p. 263-271, Jul 2007.

GRIPP, A.; CARVALHO, A. V. E.; CURSI, I. B.; SOUZA, C. S. Manejo do paciente grave internado. *In*: **Consenso Brasileiro de Psoríase**. 2 ed., 2012.

GROSSMAN, R. M.; KRUEGER, J.; YOURISH, D.; GRANELLI-PIPERNO, A. *et al.* Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 86, n. 16, p. 6367-6371, Aug 1989.

GUDMUNDSDOTTIR, A. S.; SIGMUNDSDOTTIR, H.; SIGURGEIRSSON, B.; GOOD, M. F. *et al.* Is an epitope on keratin 17 a major target for autoreactive T lymphocytes in psoriasis? **Clin Exp Immunol**, 117, n. 3, p. 580-586, Sep 1999.

GUTCHER, I.; DONKOR, M. K.; MA, Q.; RUDENSKY, A. Y. *et al.* Autocrine transforming growth factor- β 1 promotes in vivo Th17 cell differentiation. **Immunity**, 34, n. 3, p. 396-408, Mar 2011.

HAN, G.; LI, F.; SINGH, T. P.; WOLF, P. *et al.* The pro-inflammatory role of TGF β 1: a paradox? **Int J Biol Sci**, 8, n. 2, p. 228-235, 2012.

HAN, G.; WILLIAMS, C. A.; SALTER, K.; GARL, P. J. *et al.* A role for TGF β signaling in the pathogenesis of psoriasis. **J Invest Dermatol**, 130, n. 2, p. 371-377, Feb 2010.

HARPER, E. G.; GUO, C.; RIZZO, H.; LILLIS, J. V. *et al.* Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes in vitro and in vivo: implications for psoriasis pathogenesis. **J Invest Dermatol**, 129, n. 9, p. 2175-2183, Sep 2009.

HASSAN-ZAHRAEE, M.; WU, J.; GORDON, J. Rapid synthesis of IFN- γ by T cells in skin may play a pivotal role in the human skin immune system. **Int Immunol**, 10, n. 11, p. 1599-1612, Nov 1998.

HAUGH, I. M.; PRESTON, A. K.; KIVELEVITCH, D. N.; MENTER, A. M. Risankizumab: an anti-IL-23 antibody for the treatment of psoriasis. **Drug Des Devel Ther**, 12, p. 3879-3883, 2018.

HEDRICK, M. N.; LONSDORF, A. S.; SHIRAKAWA, A. K.; RICHARD LEE, C. C. *et al.* CCR6 is required for IL-23-induced psoriasis-like inflammation in mice. **J Clin Invest**, 119, n. 8, p. 2317-2329, Aug 2009.

HEINEMANN, C.; HEINK, S.; PETERMANN, F.; VASANTHAKUMAR, A. *et al.* IL-27 and IL-12 oppose pro-inflammatory IL-23 in CD4+ T cells by inducing Blimp1. **Nat Commun**, 5, p. 3770, May 2014.

HENRY, J.; TOULZA, E.; HSU, C. Y.; PELLERIN, L. *et al.* Update on the epidermal differentiation complex. **Front Biosci (Landmark Ed)**, 17, p. 1517-1532, Jan 2012.

HENSELER, T.; CHRISTOPHERS, E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. **J Am Acad Dermatol**, 13, n. 3, p. 450-456, Sep 1985.

HIROTA, K.; DUARTE, J. H.; VELDHOEN, M.; HORNSBY, E. *et al.* Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. **Nat Immunol**, 12, n. 3, p. 255-263, Mar 2011.

HORSLEY, V.; O'CARROLL, D.; TOOZE, R.; OHINATA, Y. *et al.* Blimp1 defines a progenitor population that governs cellular input to the sebaceous gland. **Cell**, 126, n. 3, p. 597-609, Aug 2006.

IMURA, C.; UEYAMA, A.; SASAKI, Y.; SHIMIZU, M. *et al.* A novel ROR γ t inhibitor is a potential therapeutic agent for the topical treatment of psoriasis with low risk of thymic aberrations. **J Dermatol Sci**, 93, n. 3, p. 176-185, Mar 2019.

ISAC, L.; JIQUAN, S. Interleukin 10 promoter gene polymorphism in the pathogenesis of psoriasis. **Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat**, 28, n. 3, p. 119-123, Sep 2019.

ISAILOVIC, N.; DAIGO, K.; MANTOVANI, A.; SELMI, C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. **J Autoimmun**, 60, p. 1-11, Jun 2015.

IVANOV, I. I.; MCKENZIE, B. S.; ZHOU, L.; TADOKORO, C. E. *et al.* The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell**, 126, n. 6, p. 1121-1133, Sep 2006.

IVANOV, I. I.; ZHOU, L.; LITTMAN, D. R. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. **Semin Immunol**, 19, n. 6, p. 409-417, Dec 2007.

JAIN, R.; CHEN, Y.; KANNO, Y.; JOYCE-SHAIKH, B. *et al.* Interleukin-23-Induced Transcription Factor Blimp-1 Promotes Pathogenicity of T Helper 17 Cells. **Immunity**, 44, n. 1, p. 131-142, Jan 2016.

JOHNSON-HUANG, L. M.; LOWES, M. A.; KRUEGER, J. G. Putting together the psoriasis puzzle: an update on developing targeted therapies. **Dis Model Mech**, 5, n. 4, p. 423-433, Jul 2012.

JOHNSTON, A.; FRITZ, Y.; DAWES, S. M.; DIACONU, D. *et al.* Keratinocyte overexpression of IL-17C promotes psoriasiform skin inflammation. **J Immunol**, 190, n. 5, p. 2252-2262, Mar 2013.

JOHNSTON, R. J.; POHOLEK, A. C.; DITORO, D.; YUSUF, I. *et al.* Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. **Science**, 325, n. 5943, p. 1006-1010, Aug 2009.

JORDAN, C. T.; CAO, L.; ROBERSON, E. D.; PIERSON, K. C. *et al.* PSORS2 is due to mutations in CARD14. **Am J Hum Genet**, 90, n. 5, p. 784-795, May 2012.

KAGAMI, S.; RIZZO, H. L.; LEE, J. J.; KOGUCHI, Y. *et al.* Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. **J Invest Dermatol**, 130, n. 5, p. 1373-1383, May 2010.

KALLIES, A.; HAWKINS, E. D.; BELZ, G. T.; METCALF, D. *et al.* Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. **Nat Immunol**, 7, n. 5, p. 466-474, May 2006.

KAVLI, G.; FØRDE, O. H.; ARNESEN, E.; STENVOLD, S. E. Psoriasis: familial predisposition and environmental factors. **Br Med J (Clin Res Ed)**, 291, n. 6501, p. 999-1000, Oct 1985.

KELLER, A. D.; MANIATIS, T. Identification and characterization of a novel repressor of beta-interferon gene expression. **Genes Dev**, 5, n. 5, p. 868-879, May 1991.

KEMP, K. L.; LEVIN, S. D.; STEIN, P. L. Lck regulates IL-10 expression in memory-like Th1 cells. **Eur J Immunol**, 40, n. 11, p. 3210-3219, Nov 2010.

KERKHOFF, C.; VOSS, A.; SCHOLZEN, T. E.; AVERILL, M. M. *et al.* Novel insights into the role of S100A8/A9 in skin biology. **Exp Dermatol**, 21, n. 11, p. 822-826, Nov 2012.

KIM, J.; KRUEGER, J. G. The immunopathogenesis of psoriasis. **Dermatol Clin**, 33, n. 1, p. 13-23, Jan 2015.

KIMBALL, A. B.; JACOBSON, C.; WEISS, S.; VREELAND, M. G. *et al.* The psychosocial burden of psoriasis. **Am J Clin Dermatol**, 6, n. 6, p. 383-392, 2005.

KJELDSEN, L.; BAINTON, D. F.; SENGELOV, H.; BORREGAARD, N. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. **Blood**, 83, n. 3, p. 799-807, Feb 01 1994.

KORMAN, N. J. Management of psoriasis as a systemic disease: what is the evidence? **Br J Dermatol**, 182, n. 4, p. 840-848, 04 2020.

KORN, T.; BETTELLI, E.; GAO, W.; AWASTHI, A. *et al.* IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. **Nature**, 448, n. 7152, p. 484-487, Jul 2007.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev Immunol**, 27, p. 485-517, 2009.

