

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

**S100A9 induz a cronificação da inflamação psoriasiforme  
pelo aumento da imunidade do tipo 3 dependente de IL-23**

**BRUNO MARCEL SILVA DE MELO**

Ribeirão Preto  
2023

**BRUNO MARCEL SILVA DE MELO**

**S100A9 induz a cronificação da inflamação psoriasiforme  
pelo aumento da imunidade do tipo 3 dependente de IL-23**

(Versão Corrigida)

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Farias  
Alves Filho

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 seja citada a fonte.

### Ficha catalográfica

Silva de Melo, Bruno Marcel

S100A9 induz a cronificação da inflamação psoriasiforme pelo aumento da imunidade do tipo 3 dependente de IL-23, 2023.

150 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: José Carlos Farias Alves Filho

1. Pele 2. Inflamação 3. Queratinócitos 4. S100A9  
5. Eixo IL-23/IL-17 6. Cronificação

Nome: Bruno Marcel Silva de Melo

Título: S100A9 induz a cronificação da inflamação psoriasiforme pelo aumento da imunidade do tipo 3 dependente de IL-23

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

**Banca examinadora**

Prof. Dr. João Santana da Silva

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz Ribeirão Preto

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza

Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor, Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“ Desconfiai do mais trivial,  
na aparência singelo.  
E examinai, sobretudo, o que parece habitual.  
Suplicamos expressamente:  
não aceiteis o que é de hábito  
como coisa natural,  
pois em tempo de desordem sangrenta,  
de confusão organizada,  
de arbitrariedade consciente,  
de humanidade desumanizada,  
nada deve parecer natural  
nada deve parecer impossível de mudar.”

Bertolt Brecht

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à todos os jovens pobres do Brasil, em especial os jovens negros, que cotidianamente têm seus sonhos interrompidos pela falta de oportunidades decorrente da desigualdade social 'esmagadora' no nosso País.

Também dedico este trabalho à minha querida e amada avó, Maria Lêda da Silva Cordeiro, que foi quem me guiou durante toda a vida, me deu amor, carinho, educação e ensinou as maiores lições que carrego comigo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao(s) Deus(es), que me guiou durante toda a vida, em especial nos últimos anos, que foram os mais desafiadores.

Ao Prof. Dr. José Carlos por ter aceitado me orientar desde o Mestrado. Agradeço o fácil convívio, a oportunidade, confiança, paciência e amizade. Obrigado por contribuir com a minha formação como Cientista.

Aos Professores Dr. Fernando de Queiroz Cunha e Dr. Thiago Mattar Cunha por também contribuírem com a minha formação como Cientista, além de tornarem o ambiente do Laboratório de Inflamação e Dor (LID) mais agradável.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada pelas conversas nos corredores, durante algumas disciplinas e em muitos eventos, em especial à Prof. Dra. Vânia Bonato, Profa. Dra. Sandra Fukada, Prof. Dr. Ademilson Castelo e Profa. Dra. Alexandra de Medeiros.

Aos meus ex-orientadores da Graduação, em especial o Prof. Dr. Francisco Martins Teixeira, que foi quem me iniciou no mundo acadêmico, me oferecendo o primeiro estágio em seu laboratório de Pesquisa. Agradeço também à Prof. Dra. Marta Chagas Monteiro, pela orientação, enquanto estive em seu laboratório, por ter plantado em mim a semente de vir para Ribeirão Preto fazer Pós-Graduação em Imunologia, e sobretudo pela amizade.

Ao Prof. Dr. Bernhard Ryffel por ter me recebido da melhor forma em seu laboratório no CRNS, em Orleans, França, durante o meu primeiro estágio fora do Brasil em 2019. Além da excelente recepção, me acompanhou durante boa parte do Doutorado, mesmo que a distância, contribuindo também com a minha formação como Cientista.



Ao prof. Dr. Burkhard Becher por ter me recebido em seu laboratório na Universidade de Zurique, Zurique, Suíça, e dado todas as condições estruturais necessárias para a realização de parte deste projeto. Agradeço também aos alunos do seu laboratório, em especial à Pascale Zwicky, Florian Ingelfinger e Stefanie Schärli pela grande ajuda na realização e análise dos experimentos. Agradeço também pelo convívio agradável.

Ao prof. Ari Waisman, por ter cedido amostras de pele de modelos psoriasiformes transgênicos.

À Prof. Dra. Cacilda Souza pela colaboração com as amostras de pacientes e pelas discussões sempre muito enriquecedoras.

Ao prof. Dr. Helder Nakaya pela supervisão e contribuição com as análises de Bioinformática.

Ao Dr. Flávio Protásio Vêras por ter me direcionado, guiado e ensinado boa parte das coisas que sei hoje. Obrigado pela parceria e amizade dos últimos anos.

Ao Dr. Diógenes Lima (*In memoriam*) pela grande ajuda com as análises *in silico*, além das conversas filosóficas sobre a vida.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia em especial: Kátia Santos, Diva Souza, Ieda Santos, Marco Antonio, Sérgio Rosa, Giuliana Bertozi, Marcela Grando, Maria Inês, Orlando Júnior, Vânia Fernandez, Gislaine Marques, José Ramon, Eliana Beatriz, Eliane Maciel, Eleni Gomes e nosso eterno Tadeu (*In memoriam*).

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, em especial à Ana S. Cristine Ferreira, por ser sempre muito solícita. Obrigado

sobretudo pela amizade e pelos conselhos. Agradeço também à Denise Ferraz pela grande ajuda com a aquisição dos experimentos de citometria de fluxo. Agradeço ainda a todos os outros funcionários do departamento em especial: Adriana Sestari, Ana Paula, Dorlei dos Santos, Elza Aparecida, Wander da Silva, Zuleica Moraes, Rubilan, Rubilan Quionero, Adriana Sestari, Wendy Rios e Ana Flávia.

A todos os funcionários do Departamento de Biologia Celular, em especial: Roberta Rosales e Elizabethe, por estarem sempre dispostas a ajudar com os microscópios do laboratório multiusuário, desde o preparo, aquisição até as análises das imagens.

Aos responsáveis pela criação e gerenciamento dos biotérios de camundongos, em especial: Dener, Júlio e colaboradores.

A todos os colaboradores que contribuíram com o desenvolvimento deste projeto no Brasil: Flávio Protásio, Timna Varela, Douglas Prado, Paulo Melo, André Saraiva, Leonardo Lima, Thainá Norbiato, Gabriel Publio e Carlos Hiroki.

A todos os colegas e amigos que conheci no LID, em especial aqueles que tive a oportunidade de dar boas risadas e ao mesmo tempo discutir Ciência: Paulo Melo, Flávio Protásio, Rafaela Mano, Eduardo Damasceno, Carlos Hiroki, Juliana Toller, Timna Varela, Douglas Prado, Cássia Regina, André Saraiva, Miriam Fonseca, Alexandre Lopes, Claudinha, Maria Cláudia, Marcela Davoli, Kalil Alves, Guilherme Cebinelli, Fernanda Castanheira, Lívia Barroso, Taty Cecílio, Raphael Sanches, Vanessa Borges, Paula Viacava, João Paulo Mesquita, Camila Meirelles, Beatriz Adjafre, Atlante Mendes, Bruna Manuela,

Cleyson Oliveira, Juliana Silva, Marcos Rosa, Dani Nascimento, César Speck e Rafael Ferreira.

Aos amigos que tive a sorte de conhecer durante a Pós-Graduação em Ribeirão Preto: Luna Lacerda, Nicole Rodrigues, Alice Hartmann, Leonardo Lima Pedro Gobira, Bruna Bertol, Ana Salina, Mouzarlem Reis, Leonardo Araújo, Nathalia Lautherbach (bolo de pacote), Maykon Tavares, Lays Trajano, Paulo Henrique, Hellen Anastácia, Roberta Maraninche, Matheus Quintana, Camila Oliveira, Juliana Bezerra, Tamara Rodrigues, Diego Catité, Kelly Duarte e Vinícius Garcia.

À Sara Pereira, aluna de Doutorado do Prof. Burkhard Becher, por ter sido uma grande amiga durante meu estágio de Doutorado em Zurique.

Agradeço também aos meus amigos Josiane Paiva, Mateus Madruga e Antonella Paiva, que são Brasileiros que moram na Suíça, e me acolheram durante todo o período que estive lá.

Às minhas grandes amigas da época da Graduação em Farmácia, que me acompanham até hoje: Maryene Guia, Stefania de Medeiros, Shirlene Brandão e Kalene Oliveira.

Aos meus grandes amigos de Belém do Pará, que não importa o tempo e a distância, sempre estarão mandando boas energias e torcendo pela minha felicidade: Amanda Paiva, João Victor, Amanda Pimentel, Gustavo Queiroz, César lobo, Letícia Silva e Tayná Ferreira.

À ex-presidenta Dilma Roussef e ao atual Presidente do Brasil, Luiz Inácio Lula da Silva por começarem um projeto político que diminuiu a desigualdade social no país e assim garantiram o acesso de muitos jovens à Universidade, através de programas como o Reuni, ProUni e políticas afirmativas

como a Lei de Cotas Sociais e Raciais. Agradeço também a todos que por ventura não consegui lembrar/mencionar, e que contribuíram para a realização deste trabalho.

### **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A minha família, em especial minha avó, Maria Leda, mãe, Claudete Pereira, irmãs, Amanda Camilly e Jéssica Gomes, tios, Mara Leda, Marcia Maria, Edivaldo Lobo, Mauro José e Márcio Cordeiro, primos, Itallo Ramos, Gustavo Santos, Ryquelme e Gabriel, por todo o amor, ensinamentos, momentos de felicidade e dificuldade, que em síntese me tornaram o ser humano que sou hoje. Obrigado por me apoiarem incondicionalmente, torcerem e vibrarem a cada realização pessoal e profissional.

Ao meu namorado Gabriel Giglio por ter sido meu companheiro e melhor amigo ao longo do último ano. Obrigado por abraçar e apoiar meus planos e sonhos.

Fontes financiadoras: FAPESP (processo nº 2018/19312-6 e processo nº 2020/13349-5), CNPq, CAPES, FAEPA e Pró-Reitoria de Pós-Graduação, pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro que contribuíram diretamente para o desenvolvimento deste trabalho, bem como para a participação em eventos científicos, que foram de grande importância para minha formação acadêmica, científica e profissional.

**Título: S100A9 induz a cronificação da inflamação psoriasiforme pelo aumento da imunidade do tipo 3 dependente de IL-23****RESUMO**

A psoríase (Ps) é a doença inflamatória crônica da pele mais prevalente, afetando aproximadamente 2-3% da população mundial. A etiologia da psoríase envolve tanto suscetibilidade genética quanto fatores ambientais. A doença é caracterizada pelo aumento da espessura da epiderme devido à ativação e proliferação acentuada de queratinócitos. O 'crosstalk' desregulado entre fatores liberados pelos queratinócitos e células imunes na pele é considerado o gatilho inicial do circuito IL-23/IL-17 que medeia a inflamação cutânea na psoríase. No entanto, os exatos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento e cronificação da doença ainda permanecem pouco compreendidos. Desta maneira, nosso estudo teve como objetivo inicial identificar novos alvos com potencial impacto na patogênese da psoríase. Para isto, reanalisamos diferentes bancos de dados públicos de pacientes com psoríase e através de análises *in silico* conseguimos identificar o perfil transcricional da pele destes pacientes. Identificamos a via de peptídeos antimicrobianos predominantemente aumentada, sendo enriquecida por diversos genes, com destaque para os genes da família S100A, incluindo S100A7, S100A8, S100A9 e S100A12. Entre todos os alvos identificados da família S100A, S100A9 tem sido um dos mais correlacionados com a atividade da doença em pacientes com psoríase, no entanto, seu exato mecanismo na doença ainda permanece pouco compreendido. Neste sentido, nosso estudo teve como principal objetivo investigar a função e mecanismos pelo qual S100A9 modula a resposta inflamatória cutânea na psoríase. A partir de amostras de pele e sangue de pacientes com psoríase, notamos um aumento da expressão de S100A9 na lesão cutânea e no plasma destes pacientes, comparando com pele e sangue controles saudáveis. O aumento da expressão gênica e proteica de S100A9 também foi observado na pele murina em modelo psoriasiforme induzido por IMQ. Funcionalmente, demonstramos que a ausência genética ou bloqueio farmacológico de S100A9 atenua a resposta inflamatória cutânea em modelo psoriasiforme induzido por IMQ. Complementar a estes dados, a injeção intradérmica de S100A9 induz um ativo processo inflamatório na pele, com semelhanças, pelo menos em parte, às observadas na psoríase. Através de análises de scRNAseq, identificamos os queratinócitos interfoliculares sendo a principal fonte de S100A9 na pele lesionada de pacientes com psoríase. Suportando estes achados, através de ensaios de transferência de medula óssea, demonstramos que S100A9 derivada de células não hematopoiéticas medeia a resposta inflamatória no modelo psoriasiforme induzido por IMQ. Através de citometria de fluxo espectral de alto parâmetro demonstramos que S100A9 exacerba a resposta inflamatória cutânea através do aumento da imunidade do tipo 3. Além disso, S100A9 induz a produção de IL-23, ativação e reprogramação metabólica de células dendríticas via TLR4 *in vitro*. Adicionalmente, identificamos que os efeitos psoriasiformes mediados por S100A9 dependem de IL-23 em diferentes modelos experimentais de psoríase. Tomado em conjunto, demonstramos que S100A9 exacerba a inflamação psoriasiforme através da indução da imunidade do tipo 3 dependente de IL-23. Ademais, demonstramos que o eixo inflamatório cutâneo IL-23/IL-17 induz a expressão de S100A9 em queratinócitos na psoríase. Conjuntamente, nossos dados revelam um circuito autorregulador entre S100A9 e IL-23/Imunidade do tipo 3, essencial para a cronificação da inflamação psoriasiforme.

**Palavras-chave:** Pele, inflamação, queratinócitos, S100A9, eixo IL-23/IL-17, cronificação.

**Title: S100A9 drives the chronification of psoriasiform inflammation by inducing IL-23-dependent type 3 immunity****ABSTRACT**

Psoriasis (Ps) is the most prevalent chronic inflammatory skin disease, affecting approximately 2-3% of the world's population. The etiology of psoriasis involves both genetic susceptibility and environmental factors. The disease is characterized by increased thickness of the epidermis due to marked activation and proliferation of keratinocytes. Dysregulated crosstalk between factors released by keratinocytes and immune cells in the skin is thought to be the initial trigger of the IL-23/IL-17 circuit that mediates cutaneous inflammation in psoriasis. However, the exact mechanisms responsible for the development and chronicity of the disease remain poorly understood. Thus, our study initially aimed to identify new targets with potential impact on the pathogenesis of psoriasis. For this, we reanalyzed different public databases of patients with psoriasis and through *in silico* analyzes we were able to identify the transcriptional profile of the skin of these patients. We identified the dominantly enhanced antimicrobial peptide pathway, which is enriched by several genes, with emphasis on the genes of the S100A family, including S100A7, S100A8, S100A9 and S100A12. Among all identified targets of the S100A family, S100A9 has been one of the most correlated with disease activity in patients with psoriasis, however, its exact mechanism in the disease remains poorly understood. In this sense, our study aimed to investigate the function and mechanisms by which S100A9 modulates the cutaneous inflammatory response in psoriasis. From skin and blood samples from patients with psoriasis, we noticed an increase in the expression of S100A9 in the skin lesion and in the plasma of these patients, compared to healthy control skin and blood. Increased S100A9 gene and protein expression was also observed in murine skin in an IMQ-induced psoriasiform model. Functionally, we demonstrate that genetic absence or pharmacological blockade of S100A9 attenuates the cutaneous inflammatory response in an IMQ-induced psoriasiform model. Complementing these data, the intradermal injection of S100A9 induces an active inflammatory process in the skin, with similarities, at least in part, to those observed in psoriasis. Through scRNAseq analyses, we identified interfollicular keratinocytes as the main source of S100A9 in the injured skin of patients with psoriasis. Supporting these findings, through bone marrow transfer assays, we demonstrate that non-hematopoietic cell-derived S100A9 mediates the inflammatory response in the IMQ-induced psoriasiform model. Through high-parameter spectral flow cytometry we demonstrated that S100A9 exacerbates the cutaneous inflammatory response by enhancing type 3 immunity. Furthermore, S100A9 induces IL-23 production, activation and metabolic reprogramming of dendritic cells via TLR4 *in vitro*. Additionally, we identified that S100A9-mediated psoriasiform effects depend on IL-23 in different experimental models of psoriasis. Taken together, we demonstrate that S100A9 exacerbates psoriasiform inflammation through induction of IL-23-dependent type 3 immunity. Furthermore, we demonstrate that the cutaneous inflammatory axis IL-23/IL-17 induces S100A9 expression in keratinocytes in psoriasis. Taken together, our data reveal an autoregulatory circuit between S100A9 and IL-23/type 3 immunity, essential for the chronification of psoriasiform inflammation.

Keywords: Skin, inflammation, keratinocytes, S100A9, IL-23/IL-17 axis, chronification.