- KORN, T.; MITSDOERFFER, M.; CROXFORD, A. L.; AWASTHI, A. *et al.* IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 47, p. 18460-18465, Nov 2008.
- KRISHNAMURTHY, K.; WALKER, A.; GROPPER, C. A.; HOFFMAN, C. To treat or not to treat? Management of guttate psoriasis and pityriasis rosea in patients with evidence of group A Streptococcal infection. **J Drugs Dermatol**, 9, n. 3, p. 241-250, Mar 2010.
- KRUEGER, G.; CALLIS, K. Potential of tumor necrosis factor inhibitors in psoriasis and psoriatic arthritis. **Arch Dermatol**, 140, n. 2, p. 218-225, Feb 2004.
- KRYCZEK, I.; BRUCE, A. T.; GUDJONSSON, J. E.; JOHNSTON, A. *et al.* Induction of IL-17+ T cell trafficking and development by IFN-gamma: mechanism and pathological relevance in psoriasis. **J Immunol**, 181, n. 7, p. 4733-4741, Oct 2008.
- KWON, H.; THIERRY-MIEG, D.; THIERRY-MIEG, J.; KIM, H. P. *et al.* Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors. **Immunity**, 31, n. 6, p. 941-952, Dec 18 2009.
- LANDE, R.; BOTTI, E.; JANDUS, C.; DOJCINOVIC, D. *et al.* The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. **Nat Commun**, 5, p. 5621, Dec 2014.
- LANGLEY, R. G.; KRUEGER, G. G.; GRIFFITHS, C. E. Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. **Ann Rheum Dis**, 64 Suppl 2, p. ii18-23; discussion ii24-15, Mar 2005.
- LEBWOHL, M. G.; BACHELEZ, H.; BARKER, J.; GIROLOMONI, G. *et al.* Patient perspectives in the management of psoriasis: results from the population-based Multinational Assessment of Psoriasis and Psoriatic Arthritis Survey. **J Am Acad Dermatol**, 70, n. 5, p. 871-881.e871-830, May 2014.
- LI, J.; LI, X.; HOU, R.; LIU, R. *et al.* Psoriatic T cells reduce epidermal turnover time and affect cell proliferation contributed from differential gene expression. **J Dermatol**, 42, n. 9, p. 874-880, Sep 2015.
- LI, S. J.; PEREZ-CHADA, L. M.; MEROLA, J. F. TNF Inhibitor-Induced Psoriasis: Proposed Algorithm for Treatment and Management. **J Psoriasis Psoriatic Arthritis**, 4, n. 2, p. 70-80, Apr 2019.
- LIN, H. H.; LIAO, C. J.; LEE, Y. C.; HU, K. H. *et al.* Lipocalin-2-induced cytokine production enhances endometrial carcinoma cell survival and migration. **Int J Biol Sci**, 7, n. 1, p. 74-86, Jan 18 2011.
- LIN, M. H.; CHOU, F. C.; YEH, L. T.; FU, S. H. *et al.* B lymphocyte-induced maturation protein 1 (BLIMP-1) attenuates autoimmune diabetes in NOD mice by suppressing Th1 and Th17 cells. **Diabetologia**, 56, n. 1, p. 136-146, Jan 2013.
- LIN, M. H.; YEH, L. T.; CHEN, S. J.; CHIOU, H. Y. *et al.* T cell-specific BLIMP-1 deficiency exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice by increasing Th1 and Th17 cells. **Clin Immunol**, 151, n. 2, p. 101-113, Apr 2014.

LISI, P. Differential diagnosis of psoriasis. **Reumatismo**, 59 Suppl 1, p. 56-60, 2007.

LIU, Y.; KRUEGER, J. G.; BOWCOCK, A. M. Psoriasis: genetic associations and immune system changes. **Genes Immun**, 8, n. 1, p. 1-12, Jan 2007.

LIU, Y. W.; FU, S. H.; CHIEN, M. W.; HSU, C. Y. *et al.* Blimp-1 molds the epigenetic architecture of IL-21-mediated autoimmune diseases through an autoregulatory circuit. **JCI Insight**, 7, n. 11, 06 08 2022.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

LOWES, M. A.; BOWCOCK, A. M.; KRUEGER, J. G. Pathogenesis and therapy of psoriasis. **Nature**, 445, n. 7130, p. 866-873, Feb 2007.

LOWES, M. A.; KIKUCHI, T.; FUENTES-DUCULAN, J.; CARDINALE, I. *et al.* Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. **J Invest Dermatol**, 128, n. 5, p. 1207-1211, May 2008.

LOWES, M. A.; RUSSELL, C. B.; MARTIN, D. A.; TOWNE, J. E. *et al.* The IL-23/T17 pathogenic axis in psoriasis is amplified by keratinocyte responses. **Trends Immunol**, 34, n. 4, p. 174-181, Apr 2013.

LOWES, M. A.; SUÁREZ-FARIÑAS, M.; KRUEGER, J. G. Immunology of psoriasis. **Annu Rev Immunol**, 32, p. 227-255, 2014.

LYNDE, C. W.; POULIN, Y.; VENDER, R.; BOURCIER, M. *et al.* Interleukin 17A: toward a new understanding of psoriasis pathogenesis. **J Am Acad Dermatol**, 71, n. 1, p. 141-150, Jul 2014.

LØNNBERG, A. S.; SKOV, L.; DUFFY, D. L.; SKYTTHE, A. *et al.* Genetic Factors Explain Variation in the Age at Onset of Psoriasis: A Population-based Twin Study. **Acta Derm Venereol**, 96, n. 1, p. 35-38, Jan 2016.

MACHADO, Á.; TORRES, T. Guselkumab for the Treatment of Psoriasis. **BioDrugs**, 32, n. 2, p. 119-128, Apr 2018.

MADDUR, M. S.; MIOSSEC, P.; KAVERI, S. V.; BAYRY, J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. **Am J Pathol**, 181, n. 1, p. 8-18, Jul 2012.

MAGNÚSDÓTTIR, E.; KALACHIKOV, S.; MIZUKOSHI, K.; SAVITSKY, D. *et al.* Epidermal terminal differentiation depends on B lymphocyte-induced maturation protein-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 104, n. 38, p. 14988-14993, Sep 2007.

MANEL, N.; UNUTMAZ, D.; LITTMAN, D. R. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. **Nat Immunol**, 9, n. 6, p. 641-649, Jun 2008.

- MARENHOLZ, I.; ZIRRA, M.; FISCHER, D. F.; BACKENDORF, C. *et al.* Identification of human epidermal differentiation complex (EDC)-encoded genes by subtractive hybridization of entire YACs to a gridded keratinocyte cDNA library. **Genome Res**, 11, n. 3, p. 341-355, Mar 2001.
- MARTIN, B. A.; CHALMERS, R. J.; TELFER, N. R. How great is the risk of further psoriasis following a single episode of acute guttate psoriasis? **Arch Dermatol**, 132, n. 6, p. 717-718, Jun 1996.
- MARTIN, D. A.; TOWNE, J. E.; KRICORIAN, G.; KLEKOTKA, P. *et al.* The emerging role of IL-17 in the pathogenesis of psoriasis: preclinical and clinical findings. **J Invest Dermatol**, 133, n. 1, p. 17-26, Jan 2013.
- MARTINS, G. A.; CIMMINO, L.; SHAPIRO-SHELEF, M.; SZABOLCS, M. *et al.* Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. **Nat Immunol**, 7, n. 5, p. 457-465, May 2006.
- MARTÍNEZ-BORRA, J.; GONZÁLEZ, S.; SANTOS-JUANES, J.; SÁNCHEZ DEL RIO, J. *et al.* Psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis share a 100 kb susceptibility region telomeric to HLA-C. **Rheumatology (Oxford)**, 42, n. 9, p. 1089-1092, Sep 2003.
- MCGEACHY, M. J.; CHEN, Y.; TATO, C. M.; LAURENCE, A. *et al.* The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. **Nat Immunol**, 10, n. 3, p. 314-324, Mar 2009.
- MEASE, P. J.; ARMSTRONG, A. W. Managing patients with psoriatic disease: the diagnosis and pharmacologic treatment of psoriatic arthritis in patients with psoriasis. **Drugs**, 74, n. 4, p. 423-441, Mar 2014.
- MEASE, P. J.; GOFFE, B. S.; METZ, J.; VANDERSTOEP, A. *et al.* Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. **Lancet**, 356, n. 9227, p. 385-390, Jul 2000.
- MEASE, P. J.; LIU, C.; SIEGEL, E.; RICHMOND, H. *et al.* Impact of Clinical Specialty Setting and Geographic Regions on Disease Management in Patients with Psoriatic Arthritis in the United States: A Multicenter Observational Study. **Am J Clin Dermatol**, 20, n. 6, p. 873-880, Dec 2019.
- MEHTA, N. N.; TEAGUE, H. L.; SWINDELL, W. R.; BAUMER, Y. *et al.* IFN- γ and TNF- α synergism may provide a link between psoriasis and inflammatory atherogenesis. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 13831, 10 2017.
- MELLOR, L. F.; GAGO-LOPEZ, N.; BAKIRI, L.; SCHMIDT, F. N. *et al.* Keratinocyte-derived S100A9 modulates neutrophil infiltration and affects psoriasis-like skin and joint disease. **Ann Rheum Dis**, Jul 04 2022.
- MENGESHA, B. G.; CONTI, H. R. The Role of IL-17 in Protection against Mucosal Candida Infections. **J Fungi (Basel)**, 3, n. 4, Sep 2017.
- MENTER, A.; GOTTLIEB, A.; FELDMAN, S. R.; VAN VOORHEES, A. S. *et al.* Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. **J Am Acad Dermatol**, 58, n. 5, p. 826-850, May 2008.

MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, 19, p. 683-765, 2001.

MROWIETZ, U.; KRAGBALLE, K.; REICH, K.; SPULS, P. *et al.* Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus. **Arch Dermatol Res**, 303, n. 1, p. 1-10, Jan 2011.