**SUMÁRIO**

<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>VI</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XVII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>XX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1. A anatomia imunológica da pele.....	24
1.2. Aspectos gerais e distribuição global da Psoríase.....	25
1.3. Psoríase, uma doença além do que se vê.....	29
1.4. Etiologia da Psoríase.....	31
1.5. Patogênese da Psoríase.....	32
1.6. Psoríase e Imunidade do tipo 3.....	34
1.7. Proteínas S100: estrutura, função e inflamação.....	37
1.8. Aspectos gerais e papel inflamatório da proteína S100A9.....	39
<b>2. HIPÓTESE.....</b>	<b>43</b>
2.1. Hipótese.....	44
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
3.1. Objetivo geral.....	46
3.2. Objetivos específicos.....	46
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
4.1. Pacientes.....	48
4.2. Animais.....	48
4.3. Modelos psoriasiformes.....	49

4.4. Tratamento farmacológico com paquinimode.....	50
4.5. Geração de camundongos quiméricos.....	50
4.6. Análises <i>in silico</i> .....	51
4.7. Processamento de tecidos para citometria de fluxo.....	52
4.8. Citometria de fluxo.....	52
4.9. Extração de RNA e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)....	53
4.10. Western blot.....	54
4.11. Microscopia intravital.....	55
4.12. Histologia.....	55
4.13. Geração de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs).....	56
4.14. ELISA.....	57
4.15 Quantificação de lactato.....	57
4.16. Ensaio de Seahorse.....	57
4.17. Teste de estresse mitocondrial.....	57
4.18. Cultura de queratinócitos (células HaCaT) <i>in vitro</i> .....	58
4.19. Análises de citometria de fluxo de alta dimensão.....	58
4.20. Quantificação e análise estatística.....	58
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>60</b>
5.1. A via de peptídeos antimicrobianos representa a assinatura gênica dominante na pele de pacientes com psoríase.....	61
5.2. Genes da família S100A estão entre os principais regulados positivamente na pele de pacientes com psoríase .....	62
5.3. A expressão de S100A9 é induzida na lesão cutânea e no plasma de pacientes com psoríase vulgar.....	65



5.4. A expressão de S100A9 é induzida e assim exacerba a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme .....	65
5.5. S100A9 <i>per se</i> induz inflamação psoriasiforme.....	69
5.6. Queratinócitos são a principal fonte de S100A9 na psoríase .....	75
5.7. S100A9 induz a cronificação da inflamação psoriasiforme através do aumento cutâneo da imunidade do tipo 3.....	79
5.8. S100A9 induz produção de IL-23, ativação e reprogramação metabólica de células dendríticas via TLR4 <i>in vitro</i> .....	83
5.9. S100A9 induz inflamação psoriasiforme dependente de IL-23.....	91
5.10 O eixo cutâneo IL-23/IL-17 induz a expressão de S100A9 na psoríase.....	94
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>99</b>
6.1. Discussão.....	100
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>105</b>
7.1. Conclusão.....	106
<b>8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>107</b>
8.1. Referências bibliográficas.....	108
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>119</b>
9.1. Anexo 1: Prêmios recebidos durante o Doutorado.....	120
9.2. Anexo 2: Artigos publicados/em revisão durante o doutorado.....	121
9.3. Anexo 3: Aprovação da CEUA.....	122
9.4. Anexo 4: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) HCFMRP/USP.....	123

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Estrutura e composição imunológica cutânea.....	25
<b>Figura 2:</b> Apresentações clínicas e subtipos da psoríase.....	27
<b>Figura 3:</b> Prevalência global da psoríase.....	28
<b>Figura 4:</b> Visão global das condições associadas à Psoríase.....	30
<b>Figura 5:</b> Mecanismo simplificado da imunopatogênese da psoríase.....	34
<b>Figura 6:</b> Modelo orbital representando os diferentes tipos de imunidade.....	36
<b>Figura 7:</b> Estrutura das proteínas S100.....	38
<b>Figura 8:</b> Estrutura das proteínas S100A8 e S100A9.....	40
<b>Figura 9:</b> A via de peptídeos antimicrobianos é predominantemente up regulada na pele de pacientes com psoríase.....	62
<b>Figura 10:</b> <i>S100A7</i> , <i>S100A8</i> , <i>S100A9</i> e <i>S100A12</i> estão entre os principais genes diferencialmente expressos na pele de pacientes com psoríase vulgar.....	63
<b>Figura 11:</b> A expressão de S100A9 é induzida na lesão cutânea e no plasma de pacientes com psoríase vulgar.....	65
<b>Figura 12:</b> A expressão de S100A9 é induzida na pele em modelo psoriasiforme.....	67
<b>Figura 13:</b> S100A9 exacerba a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme..	68
<b>Figura 14:</b> S100A9 induz o acúmulo massivo de células Lysm <sup>+</sup> na pele agudamente.....	69
<b>Figura 15:</b> A injeção intradermal de S100A9 induz inflamação na pele semelhante à psoríase.....	70
<b>Figura 16:</b> A injeção intradermal de S100A9 induz o aumento cutâneo de linfócitos T CD4, T CD8, NK e monócitos.....	71

<b>Figura 17:</b> A injeção intradérmica de S100A9 induz o acúmulo de ILCs e células dendríticas nos linfonodos drenantes da pele.....	73
<b>Figura 18:</b> Estratégia de gate para as análises no UMAP e citometria de fluxo..	74
<b>Figura 19:</b> Queratinócitos são a principal fonte de S100A9 na pele lesionada de pacientes com psoríase.....	76
<b>Figura 20:</b> S100A9 derivado de células não hematopoiéticas agrava a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme.....	77
<b>Figura 21:</b> Células GFP transplantadas repopulam diferentes compartimentos em camundongos WT irradiados.....	78
<b>Figura 22:</b> S100A9 sustenta o acúmulo de linfócitos T V $\gamma$ 4, monócitos e mastócitos na pele em modelo psoriasiforme.....	80
<b>Figura 23:</b> S100A9 induz o acúmulo de linfócitos T V $\gamma$ 4 nos linfonodos drenantes da pele em modelo psoriasiforme.....	81
<b>Figura 24:</b> S100A9 sustenta a produção de IL-17a em linfócitos T $\gamma\delta$ nos linfonodos drenantes da pele em modelo psoriasiforme induzido por IMQ.....	83
<b>Figura 25:</b> S100A9 induz a expressão de IL-23 e ativação de células dendríticas <i>in vitro</i> .....	85
<b>Figura 26:</b> MEG-14 neutraliza o efeito de S100A9 em células dendríticas <i>in vitro</i> .....	86
<b>Figura 27:</b> S100A9 induz aumento da glicólise aeróbica em células dendríticas <i>in vitro</i> .....	88
<b>Figura 28:</b> S100A9 induz redução do consumo de oxigênio e disfunção mitocondrial em células dendríticas <i>in vitro</i> .....	89
<b>Figura 29:</b> S100A9 induz ativação de células dendríticas via TLR4 <i>in vitro</i> .....	91

<b>Figura 30:</b> A inflamação psoriasiforme induzida por S100A9 depende de IL-23.....	93
<b>Figura 31:</b> IL-17A induz expressão de S100A9 em queratinócitos humanos imortalizados.....	94
<b>Figura 32:</b> A produção cutânea de IL-17a induz a expressão de S100A9 em modelo psoriasiforme.....	95
<b>Figura 33:</b> O eixo IL-23/IL-17 induz a expressão de S100A9 na psoríase.....	96
<b>Figura 34:</b> S100A9 medeia a cronificação da inflamação psoriasiforme através do aumento de IL-23/imunidade do tipo 3.....	98

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

APC - Célula apresentadora de antígeno

BMDCS - Células Dendríticas derivadas de células da medula óssea

BSA - Área de superfície corporal

DC - Células dendrítica

DNASE - Desoxirribonuclease

ECAR - Taxa de Acidificação Extracelular

ECS - Células endoteliais

FCS - Soro Fetal Bovino

GM-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

HACAT - Queratinócitos humanos imortalizados

HE - Hematoxilina e eosina

HLA - Antígeno leucocitário humano

IL - Interleucina

ILC - Células Linfóides Inatas

IMQ - Imiquimode

KRT14 - Queratina 14

KRT17 - Queratina 17

LC - Células de langerhans

MEC - Matriz extracelular

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

OCR - Taxa de Consumo de oxigênio

PAQ - Paquinimode

PASI - Índice da área e severidade da psoríase

PFA - Paraformaldeído

PRRs - Receptores de reconhecimento de padrão

scRNA-Seq - Sequenciamento de célula única

TLR - Receptor do tipo toll

UTK - Ustequinumabe

VSMCS - Células do músculo liso vascular

# ***Introdução***

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A anatomia imunológica da pele

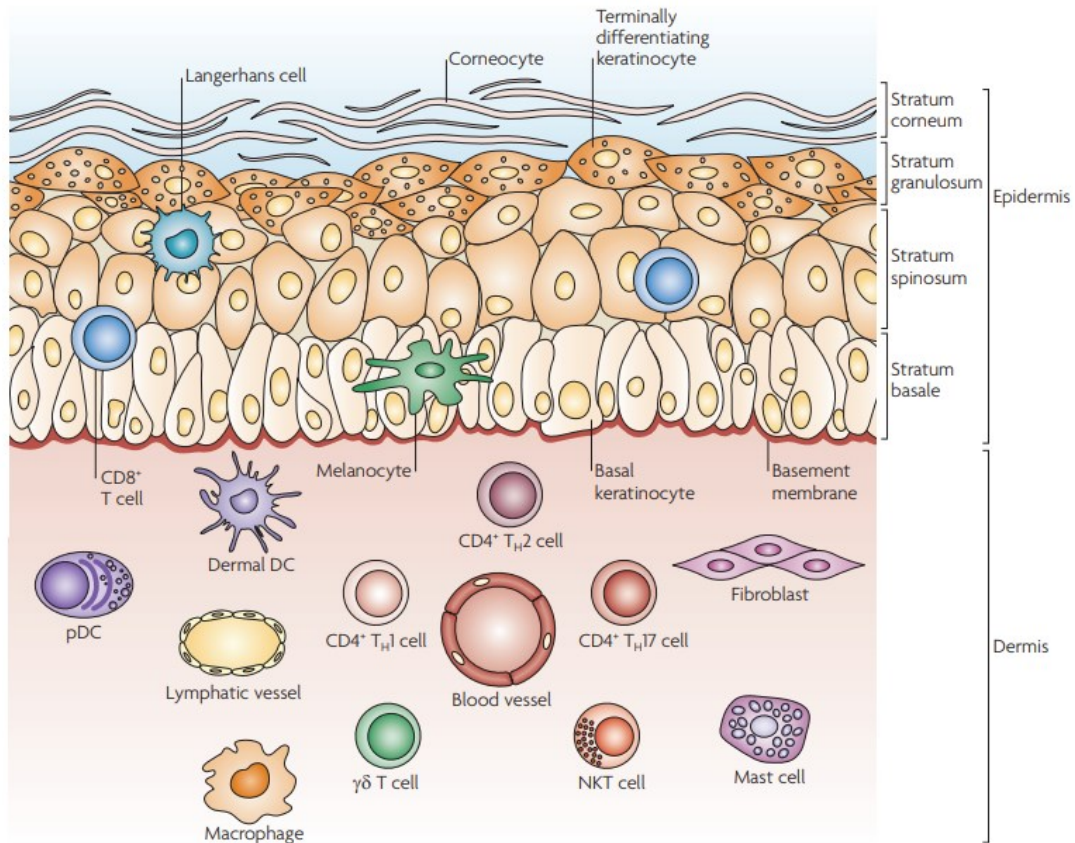
A pele é o maior órgão do corpo humano e a principal barreira física entre o corpo e meio ambiente. O tecido cutâneo é um dos principais componentes da imunidade inata, sendo a primeira linha de defesa contra patógenos, lesões físicas e químicas (NESTLE et al., 2009). A pele pode ser estruturalmente dividida em diferentes camadas, também conhecidas como epiderme, derme e hipoderme (KABASHIMA et al., 2018). A estrutura da pele reflete a complexidade de suas funções como barreira protetora, tendo uma composição robusta de células do sistema imune, que estão organizadas de forma estratégica ao longo do tecido cutâneo (KABASHIMA et al., 2018).

A camada mais externa ou superficial da pele, conhecida como epiderme, é formada por células epiteliais estratificadas que estão conectadas diretamente com a derme. Aproximadamente 90% da epiderme é constituída de queratinócitos que são as células responsáveis pela formação do epitélio estratificado pavimentoso (KABASHIMA et al., 2018). Nesta camada, incluem o estrato basal, o estrato espinhoso, o estrato granuloso e a camada mais externa, o estrato córneo, que é responsável pela função de barreira vital da pele. Além dos queratinócitos, a epiderme é constituída de células do sistema imune, como as células de Langerhans (LCs), que são um subconjunto exclusivo de células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs), e residem entre os queratinócitos. Além das LCs, dois subconjuntos de linfócitos T podem ser encontrados na epiderme: os linfócitos T  $\gamma\delta$  do subtipo V $\gamma$ 5 e linfócitos T CD8 residentes de memória (KABASHIMA et al., 2018; NESTLE et al., 2009) (**Figura 1**).



A epiderme e a derme estão fixadas em uma camada composta por tecido adiposo, conhecida como hipoderme. Na derme, existe uma diversidade grande de células, como os fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imune, incluindo as células dendríticas (DCs) dermais, DCs plasmocitóides, macrófagos, mastócitos, linfócitos T  $\gamma\delta$  do subtipo V $\gamma$ 4 e V $\gamma$ 6 e células linfóides inatas (ILCs) (KABASHIMA et al., 2018; NESTLE et al., 2009). Em condições homeostáticas, quantidades reduzidas de neutrófilos, monócitos e linfócitos T TCR $\alpha\beta$  circulam pela derme, no entanto em resposta a estímulos inflamatórios, células imunes se acumulam rapidamente nesta camada. Anatomicamente, a derme é caracterizada por abundante matriz extracelular (MEC), composta por fibras de colágeno e elastina que preenchem os espaços extracelulares. A MEC fornece um arcabouço estrutural favorável à migração de células do sistema imune. Os vasos sanguíneos e linfáticos são distribuídos estrategicamente ao longo da MEC (KABASHIMA et al., 2018; NESTLE et al., 2009).

As células do sistema imune desempenham um papel importante na homeostasia cutânea, através do controle de infecções e no controle da resposta inflamatória. No entanto, a inflamação persistente da pele pode culminar na ativação desordenada do epitélio, podendo ser o gatilho para o surgimento de doenças inflamatórias, a exemplo da psoríase (HARRISON et al., 2019; KABASHIMA et al., 2018).



**Figura 1: Estrutura e composição imunológica cutânea.** A estrutura da pele reflete a complexidade de suas funções como barreira protetora, na manutenção da temperatura corporal, na coleta de informações sensoriais do ambiente e tendo um papel ativo do sistema imunológico. A epiderme contém o estrato basal, o estrato espinhoso, o estrato granuloso e a camada mais externa, o estrato córneo, que é responsável pela função de barreira vital da pele. Células especializadas na epiderme incluem melanócitos, que produzem pigmento (melanina), e células de Langerhans. Raros linfócitos T, principalmente linfócitos TCD8 citotóxicos podem ser encontrados no estrato basal e no estrato espinhoso. A derme é composta por colágeno, tecido elástico e fibras reticulares. Ela contém muitas células especializadas, como subconjuntos de células dendríticas (DC), incluindo DCs demais e DCs plasmocitoides (pDCs) e subconjuntos de linfócitos T, incluindo T CD4, dos tipos TH1, TH2 e TH17, além de linfócitos T  $\gamma\delta$  e linfócitos T natural killers (NKT). Além disso, macrófagos, mastócitos e fibroblastos estão presentes. Vasos sanguíneos e linfáticos também estão presentes em toda a derme. Adaptado de *O. Nestle, et al.* 2009.

## 1.2. Aspectos gerais e distribuição global da Psoríase

A psoríase é uma doença crônica, imunomediada, não transmissível, desfigurante e incapacitante, para a qual não há cura, e com grande impacto negativo sobre a qualidade de vida dos pacientes (MROWIETZ; STEINZ; GERDES, 2014). A psoríase afeta aproximadamente 2-3% da população em todo o mundo. A doença é caracterizada pelo aumento da espessura cutânea

decorrente da ativação acentuada de queratinócitos e células do sistema imune que infiltram a derme e epiderme (FRANK NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009; GREB et al., 2016; GRIFFITHS et al., 2021a). Além da pele, a psoríase também pode afetar unhas e articulações (GRIFFITHS et al., 2021a; MEASE, 2017; OLIVIERI et al., 2014), sendo a artrite psoriásica uma das mais frequentes comorbidades associadas a doença, chegando a afetar 1% da população mundial (ZACHARIAE et al., 2002).

A psoríase possui diferentes formas de manifestações clínicas, incluindo a psoríase em placas ou psoríase vulgar, psoríase gutata, psoríase inversa, psoríase pustulosa generalizada, psoríase pustulosa palmoplantar e psoríase eirtodérmica (GRIFFITHS et al., 2021a) (**Figura 2**). A psoríase vulgar é a forma mais prevalente da doença e mais de uma destas manifestações clínicas podem ocorrer no mesmo indivíduo (GRIFFITHS et al., 2021a). Sinais e sintomas compartilhados pelos diferentes fenótipos podem incluir pápulas, placas vermelhas, descamação, coceira, queimação e dor. A extensão do acometimento da pele é variável e a maioria dos tipos de psoríase tem uma evolução cíclica, estando ativa por algumas semanas ou meses, e depois diminuindo por algum tempo ou até mesmo entrando em remissão por um período (FRANK NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009, [s.d.]; GREB et al., 2016; GRIFFITHS et al., 2021a).

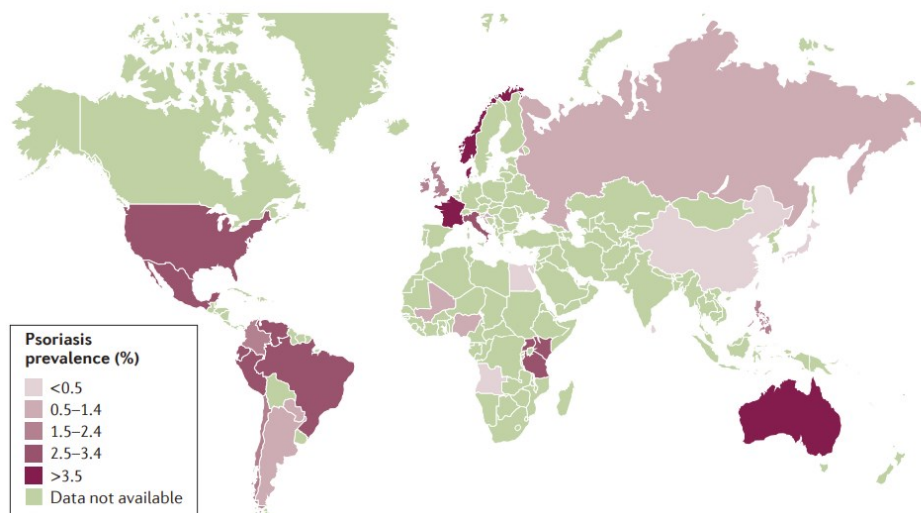


**Figura 2: Apresentações clínicas e subtipos de psoríase.** (A) Psoríase em placas rosas são observadas na pele branca. (B) Na pele negra, as placas são aczentadas. (C) A simetria das placas é característica. (D) Psoríase gutata. (E) Psoríase eritrodérmica. (F) Psoríase pustulosa generalizada. (G) Psoríase pustulosa palmoplantar. (H) Psoríase inversa com ausência de escamas. (I) Depressões nas unhas e onicólise. (J) Artrite psoriática com dactilite e alterações ungueais. Adaptado de Griffiths *et al*, 2021.

A psoríase afeta mais de 125 milhões de adultos e crianças em todo o mundo (GREB *et al.*, 2016). A doença afeta igualmente homens e mulheres, com idade média de início aos 33 anos (PARISI *et al.*, 2013). A idade de início pode

ser afetada por fatores genéticos e ambientais (GRIFFITHS et al., 2021a). Apesar de poder se manifestar em qualquer idade, estão documentadas duas fases etárias do aparecimento da doença, reforçando o que é conhecido como distribuição bimodal. A primeira fase dá-se em torno de 18-39 e a segunda fase em torno de 50-69 anos (GREB et al., 2016; GRIFFITHS et al., 2021b; PARISI et al., 2013).