MURPHY, C. A.; LANGRISH, C. L.; CHEN, Y.; BLUMENSCHNEIN, W. *et al.* Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. **J Exp Med**, 198, n. 12, p. 1951-1957, Dec 15 2003.

MURPHY, M.; KERR, P.; GRANT-KELS, J. M. The histopathologic spectrum of psoriasis. **Clin Dermatol**, 25, n. 6, p. 524-528, 2007 Nov-Dec 2007.

NAIR, R. P.; DUFFIN, K. C.; HELMS, C.; DING, J. *et al.* Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. **Nat Genet**, 41, n. 2, p. 199-204, Feb 2009.

NATIONALPSORIASISFOUNDATION-STATISTICS. **National Psoriasis Foundation. Statistics**. Disponível em: <https://www.psoriasis.org/content/statistics/>. Acesso em: May.

NELSON, A. M.; ZHAO, W.; GILLILAND, K. L.; ZAENGLEIN, A. L. *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin mediates 13-cis retinoic acid-induced apoptosis of human sebaceous gland cells. **J Clin Invest**, 118, n. 4, p. 1468-1478, Apr 2008.

NESTLE, F. O.; CONRAD, C.; TUN-KYI, A.; HOMEY, B. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. **J Exp Med**, 202, n. 1, p. 135-143, Jul 2005.

NESTLE, F. O.; KAPLAN, D. H.; BARKER, J. Psoriasis. **N Engl J Med**, 361, n. 5, p. 496-509, Jul 2009.

NEUHOFER, W. Role of NFAT5 in inflammatory disorders associated with osmotic stress. **Curr Genomics**, 11, n. 8, p. 584-590, Dec 2010.

NEUMANN, C.; HEINRICH, F.; NEUMANN, K.; JUNGHANS, V. *et al.* Role of Blimp-1 in programming Th effector cells into IL-10 producers. **J Exp Med**, 211, n. 9, p. 1807-1819, Aug 2014.

NEUMANN, C.; SCHEFFOLD, A.; RUTZ, S. Functions and regulation of T cell-derived interleukin-10. **Semin Immunol**, 44, p. 101344, 08 2019.

NIEHUES, H.; TSOI, L. C.; VAN DER KRIEKEN, D. A.; JANSEN, P. A. M. *et al.* Psoriasis-Associated Late Cornified Envelope (LCE) Proteins Have Antibacterial Activity. **J Invest Dermatol**, 137, n. 11, p. 2380-2388, 11 2017.

NOCKOWSKI, P.; SZEPIETOWSKI, J. C.; ZIARKIEWICZ, M.; BARAN, E. Serum concentrations of transforming growth factor beta 1 in patients with psoriasis vulgaris. **Acta Dermatovenerol Croat**, 12, n. 1, p. 2-6, 2004.

NURIEVA, R.; YANG, X. O.; MARTINEZ, G.; ZHANG, Y. *et al.* Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. **Nature**, 448, n. 7152, p. 480-483, Jul 2007.

- O'NEILL, J. L.; KALB, R. E. Ustekinumab in the therapy of chronic plaque psoriasis. **Biologics**, 3, p. 159-168, 2009.
- O'NEILL, T.; SILMAN, A. J. Psoriatic arthritis. Historical background and epidemiology. **Baillieres Clin Rheumatol**, 8, n. 2, p. 245-261, May 1994.
- O'SHEA, J. J.; PAUL, W. E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. **Science**, 327, n. 5969, p. 1098-1102, Feb 2010.
- OGAWA, E.; SATO, Y.; MINAGAWA, A.; OKUYAMA, R. Pathogenesis of psoriasis and development of treatment. **J Dermatol**, 45, n. 3, p. 264-272, Mar 2018.
- OHINATA, Y.; PAYER, B.; O'CARROLL, D.; ANCELIN, K. *et al.* Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. **Nature**, 436, n. 7048, p. 207-213, Jul 2005.
- OKADA, Y.; HAN, B.; TSOI, L. C.; STUART, P. E. *et al.* Fine mapping major histocompatibility complex associations in psoriasis and its clinical subtypes. **Am J Hum Genet**, 95, n. 2, p. 162-172, Aug 2014.
- OLIVEIRA, M. E. F.; ROCHA, B. E. O.; DUARTE, G. V. Psoriasis: classical and emerging comorbidities. **An Bras Dermatol**, 90, n. 1, p. 9-20, 2015 Jan-Feb 2015.
- OPPMANN, B.; LESLEY, R.; BLOM, B.; TIMANS, J. C. *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**, 13, n. 5, p. 715-725, Nov 2000.
- PARHAM, C.; CHIRICA, M.; TIMANS, J.; VAISBERG, E. *et al.* A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. **J Immunol**, 168, n. 11, p. 5699-5708, Jun 2002.
- PASCHOAL, R. S.; SILVA, D. A.; CARDILI, R. N.; SOUZA, C. D. S. Metabolic syndrome, C-reactive protein and cardiovascular risk in psoriasis patients: a cross-sectional study. **An Bras Dermatol**, 93, n. 2, p. 222-228, 03 2018.
- PASQUALI, L.; SRIVASTAVA, A.; MEISGEN, F.; DAS MAHAPATRA, K. *et al.* The Keratinocyte Transcriptome in Psoriasis: Pathways Related to Immune Responses, Cell Cycle and Keratinization. **Acta Derm Venereol**, 99, n. 2, p. 196-205, Feb 2019.
- PERERA, G. K.; DI MEGLIO, P.; NESTLE, F. O. Psoriasis. **Annu Rev Pathol**, 7, p. 385-422, 2012.
- PETTEY, A. A.; BALKRISHNAN, R.; RAPP, S. R.; FLEISCHER, A. B. *et al.* Patients with palmoplantar psoriasis have more physical disability and discomfort than patients with other forms of psoriasis: implications for clinical practice. **J Am Acad Dermatol**, 49, n. 2, p. 271-275, Aug 2003.
- PIVARCSI, A.; STÄHLE, M.; SONKOLY, E. Genetic polymorphisms altering microRNA activity in psoriasis--a key to solve the puzzle of missing heritability? **Exp Dermatol**, 23, n. 9, p. 620-624, Sep 2014.

PREVOO, M. L.; VAN 'T HOF, M. A.; KUPER, H. H.; VAN LEEUWEN, M. A. *et al.* Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, 38, n. 1, p. 44-48, Jan 1995.

PRINZ, J. C. Melanocytes: Target Cells of an HLA-C*06:02-Restricted Autoimmune Response in Psoriasis. **J Invest Dermatol**, 137, n. 10, p. 2053-2058, 10 2017.

RAPOSO, I.; TORRES, T. Palmoplantar Psoriasis and Palmoplantar Pustulosis: Current Treatment and Future Prospects. **Am J Clin Dermatol**, 17, n. 4, p. 349-358, Aug 2016.

RAPP, S. R.; FELDMAN, S. R.; EXUM, M. L.; FLEISCHER, A. B. *et al.* Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. **J Am Acad Dermatol**, 41, n. 3 Pt 1, p. 401-407, Sep 1999.

RAYCHAUDHURI, S. K.; MAVERAKIS, E.; RAYCHAUDHURI, S. P. Diagnosis and classification of psoriasis. **Autoimmun Rev**, 13, n. 4-5, p. 490-495, 2014 Apr-May 2014.

REICH, K.; RICH, P.; MAARI, C.; BISSONNETTE, R. *et al.* Efficacy and safety of mirikizumab (LY3074828) in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis: results from a randomized phase II study. **Br J Dermatol**, 181, n. 1, p. 88-95, 07 2019.

RIZVI, S.; CHAUDHARI, K.; SYED, B. A. The psoriasis drugs market. **Nat Rev Drug Discov**, 14, n. 11, p. 745-746, 11 2015.

ROBERTSON, E. J.; CHARATSI, I.; JOYNER, C. J.; KOONCE, C. H. *et al.* Blimp1 regulates development of the posterior forelimb, caudal pharyngeal arches, heart and sensory vibrissae in mice. **Development**, 134, n. 24, p. 4335-4345, Dec 2007.

ROMITI, R.; MARAGNO, L.; ARNONE, M.; TAKAHASHI, M. D. [Psoriasis in childhood and adolescence]. **An Bras Dermatol**, 84, n. 1, p. 9-20, 2009 Jan-Feb 2009.

RUTISHAUSER, R. L.; MARTINS, G. A.; KALACHIKOV, S.; CHANDELE, A. *et al.* Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. **Immunity**, 31, n. 2, p. 296-308, Aug 2009.

SALAFFI, F.; CIAPETTI, A.; CAROTTI, M.; GASPARINI, S. *et al.* Disease activity in psoriatic arthritis: comparison of the discriminative capacity and construct validity of six composite indices in a real world. **Biomed Res Int**, 2014, p. 528105, 2014.

SALEHI, S.; BANKOTI, R.; BENEVIDES, L.; WILLEN, J. *et al.* B lymphocyte-induced maturation protein-1 contributes to intestinal mucosa homeostasis by limiting the number of IL-17-producing CD4+ T cells. **J Immunol**, 189, n. 12, p. 5682-5693, Dec 2012.