A prevalência da psoríase é conhecida em apenas 19% dos países em todo o mundo e está distribuída de forma desigual entre regiões geográficas, ocorrendo mais comumente em indivíduos brancos (**Figura 3**). A prevalência geral da doença varia de 0,1% no leste da Ásia para 1,5% na Europa Ocidental, e é mais alto nos países de alta renda. A prevalência e a incidência são menor em crianças do que em adultos (PARISI et al., 2013; TOLLEFSON et al., 2010). No Brasil, a psoríase afeta em torno de 3 milhões de pessoas, com prevalência duas vezes maior em indivíduos da região Sul comparado à região Norte do país (DI MEGLIO; NESTLE, 2017; ROMITI et al., 2017).



**Figura 3: Prevalência global da psoríase.** Uma revisão sistemática de estudos internacionais de base populacional demonstrou uma prevalência global de psoríase em adultos variando de 2,7% nos Estados Unidos a 8,5% na Noruega. As taxas de prevalência mais baixas foram observadas em índios latino-americanos, nativos americanos e em países africanos e asiáticos, enquanto as taxas mais altas foram relatadas na Europa. Mesmo na Ásia, a prevalência variou de 0,3% em Hong Kong, Sendai (Japão) e cinco grandes cidades da China continental a 2,4% nas Filipinas. Adaptado de Greb *et al*, 2016.

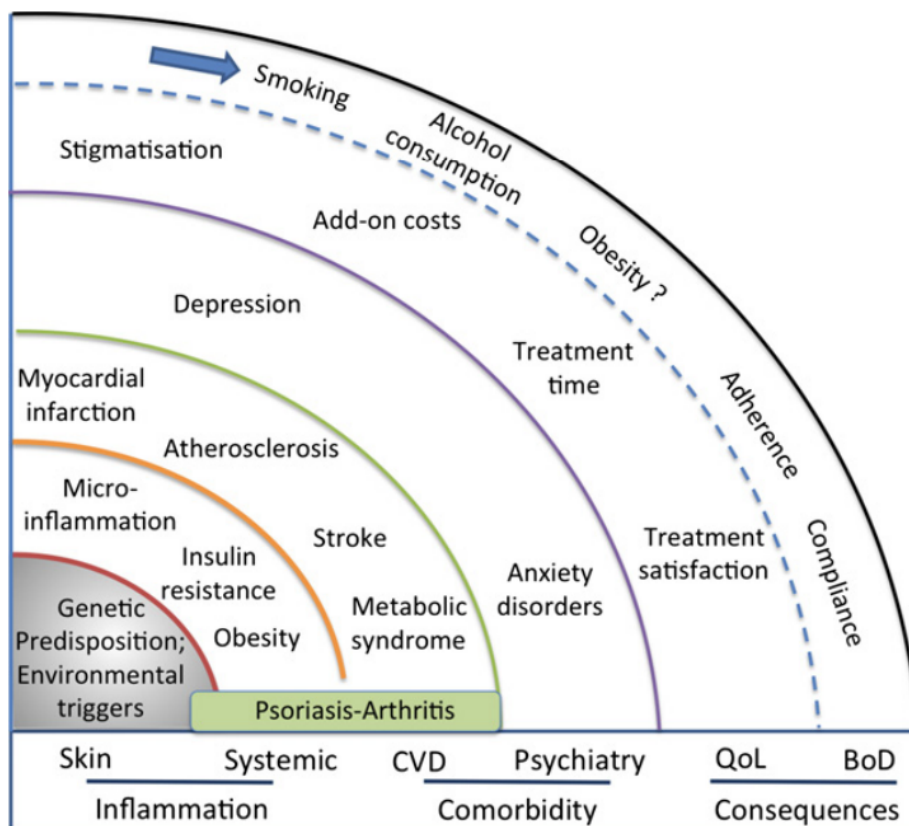
### **1.3. Psoríase, uma doença além do que se vê**

A psoríase vem sendo comumente associada à outras doenças não dermatológicas, conhecidas como comorbidades, e desta maneira a doença atualmente é considerada uma patologia inflamatória sistêmica (GERDES; MROWIETZ, 2012; MALLBRIS et al., 2004). Uma das comorbidades mais importantes relacionadas à psoríase é a obesidade (ARMSTRONG; HASKAMP; ARMSTRONG, 2012; PALLER et al., 2013). A síndrome metabólica foi identificada como uma das condições associadas mais importantes por conta de um desenvolvimetro subsequente ou paralelo de aterosclerose, que é um fator de risco para complicações como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (AVC) (ARMSTRONG; HASKAMP; ARMSTRONG, 2013; MROWIETZ; ELDER; BARKER, 2006). Já foi demonstrado que pacientes com psoríase têm uma expectativa de vida reduzida de até 5 anos, devido às complicações cardiovasculares (ARMSTRONG; HASKAMP; ARMSTRONG, 2013).

A psoríase causa um grande ônus físico, emocional e social (ARMSTRONG; HASKAMP; ARMSTRONG, 2013; GERDES; MROWIETZ, 2012; MALLBRIS et al., 2004; MROWIETZ; ELDER; BARKER, 2006). Em geral, a qualidade de vida dos pacientes é significativamente comprometida (ABUABARA et al., 2010; ARMSTRONG; HASKAMP; ARMSTRONG, 2012; KURD et al., 2010; PALLER et al., 2013). Desfiguração, incapacidade e perda acentuada da produtividade são desafios comuns para as pessoas com psoríase. Nesta direção, já foi comprovado que a depressão e transtornos de ansiedade também estão associados à doença (KIMBALL et al., 2012; KURD et al., 2010).

A comorbidade mais prevalente associada à psoríase é a artrite psoriásica, que pode causar danos nas articulações destes pacientes (GRIFFITHS et al., 2021a; MROWIETZ; STEINZ; GERDES, 2014). Na maioria dos pacientes com psoríase que também desenvolvem Artrite psoriásica, o início da artrite ocorre aproximadamente 10 anos após o início de sua doença de pele. No entanto, 15% dos pacientes podem desenvolver artrite antes do aparecimento das manifestações cutâneas da psoríase. Não há correlação direta entre a gravidade das manifestações articulares e cutâneas (ELKAYAM et al., 2000; GLADMAN et al., 2005; RAHMAN, 2011).

A **Figura 4** tenta ilustrar a complexidade da psoríase, ilustrando desde os fatores que podem desencadear, até as principais consequências e desafios de viver com a doença.



**Figura 4. Visão global das condições associadas à Psoríase.** As esferas da doença da psoríase. CVD, doença cardiovascular; QoL, qualidade de vida; BoD, carga de doença. Adaptado de Mrowietz et al. 2014.

#### 1.4. Etiologia da Psoríase

A etiologia da psoríase é complexa e envolve fatores genéticos e ambientais (GRIFFITHS et al., 2021a). Esta correlação entre fatores genéticos e psoríase foi inicialmente identificada através de estudos epidemiológicos envolvendo gêmeos e famílias. A herdabilidade é o principal fator de risco para o desenvolvimento da psoríase, sendo o risco duas a três vezes maior em gêmeos monozigóticos em comparação com gêmeos dizigóticos (SUN et al., 2010; TSOI et al., 2017; ZHANG et al., 2014). Estudos de associação do genoma têm sido úteis na identificação de loci de suscetibilidades de alto risco para o desenvolvimento da psoríase, com mais de 80 loci explicando cerca de 30% da herdabilidade da doença. O perfil genético da psoríase é dominado pela variação no locus de suscetibilidade à psoríase 1 (HLA-C; anteriormente conhecido como PSORS1), que compreende genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), que codificam os antígenos leucocitários humanos (HLAs). A presença de alguns padrões genéticos, em especial o *HLA-C\*06:02* é considerado atualmente o principal fator de risco genético para o desenvolvimento da psoríase (NAIR et al., 2006; OKADA et al., 2014; ZHANG et al., 2014). A herança de pelo menos um alelo aumenta o risco de psoríase em quatro a cinco vezes (SUN et al., 2010; TSOI et al., 2017; ZHANG et al., 2014). A presença de outros padrões genéticos como o HLA-B13, HLA-B17, HLA-B37, HLA-Bw16, HLA-Bw57 e HLA-DR7 também aumenta o risco de desenvolvimento da psoríase (OKADA et al., 2014). Além do MHC, outros 17 loci de suscetibilidade foram identificados e incluem mutações em regiões de suscetibilidade à psoríase 2 (PSORS2) na região 17q24-q25, abrangendo o gene que codifica a proteína 14 contendo o domínio de recrutamento de caspase



(*CARD14*), PSORS4 no complexo de diferenciação da epiderme, PSORS7 no cromossomo 1p, abrangendo o locus do receptor de IL-23 (*IL23R*) e PSORS6 no cromossomo 19p13 abrangendo o locus das tirosinas quinases (CAPON et al., 1999; KARASON et al., 2005; LEE et al., 2000; SAGOO et al., 2004; VEAL et al., 2001).

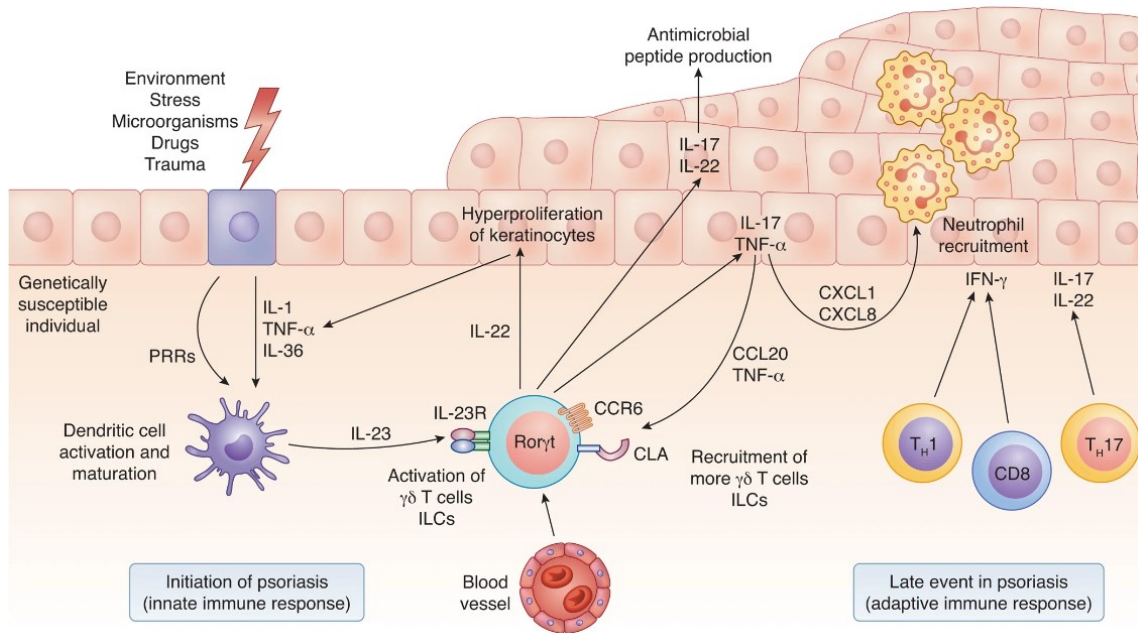
A psoríase pode ser desencadeada em indivíduos geneticamente predispostos através de diferentes estímulos ambientais, como o estresse, infecções (particularmente estreptocócica), consumo de álcool, tabagismo, exposição a drogas como o lítio, antimaláricos e anti-inflamatórios não esteroides, e, em alguns casos, luz solar. Ganho de peso e obesidade são fatores de risco e gatilhos, bem como um possível consequência de viver com psoríase (GRIFFITHS; BARKER, 2007; KUMAR et al., 2013).

### **1.5. Patogênese da Psoríase**

Até o início dos anos 90, acreditava-se que a patogênese da psoríase se resumia ao processo de ativação e proliferação de queratinócitos. Atualmente, no entanto, sabemos que o sistema imunológico tem um papel central no desenvolvimento e manutenção da doença (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015; FRANK NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009; GREB et al., 2016; GRIFFITHS et al., 2021a).

O 'crosstalk' desregulado entre queratinócitos e células do sistema imune na pele é considerado o principal mecanismo desencadeador da psoríase. Evidências pré-clínicas demonstram que a liberação de mediadores derivados de queratinócitos, incluindo peptídeos antimicrobianos, tem um papel central no início da patogênese da psoríase, principalmente por meio da ativação de DCs

e subsequente ativação de linfócitos T (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015; FRANK NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009; GREB et al., 2016; GRIFFITHS et al., 2021a). Lande e colaboradores (2007) demonstraram que a catelicidina LL-37, liberada por queratinócitos ativados, forma um complexo com o DNA próprio. Este complexo é reconhecido por células dendríticas plasmocitóides (pDCs) via TLR9, que passa a produzir interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) (LANDE et al., 2007). O IFN- $\alpha$  associado a citocinas secretadas pelos queratinócitos como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  ativam diretamente as DCs na derme. A ativação de DCs culmina na produção de IL-12 e IL-23, e subsequente ativação de linfócitos T naive em linfócitos Th1 e Th17 nos linfonodos drenantes da pele, respectivamente. Os linfócitos T  $\gamma\delta$  residentes na derme podem ser diretamente ativados na pele e assim iniciar a cascata inflamatória. Os linfócitos T ativados produzem citocinas como a IL-17A, IL-22, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que ativam diretamente os queratinócitos, induzindo assim a produção de citocinas e quimiocinas adicionais, como TNF- $\alpha$  e CXCL-1, que são cruciais para o recrutamento de neutrófilos e adicionais linfócitos T, que amplificam ainda mais a cascata inflamatória na psoríase (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015; GRIFFITHS et al., 2021b; PANTELYUSHIN et al., 2012; SCHÖN; ERPENBECK, 2018) (**Figura 5**).



**Figura 5: Mecanismo simplificado da imunopatogênese da psoríase.** Vários agentes estressores podem ativar DCs diretamente por meio de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) ou indiretamente por estresse de queratinócitos (liberação de IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-36). DCs sensíveis ao estresse podem produzir IL-23, que ativa linfócitos T  $\gamma\delta$  e ILCs para produzir IL-17 e IL-22, representando um evento precoce na psoríase que é mediado pela resposta imune inata. Além disso, Linfócitos Th1 e Th17 são ativados nos linfonodos drenantes da pele, e através de um gradiente de quimioquinas, essas células retornam à pele, produzindo assim citocinas como o IFN- $\gamma$  e IL-17a, respectivamente, que ativam diretamente os queratinócitos e amplificam a resposta inflamatória na psoríase. Adaptado de Becher, B. *et al*, 2012.

A fisiopatologia da psoríase é complexa e envolve diferentes células e moléculas, no entanto, tem crescido o número de evidências na literatura demonstrando que a doença é mediada principalmente por células que ativam o circuito imunológico cutâneo IL-23/IL-17. Agentes terapêuticos direcionados especificamente para o eixo IL-23/IL-17 tem demonstrado eficácia clínica dramática no tratamento de pacientes com psoríase moderada a grave (GHORESCHI et al., 2021).

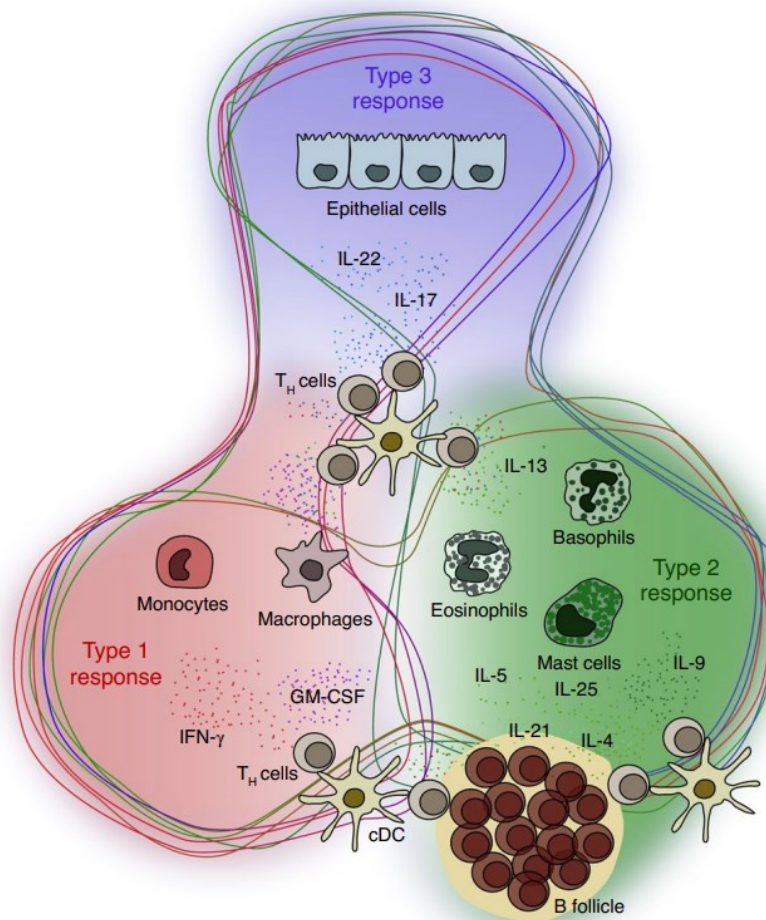
### 1.6. Psoríase e imunidade do tipo 3

O sistema imunológico adaptou suas funções efetoras para responder a diferentes espécies de microrganismos e desta maneira garantir a manutenção da homeostasia do hospedeiro (EBERL; PRADEU, 2018). Didaticamente, as

células do sistema imune podem ser agrupadas em diferentes tipos de resposta imune, baseado nas principais funções efetoras e células/tecidos alvos (TUZLAK et al., 2021). Estas respostas foram mais recentemente caracterizadas como imunidade do tipo 1, 2 ou 3 (**Figura 6**) (ANNUNZIATO; ROMAGNANI; ROMAGNANI, 2015; TUZLAK et al., 2021). As respostas imunes do tipo 1 também conhecida como imunidade celular, são àquelas direcionadas a patógenos intracelulares, e desta maneira depende comumente da interação entre Linfócitos Th1 e células mielóides como os macrófagos, células dendríticas e monócitos. Já a imunidade do tipo 2 está comumente associada a resposta contra organismos multicelulares que não podem ser facilmente fagocitados, tendo como ponte de interação central os mediadores secretados pelos Linfócitos Th2 e os mastócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos B, como células alvo. Já a imunidade do tipo 3 são definidas como reações específicas dos tecidos de barreira a distúrbios extracelulares(ANNUNZIATO; ROMAGNANI; ROMAGNANI, 2015; TUZLAK et al., 2021).