SALGADO-BOQUETE, L.; CARRASCOSA, J. M.; LLAMAS-VELASCO, M.; RUIZ-VILLAVERDE, R. *et al.* A New Classification of the Severity of Psoriasis: What's Moderate Psoriasis? **Life (Basel)**, 11, n. 7, Jun 29 2021.

SANJABI, S.; ZENEWICZ, L. A.; KAMANAKA, M.; FLAVELL, R. A. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. **Curr Opin Pharmacol**, 9, n. 4, p. 447-453, Aug 2009.

SBIDIAN, E.; CHAIMANI, A.; AFACH, S.; DONEY, L. *et al.* Systemic pharmacological treatments for chronic plaque psoriasis: a network meta-analysis. **Cochrane Database Syst Rev**, 1, p. CD011535, 01 09 2020.

SBIDIAN, E.; MAZA, A.; MONTAUDIÉ, H.; GALLINI, A. *et al.* Efficacy and safety of oral retinoids in different psoriasis subtypes: a systematic literature review. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, 25 Suppl 2, p. 28-33, May 2011.

SCHWANHÄUSSER, B.; BUSSE, D.; LI, N.; DITTMAR, G. *et al.* Global quantification of mammalian gene expression control. **Nature**, 473, n. 7347, p. 337-342, May 2011.

SELLHEYER, K.; KRAHL, D. Blimp-1: a marker of terminal differentiation but not of sebocytic progenitor cells. **J Cutan Pathol**, 37, n. 3, p. 362-370, Mar 2010.

SHAH, N.; GUO, Y.; WENDELSDORF, K. V.; LU, Y. *et al.* A crowdsourcing approach for reusing and meta-analyzing gene expression data. **Nat Biotechnol**, 34, n. 8, p. 803-806, 08 2016.

SHAO, S.; CAO, T.; JIN, L.; LI, B. *et al.* Increased Lipocalin-2 Contributes to the Pathogenesis of Psoriasis by Modulating Neutrophil Chemotaxis and Cytokine Secretion. **J Invest Dermatol**, 136, n. 7, p. 1418-1428, 07 2016.

SHAPIRO-SHELEF, M.; LIN, K. I.; MCHEYZER-WILLIAMS, L. J.; LIAO, J. *et al.* Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. **Immunity**, 19, n. 4, p. 607-620, Oct 2003.

SHASHIDHARAMURTHY, R.; MACHIAH, D.; AITKEN, J. D.; PUTTY, K. *et al.* Differential role of lipocalin 2 during immune complex-mediated acute and chronic inflammation in mice. **Arthritis Rheum**, 65, n. 4, p. 1064-1073, Apr 2013.

SHI, Y.; CHEN, Z.; ZHAO, Z.; YU, Y. *et al.* IL-21 Induces an Imbalance of Th17/Treg Cells in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis Patients. **Front Immunol**, 10, p. 1865, 2019.

SOCIEDADEBRASILEIRADEDERMATOLOGIA., 2020, Rio de Janeiro. **Consenso brasileiro de psoríase 2020: algoritmo de tratamento da Sociedade Brasileira de Dermatologia.**

SODERSTROM, C.; BERSTEIN, G.; ZHANG, W.; VALDEZ, H. *et al.* Ultra-Sensitive Measurement of IL-17A and IL-17F in Psoriasis Patient Serum and Skin. **AAPS J**, 19, n. 4, p. 1218-1222, 07 2017.

SREEJIT, G.; FLYNN, M. C.; PATIL, M.; KRISHNAMURTHY, P. *et al.* S100 family proteins in inflammation and beyond. **Adv Clin Chem**, 98, p. 173-231, 2020.

STRANGE, A.; CAPON, F.; SPENCER, C. C.; KNIGHT, J. *et al.* A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. **Nat Genet**, 42, n. 11, p. 985-990, Nov 2010.

STUMHOFER, J. S.; SILVER, J. S.; LAURENCE, A.; PORRETT, P. M. *et al.* Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. **Nat Immunol**, 8, n. 12, p. 1363-1371, Dec 2007.

SYED, Z. U.; KHACHEMOUNE, A. Inverse psoriasis: case presentation and review. **Am J Clin Dermatol**, 12, n. 2, p. 143-146, Apr 2011.

TAKESHITA, J.; GREWAL, S.; LANGAN, S. M.; MEHTA, N. N. *et al.* Psoriasis and comorbid diseases: Epidemiology. **J Am Acad Dermatol**, 76, n. 3, p. 377-390, Mar 2017.

TARTAR, D.; BHUTANI, T.; HUYNH, M.; BERGER, T. *et al.* Update on the immunological mechanism of action behind phototherapy. **J Drugs Dermatol**, 13, n. 5, p. 564-568, May 2014.

TEIGELKAMP, S.; BHARDWAJ, R. S.; ROTH, J.; MEINARDUS-HAGER, G. *et al.* Calcium-dependent complex assembly of the myeloid differentiation proteins MRP-8 and MRP-14. **J Biol Chem**, 266, n. 20, p. 13462-13467, Jul 15 1991.

TILLET, W.; JADON, D.; SHADDICK, G.; CAVILL, C. *et al.* Smoking and delay to diagnosis are associated with poorer functional outcome in psoriatic arthritis. **Ann Rheum Dis**, 72, n. 8, p. 1358-1361, Aug 2013.

TORSEKAR, R.; GAUTAM, M. M. Topical Therapies in Psoriasis. **Indian Dermatol Online J**, 8, n. 4, p. 235-245, 2017 Jul-Aug 2017.

TSOI, L. C.; SPAIN, S. L.; KNIGHT, J.; ELLINGHAUS, E. *et al.* Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity. **Nat Genet**, 44, n. 12, p. 1341-1348, Dec 2012.

TUCKER, L. J.; COATES, L. C.; HELLIWELL, P. S. Assessing Disease Activity in Psoriatic Arthritis: A Literature Review. **Rheumatol Ther**, 6, n. 1, p. 23-32, Mar 2019.

TURNER, C. A.; MACK, D. H.; DAVIS, M. M. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. **Cell**, 77, n. 2, p. 297-306, Apr 1994.

VARMAN, K. M.; NAMIAS, N.; SCHULMAN, C. I.; PIZANO, L. R. Acute generalized pustular psoriasis, von Zumbusch type, treated in the burn unit. A review of clinical features and new therapeutics. **Burns**, 40, n. 4, p. e35-39, Jun 2014.

VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. **Annu Rev Immunol**, 10, p. 411-452, 1992.

VILLANI, A. P.; ROUZAUD, M.; SEVRAIN, M.; BARNETCHE, T. *et al.* Prevalence of undiagnosed psoriatic arthritis among psoriasis patients: Systematic review and meta-analysis. **J Am Acad Dermatol**, 73, n. 2, p. 242-248, Aug 2015.

VINCENT, S. D.; DUNN, N. R.; SCIAMMAS, R.; SHAPIRO-SHALEF, M. *et al.* The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. **Development**, 132, n. 6, p. 1315-1325, Mar 2005.

VOLPE, E.; SERVANT, N.; ZOLLINGER, R.; BOGIATZI, S. I. *et al.* A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. **Nat Immunol**, 9, n. 6, p. 650-657, Jun 2008.

WANG, G.; MA, N.; MENG, L.; WEI, Y. *et al.* Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is involved in lipocalin-2-promoted human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. **Mol Cell Biochem**, 410, n. 1-2, p. 207-213, Dec 2015.

WANG, L.; VAN PANHUYS, N.; HU-LI, J.; KIM, S. *et al.* Blimp-1 induced by IL-4 plays a critical role in suppressing IL-2 production in activated CD4 T cells. **J Immunol**, 181, n. 8, p. 5249-5256, Oct 2008.

WANG, X.; LIU, X.; LIU, N.; CHEN, H. Prediction of crucial epigenetically-associated, differentially expressed genes by integrated bioinformatics analysis and the identification of S100A9 as a novel biomarker in psoriasis. **Int J Mol Med**, 45, n. 1, p. 93-102, Jan 2020.

WILSMANN-THEIS, D.; KOCH, S.; MINDNICH, C.; BONNESS, S. *et al.* Generation and functional analysis of human TNF- α /iNOS-producing dendritic cells (Tip-DC). **Allergy**, 68, n. 7, p. 890-898, Jul 2013.

WILSON, N. J.; BONIFACE, K.; CHAN, J. R.; MCKENZIE, B. S. *et al.* Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. **Nat Immunol**, 8, n. 9, p. 950-957, Sep 2007.

YAMAMOTO, T. Extra-palmoplantar lesions associated with palmoplantar pustulosis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, 23, n. 11, p. 1227-1232, Nov 2009.

YANG, L.; ANDERSON, D. E.; BAECHER-ALLAN, C.; HASTINGS, W. D. *et al.* IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. **Nature**, 454, n. 7202, p. 350-352, Jul 2008.

ZABA, L. C.; SUÁREZ-FARIÑAS, M.; FUENTES-DUCULAN, J.; NOGRALES, K. E. *et al.* Effective treatment of psoriasis with etanercept is linked to suppression of IL-17 signaling, not immediate response TNF genes. **J Allergy Clin Immunol**, 124, n. 5, p. 1022-1010.e1021-1395, Nov 2009.

ZHANG, D. J.; WANG, Q.; WEI, J.; BAIMUKANOVA, G. *et al.* Selective expression of the Cre recombinase in late-stage thymocytes using the distal promoter of the Lck gene. **J Immunol**, 174, n. 11, p. 6725-6731, Jun 01 2005.

ZHANG, N.; BEVAN, M. J. TGF- β signaling to T cells inhibits autoimmunity during lymphopenia-driven proliferation. **Nat Immunol**, 13, n. 7, p. 667-673, May 27 2012.

ZHANG, S. The role of transforming growth factor β in T helper 17 differentiation. **Immunology**, 155, n. 1, p. 24-35, 09 2018.

ZHENG, Y.; SUN, L.; JIANG, T.; ZHANG, D. *et al.* TNF α promotes Th17 cell differentiation through IL-6 and IL-1 β produced by monocytes in rheumatoid arthritis. **J Immunol Res**, 2014, p. 385352, 2014.

ZHOU, L.; IVANOV, I. I.; SPOLSKI, R.; MIN, R. *et al.* IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nat Immunol**, 8, n. 9, p. 967-974, Sep 2007.

Anexos

Anexo A



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 14 de abril de 2016.

Ofício nº 1293/2016
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 5666/2016

Prezadas Pesquisadoras,

O trabalho intitulado "**O PAPEL DOS RECEPTORES CANABINÓIDES E A SUA RELAÇÃO COM AS CÉLULAS IMUNES NA PELE DE PACIENTES COM PSORÍASE**", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 425ª Reunião Ordinária realizada em 11/04/2016, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^a MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

LORENA CARLA OLIVEIRA DA COSTA
PROF^a DR^a CACILDA DA SILVA SOUZA (Orientadora)
Depto. de Clínica Médica – Divisão de Dermatologia

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

Anexo B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO: O PAPEL DOS RECEPTORES CANABINÓIDES E A SUA RELAÇÃO COM AS CÉLULAS IMUNES NA PELE DE PACIENTES COM PSORÍASE

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: DRA LORENA CARLA OLIVEIRA DA COSTA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CACILDA DA SILVA SOUZA

O(A) Sr(a). está sendo convidado para participar de estudo sobre PSORÍASE, cuja causa ainda não é totalmente conhecida, mas parece estar em parte relacionada a um desequilíbrio do sistema de defesa do nosso organismo. Este projeto de pesquisa busca identificar sinais internos anormais e estudar as relações com as células do sistema de defesa que possam estar agindo no desenvolvimento da doença. O estudo pode ajudar a entender melhor a doença e desenvolver novos medicamentos.

PROCEDIMENTOS: Se o(a) Sr(a). concordar em participar do estudo, será necessária sua autorização para coleta de 8 ml de sangue (uma colher de sopa) de veia superficial e duas amostras da pele, como os exames comuns utilizados no seu diagnóstico e seguimento. A biópsia é feita após anestesia da pele, para a retirada de pedaço de espessura menor do que a circunferência de um lápis (4 mm de diâmetro). Os desconfortos são a picada da agulha para colher o sangue, e aplicação da anestesia na pele para biópsia. O local da picada da coleta do sangue pode ficar arroxado, o sangramento da biópsia para com curativo, e a cicatrização da pele pode durar de 3 a 5 dias. Os riscos são: cicatriz (1-2 mm) no local da biópsia (frequente), infecção (raro) e alergia à anestesia (muito raro). Se isto ocorrer, o Sr (a) será atendido pela pesquisadora médica colaboradora ou equipe da Dermatologia do HC de Ribeirão Preto. Estes procedimentos não irão prejudicar, retardar ou alterar o tratamento e o seguimento médico que você esteja realizando. Uma única coleta da amostra da pele está prevista para este estudo. Todo material extraído da sua pele será utilizado apenas para finalidade proposta neste estudo, e o uso para outros fins deverá ter novamente a sua permissão.

O seu nome e os seus dados pessoais são confidenciais e não serão de forma alguma divulgados publicamente nos documentos deste estudo, serão arquivados e apenas o pesquisador responsável terá acesso ao número que identifica seu nome.

O (A) Sr (a) não terá benefícios diretos com os resultados deste estudo, que busca descobrir a causa da doença e no futuro, talvez, novos tratamentos.

O(A) Sr(a). não terá despesas extras ou alguma compensação financeira para participar do estudo.

O(A) Sr(a).tem total liberdade para recusar a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase do estudo, sem penalização alguma e sem prejuízo em sua relação com a pesquisadora, ou com a instituição envolvida e sem que isto prejudique o seu tratamento e atendimento médico.

O(A) Sr(a). receberá uma cópia deste termo, no qual consta o telefone e endereço da pesquisadora responsável, podendo entrar em contato com a mesma para qualquer esclarecimento de dúvidas relacionadas ao projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento do estudo.

Ribeirão Preto, Data: _____

Dra Lorena Carla Oliveira da Costa– médica pós-graduanda da Divisão de Dermatologia
Hospital das Clínicas-FMRPUSP- Av.: Bandeirantes, 3900 – Mte Alegre, Telefone:(16)3602-5161,
email:lcodcosta@hotmail.com

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. A pesquisadora me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, tel: (16) 3602- 2228

Assinatura: _____

Nome do participante: _____

Registro do participante: _____

Anexo C

Artigo Publicado

Archives of Dermatological Research

<https://doi.org/10.1007/s00403-022-02379-3>

Impact factor 3.196



Expression of B lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp-1) in keratinocyte and cytokine signalling drives human Th17 response in psoriasis

Lorena Carla Oliveira da Costa¹ · Luiz Gustavo Gardinassi² · Flávio Protásio Veras³ · Cristiane Milanezi⁴ · Leandra Náira Zambelli Ramalho⁵ · Luciana Benevides⁶ · José Carlos Alves-Filho³ · João Santana da Silva^{4,6} · Cacilda da Silva Souza¹

Received: 4 December 2021 / Revised: 30 June 2022 / Accepted: 1 August 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Transcriptional factor B lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp-1) is pivotally implicated in T helper 17 (Th17) cell differentiation. This study investigated expression of the Blimp-1 protein, positive regulatory domain 1 (*PRDM1*), and cytokine genes in psoriasis (PsO). Affected (AS-PsO) and non-affected skin (nAS-PsO) samples were used to assess gene and protein expressions by reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR), and immunostaining and confocal microscopy, respectively; the normalised public transcriptomic data permitted differential gene expression analyses. On RT-qPCR, *PRDM1* and *IL17A* transcripts showed higher expression in AS-PsO than in nAS-PsO ($n = 34$) ($p < 0.001$; $p < 0.0001$, respectively). Confocal microscopy showed Blimp-1 protein expression in epidermal layer keratinocytes in AS-PsO, but not in nAS-PsO. Bioinformatic analysis of the transcriptomic dataset GSE13355 corroborated the increased *PRDM1*, signal transducer and activator of transcription 3 (*STAT3*), *IL12B*, *TNF*, *IL17A*, *IL6*, *IL1B*, *IL22*, and *IL10* gene expression in AS-PsO, when compared to normal skin and nAS-PsO ($p < 0.001$). *PRDM1* expression correlated positively ($p < 0.0001$) with that of *IL17A* ($r = 0.7$), *IL1B* ($r = 0.67$), *IL12B* ($r = 0.6$), *IL6* ($r = 0.59$), *IL22* ($r = 0.53$), *IL23A* ($r = 0.47$), *IL21* ($r = 0.47$), *IL27* ($r = 0.34$), *IL23R* ($r = 0.32$), S100 calcium binding protein A9 ($r = 0.63$), and lipocalin 2 ($r = 0.50$), and negatively with that of *TGFB1* ($r = -0.28$) and *RORC* ($r = -0.60$). Blimp-1 may be critical in the pathogenesis of PsO dysregulation involving the Th17 inflammatory pathway. This knowledge may accelerate the development of new treatments.

Keywords Psoriasis · B lymphocyte-induced maturation protein 1 · Interleukin-17 · Transforming growth factor beta · Th17 cells · Cytokines

Introduction

Psoriasis (PsO) is an immune-mediated disease with the interleukin (IL)-23/T helper type 17 (Th17) axis as the main pathway involving multiple proinflammatory and proliferative

inducers secreted by dendritic cells (DC), T cells, and keratinocytes (KCs). IL-23 and IL-12 from activated DCs stimulate the Th17, Th22, and Th1 subpopulations to produce effector cytokines [1–5]. Among these, tumour necrosis factor (TNF) α , IL-1 β , IL-17A, IL-17F, IL-21, and IL-22 drive KC responses

✉ Cacilda da Silva Souza
cssouza@fmrp.usp.br

¹ Dermatology Division, Department of Internal Medicine, Ribeirão Preto Medical School, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto, São Paulo 14048-900, Brazil

² Department of Biosciences and Technology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

³ Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

⁴ Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

⁵ Department of Pathology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

⁶ Fiocruz-Bi-Institutional Translational Medicine Platform, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

[6–10]. Moreover, KCs may act as initiators of cutaneous inflammation and produce cytokines, adhesion molecules, and chemotactic factors in response to diverse stimuli [1, 10–12]. Activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B), by TNF- α and IL-1 β signalling, affects the differentiation, proliferation, and survival (apoptosis) of KCs and lymphocytes, as well as cytokine and chemokine production, which recruits inflammatory cells into the skin [6, 13–15].