Diferentemente da imunidade do tipo 1 e 2, as repostas imunes do tipo 3 são menos direcionadas a células imunes efetoras, e ativam diretamente células não imunes, como o epitélio intestinal e cutâneo (ANNUNZIATO; ROMAGNANI; ROMAGNANI, 2015; TUZLAK et al., 2021). Os receptores para as citocinas IL-17 e IL-22 são expressos em todo este compartimento estromal. Em condições de homeostase, já foi demonstrado que os linfócitos T produtores de IL-17 são essenciais para a manutenção da função de barreira do epitélio intestinal (MALOY; KULLBERG, 2008). No entanto, em condições de ativação exacerbada e desordenada do sistema imune, com aumento da produção de IL-17 e IL-22, essas barreiras epiteliais podem sofrer uma quebra de tolerância e

iniciar uma inflamação local, culminando no surgimento de doenças inflamatórias, como acontece na psoríase (GREB et al., 2016; GRIFFITHS et al., 2021a) (**Figura 6**). A ativação do eixo IL-23/IL-17 como mecanismo central da patogênese da psoríase engaja a ativação subsequente de queratinócitos, que por sua vez liberam mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, peptídeos antimicrobianos e alarminas que amplificam e sustentam a resposta inflamatória na psoríase (EHRCHEN et al., 2009a; GONG et al., 2019; GREB et al., 2016; JIN et al., 2014).



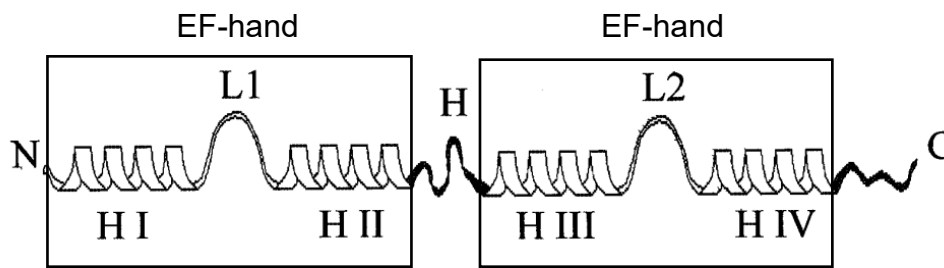
**Figura 6: Modelo orbital representando didaticamente os diferentes tipos de resposta imune.** As respostas do tipo 1 têm como alvo os fagócitos mononucleares, incluindo macrófagos e monócitos. As células responsivas da imunidade tipo 2 são predominantemente mastócitos, eosinófilos e basófilos, bem como células B (particularmente nos centros germinativos). A imunidade do tipo 3 envolve células predominantemente não imunes, como células epiteliais através de tecidos de barreira. Adaptado de Tuzlak, *et al.* 2021.

### 1.7. Proteínas S100: estrutura, função e inflamação

O sistema imune inato reconhece moléculas "não próprias" derivadas de patógenos, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), via receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) (LI; WU, 2021). Além disso, já é bem estabelecido que moléculas endógenas derivadas de células do hospedeiro, denominadas padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou alarminas podem ser reconhecidas pelo sistema imune (GONG et al., 2019). Os DAMPs são moléculas cuja liberação se dá por mecanismos de estresse, lesão ou morte celular (GONG et al., 2019). Além de atuar regulando a homeostase, através da regeneração e reparo tecidual (GONG et al., 2019), os DAMPs também podem exacerbar a resposta inflamatória, através da ativação direta de células do sistema imune (GONG et al., 2019). Dentre as principais alarminas descritas estão o HMGB1, ácido úrico, catelicidinas, defensinas, anexinas, IL-1 $\alpha$  e as proteínas da família S100 (AUSTERMANN; ZENKER; ROTH, 2017; JIN et al., 2014).

A família das proteínas S100 representa o maior subgrupo de proteínas com domínio EF-hand ligante de cálcio em vertebrados (FRITZ; HEIZMANN, 2006; KILBY; VAN ELDIK; ROBERTS, 1996; MCCLINTOCK; SHAW, 2003). As proteínas S100 são moléculas de baixo peso molecular, tendo cada domínio cerca de 10-12kDa e contendo dois motivos estruturais hélice-alça-hélice, EF-hand, ligados por uma região de dobradiça flexível (**Figura 7**) (DONATO, 1999). Além do Ca<sup>2+</sup>, estas proteínas podem se ligar a outros íons metálicos como o Zn<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> (DROHAT et al., 1996; KILBY; VAN ELDIK; ROBERTS, 1996). A interação das proteínas S100A aos íons metálicos pode induzir mudança na

conformação, no estado de oligomerização e na função destas proteínas (FRITZ; HEIZMANN, 2006; DONATO, 1999).



**Figura 7: Estrutura das proteínas S100. Representação esquemática da estrutura secundária de uma proteína da família S100.** L1 e L2 representam as alças ligantes de íons entre as regiões N e C terminal. H - Região 'hinge' ou de dobradiça. H I, II, III e IV - Hélice I, II, III e IV. Adaptado de Donato, R. 2001.

Atualmente, vinte e quatro proteínas da família S100 estão descritas. O nome destas proteínas se deve ao fato destas serem 100% solúveis em sulfato de amônio em pH neutro (KURPET; CHWATKO, 2022). Estas proteínas são expressas de maneira específica pelas células e tecidos e estão envolvidas em múltiplas funções intracelulares e extracelulares (CHEN et al., 2014; ECKERT et al., 2004; KURPET; CHWATKO, 2022; ZIMMER et al., 1995). Com base em seus papéis em processos biológicos, as proteínas S100 podem ser subdivididas em três subgrupos principais: proteínas que possuem apenas funções intracelulares (por exemplo, S100A1), proteínas com efeitos intracelulares e extracelulares (por exemplo, S100B) e proteínas S100 exercendo principalmente funções extracelulares (por exemplo, S100A15) (et al., 2014; ECKERT et al., 2004; KURPET; CHWATKO, 2022; ZIMMER et al., 1995).

As principais funções intracelulares que as proteínas S100A estão envolvidas incluem: modular a concentração intracelular de cálcio, regulação enzimática, modulação do metabolismo celular, interação com receptores intracelulares, regulação transcricional e regulação da fosforilação de proteínas (DONATO, 1999; GOYETTE; GECZY, 2011; ZIMMER et al., 1995). Quando

Secretadas para o espaço extracelular, as proteínas S100A atuam de forma parácrina ou autócrina via ativação de receptores de superfície celular, regulando o crescimento, proliferação, diferenciação e apoptose celular (GOYETTE; GECZY, 2011; ZIMMER et al., 1995). Vários trabalhos já demonstraram que as proteínas da família S100A podem atuar como DAMPs ou alarminas e ativar células do sistema imune via RAGE e TLR4 (GONG et al., 2019; KOVAČIĆ et al., 2018; SEN CHAUDHURI et al., 2022; SILVA et al., 2020; WEBER; ZIMMER, 2010). A liberação destas proteínas em condição de ativação e dano tecidual tem correlacionado a família das proteínas S100 em diferentes doenças inflamatórias como a artrite, doenças cardiovasculares e metabólicas, neoplasias e psoríase (GOYETTE; GECZY, 2011; HEIZMANN, 2019; WILSMANN-THEIS et al., 2016).

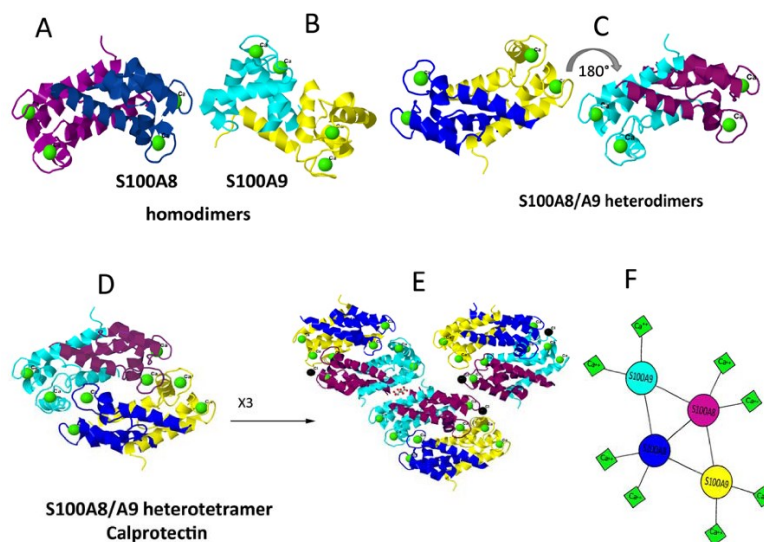
### **1.8. Aspectos gerais e papel inflamatório da proteína S100A9**

Através de uma análise *in silico* de um conjunto de dados transcriptômicos da pele de pacientes com psoríase, identificamos quatro genes da família S100A, incluindo *S100A7*, *S100A8*, *S100A9* e *S10012*, entre os principais genes diferencialmente expressos na pele lesionada de pacientes com psoríase (Figura 9 e 10). Entre todos estes genes, a expressão de *S100A9* tem sido correlacionada com a atividade da doença em pacientes com psoríase (BENOIT et al., 2006a; SCHONTHALER et al., 2013; WILSMANN-THEIS et al., 2016a), no entanto seu exato mecanismo na doença permanece pouco compreendido.

A proteína *S100A9*, também conhecida como MRP-14 ou calgranulina B é um membro da família S100A, codificada pelo gene *S100A9* em humanos. Assim como outros genes da família S100A, o gene que codifica a expressão de *S100A9* está localizado no cromossomo 1q21 em humanos. A proteína *S100A9*



apresenta baixo peso molecular, com aproximadamente 14kDa (ECKERT et al., 2004; KURPET; CHWATKO, 2022; MITCHELL et al., 2008) e pode ser encontrada na forma de homodímero ou heterodímero complexada com S100A8, ou até mesmo na forma de heterotetrâmero (PRUENSTER et al., 2016; VOGL; GHARIBYAN; MOROZOVA-ROCHE, 2012) (**Figura 8**). A ligação de cálcio e do zinco a esta proteína desencadeia alterações conformacionais, que modulam sua atividade funcional (HUNTER; CHAZIN, 1998; ZREIQAT et al., 2010) (**Figura 8**). Um estudo recente demonstrou que os efeitos inflamatórios de S100A9 são mediados pela dimerização desta proteína com S100A8, enquanto que a tetramerização estaria mais associada como um mecanismo de regulação negativa de seus efeitos inflamatórios (VOGL et al., 2018).



**Figura 8: Estrutura das proteínas S100A8 e S100A9.** (A) homodímero de S100A8; subunidades individuais são mostradas em roxo e azul escuro; (B) homodímero S100A9; as subunidades são mostradas em azul marinho e amarelo; (C) heterodímeros S100A8/A9 mostrados em duas projeções rotacionadas em 180°; (D) S100A8/A9 heterotetrâmero também chamado de calprotectina e (E) S100A8/A9 dodecâmero montado a partir de 3 calprotectinas; (F) Esboço esquemático dos arranjos de S100A8 e S100A9 na calprotectina. As subunidades são apresentadas em cores individuais como em (A) e (B). Os íons  $\text{Ca}^{2+}$  ligados são mostrados por esferas ou quadrados verdes, respectivamente. Adaptado de Vogl, T. *et al*, 2012.

A expressão e localização física de S100A9 varia de acordo com o tipo de célula e seu estado de ativação (CHENG et al., 2008; MITCHELL et al., 2008; SCHONTHALER et al., 2013; VOGL; GHARIBYAN; MOROZOVA-ROCHE,

2012). S100A9 pode ser expressa em células mielóides, nos tecidos de barreira e em células tumorais (CHRISTMANN et al., 2021). S100A9 é expressa constitutivamente em neutrófilos e monócitos (DE FILIPPO et al., 2014; MITCHELL et al., 2008; RAMMES et al., 1997; SILVA et al., 2020). Em células não imunes, como os queratinócitos, já foi descrito que a expressão de S100A9 é induzida em condições de estresse ou ativação (ABTIN et al., 2010; BENOIT et al., 2006c; SCHONTHALER et al., 2013).

Muito trabalhos têm demonstrado o papel inflamatório de S100A9 em diferentes contextos. Erchen e colaboradores demonstraram que S100A9 murino tem um papel quimiotático para macrófagos peritoneais e alveolares. Além disso S100A9 humano demonstrou efeito em atrair neutrófilos (EHRCHEN et al., 2009a). Foi demonstrado também que S100A9 induz a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 em macrófagos via ativação de NF- $\kappa$ B (SUNAHORI et al., 2006). S100A9 também estimula a produção de IL-8 em células epiteliais (KANG; HWANG; CHUNG, 2015). Apesar de ser expressa constitutivamente no espaço intracelular em algumas células, as proteínas S100A9 apresentam funções predominantemente extracelulares, atuando assim como DAMPs ou alarminas (JIN et al., 2014; TSAI et al., 2014). Mecanicamente, alguns trabalhos tem demonstrado que os efeitos extracelulares de S100A9 são mediados através dos receptores TLR4 e RAGE (EHRCHEN et al., 2009b; KOVAČIĆ et al., 2018; LOSER et al., 2010; SILVA et al., 2020; VOGL et al., 2018).

A expressão aumentada de S100A9 já foi correlacionada positivamente em diferentes doenças inflamatórias, a exemplo da vasculite (PEPPER et al., 2013), artrite reumatóide (FOELL; ROTH, 2004), artrite psoriásica (FOELL; ROTH, 2004) e psoríase (BENOIT et al., 2006b; SCHONTHALER et al., 2013).

No contexto da psoríase, níveis séricos de S100A9 tem sido correlacionados com a atividade da doença em pacientes (BENOIT et al., 2006c). Um dos poucos estudos que explorou o papel da proteína S100A9 na psoríase, demonstrou que o heterodímero S100A8/A9 migra para o núcleo e regula a expressão de C3 nos queratinócitos, promovendo a proliferação destas células e posteriormente inflamação da pele (SCHONTHALER et al., 2013). No entanto, um trabalho recente demonstrou que a ausência genética de S100A9 não afeta a maturação e o perfil inflamatório de queratinócitos, *in vitro* (CHRISTMANN et al., 2021). A maioria destes trabalhos negligenciou os possíveis efeitos de S100A9 como uma alarmina, e assim seus possíveis efeitos como moduladora da resposta imune da pele no curso inflamatório da psoríase.

Elucidar os mecanismos pelo qual S100A9 modula a resposta inflamatória na psoríase, além de contribuir para o entendimento do mecanismo fisiopatológico da psoríase, possibilitaria apontar novos caminhos para o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas ou de diagnósticos mais eficientes para melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos pela doença.

***Hipótese***

## **2. HIPÓTESE**

Dado o exposto, a hipótese deste trabalho é de que a proteína S100A9 medeia um papel pró-inflamatório na pele, exacerbando assim a inflamação cutânea na psoríase.

## ***Objetivos***

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o papel da S100A9 na patogênese da psoríase.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**3.2.a.** Determinar o perfil transcricional da pele de pacientes com psoríase;

**3.2.b.** Avaliar a expressão da S100A9 na lesão cutânea e no plasma de pacientes com psoríase;

**3.2.c.** Caracterizar a expressão da S100A9 em modelo psoriasiforme induzido por IMQ;

**3.2.d.** Avaliar o papel da S100A9 em modelo psoriasiforme induzido por IMQ;

**3.2.e.** Investigar o efeito direto de S100A9 na inflamação cutânea;

**3.2.f.** Determinar a principal fonte da S100A9 na psoríase;

**3.2.g.** Avaliar os mecanismos pelo qual S100A9 modula a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme induzido por IMQ;

**3.2.h.** Avaliar a função, metabolismo e mecanismos da S100A9 em células dendríticas *in vitro*;

**3.2.i.** Determinar os sinais necessários para a expressão da S100A9.

## ***Material e Métodos***



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Pacientes

Amostras de sangue foram coletadas de 5 doadores saudáveis e 22 pacientes com psoríase vulgar com lesões de psoríase ativas envolvendo uma área de superfície corporal (BSA) superior a 10% e/ou índice de área e gravidade da psoríase (PASI) superior a 10, critérios para psoríase moderada-grave. Esses pacientes estavam em uso de tratamento tópico (corticosteroides e/ou calcipotriol) ou não estavam em uso de nenhum tratamento sistêmico. Esses foram os critérios de inclusão/exclusão. As amostras de pele humana foram obtidas de 12 pacientes com psoríase vulgar, com a coleta da pele através de um punch de 2 mm, de regiões lesionadas ou não lesionadas dos mesmos pacientes. Essas amostras foram coletadas pelos médicos dermatologistas habilitados para este procedimento. Todas as amostras foram utilizadas para análises de proteínas por Western Blot, ELISA ou cortes congelados para Imunofluorescência. As aquisições das amostras, incluindo as biópsias de pele e amostras de sangue, foram previamente aprovadas pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (65644117.1.0000.5440). O consentimento informado foi obtido para todos os procedimentos.

### 4.2. Animais

Camundongos KRT14Cre-IL17a<sup>ind/+</sup> (background C57BL/6) foram gerados através do cruzamento de camundongos IL17a<sup>ind/ind</sup> com camundongos KRT14Cre, conforme descrito anteriormente (Croxford et al., 2014). O alelo IL-17a<sup>ind</sup> permite a supreexpressão condicional de IL-17a e proteína fluorescente verde (GFP) aumentada após recombinação mediada por Cre. Esses animais

foram utilizados através da colaboração com o Prof. Dr. Ari Waisman. Todos os animais foram alojados de acordo com as diretrizes da “Central Animal Facility do University Medical Center”, Mainz, Alemanha. Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) foram adquiridos de Charles River. As cepas de camundongos *Il23a<sup>-/-</sup>* e *Il17ra<sup>-/-</sup>* foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Bernhard Ryffel do “Centre National de la Recherche Scientifique”, Orleans, França. Camundongos *S100a9<sup>-/-</sup>* (Manitz et al. 2003) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Johannes Roth e Thomas Vogl, da Universidade de Munster, Alemanha. Todos os camundongos foram criados e alojados em condições específicas livres de patógenos (SPF) no Centro de criação de camundongos especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Todos os experimentos foram realizados com camundongos machos ou fêmeas de 8 a 10 semanas de idade de acordo com as diretrizes do comitê de ética animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Todos os experimentos foram realizados em concordância com o comitê de Ética para animais de experimentação (077/2019).