IL-23 overexpression drives the differentiation and expansion of effector Th17 cells. Meanwhile, IL-23 receptor (IL-23R) expression is a key determinant of Th17 cell pathogenicity [12, 16–18]. Th17 cells are the primary source of IL-17A; however, other IL-17A-producing cells have also been identified, including CD8⁺ cells, $\gamma\delta$ -T cells, and natural killer T cells [5, 19]. Multiple factors are involved in the development of pathogenic Th17 cells and cytokine production, such as the differentiation factors, transforming growth factor beta (TGF- β) combined with IL-6 or IL-21; growth and stabilization factor (IL-23); transcription factors: NF- κ B, signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3), and retinoic-related orphan receptors gamma t and alpha (ROR γ t, and ROR α); and intracellular signal transducers Janus kinase (JAK), JAK-1, JAK-2 and tyrosine kinase 2 [18–23].

However, there are gaps in our understanding of how transcriptional factors and pleiotropic cytokines, in different pathways, control pathogenic and non-pathogenic Th17 functions.

B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp-1), encoded by the positive regulatory domain 1 gene (*PRDM1*), is a transcription factor expressed by the B cell lineage [24, 25], as well as by T cells, granulocytes, macrophages, and epithelial cells [26]. IL-12, IL-4, IL-2, and IL-6 can induce Blimp-1 expression in T cells [27–29].

In this study, we sought to investigate the expression of the Blimp-1 protein, *PRDM1* gene, as well as its relationship with cytokine gene expression of the Th17 program in PsO.

Materials and methods

Study subjects

In this observational study, 34 adult patients older than 18 years with plaque PsO, who did not undergo any systemic anti-psoriatic treatments or topical treatment (corticosteroids, calcipotriol, calcineurin inhibitors) for 2 weeks prior to biopsy, were recruited from the Dermatology Outpatient Clinic of the Clinics Hospital of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, from June 2017 to August 2018. Other subtypes of psoriasis, pregnancy, and disagreement in study participation were additional exclusion criteria. Sex, age, and disease duration were recorded, and disease severity was assessed using the Psoriasis Area and Severity Index (PASI) and Dermatology

Life Quality Index (DLQI). Full-thickness, 4-mm-punch biopsies were collected from AS–PsO and non-affected skin (nAS–PsO) samples of each patient. Samples were immediately placed in RPMI medium (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for immunofluorescence or TRIzol™ (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) for gene expression analysis. The study was approved (protocol 5666/2016) by the Institutional Review Board (IRB) and was performed in accordance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all participants included in the study.

Immunostaining and confocal microscopy

Paraffin-embedded tissue sections (5- μ m thick) of AS–PsO and nAS–PsO samples were stained using primary antibodies against mouse anti-PRDM1/Blimp-1 (Abcam, Cambridge, MA, USA, Cat# ab81961, dilution 1:200) or rabbit anti-cytokeratin 17 (K17) (Abcam, Cat# ab53707, 1:1000 dilution). Next, the samples were incubated with alpaca anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA, Cat# 615-545-214, 1:1000) and alpaca anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 (Jackson ImmunoResearch, Cat# 611-585-215, 1:1000) secondary antibodies for 30 min. The nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Invitrogen, Renfrewshire, Scotland, UK, Cat# D1306, 1:1.000). Images were acquired using an Axio Observer with an LSM 780 microscope (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) and analysed using the Fiji image processing package in Image J (open-source platform).

RNA purification and gene expression analysis

Biopsies were homogenised using the T 10 basic Ultra-Turrax™ (Ika™, Staufen, Germany) S10N-5G dispersion tool. RNA was extracted using the SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was measured at 260 nm and purity was assessed at 260:280 nm using a NanoDrop® 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). cDNA was prepared with 500 ng of total RNA using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription–quantitative polymerase chain reaction (RT–qPCR) was performed on a StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) using the PrimerTime Std™ qPCR Assay and PrimeTime™

Gene Expression Master Mix, which is a probe-based assay. Primers and probes were ordered from Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA, USA) according to the following assay identifiers: Human *PRDM1* (Hs.PT.56a.39313533.g), human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) (Hs.PT.39a.22214836), and human β 2-microglobulin (*B2M*) (Hs.PT.58v.18759587) (Table S1; see Supporting Information). The PCR process consisted of a cycle of 2 min at 50 °C, denaturation for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. Data were analysed using StepOne-Plus™ Software v2.3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) with automatically set baseline and manually adjusted fluorescence thresholds for the determination of quantification cycle (C_q) values. The samples were normalised to the *GAPDH* and *B2M* levels. RT-qPCR data were analysed by the comparative C_q method using the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ formula. Statistical comparisons between samples were performed using the Mann-Whitney test and the statistical significance was set at $p < 0.05$.

Public transcriptomic data analysis

From the publicly available data set GSE13355 in the Gene Expression Omnibus (GEO) repository catalogues, genome-wide gene expression biopsy profiles of 58 psoriatic patients and 64 healthy controls were acquired via microarray technology. Normalised data and differential expression analyses were performed using the OMiCC platform (<https://omicc.niaid.nih.gov/>) [30]. Next, expression of pre-selected genes was evaluated: *PRDM1*, *STAT3*, *RORC* (retinoic-related orphan receptor C), *S100A9* (S100 calcium-binding protein A9), *LCN2* (lipocalin 2), *TNF*, *IL23A*, *IL23R* (interleukin 23 receptor), *IL17A*, *IL17RA* (interleukin 17 receptor A), *TGFB1* (transforming growth factor beta-1), *IL6*, *IL21*, *IL22*, *IL10*, and *IL27*. Expression of each gene was analysed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison test. Correlations were determined using Spearman's method. Statistical analyses and plots were generated using GraphPad Prism v. 5.03 (San Diego, CA, USA).

Results

Study population

This study included 34 adult patients with plaque PsO, with a mean age of 51.12 ± 14.29 years and predominantly male gendered ($n = 25$; 73.5%). The patients had an average of 11.31 ± 10.82 years of disease and moderate-to-severe PsO, based on the average baseline PASI scores of 13.0 ± 6.69 (Table 1).

Expression of Blimp-1 positively correlates with the expression of IL-17 in the skin of psoriatic patients

RT-qPCR assays showed upregulation of *PRDM1* mRNA ($m = 2.19$ -fold) and *IL17* ($m = 11.95$ -fold) in AS-PsO compared to nAS-PsO in patients with PsO and a positive correlation ($p < 0.0005$; $r = 0.44$; $R^2 = 0.22$) between them (Fig. 1).

Bioinformatic analysis of the public transcriptomics data set GSE13355 [4] showed increased expression of *PRDM1*, *STAT3*, *S100A9*, and *LCN2* genes (Fig. 2a, b) in AS-PsO compared to that in nAS-PsO and normal skin of healthy controls (NSC) ($p < 0.001$). However, the *RORC* expression in AS-PsO was lower than that in nAS-PsO and NSC ($p < 0.001$) (Fig. 2a). These findings corroborated the increased expression of *TNF*, *IL12B*, *IL17A*, *IL1B*, *IL6*, *IL22*, *IL10* (vs. nAS-PsO, $p < 0.001$; vs. NSC, $p < 0.001$), and *IL23R* (vs. NSC, $p < 0.001$; vs. nAS-PsO, $p < 0.01$). In addition, increased gene expression of *IL23A* ($p < 0.001$), *IL21*, *IL27* and *IL4* ($p < 0.05$) in AS-PsO vs. NSC, but no difference compared to nAS-PsO samples, was observed; likewise, increased gene expression of *TGFB1* and *IL17RA* in AS-PsO vs. nAS-PsO ($p < 0.01$) was detected, but the expression of both genes did not differ compared to NSC (Table 2; Figures S4–S5, see Supporting Information).

Accordingly, *PRDM1* expression showed a positive correlation ($p < 0.0001$) with *STAT3* ($r = 0.65$), *S100A9* ($r = 0.63$), *LCN2* ($r = 0.50$) (Fig. 2c, d); *IL17A* ($r = 0.70$), *IL1B* ($r = 0.67$), *IL12B* ($r = 0.60$), *IL6* ($r = 0.59$), *TNF* ($r = 0.58$), *IL22* ($r = 0.53$), *IL23A* ($r = 0.47$), *IL21* ($r = 0.47$), *IL27* ($r = 0.34$), *IL23R* ($r = 0.32$), and *IL10* ($r = 0.30$), but a negative correlation ($p < 0.0001$) with *TGFB1* ($r = -0.28$) (Figs. S4–S5) and *RORC* ($r = -0.60$) gene expression (Fig. 2c; Table 3).