### **4.3. Modelos psoriasiformes**

Imiquimod 5% (IMQ) foi aplicado topicamente diariamente na pele do dorso (70 mg) ou da orelha (20 mg) de camundongos de 8-10 semanas de idade pela duração indicada nas legendas das figuras. Para a pele do dorso, os camundongos foram previamente depilados com barbeador e, posteriormente, creme depilatório ‘veet’ para remover o pelo residual. Após 2 dias, o creme contendo IMQ foi aplicado na orelha ou na pele do dorso. S100A9 recombinante (500 ng/orelha) ou PBS foram injetados intradermicamente diariamente pela

duração indicada nas legendas das figuras. As injeções foram realizadas usando uma seringa de insulina em um volume total de 10-15  $\mu$ l/orelha. Os camundongos KRT14Cre-Il17a<sup>ind/+</sup> desenvolveram uma grave inflamação da pele 8 semanas após o nascimento (Croxford et al., 2014), sendo imediatamente sacrificados logo após começarem a perder peso.

#### **4.4. Tratamento farmacológico com paquinimode**

O composto Paquinimod (PAQ) foi gentilmente cedido pela Active Biotech AB (Suécia) sob um Contrato de Transferência de Material. Os camundongos foram tratados com ABR 215757 após a aplicação tópica de Aldara. O composto ABR215757, também conhecido como PAQ, é um 'scavenger' de S100A9 e assim bloqueia seus efeitos (Björk et al., 2009). Os camundongos receberam tratamento com PAQ por gavagem oral (10 mg/kg) diariamente, antes do primeiro e até o último dia da aplicação tópica de IMQ.

#### **4.5. Geração de camundongos quiméricos**

Camundongos de 10 semanas foram utilizados com recipientes. Camundongos recipientes WT e *S100a9*<sup>-/-</sup> foram primeiramente irradiados letalmente com um irradiador de fonte de césio 137 (Mark I modelo 25) a 7 Gy, e subsequentemente transplantados com  $5 \times 10^6$  de células da medula óssea oriundas de camundongos WT, *S100a9*<sup>-/-</sup> ou GFP totais. Após o transplante de medula óssea, os camundongos foram tratados com o antibiótico cloridrato de ciprofloxacina diluído em água potável (10 mg/ml, EMS) por 15 dias consecutivos. Os camundongos transplantados receptores foram submetidos a inflamação semelhante à psoríase induzida por IMQ 8 semanas após a

reconstituição da medula óssea e analisados conforme as descrições acima. Células da medula óssea da medula óssea de camundongos GFP foram transferidas para camundongos WT irradiados como controle do experimento.

#### 4.6. Análises *in silico*

Dados brutos de conjuntos de dados de microarrays foram baixados do Gene Expression Omnibus (GEO) (Edgar et al. 2002). Os efeitos de lote foram detectados usando dados de varredura como substitutos de lote e depois removidos usando o pacote *sva*. A normalização foi realizada usando o algoritmo *Robust Multi Array* do pacote *affy bioconductor*. A ambiguidade entre as sondas correspondentes ao mesmo gene foi removida selecionando sondas com a maior média de expressão entre as amostras. O controle de qualidade das amostras de microarrays foi realizado usando o pacote *arrayQualityMetrics* (Kauffmann et al. 2009). Um teste t moderado, conforme implementado no pacote *Limma*, foi usado para detectar genes diferencialmente expressos entre amostras de pele lesionada e não lesionada de pacientes com psoríase (Ritchie et al. 2015). A detecção de genes diferencialmente expressos foi realizada usando o pacote *Limma* (Ritchie et al., 2015) e estão representados no gráfico do 'meta-volcano' dos bancos de dados GSE13355, GSE14905, GSE53552, GSE6710 e GSE30999. A expressão de *S100A9* desses diferentes bancos de dados foi quantificada e representada no GraphPad prisma 9 (GraphPad Software) após normalização. Um subconjunto de genes normalizados (*KRT14*, *KRT17*, *LCN2*, *IL23A*) foi então correlacionado com o gene *S100A9* usando o valor p e o coeficiente de correlação (r) com o teste não paramétrico de correlação de Spearman do banco de dados GSE133355. Reanalizamos dados

transcriptômicos de célula única do conjunto de dados público GSE150672 (Hughes et al. 2020) para avaliar a expressão de *S100A9* em diferentes subtipos de células da pele de psoríase humana usando o pipeline Seurat (Butler et al. 2018). Os valores da expressão de *S100A9* oriundos dos bancos de dados GSE53552 e GSE117239 após normalização. As análises de perfil transcricional do banco de dados GSE117239 também foi realizada diretamente na plataforma “Gene expression omnibus” através da ferramenta “GEO2R” disponível no próprio site.

#### **4.7. Processamento de tecidos para citometria de fluxo**

A pele do dorso e da orelha foi coletada e digerida conforme descrito anteriormente (Zwicky et al. 2021). A pele foi cortada em pequenos pedaços e digerida em RPMI, 5% suplementado com colagenase de *Clostridium histolyticum* (1mg/ml) e desoxirribonuclease (DNase) I (100 µg/ml; ambos Sigma-Aldrich) em 37°C durante 1,5 horas. Após a digestão, aspiramos o conteúdo de pele digerida, com uma seringa e agulha de calibre 18. Os linfonodos foram cortados em pedaços pequenos e digeridos em RPMI, Hapes 10 mM suplementado com colagenase IV (0,2 mg/ml) e DNase I (100 µg/ml) a 37°C por 40 min. Após a digestão do tecido, usando uma seringa com uma agulha de calibre 18, as células foram filtradas em um filtro de células de 100 µm e lavadas em PBS.

#### **4.8. Citometria de fluxo**

Para marcação de superfície, as suspensões de células foram incubadas com anticorpos em PBS a 4°C por 30 min. Para coloração de citocinas intracelulares,

as células foram estimuladas em meio de cultura com PMA (50 ng/ml; Sigma-Aldrich) e ionomicina (500 ng/ml; Sigma-Aldrich) por 4 h na presença de monensina (GolgiStop 1,5 µg/ml; BD Biosciences) a 37°C em uma câmara de CO<sub>2</sub> umidificada a 5%. Após a marcação da superfície, as células foram fixadas e permeabilizadas com 100 µl de solução BD Cytofix/Cytoperm a 4°C por 20 min. Em seguida, as células foram lavadas e marcadas intracelularmente a 4°C em tampão de permeabilização durante a noite. A marcação foi realizada a 4°C durante a noite em tampão de permeabilização. As amostras foram adquiridas em FACS verse (BD Biosciences) e Cytex Aurora 5L (Cytex), e os dados foram analisados usando o software FlowJo X (Tree Star).

#### 4.9. Extração de RNA e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

O RNA total de toda a pele foi isolado usando o RNeasy Kit de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen). O cDNA de primeira fita foi sintetizado a partir de 500 µg de mRNA usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (4368814, Thermo Fisher Scientific). A PCR quantitativa em tempo real foi realizada usando O Master mix Power Syber Green (Thermo Fisher Scientific), primers conforme descrito na Tabela de Recursos Chave e o sistema Stepone Real-Time PCR. Os dados foram normalizados para valores de *Gapdh* ou *Actb*, e utilizamos o método  $\Delta\Delta C_t$  para as análises. Os primers utilizados foram:

##### *Actb*

Sense: CATCTTCTTGTGCAGTGCCA

Antisense: CGGCCAAATCCGTTTAC

##### *Gapdh*

Sense: CATCTTCTTGTGCAGTGCCA

Antisense: CGGCCAAATCCGTTTAC

##### *S100a8*

Sense: AAATCACCATGCCCTCTACAAG

Antisense: CCACTTTTATCACCATCGCAA  
*S100a9*  
 Sense: CAGCATAACCACCATCATCG  
 Antisense: GTCCTGGTTTGTGTCCAGGT  
*Lcn2*  
 Sense: CCCCATCTCTGCTCACTGTC  
 Antisense: TTTTCTGGACCGCATTG  
*//36y*  
 Sense: ATGGACACCCTACTTTGCTG;  
 Antisense: TGTCCGGGTGTGGTAAAACA);  
*//23a*  
 Sense: CACCTCCCTACTAGGACTCAGC  
 Antisense: CTGCCACTGCTGACTAGAAC  
*//12b*  
 Sense: CACCTCCCTACTAGGACTCAGC  
 Antisense: CTGCCACTGCTGACTAGAAC  
*//17a*  
 Sense: GCTCCAGAAGGCCCTCAG  
 Antisense: CTTCCCTCCGCATTGACA  
*//22*  
 Sense: CAGTCCTGTCACATCAGCGGT  
 Antisense: AGGTCCAGTTCCCAATCGCCT  
*S100A9*  
 Sense: CAGCATAACCACCATCATCG  
 Antisense: GTCCTGGTTTGTGTCCAGGT  
*KRT14*  
 Sense: CAGTCCTGTCACATCAGCGGT  
 Antisense: GTCCTGGTTTGTGTCCAGGT

#### 4.10. Western blot

Toda a pele da psoríase humana ou pele do dorso pós IMQ foi coletada e homogeneizada em Tampão RIPA (Sigma Aldrich) com coquetel contendo inibidor de protease e fosfatase (Cell Signaling). A concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de proteína BCA (Sigma Aldrich). Para separação por eletroforese, 10 µg de proteína total foram adicionadas em géis de SDS-poliacrilamida de acordo com protocolos padrão (SDS-PAGE) e depois transferidos para membrana de nitrocelulose (Bio-rad). As membranas foram incubadas a 4°C com tampão de bloqueio, leite a 5% (Cell Signalling) em solução tamponada com Tris e Tween-20 a 0,1% (TBS-T) por 1 h em temperatura

ambiente e, em seguida, as membranas foram incubadas em solução de BSA a 5% com 0,1 % Tween-20 contendo anticorpo monoclonal anti-S100A9 (goat) (1:1000, R&D) overnight. As membranas foram subsequentemente lavadas em TBS-T e incubadas durante 2 h com o anticorpo secundário conjugado com HRP apropriado (diluição 1:3.000; Sigma-Aldrich). As membranas foram reveladas com um sistema ECL (GE Healthcare) e, em seguida, o sinal de quimioluminescência foi registrado no Sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories), seguindo as recomendações do fabricante. GAPDH e  $\beta$ -actina (Cell Signalling) foram usados como controle de normalização. Os dados foram analisados com o software Image Lab (Bio-Rad Laboratories).

#### **4.11. Microscopia intravital**

Foi realizada injeção intradérmica de S100A9 ou PBS na orelha de camundongos  $Lysm^{Gfp}$ , no volume máximo de 15ul em cada orelha. Após as injeções, as orelhas desses animais foram adquiridas por 2 horas seguidas, através do sistema Leica MMC e analisada no software Image J.

#### **4.12. Histologia**

Logo após a coleta, a pele da orelha ou do dorso foram fixadas em paraformaldeído a 4% (PFA) a 4°C por 24 h e, em seguida, embebidas em parafina para coloração de hematoxilina e eosina (H&E). A espessura da pele foi medida histologicamente de forma cega. Os dados representam a média de três medidas em áreas selecionadas aleatoriamente. A aquisição das imagens foi realizada em microscópio Leica MMC e analisada no software Image J. Para coloração de imunofluorescência, pele humana e de camundongo foram



coletadas previamente em PBS, depois fixadas em PFA 4% a 4°C por 24 h, lavadas em PBS e crioprotetidas em solução de sacarose 30% por 72 h. Os tecidos foram então incorporados no composto OCT (Tissue-Tek; Sakura Finetek) e congelados em gelo seco. Os cortes de pele foram cortadas por criostato (Leica) em cortes transversais de 10-15 µm de espessura montadas em lâminas de vidro. As amostras foram então incubadas com a solução de trabalho (PBS-BSA 1%, 0,05% de Tween) a 4°C por 30 min. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpos primários contra KRT14 (Abcam), KRT17 (Abcam) ou S100A9 (R&D) diluídos na solução de trabalho a 4°C durante a noite. Os cortes foram lavados pelo menos cinco vezes com TBS-T por 5 min antes de incubar com anticorpos secundários e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) diluído na solução de trabalho a 4°C por 30 min. Os cortes foram lavados pelo menos cinco vezes com TBS-T e, em seguida, o meio de montagem foi adicionado. A aquisição das imagens foi realizada em microscópio LSM 780 (Carl Zeiss).

#### **4.13. Geração de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs)**

As células da medula óssea foram isoladas de camundongos WT com 6-10 semanas de idade e cultivadas na presença de 20 ng/ml de fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) em um meio completo contendo RPMI-1640 (Corning), meio com 10% de soro fetal bovino (FCS), 2% de L-glutamina (Gibco), 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (Wisent). Após 7 dias, os BMDCs foram coletados, semeados a 1 milhão de células/ml e estimulados com recombinante S100A9 (1 µg/ml). Marcadores de ativação e produção de citocinas foram avaliados por citometria de fluxo de alta dimensão e ELISA, respectivamente.

#### **4.14. ELISA**

Os níveis de citocinas ou proteínas em sobrenadantes de células, amostras de tecido e plasma foram avaliados por ELISA de acordo com os protocolos do fabricante do kit DuoSet ELISA (R&D Systems).

#### **4.15 Quantificação de lactato**

A produção de lactato foi medida no sobrenadante da cultura celular usando um kit de ensaio colorimétrico (Quibasa-Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante.

#### **4.16. Ensaio de Seahorse**

A ECAR e OCR foi avaliada com um analisador de fluxo extracelular Seahorse Bioscience XF-96 (Seahorse bioscience) de acordo com as instruções do fabricante. As células dendríticas foram tratadas previamente, durante 6 horas com diferentes concentrações de S100A9. Após isso, foi adicionado meio sem glicose e a ECAR e OCR foi avaliada conforme as drogas glicose, rotenona/ antimicina A e 2-DG foram sendo adicionadas.

#### **4.17. Teste de estresse mitocondrial**

Após 24 horas de estímulo na presença de S100A9 (1µg/ml), células dendríticas foram coletadas e marcadas com diferentes sondas, “mitotracker green”, que avalia massa mitocondrial, e “mitotracker red”, que avalia potencial de membrana. As amostras foram adquiridas no FACS Verse e analisadas no FlowJo.

#### **4.18. Cultura de queratinócitos (células HaCaT) *in vitro***

A linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT) foi expandida e mantida em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM - Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de soro fetal bovino, glicose (4,5 g/l), penicilina (100 U/ml), L- glutamina (2 mM) e gentamicina (0,2 mg/ml) a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células HaCaT foram estimuladas com IL-17A (100 ng/ml - sistemas R&D) em uma placa de 24 poços por 24 horas.

#### **4.19. Análises de citometria de fluxo de alta dimensão**

Os dados foram pré-processados usando FlowJo. A estratégia de gate foi realizada para incluir células CD45<sup>+</sup> únicas e vivas. Após a compensação, os dados foram exportados do FlowJo (Tree stars) e importados para o R studio. Os dados foram transformados usando uma função hiperbólica inversa e normalizados. A redução de dimensionalidade e visualização por UMAP (McInnes et al. 2020) e algoritmo FlowSOM (Van Gassen et al. 2015) foi usado para clusterização automática, combinando as informações no heatmap com valores de expressão mediana e o UMAP com valores de expressão sobrepostos (Butler et al. 2018).

#### **4.20. Quantificação e análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 8 (GraphPad Software) e R studio. As comparações para dois grupos foram calculadas usando testes t de Student bicaudais não pareados, e comparações múltiplas por ANOVA de uma via ou ANOVA de duas vias com pós teste de Bonferroni. As correlações foram analisadas com testes de correlação de

Spearman não paramétricos bicaudais. Valores de  $P$  abaixo de 0,05 foram considerados significativos ( $*P<0,05$ ). Detalhes estatísticos para cada experimento podem ser encontrados nas legendas das figuras correspondentes.

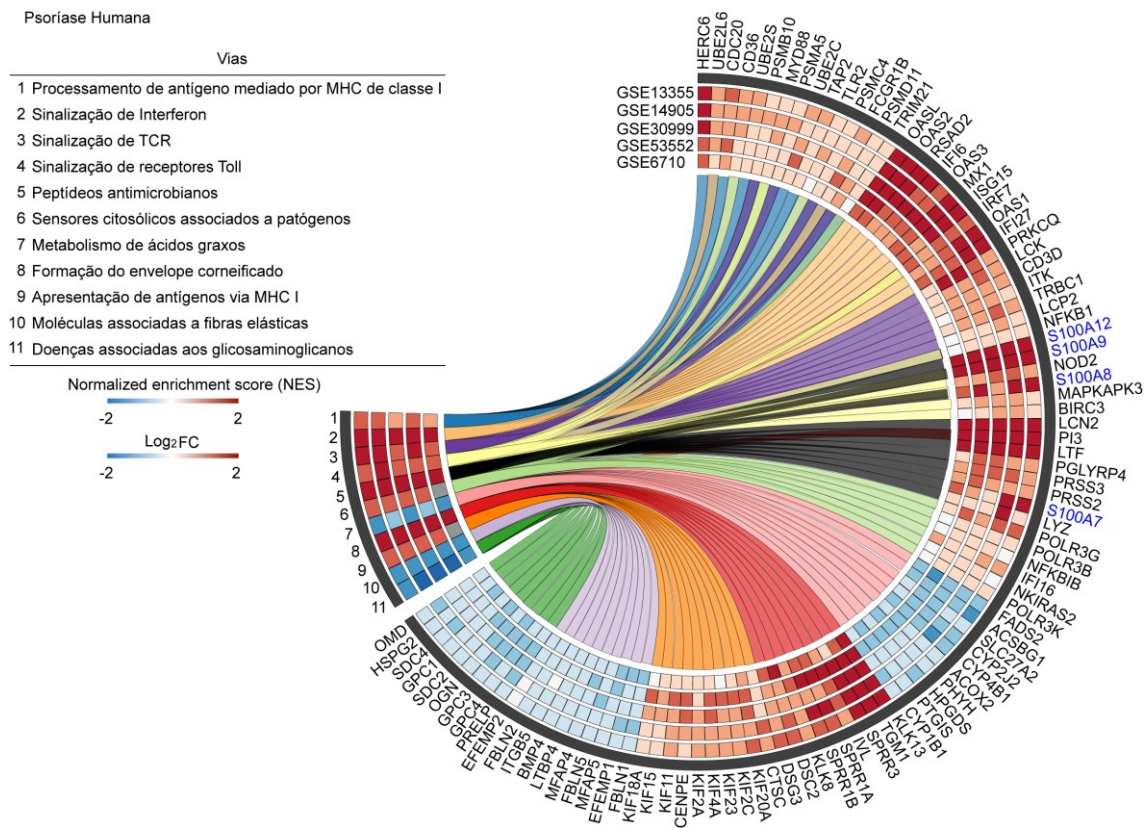
## ***Resultados***

## 5. RESULTADOS

### 5.1. A via de peptídeos antimicrobianos representa a assinatura gênica dominante na pele de pacientes com psoríase

Apesar dos recentes avanços no entendimento da patogênese da psoríase (GRIFFITHS et al., 2021a), bem como a recente inclusão de terapias farmacológicas mais eficazes para o tratamento da doença (GHORESCHI et al., 2021), os mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção da doença ainda permanecem pouco compreendidos. Neste sentido, nosso estudo teve como objetivo inicial identificar novos alvos com potencial participação na patogênese da psoríase. Desta forma, reanalisamos diferentes bancos de dados públicos, oriundos de diferentes estudos de pacientes com psoríase, e através de uma análise sistemática e não enviesada, conseguimos avaliar as principais alterações transcricionais entre pele não lesionada e lesionada de pacientes com psoríase, representadas no gráfico circular (**Figura 9**). Vias relacionadas com o metabolismo de ácidos graxos, moléculas associadas a fibras elásticas e doenças associadas a glicosaminoglicanos estão reguladas negativamente (**Figura 9**). Por outro lado, vias relacionadas ao processamento de antígenos via MHC de classe I, sinalização de interferon, sinalização de TCR, sinalização de receptor Toll-like (TLR), sensores citosólicos associados a patógenos e formação do envelope corneificado estão reguladas positivamente. Todas estas vias são enriquecidas por diferentes genes, que estão conectados às vias através das linhas coloridas, representado no gráfico circular (**Figura 9**). De forma interessante, a via de peptídeos antimicrobianos está predominantemente regulada positivamente, sendo esta enriquecida por diversos genes, tais como *PI3*, *LCN2*, *LTF*, *RNASE7*,

*PRSS3*, *PGLYRP4*, *PRSS2*, *LYZ*, *PGLYRP3*, *GNLY*, *S100A7*, *S100A8*, *S100A9* e *S100A12* (**Figura 9**).