Table 1 Demographic and clinical data of the studied cases

Variable	Study group ($n = 34$)
Age (years, mean \pm SD)	51.12 ± 14.29
Sex	
Male, n (%)	25 (73.5)
Female, n (%)	9 (26.5)
Duration of the disease (years, mean \pm SD)	11.31 ± 10.82
PASI (mean \pm SD)	13.0 ± 6.69
DLQI (mean \pm SD)	12.75 ± 6.34

SD, Standard deviation; PASI, Psoriasis Area and Severity Index; DLQI, Dermatology Life Quality Index

Table 2 Gene expression in affected and non-affected skin samples from patients with psoriasis, and normal skin samples from controls, using the GSE13355 data set

Gene expression	AS–PsO × NSC <i>p</i> value (<i>n</i> = 58)	AS– PsO × nAS– PsO <i>p</i> value (<i>n</i> = 58)	nAS–PsO × NSC <i>p</i> value (<i>n</i> = 64)
<i>PRDM1</i>	<0.001	<0.001	ns
<i>STAT3</i>	<0.001	<0.001	ns
<i>RORC</i> ^a	<0.001	<0.001	ns
<i>S100A9</i>	<0.001	<0.001	<0.01
<i>LCN2</i>	<0.001	<0.001	ns
<i>TNF</i>	<0.001	<0.001	ns
<i>IL12B</i>	<0.001	<0.001	ns
<i>IL1B</i>	<0.001	<0.001	ns
<i>IL6</i>	<0.001	<0.001	ns
<i>IL17A</i>	<0.001	<0.001	ns
<i>IL22</i>	<0.001	<0.001	ns
<i>IL10</i>	<0.001	<0.001	ns
<i>IL23R</i>	<0.001	<0.01	ns
<i>IL23A</i>	<0.001	ns	<0.01
<i>IL21</i>	<0.05	ns	ns
<i>IL27</i>	<0.05	ns	ns
<i>IL4</i>	<0.05	ns	ns
<i>IL17RA</i>	ns	<0.01	ns
<i>TGFB1</i>	ns	<0.01	ns
<i>IL2</i>	ns	ns	ns

IL, interleukin; *PRDM1*, positive regulatory domain 1; *STAT3*, signal transducer and activator of transcription 3; *RORC*, retinoic acid receptor-related orphan receptor C; *S100A9*, S100 calcium binding protein A9; *LCN2*, lipocalin 2; *TNF*, tumour necrosis factor; *IL23R*, interleukin 23 receptor; *IL17RA*, interleukin 17 receptor A; *TGFB1*, transforming growth factor-beta 1; AS–PsO, affected skin; nAS–PsO, non-affected skin from psoriasis patients; NSC, normal skin from controls; ns, non-significant

^aDecrease in *RORC* gene expression in AS–PsO vs. nAS–PsO and AS–PsO vs. NSC ($p < 0.001$). Data from GSE 3355, comprising genome-wide gene expression in skin biopsies from 58 psoriasis patients and 64 healthy controls were analysed using bioinformatics and ANOVA. $p < 0.05$ was considered statistically significant

Hyperproliferation (acanthosis) of the epidermis was markedly high in AS–PsO, which had pronounced cytokeratin 17 (K17) and Blimp-1 protein expression. Blimp-1 protein was expressed in KCs from all epidermal layers of AS–PsO, but not in nAS–PsO (Fig. 3).

Table 3 Correlation between *PRDM1* gene expression and cytokine, transcription factor, and immune protein gene expression in patients with psoriasis using the GSE13355 data set

<i>PRDM1</i> gene expres- sion correlations	Spearman's <i>r</i>	Determination coefficient <i>R</i> ²	<i>p</i> value
<i>IL17A</i>	0.70	0.34	<0.0001
<i>IL1B</i>	0.67	0.38	<0.0001
<i>STAT3</i>	0.65	0.54	<0.0001
<i>S100A9</i>	0.63	0.44	<0.0001
<i>IL12B</i>	0.60	0.31	<0.0001
<i>IL6</i>	0.59	0.27	<0.0001
<i>TNF</i>	0.58	0.32	<0.0001
<i>IL22</i>	0.53	0.25	<0.0001
<i>LCN2</i>	0.50	0.37	<0.0001
<i>IL21</i>	0.47	0.18	<0.0001
<i>IL23A</i>	0.47	0.20	<0.0001
<i>IL27</i>	0.34	0.10	<0.0001
<i>IL23R</i>	0.32	0.08	<0.0001
<i>RORC</i>	–0.60	0.38	<0.0001
<i>TGFB1</i>	–0.28	0.08	<0.0001

PRDM1, positive regulatory domain 1; *IL*, interleukin; *STAT3*, signal transducer and activator of transcription 3; *S100A9*, S100 calcium-binding protein A9; *TNF*, tumour necrosis factor; *LCN2*, Lipocalin 2; *IL23R*, interleukin 23 receptor; *IL23R*, interleukin 23 receptor; *RORC*, retinoic acid receptor-related orphan receptor C; *TGFB1*, transforming growth factor-beta 1 genes. The direction and strength of the linear correlation between the studied variables were assessed using the Spearman correlation coefficient (*r*) and determination coefficient (*R*²). Statistical significance was set at $p < 0.05$. Data from GSE 13355, comprising genome-wide gene expression in skin biopsies from 58 patients with psoriasis and 64 healthy controls

Discussion

This study showed increased expression of *PRDM1* and *IL17* transcripts and marked Blimp-1 protein (encoded by *PRDM1* gene) expression in all epidermal layers of AS–PsO. Bioinformatic analysis (GSE13355 data set) showed a positive correlation between the expression of *PRDM1* and cytokine genes of the Th17 inflammatory program in AS–PsO, suggesting that the transcriptional factor Blimp-1 might be involved in PsO pathogenesis, particularly via the IL-23/Th17 axis.

Blimp-1 plays a role in multiple developmental checkpoints in non-lymphoid lineages, including KC maturation. There was a strong correlation between Blimp-1 expression and terminal differentiation of mouse and human KCs [31]. Blimp-1 is expressed by granular layer KCs and regulates the transition of KCs from the granular layer to the cornified layer of the epidermis. Conditional knockout (CKO) mice with *Prdm1* deletion exhibited defects in the terminal differentiation of sebocytes and KCs along with delayed formation of the epidermal permeability barrier, hyperkeratinisation, and abnormal desquamation [32]. Misregulated genes

and nAS-PsO was corroborated by bioinformatic analysis (GSE13355 data set). Furthermore, positive correlations between the gene expression of *PRDM1* and *STAT3*, *S100A9*, *LCN2*, and genes encoding cytokines of the Th17 program, including *IL1B*, *IL6*, *IL21*, *IL22*, and *IL27*, in addition to *TNF*, *IL12B*, *IL23A* and *IL17A* were evidenced. These findings are indicative of the involvement of Blimp-1 in PsO.

However, the bioinformatic analysis showed interesting findings, such as no difference in *IL23A*, *IL21*, and *IL27* gene expression in AS-PsO vs. nAS-PsO, and in *TFGB1* expression in AS-PsO vs. NSC; a decrease in *RORC* expression in AS-PsO, and a negative correlation between *PRDM1*, *TGFB1*, and *RORC* gene expression, respectively. Accordingly, the role of other cytokines and pathways in the Th17 program and their relationships with transcriptional factors, such as Blimp-1, require further exploration.

Multiple combinations of cytokines have been described in Th17 differentiation in humans, including IL-6, IL-1 β , IL-21, and the role of TGF- β , potentially in a dose-dependent manner, is an ongoing debate [21, 22, 42–45].

In PsO, IL-23 and IL-23R expression are critical for the stabilization and maintenance of the Th17 pathogenic functions, respectively [12, 16, 17]. Thus, mutual signals of ROR γ t and JAK/STAT3 pathways, induced by IL-6 or IL-21 together with low amounts of TGF- β , might promote IL-23R expression and confer IL-23 responsiveness, but high concentrations of TGF- β seem to inhibit the expression of IL-23R [21, 22, 43–45].

Moreover, IL-23 strongly increased Treg differentiation into IL-17A-producing cells, promoting high ROR- γ t expression levels and enhanced Foxp3 loss [46]. IL-6 also plays a pivotal role in driving whether the immune response is predominated by Th17 cells or Tregs [22]. TGF- β signalling can play a role in Th17 cell generation and function in the balance between the reciprocal conversion of Th17 and Treg cells. A combination of TGF- β and IL-6 or IL-21 induces surface ROR- γ t expression and Th17 differentiation [47, 48] and IL-23R expression [33, 49].

Blimp-1 expression is induced by IL-21, and a negative feedback loop occurs, wherein IL-21 inhibits its own production through the induction of Blimp-1 [37]. Meanwhile, IL-21 and IL-21R are highly expressed in the AS-PsO and peripheral blood [9]. IL-21 can induce Th17 cell differentiation by inhibiting Treg cell differentiation via upregulating ROR- γ t expression and downregulating Foxp3 expression. IL-21 may promote epidermal hyperplasia and inflammation by inducing an imbalance in Th17 and Treg cell populations [50].

Similarly, Th17 cells highly express IL-22 and KCs express IL-22R in the skin. IL-22 has a dual role in the immune response, and its signalling leads to the activation of proliferative and/or apoptotic programs [51]. IL-22 also induces the expression of acute inflammatory proteins,

mucins, and antimicrobial peptides, which are essential for maintaining tissue integrity during inflammation [51]. High IL-22 levels in psoriatic skin are strongly associated with upregulated cutaneous S100A9 and other immune proteins [52].