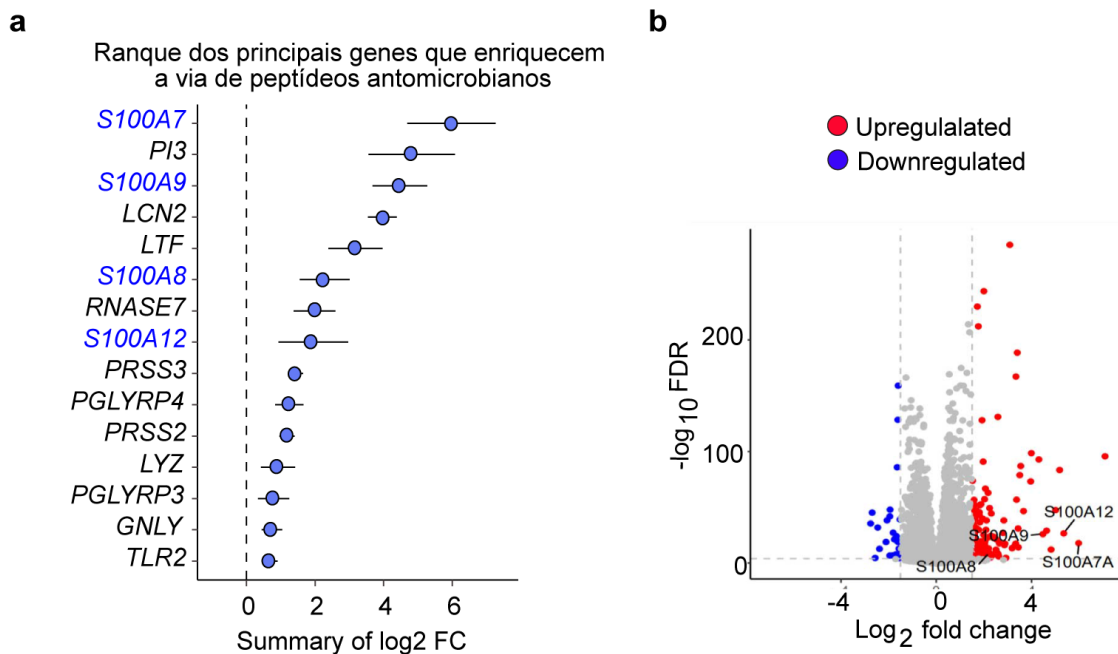


**Figura 9. A via de peptídeos antimicrobianos é dominantemente up regulada na pele de pacientes com psoríase.** Gráfico circular representa o número de genes diferencialmente expressos (DEGs) entre pele lesionada e não lesionada de pacientes com psoríase em cinco bancos de dados diferentes (GSE13355, GSE14905, GSE53552, GSE6710 e GSE30999). Representação circular de DEGs e análise de enriquecimento do conjunto de genes para pele psoriática lesionada e não lesionada. Os valores individuais de log<sub>2</sub> [fold change] (normalizados na linha de base) foram usados como classificações em uma única amostra de análise de enriquecimento do conjunto de genes para identificar vias consistentemente enriquecidas entre os indivíduos. Linhas coloridas conectam genes e vias.

## 5.2. Genes da família S100A estão entre os principais regulados positivamente na pele de pacientes com psoríase

O blobograma apresenta a lista com os quinze principais genes que enriquecem a via de peptídeos antimicrobianos (**Figura 10a**), com destaque para os genes da família S100A, incluindo *S100A7*, *S100A8*, *S100A9* e *S100A12* (**Figura 10a**). Corroborando com esses dados, através de uma meta-análise do perfil transcricional entre pele lesionada e não lesionada de pacientes com

psoríase, dos mesmos bancos de dados analisados anteriormente, identificamos diversos genes diferencialmente expressos (down e up regulados), estando os genes *S100A7*, *S100A8*, *S100A9*, e *S100A12* entre os principais genes regulados positivamente, em vermelho, anotados no “meta-volcano plot” (**Figura 10b**).



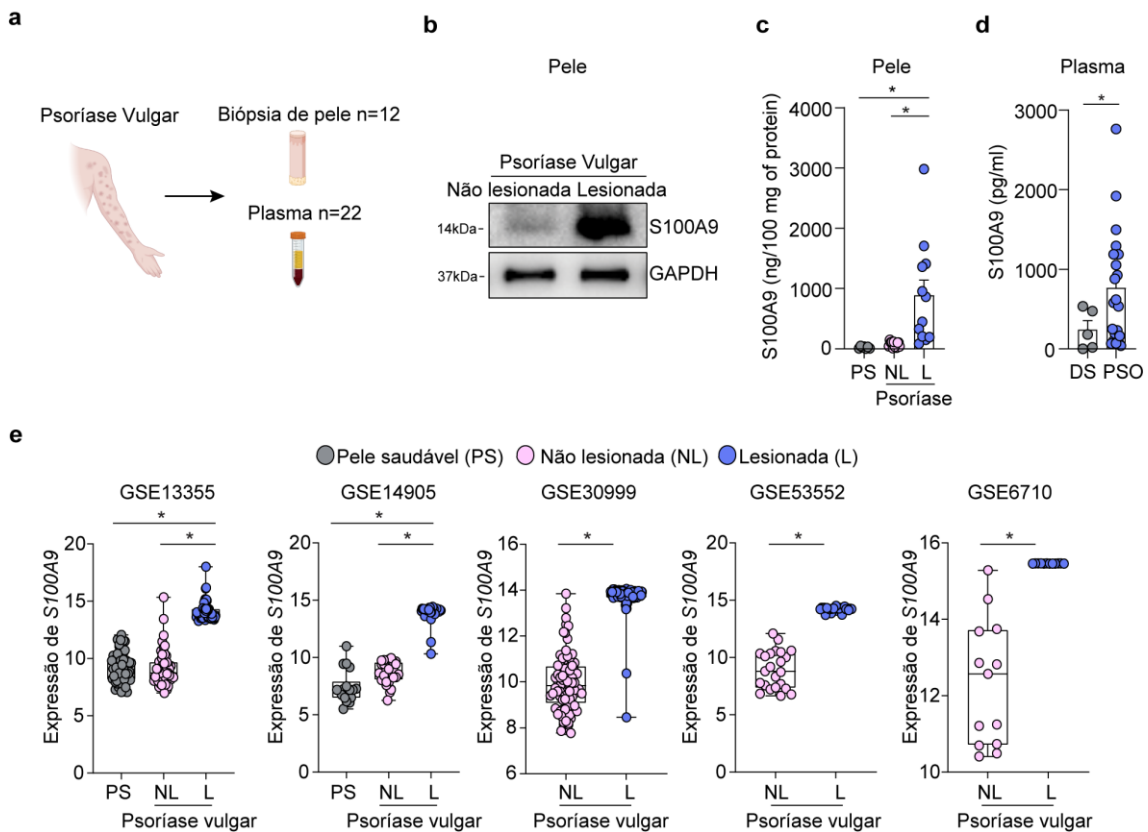
**Figura 10.** *S100A7*, *S100A8*, *S100A9* e *S100A12* estão entre os principais genes diferencialmente expressos na pele de pacientes com psoríase vulgar. (a) Blobograma representa os quinze genes mais regulados positivamente na via de peptídeos antimicrobianos entre pele lesionada e não lesionada de pacientes com psoríase do conjunto de dados GSE13355. (b) Meta-volcano da expressão gênica (Fold change log<sub>2</sub> versus valor de p ajustado de -log<sub>10</sub>) de diferentes bancos de dados de psoríase humana (GSE13355, GSE14905, GSE53552, GSE6710 e GSE30999). *S100A7*, *S100A8*, *S100A9* e *S100A12* são anotados.

### 5.3. A expressão de *S100A9* é induzida na lesão cutânea e no plasma de pacientes com psoríase vulgar

Ao identificar a assinatura gênica dominante na pele de pacientes com psoríase, buscamos validar muitos destes achados em amostras de pacientes com psoríase vulgar. Inicialmente, estabelecemos uma colaboração com a Divisão de Dermatologia do Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto, FMRP-USP, onde foi possível coletar amostras de pele e sangue oriundas de pacientes com



psoríase vulgar (PSO) e doadores saudáveis (DS) (**Figura 11a**). Corroborando as análises *in silico* prévias, observamos um aumento significativo da expressão de S100A9 na pele lesionada em comparação com a pele não lesionada do mesmo paciente com psoríase vulgar (**Figura 11b**). Seguindo esta direção, através de um método mais sensível, conseguimos quantificar o aumento da expressão de S100A9 na pele lesionada de pacientes com psoríase vulgar, comparando com pele não lesionada dos mesmos pacientes ou pele de indivíduos saudáveis (**Figura 11c**). Dando suporte a estes achados, identificamos nos mesmos bancos de dados públicos descritos anteriormente o aumento da expressão gênica de S100A9 na pele lesionada de pacientes com psoríase (**Figura 11e**). Notavelmente, não encontramos diferença significativa nos níveis de S100A9 entre pele não lesionada e pele de indivíduos saudáveis, o que demonstra que a expressão de S100A9 está confinada à regiões lesionadas com resposta inflamatória ativa (**Figura 11c**). Também notamos quantidades aumentadas de S100A9 no plasma de pacientes com psoríase em relação a doadores saudáveis, demonstrando que essa proteína está sendo liberada sistemicamente durante o curso inflamatório da psoríase (**Figura 11e**). Todos estes dados sugerem uma participação da proteína S100A9 na patogênese da psoríase.

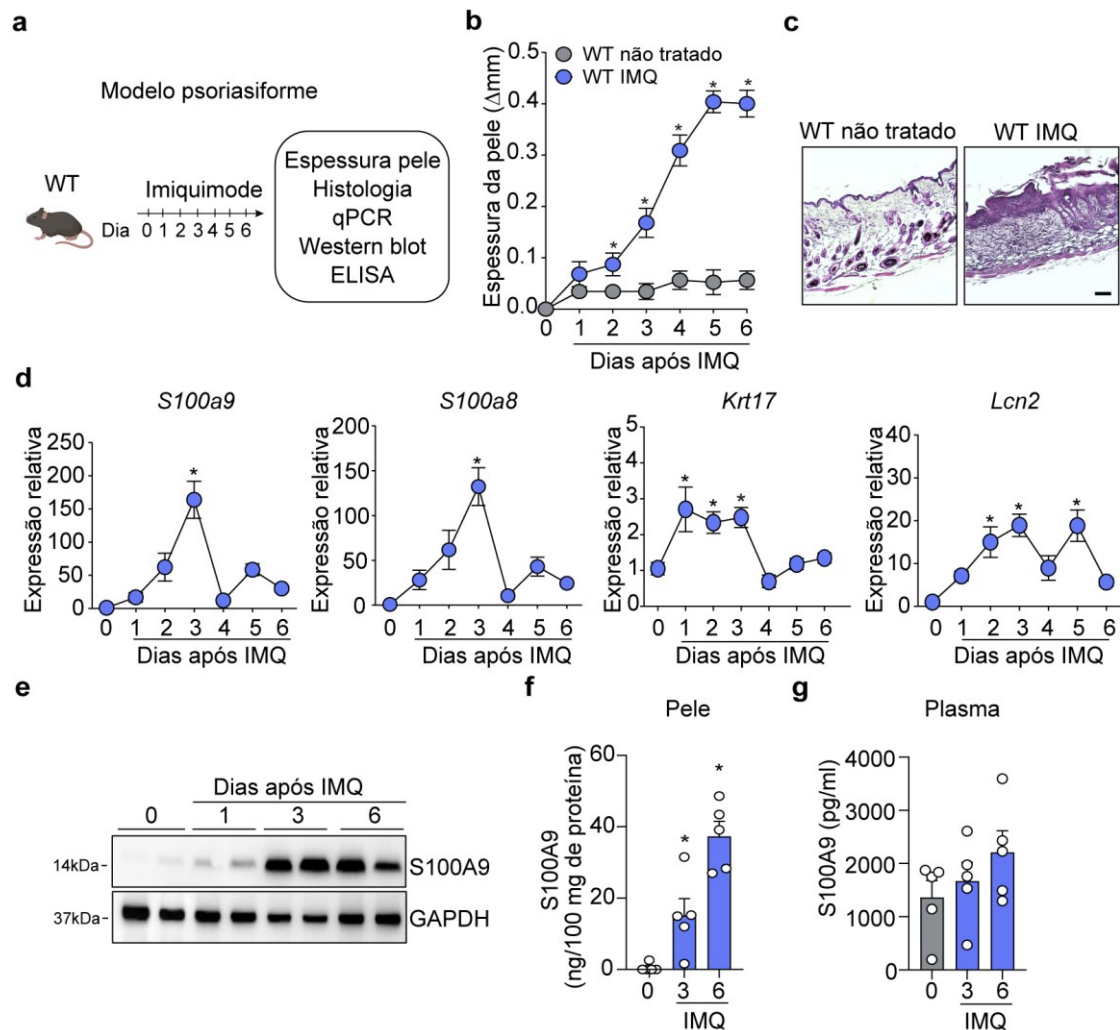


**Figura 11. A expressão de S100A9 é induzida na lesão cutânea e no plasma de pacientes com psoríase vulgar.** (a) Amostras de pele (n=12) e de sangue (n=22) foram coletadas de pacientes com psoríase vulgar. Amostras de pele, oriundas de regiões lesionadas (L) e não lesionadas (NL) foram coletadas com o uso de um punch, 4mm. Pele (n=7) e sangue (n=5) de indivíduos saudáveis foram coletados como controle. (b) Western blot da expressão de S100A9 no lisado total de pele lesionada ou não lesionada de um paciente com psoríase vulgar. (c) Expressão de S100A9 no lisado de pele lesionada (n=12) e não lesionada (n=12) de pacientes com psoríase vulgar e pele saudável (PS) (n=7), quantificado por ELISA. (d) Níveis plasmáticos de S100A9 oriundos de doadores saudáveis (DS) (n=5) e pacientes com psoríase vulgar (PSO) (n=22) dosados por ELISA. (e) Os gráficos em barra representam a expressão de S100A9 entre indivíduos saudáveis, pele lesionada e não lesionada de pacientes com psoríase, de cinco bases de dados de psoríase humana (GSE13355, 14905, 30999, 53552 e 6710). A significância estatística foi avaliada pelo teste *t* de Student não pareado em c, d e e.  $P < 0,05$  (\*) foi considerado estatisticamente significativo.

#### 5.4. A expressão de S100A9 é induzida e assim exacerba a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme

Para explorar o papel de S100A9 na patogênese da psoríase, utilizamos o modelo de inflamação psoriasiforme induzido por imiquimode 5% (IMQ), agonista de TLR7/8 (VAN DER FITS et al., 2009a). O modelo consiste na aplicação tópica de IMQ diretamente na pele de camundongos previamente depilados. Esse modelo mimetiza muitas características observadas na psoríase

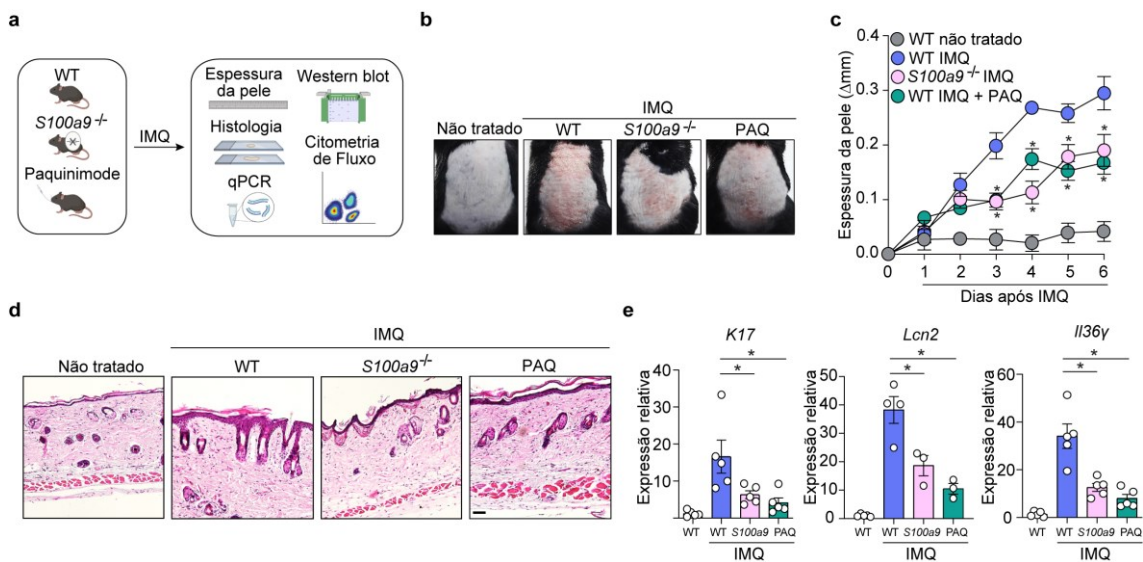
em humanos, como hiperproliferação de queratinócitos, aumento de infiltrado inflamatório na derme e resposta inflamatória dependente do eixo IL-23/IL17a (VAN DER FITS et al., 2009b). A princípio, utilizamos o modelo para avaliar a expressão de S100A9. A ilustração do modelo e análises realizadas estão ilustradas (**Figura 12a**). Após aplicação tópica de IMQ, notamos o aumento da espessura da pele, dia após dia, comparado ao grupo sem tratamento cutâneo com IMQ (**Figura 12b**). Além disso, observamos um aumento do infiltrado inflamatório na derme, aumento da espessura da epiderme, com proliferação massiva de queratinócitos, avaliados por coloração com hematoxilina e eosina (H&E) (**Figura 12c**). Assim como observado em pacientes com psoríase, há um aumento da expressão gênica de *S100a9* na pele após aplicação de tópica de IMQ. Também constatamos o aumento da expressão de outros genes associados com ativação e proliferação de queratinócitos, tais como *S100a8*, *Krt17* e *Lcn2* (**Figura 12d**). Combinando diferentes técnicas, observamos que a expressão proteica de S100A9 é massivamente aumentada na pele, mas não no plasma, de camundongos WT após aplicação tópica de IMQ (**Figura 12e-g**).