Blimp-1 and TGF- β may play a direct role in activating IL-10 transcription in human Th17 cells and potentially antagonising Th17 immunity via different pathways [53–55]. Blimp-1 is the key driver of IL-10 production in proinflammatory effector T cells downstream of IL-12 and IL-27. Conversely, TGF- β can antagonise this pathway and induce the switch to Blimp-1 independent of transcription factor c-Maf/Aryl hydrocarbon receptor-dependent IL-10 expression in Th17 [36, 56]. Furthermore, Blimp-1 expression is essential for Foxp3 + Treg cells to produce IL-10 [29, 57].

In this context, the positive correlations between the gene expression of *PRDM1* and genes encoding *IL27* and *IL10*, and the negative correlations with *TGFB1* gene, respectively, suggest the involvement of other complex pathways and pleiotropic cytokines in PsO inflammation, but these issues must be investigated in further studies.

Although primarily an anti-inflammatory cytokine, the overexpression of TGF β 1 in KCs induces skin inflammation. TGF β 1 overexpression in KCs induces skin inflammation in K5.TGF β 1^{wt} transgenic mice with striking similarities to human PsO. Therefore, the mechanism of action of TGF β 1 appears to be complex [58]. High serum levels of TGF β 1 have been correlated with the severity of PsO in humans [59]. However, results from studies investigating tissue levels of TGF- β 1 in human PsO are still inconclusive [59, 60].

TGF- β and IL-6 may antagonise Th17 immunity via IL-10 production through c-Maf induction [55]. In addition, low levels of IL-10 and/or polymorphisms of the IL-10 gene may play a key role in the immunopathology and PsO severity [61, 62].

This study had some limitations inherent to an observational analysis. Translational studies, mainly based on CKO animals, inflammatory disease models, immunoassays and mechanistic studies may help clarify and corroborate our findings.

We speculate that Blimp-1, in addition to being involved in keratinisation, can serve as an activating factor of Th17 cells in PsO. Blimp-1 may be an essential transcription factor downstream of IL-23, IL-12, IL-6, IL-21, and IL-27, which cooperate with STAT-3 to drive the Th17 inflammatory program in PsO. However, the detailed mechanisms underlying the interactions among Blimp-1, ROR- γ t, TGF- β , IL-10, IL-27, and other pathways in the Th17 inflammatory program require exploration.

In conclusion, our findings revealed that Blimp-1 expression in AS-PsO is associated with PsO pathogenesis. The correlation between gene expression of the *PRDM1* and genes encoding immune response proteins

24. Keller AD, Maniatis T (1991) Identification and characterization of a novel repressor of interferon gene expression. *Genes Dev* 5:868–879. <https://doi.org/10.1101/gad.5.5.868>
25. Turner CA, Mack DH, Davis MM (1994) Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 77:297–306. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90321-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90321-2)
26. John SA, Garrett-Sinha LA (2009) Blimp1: a conserved transcriptional repressor critical for differentiation of many tissues. *Exp Cell Res* 315:1077–1084. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.11.015>
27. Cimmino L, Martins GA, Liao J et al (2008) Blimp-1 attenuates Th1 differentiation by repression of ifng, tbx21, and bcl6 gene expression. *J Immunol* 181:2338–2347. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2338>
28. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D et al (2009) Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 325:1006–1010. <https://doi.org/10.1126/science.1175870>
29. Cretney E, Xin A, Shi W et al (2011) The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat Immunol* 12:304–312. <https://doi.org/10.1038/NI.2006>
30. Shah N, Guo Y, Wendelsdorf KV et al (2016) A crowdsourcing approach for reusing and meta-analyzing gene expression data. *Nat Biotechnol* 34:803–806. <https://doi.org/10.1038/nbt.3603>
31. Candi E, Schmidt R, Melino G (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:328–340. <https://doi.org/10.1038/nrm1619>
32. Magnusdottir E, Kalachikov S, Mizukoshi K et al (2007) Epidermal terminal differentiation depends on B lymphocyte-induced maturation protein-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14988–14993. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707323104>
33. Jain R, Chen Y, Kanno Y et al (2016) Interleukin-23-induced transcription factor Blimp-1 promotes pathogenicity of T helper 17 cells. *Immunity* 44:131–142. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.11.009>
34. Lin MH, Yeh LT, Chen SJ et al (2014) T cell-specific BLIMP-1 deficiency exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice by increasing Th1 and Th17 cells. *Clin Immunol* 151:101–113. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2014.02.006>
35. Lin M-H, Chou F-C, Yeh L-T et al (2013) B lymphocyte-induced maturation protein 1 (BLIMP-1) attenuates autoimmune diabetes in NOD mice by suppressing Th1 and Th17 cells. *Diabetologia* 56:136–146. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2722-y>
36. Salehi S, Bankoti R, Benevides L et al (2012) B lymphocyte-induced maturation protein-1 contributes to intestinal mucosa homeostasis by limiting the number of IL-17-producing CD4+ T Cells. *J Immunol* 189:5682–5693. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201966>
37. Fu SH, Yeh LT, Chu CC et al (2017) New insights into Blimp-1 in T lymphocytes: a divergent regulator of cell destiny and effector function. *J Biomed Sci* 24:49. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0354-8>
38. Martins GA, Cimmino L, Shapiro-Shelef M et al (2006) Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. *Nat Immunol* 7:457–465. <https://doi.org/10.1038/ni1320>
39. Chiang MF, Yang SY, Lin IY et al (2013) Inducible deletion of the Blimp-1 gene in adult epidermis causes granulocyte-dominated chronic skin inflammation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:6476–6481. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219462110>
40. de Sousa AR, Penalva LO, Marcotte EM, Vogel C (2009) Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst*. <https://doi.org/10.1039/b908315d>
41. Schwanhäusser B, Busse D, Li N et al (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473:337–342. <https://doi.org/10.1038/nature10098>
42. de Jong E, Suddason T, Lord GM (2010) Translational mini-review series on Th17 cells: development of mouse and human T helper 17 cells. *Clin Exp Immunol* 159:148. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2249.2009.04041.X>
43. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L et al (2006) The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126:1121–1133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>
44. Ivanov II, Zhou L, Littman DR (2007) Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Sem Immunol* 19:409–417. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.10.011>
45. Manel N, Unutmaz D, Littman DR (2008) The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR γ mat. *Nat Immunol* 9:641–649. <https://doi.org/10.1038/NI.1610>
46. Jorn Bovenschen H, van de Kerkhof PC, van Erp PE et al (2011) Foxp3+ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin. *J Invest Dermatol* 131:1853–1860. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.139>
47. Korn T, Bettelli E, Gao W et al (2007) IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448:484–487. <https://doi.org/10.1038/nature05970>
48. Nurieva R, Yang XO, Martinez G et al (2007) Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448:480–483. <https://doi.org/10.1038/nature05969>
49. Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, Bayry J (2012) Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol* 181:8–18. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.03.044>
50. Shi Y, Chen Z, Zhao Z et al (2019) IL-21 induces an imbalance of Th17/Treg cells in moderate-to-severe plaque psoriasis patients. *Front Immunol* 10:1865. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01865>
51. Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA (2009) Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol* 9:447–453. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.04.008>
52. Fritz Y, Klenotic PA, Swindell WR et al (2017) Induction of alternative proinflammatory cytokines accounts for sustained psoriasiform skin inflammation in IL-17C+IL-6KO mice. *J Invest Dermatol* 137:696–705. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.10.021>
53. Chang KK, Liu LB, Jin LP et al (2017) IL-27 triggers IL-10 production in Th17 cells via a c-Maf/ROR γ t/Blimp-1 signal to promote the progression of endometriosis. *Cell Death Dis* 8:e2666. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.95>
54. Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A et al (2007) Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* 8:1363–1371. <https://doi.org/10.1038/ni1537>
55. Xu J, Yang Y, Qiu G et al (2009) c-Maf regulates IL-10 expression during Th17 polarization. *J Immunol* 182:6226–6236. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0900123>
56. Neumann C, Heinrich F, Neumann K et al (2014) Role of Blimp-1 in programming Th effector cells into IL-10 producers. *J Exp Med* 211:1807–1819. <https://doi.org/10.1084/jem.20131548>
57. Cretney E, Leung PS, Trezise S et al (2018) Characterization of Blimp-1 function in effector regulatory T cells. *J Autoimmunity* 91:73–82. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.04.003>
58. Han G, Williams CA, Salter K et al (2010) A role for TGFB signaling in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 130:371–377. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.252>

59. Flisiak I, Chodynicka B, Porebski P, Flisiak R (2002) Association between psoriasis severity and transforming growth factor β 1 and β 2 in plasma and scales from psoriatic lesions. *Cytokine* 19:121–125. <https://doi.org/10.1006/cyto.2002.1953>
60. Zaher H, Shaker OG, El-Komy MHM et al (2009) Serum and tissue expression of transforming growth factor beta 1 in psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23:406–409. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2008.03064.x>
61. Dowlatshahi EA, van der Voort EAM, Arends LR, Nijsten T (2013) Markers of systemic inflammation in psoriasis: a systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol* 169:266–282. <https://doi.org/10.1111/bjd.12355>
62. Isac L, Jiquan S (2019) Interleukin 10 promotor gene polymorphism in the pathogenesis of psoriasis. *Acta Dermatovenereol Alp*

Pannonica Adriat 28:119–123. <https://doi.org/10.15570/actaapa.2019.29>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.