**Figura 12. A expressão de S100A9 é induzida na pele em modelo psoriasiforme.** Camundongos WT (C57BL/6) previamente depilados foram tratados topicamente com IMQ 5% diariamente antes das análises. Camundongos WT não tratados foram utilizados como controle. (a) Ilustração esquemática do modelo psoriasiforme e das análises realizadas. (b) Cinética da alteração da inflamação ( $\Delta$ ) na pele do dorso, medida com um paquímetro. (c) Imagens representativas de cortes de pele do dorso coradas por H&E adquiridas com objetiva de 20x. Barras de escala, 100  $\mu$ m. (d) Níveis de expressão relativa de RNAm de *S100a9*, *S100a8*, *Krt17* e *Lcn2* normalizados pelo *Gapdh*, nos lisados de pele total de camundongos WT, avaliado por qPCR. (e) Western blot da expressão de S100A9 nos lisados de pele inteira de camundongos WT pós IMQ. Adaptado de Silva de Melo, Bruno Marcel. *Alarmina S100A9: um mediador crítico no desenvolvimento da psoríase*. 2017. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. (f) Quantificação da expressão proteica de S100A9 por ELISA na pele e no (g) plasma 3 e 6 dias após aplicação tópica de IMQ. Os gráficos representam a média  $\pm$  SEM de dados obtidos de 2-3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com o teste de comparação múltipla de bonferroni em b e ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni em d, f e g.  $P < 0,05$  (\*) foi considerado estatisticamente significativo.

Para investigar o papel funcional de S100A9 no curso inflamatório do modelo psoriasiforme induzido por IMQ, utilizamos camundongos geneticamente deficientes para S100A9 (*S100a9*<sup>-/-</sup>) e camundongos WT tratados com

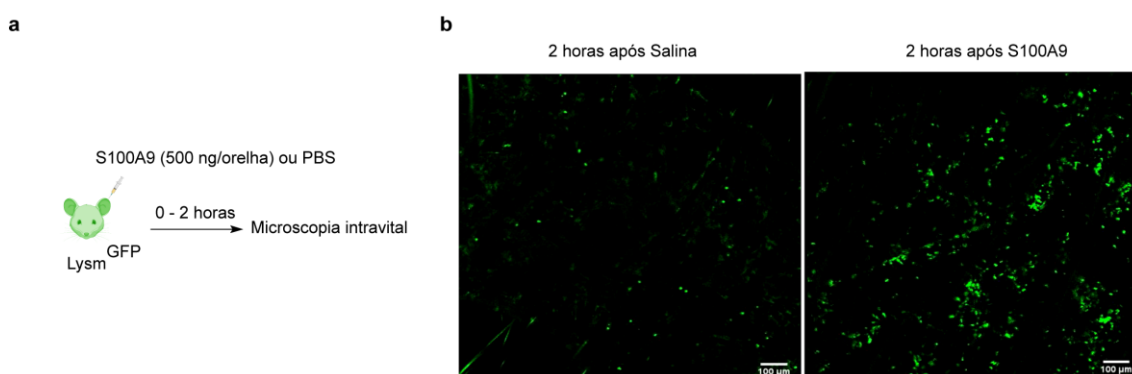
paquinimod (PAQ) (**Figura 13a**), um agente farmacológico que bloqueia as ações biológicas de S100A9 (Björk et al. . 2009). Em comparação com os camundongos WT, tanto os camundongos tratados com PAQ quanto os *S100a9*<sup>-/-</sup> apresentaram um processo inflamatório atenuado, com redução da inflamação macroscópica (**Figura 13b**), bem como diminuição da espessura da pele do dorso (**Figura 13c**), após a aplicação tópica de IMQ (**Figura 13e-f**). Nesta mesma linha, a inibição farmacológica ou ablação genética de S100A9 também diminuiu a espessura da epiderme, avaliada por coloração de H&E (**Figura 13d**). Além disso, também observamos uma redução da expressão de vários genes classicamente associados à ativação de queratinócitos e inflamação nesse modelo psoriasiforme, como *Krt17*, *Lcn2* e *I136γ* (**Figura 13e**). Examinados em conjunto, estes dados demonstram que S100A9 é abundantemente expressa na pele murina e desempenha um papel crítico na manutenção da inflamação de pele induzida por IMQ.



de dados obtidos de 2-3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com o teste de comparação múltipla de bonferroni em c e ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni em e.  $P < 0,05$  (\*) foi considerado estatisticamente significativo.

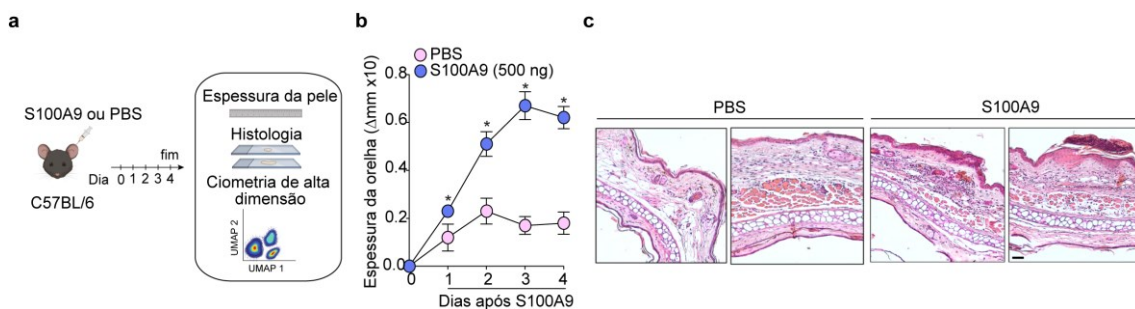
### 5.5. S100A9 *per se* induz inflamação psoriasiforme

Dada a evidência do efeito pró-inflamatório de S100A9, levantamos a hipótese de que S100A9 *per se* poderia induzir diretamente alterações psoriasiformes na pele. Para isto, combinamos diversas abordagens para avaliar os efeitos de S100A9 na resposta inflamatória cutânea. Utilizamos inicialmente um modelo de injeção intradérmica de S100A9 na orelha (500 ng), em camundongos Lysm-GFP (**Figura 14a**) e avaliamos os efeitos agudamente. Após injeção intradérmica de S100A9, surpreendentemente, podemos notar uma transmigração rápida e massiva de células Lysm-GFP para o tecido durante duas horas após injeção de S100A9 intradérmica, em comparação com os camundongos que receberam somente injeção de PBS (**Figura 14b**), demonstrando assim que S100A9 induz um processo inflamatório ativo na pele agudamente.



**Figura 14. S100A9 induz o acúmulo massivo de células Lysm<sup>+</sup> na pele agudamente.** (a e b) PBS ou S100A9 (500 ng/orelha) foram injetados intradérmicamente na orelhas (10-15 µl) de camundongos Lysm-GFP e avaliadas durante duas horas por microscopia intravital. (a) Ilustração esquemática da estratégia do experimento. (b) Foto juntando todos os tempos, durante 2 horas após injeção intradérmica de S100A9 ou PBS na orelha, avaliada por microscopia intravital.

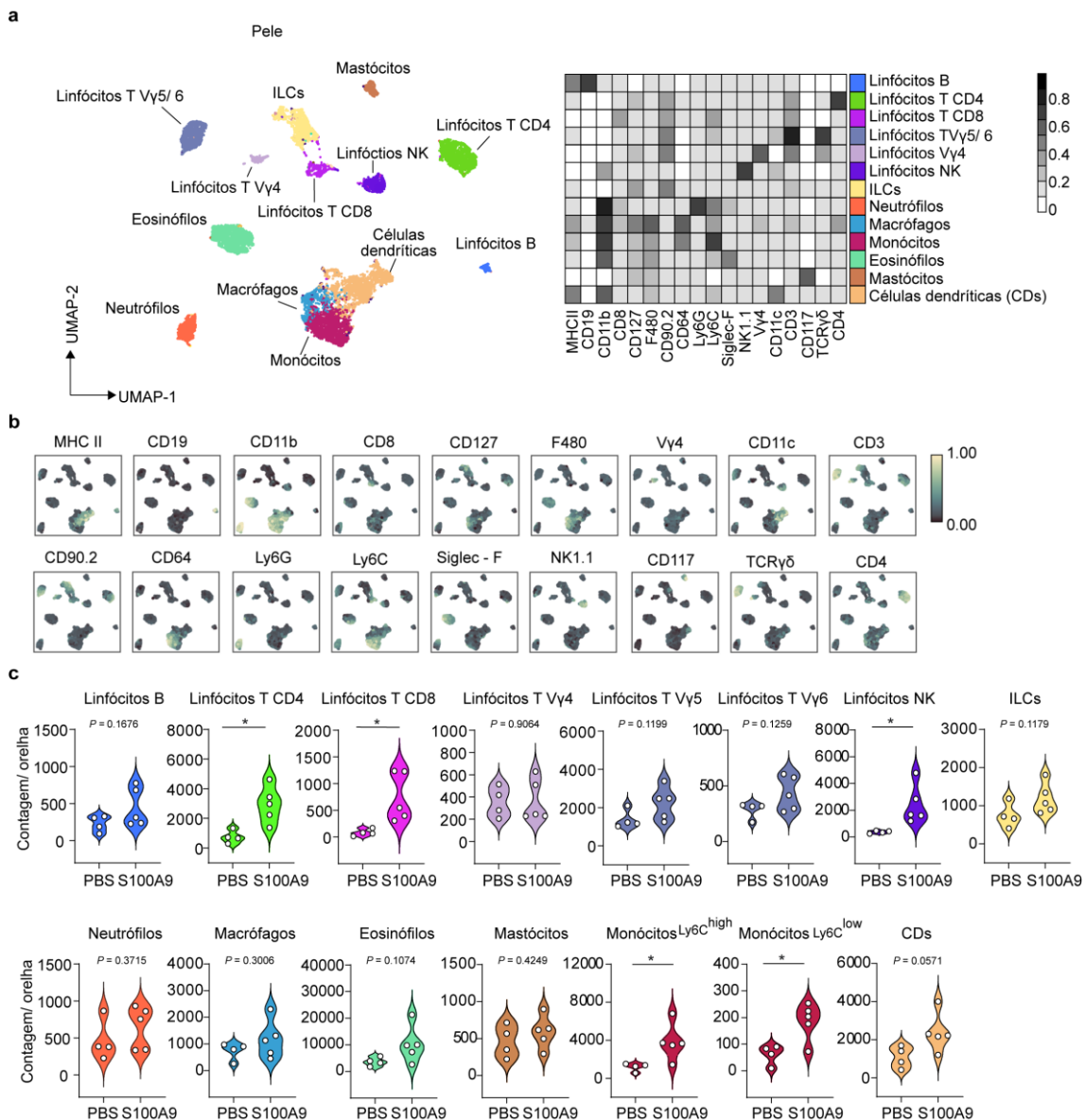
Neste contexto, para avaliar os efeitos de S100A9 na resposta inflamatória cutânea em períodos mais tardios, estabelecemos um modelo de injeção diária de S100A9 intradermal por quatro dias consecutivos. Assim, avaliamos a espessura, aspectos histopatológicos e a resposta celular na pele e linfonodos drenantes da pele, por citometria de fluxo de alta dimensão (**Figura 15a**). Nodatamente, a injeção intradermal de S100A9 induz o aumento da espessura da orelha (**Figura 15b**), bem como o acúmulo de células inflamatórias na derme, e aumento significativo da espessura da epiderme, comparado ao grupo que recebeu apenas PBS (**Figura 15c**).



**Figura 15. A injeção intradermal de S100A9 induz inflamação na pele semelhante à psoríase.** (a e b) PBS ou S100A9 (500 ng/orelha) foram injetados intradermal na orelhas (10-15 ul) de camundongos WT durante 4 dias. (a) Ilustração esquemática da estratégia do experimento. (b) Cinética da alteração da espessura (delta) na pele do dorso, medida com um paquímetro. (c) Imagens representativas de cortes de pele da orelha coradas com H&E adquiridas com objetiva de 20x. Barras de escala, 100 μm. O gráfico representa a média ± SEM de dados obtidos de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com o teste de comparação múltipla de bonferroni em b.  $P < 0,05$  (\*) foi considerado estatisticamente significativo.

Para melhor caracterizar o perfil da resposta inflamatória após injeção intradermal de S100A9, utilizamos citometria de fluxo de alta dimensão, que nos permitiu compreender de maneira integrada e não enviesada o papel de S100A9 na pele e linfonodos drenantes da pele. Quatro dias após injeções intradermais de S100A9 ou PBS, através de mapeamento de célula única, aplicando a redução de dimensionalidade usando UMAP (Projeção e aproximação de manifold uniforme) (Mcinnnes et al. 2020), em conjunto com o agrupamento

FlowSOM (Van Gassen et al. 2015), identificamos dentro do compartimento CD45<sup>+</sup> treze clusters de células na pele (**Figura 16a-b**) e nove clusters nos linfonodos drenantes da pele (**Figura 16a-b**), entre células mielóides e linfóides, que foram distinguidos pela expressão mediana dos marcadores representados no heatmap e UMAP com as sobreposições (**Figura 16a-b**).

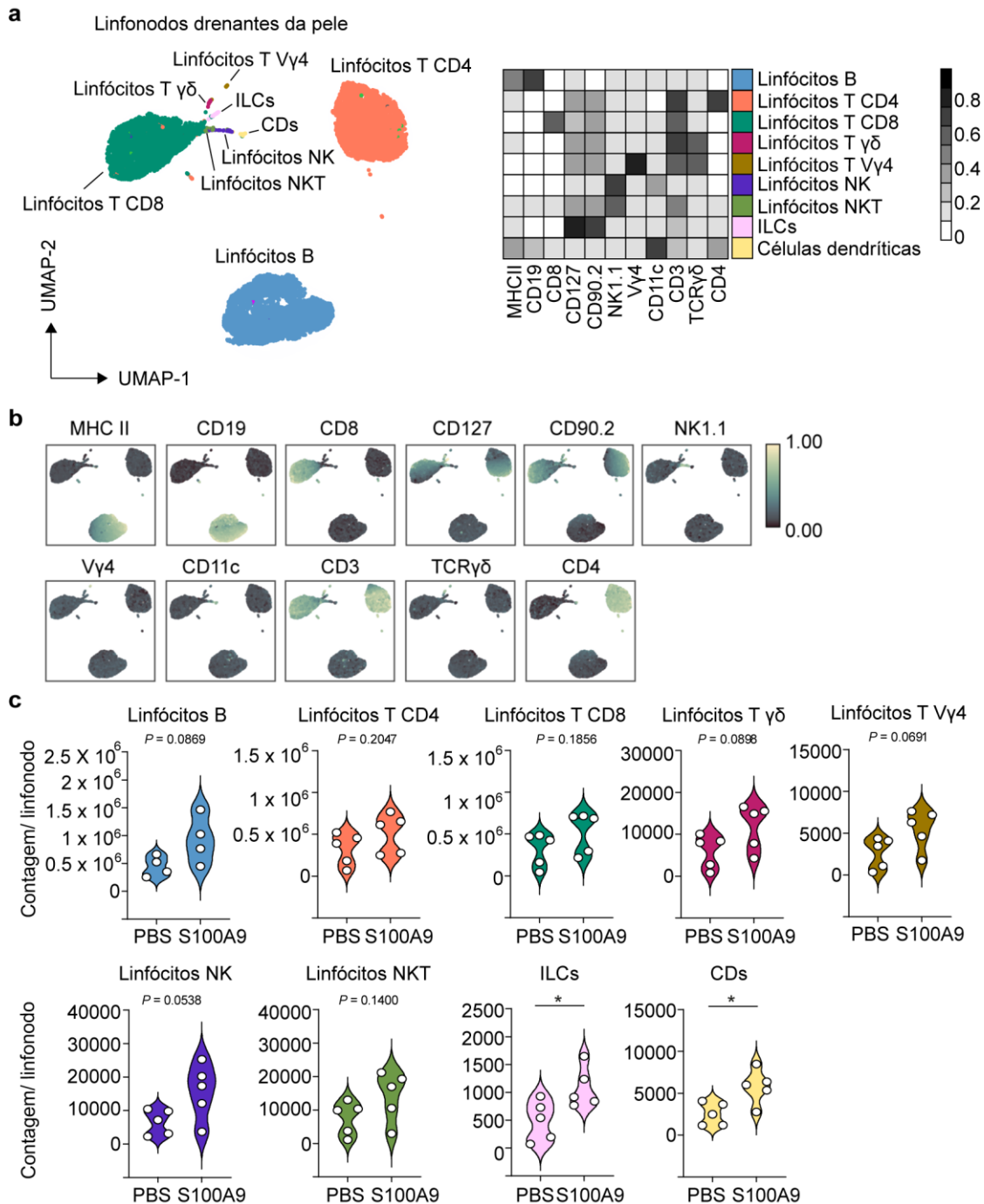


**Figura 16. A injeção intradermal de S100A9 induz o aumento cutâneo de linfócitos T CD4, T CD8, linfócitos NK e monócitos.** Disposição de populações de células imunes CD45<sup>+</sup> de orelhas de camundongos WT após 4 dias de injeção intradermal de PBS ou S100A9 (500ng/orelha), avaliado por citometria de fluxo de alta dimensão. (a) UMAP com agrupamento FlowSOM sobreposto e heatmap correspondente, demonstrando o nível de expressão do marcador relativo entre as populações de células identificadas. (b) Valores da mediana da expressão dos marcadores sobrepostos, apresentados no UMAP. (c) Números de células CD45<sup>+</sup> avaliadas por citometria de fluxo de alta dimensão. O gráfico representa a média ± SEM de dados



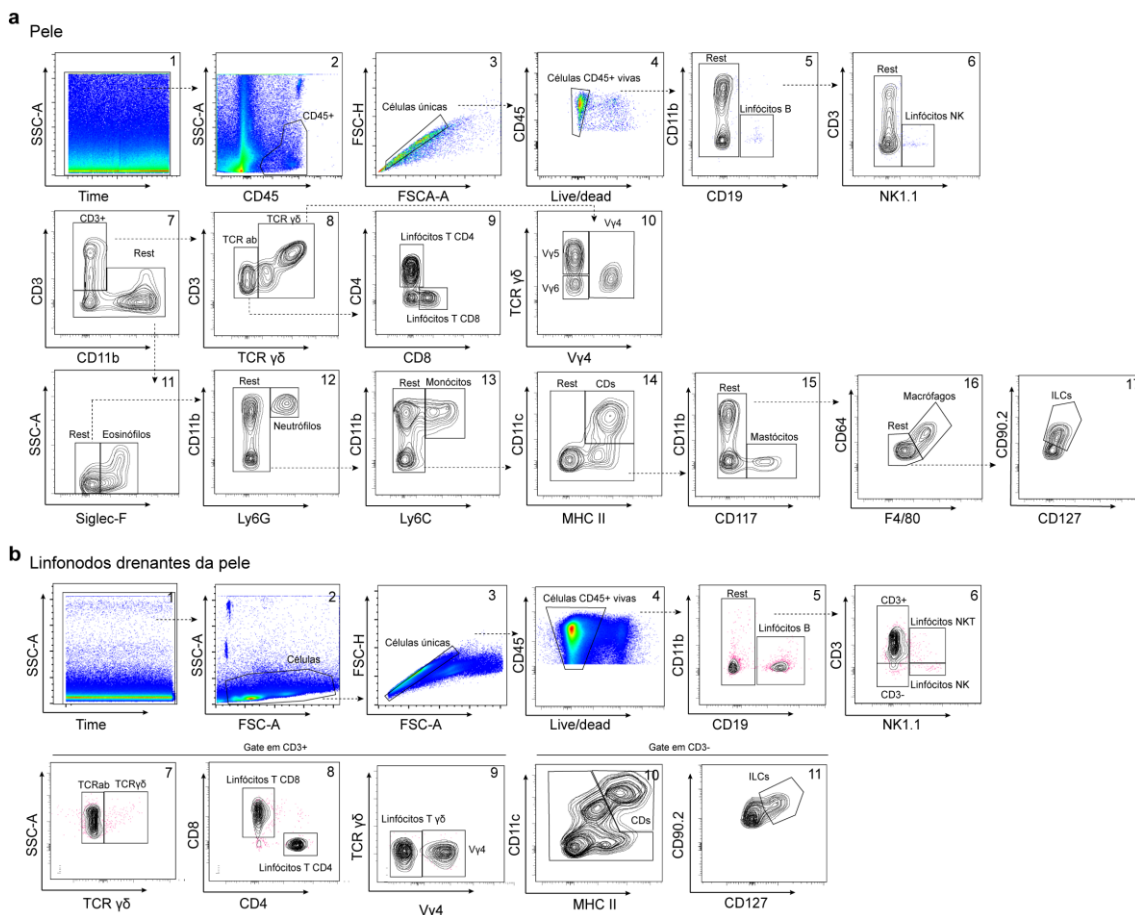
obtidos de 2 experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada pelo teste *t* de Student não pareado em c.  $P < 0,05$  (\*) foi considerado estatisticamente significante.

Curiosamente, notamos o aumento no número total de linfócitos T CD4, T CD8 , linfócitos NK, monócitos Ly6C<sup>high</sup> e Ly6C<sup>low</sup> na pele, quatro dias após injeções intradermais de S100A9, em comparação com os animais que receberam apenas injeção de PBS (**Figura 16c**). Também verificamos o aumento de ILCs e células dendríticas nos linfonodos drenantes da pele (**Figura 17**). Em conjunto, nossos dados reforçam o papel inflamatório de S100A9 na inflamação de pele e demonstra que S100A9 per se é suficiente para induzir um processo inflamatório ativo, além do acúmulo de células inflamatórias na derme e aumento da espessura da epiderme, que tem semelhanças histopatológicas próximas da psoríase.



**Figura 17. A injeção intradérmica de S100A9 induz o acúmulo de ILCs e células dendríticas nos linfonodos drenantes da pele.** Disposição de populações de células imunes CD45<sup>+</sup> dos linfonodos drenantes da pele de camundongos WT após 4 dias de injeção intradérmica de PBS ou S100A9 (500ng/orelha), avaliado por citometria de fluxo de alta dimensão. (a) UMAP com agrupamento FlowSOM sobreposto e heatmap correspondente demonstrando o nível de expressão do marcador relativo entre as populações de células identificadas. (b) Valores de expressão mediana dos marcadores sobrepostos apresentados no UMAP. (c) Números de células CD45<sup>+</sup> avaliadas por citometria de fluxo de alta dimensão. O gráfico representa a média  $\pm$  SEM de dados obtidos de 2 experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada pelo teste *t* de Student não pareado em c.  $P < 0,05$  (\*) foi considerado estatisticamente significativo.

Inicialmente, utilizamos a análise de algoritmo guiada para identificar o maior número de clusters possíveis na pele e linfonodos, de uma maneira integrada e desviesada, porém, não foi possível separar algumas populações através desta estratégia, devido a limitação dos marcadores que foram utilizados no painel mostrado. Para superar isto, utilizamos a estratégia de gate manual que nos possibilitou identificar e quantificar o número absoluto de algumas populações, a exemplo dos linfócitos T  $\gamma\delta$  dos tipos 5 e 6 na pele, que não puderam ser segregados no UMAP, mas que foi possível segregar através de estratégia de gate manual (**Figura 18a**). Todas as contagens de número absoluto de pele e linfonodo mostradas ao longo dessa tese foram realizadas através de gate manual (**Figura 18a-b**).



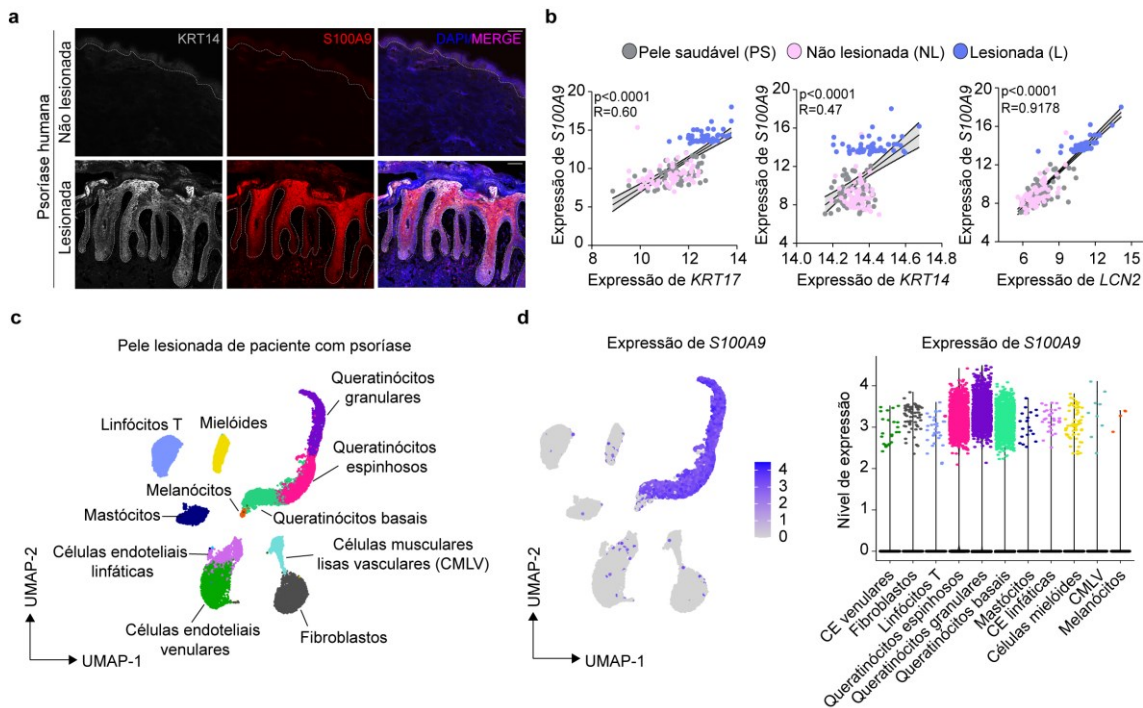
**Figura 18. Estratégia de gate para as análises no UMAP e citometria de fluxo.** (a) Estratégia de gate representativas para células CD45<sup>+</sup> vivas na pele. (b) Estratégias de gate representativas

para células CD45<sup>+</sup> vivas nos linfonodos drenantes da pele. Todas as análises foram realizadas através do software Flowjo X.

## 5.6. Queratinócitos são a principal fonte de S100A9 na psoríase

Levando em consideração os dados prévios do aumento da expressão de S100A9 na pele lesionada de pacientes com psoríase, utilizamos diferentes abordagens para investigar quais células seriam a principal fonte de S100A9 na psoríase humana. Através de análises de imunofluorescência, corroborando os dados anteriores, que demonstram que a expressão de S100A9 está confinada apenas na lesão cutânea, em comparação com a pele não lesionada do mesmo paciente com psoríase, observamos o aumento da expressão de S100A9 em células inflamatórias que infiltram a derme na pele lesionada de pacientes com psoríase, porém a expressão massiva de S100A9 é observada principalmente na epiderme, onde é co-expressa com queratina 14 (KRT14), um marcador clássico de ativação de queratinócitos (**Figura 19a**). Seguindo esta linha, a análise de um conjunto de dados transcriptômicos de pele de pacientes com psoríase (NAIR et al., 2009) revelou uma correlação positiva entre a expressão de S100A9 e genes associados à ativação e proliferação de queratinócitos, como KRT17, KRT14 e LCN2 na pele lesionada, em comparação com pele não lesionada e pele saudável (**Figura 19b**). Para melhor identificar a fonte celular de S100A9 na psoríase, reanalisamos dados de sequenciamento de RNA de células únicas (scRNA-seq) oriundos de pele lesionada de pacientes com psoríase vulgar (HUGHES et al., 2020), que nos permitiu identificar diferentes compartimentos celulares na pele lesionada de pacientes com psoríase (**Figura 19c**). Suportando os dados descritos anteriormente, descobrimos que os queratinócitos de todas as camadas da pele (basal, espinhosa e granular) representam o tipo de célula que predominantemente expressa S100A9 na pele

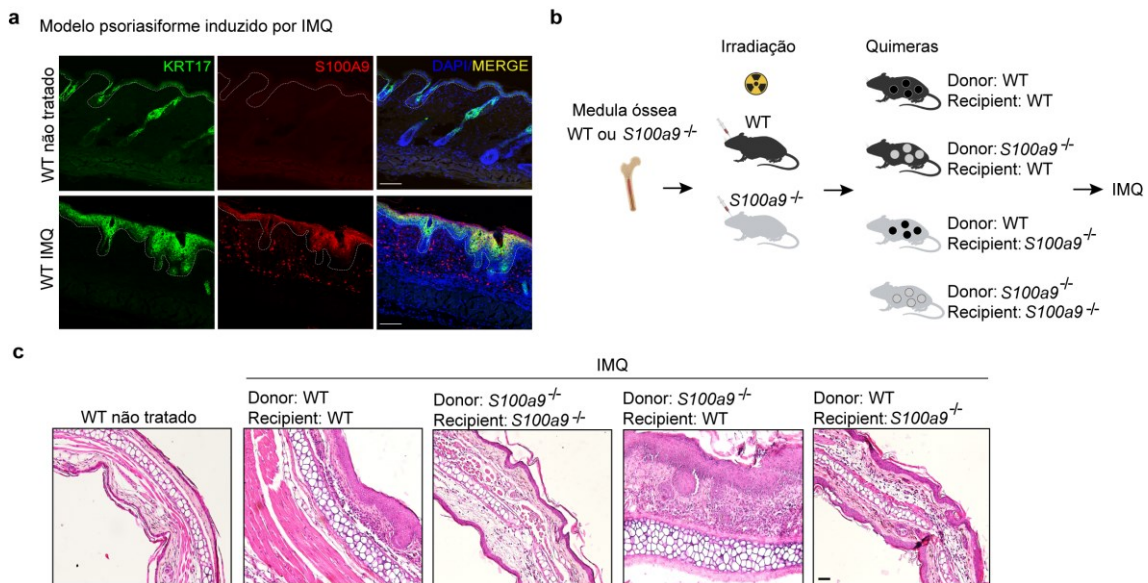
lesionada de pacientes com psoríase (**Figura 19d**). Uma baixa frequência da expressão de *S100A9* foi detectada em células mielóides, fibroblastos, células endoteliais linfáticas, linfócitos T, células endoteliais venulares, mastócitos, células musculares lisas vasculares (VSMCs) e melanócitos (**Figura 19d**).



**Figura 19. Queratinócitos são a principal fonte de S100A9 na pele lesionada de pacientes com psoríase.** (a) Imagens de imunofluorescência com marcação para KRT17 (verde), S100A9 (vermelho) e DAPI (azul) de pele lesionada e não lesionada de paciente com psoríase foram adquiridas com microscópio confocal multifotom LSM 800 (Carl Zeiss Microscopy) e analisadas utilizando o software Fiji do imageJ. Barra de escala, 100 μm. (b) Correlação entre S100A9 e KRT17, KRT14, e LCN2 em pele de indivíduos saudáveis e pele lesionada e não lesionada de pacientes com psoríase oriundas do banco de dados publico GSE13355. (c) Análise de scRNAseq representando diferentes compartimentos de células da pele lesionada de psoríase humana oriundas do bando de dado GSE150672. Gráfico UMAP apresentando todos os clusters identificados na pele lesionada de psoríase humana. (d) Expressão e quantificação de S100A9 entre todos os clusters que foram identificados. O valor de P e o coeficiente de correlação (r) foram obtidos por meio do teste não paramétrico de correlação de postos de Spearman em b.

Assim como na pele humana, percebemos uma menor expressão de S100A9 em células que infiltram a derme, mas uma expressão predominante de S100A9 confinada à epiderme e co-expressa com KRT17 na pele de camundongos após aplicação tópica de IMQ (**Figura 20a**). Para avaliar a fonte de S100A9 responsável pelos efeitos pró-inflamatórios observados no modelo

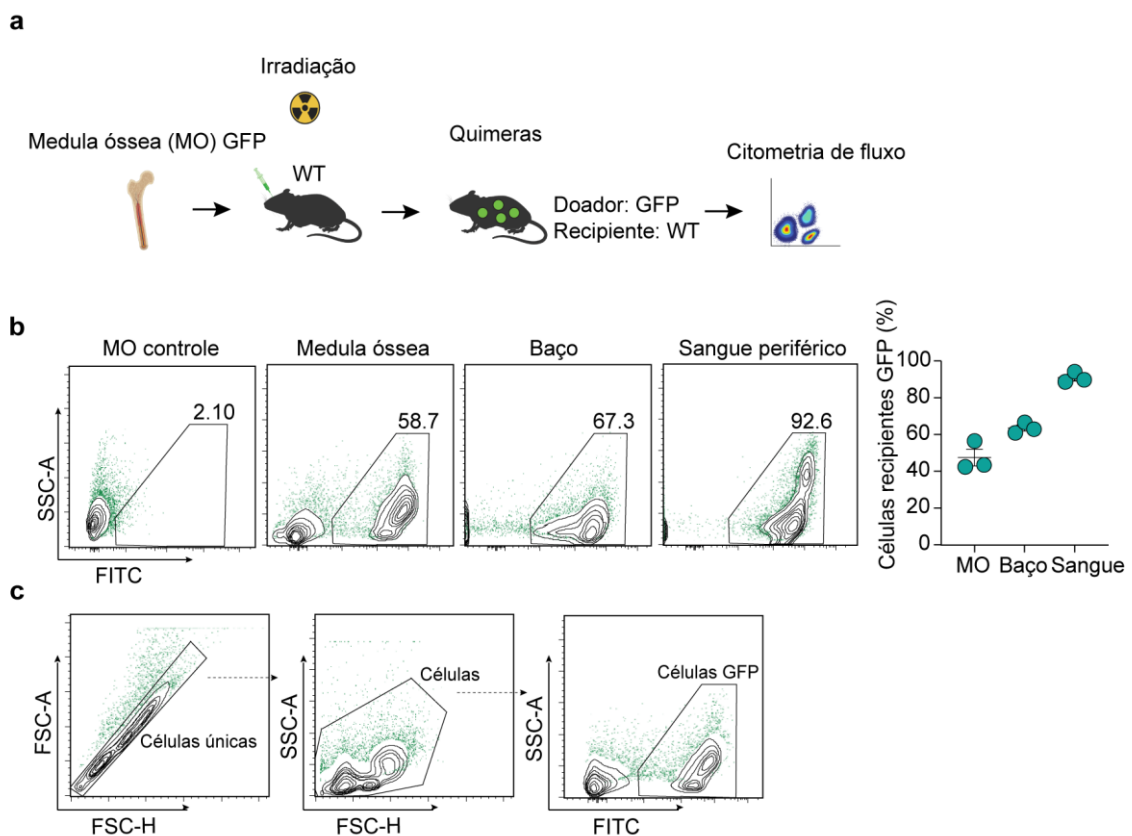
psoriasiforme, decidimos produzir animais quiméricos entre camundongos WT e *S100a9*<sup>-/-</sup>. Transferimos células da medula óssea isoladas de camundongos WT ou *S100a9*<sup>-/-</sup> para camundongos WT ou *S100a9*<sup>-/-</sup> irradiados letalmente, e induzimos inflamação psoriasiforme nos camundongos quiméricos 8 semanas após o transplante de medula (**Figura 20b**). Camundongos quiméricos *S100a9*<sup>-/-</sup> recipientes apresentaram uma redução da resposta inflamatória psoriasiforme, independente dos genótipos das células da medula óssea do doador (**Figura 20c**). Em conjunto, nossos dados demonstram que os queratinócitos são a fonte predominante de S100A9 na pele de pacientes com psoríase e na pele murina em modelo psoriasiforme induzido por IMQ, e que S100A9 derivado de células não hematopoiéticas agrava a inflamação de pele neste modelo de psoríase experimental.



**Figura 20. S100A9 derivado de células não hematopoiéticas agrava a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme.** Camundongos WT receberam tratamento com IMQ durante 6 dias consecutivos. Camundongos não tratados foram utilizados como controle. (a) Imagens de imunofluorescência com marcação para KRT17 (verde), S100A9 (vermelho) e DAPI (azul) foram adquiridas com microscópio confocal multifotão LSM 800 (*Carl Zeiss Microscopy*) e analisadas utilizando o software *Fiji* do *imageJ*, na pele de camundongos após aplicação tópica de IMQ. Barra de escala, 50  $\mu$ m. (b) Detalhamento esquemático da geração de camundongos quiméricos. Camundongos WT ou *S100a9*<sup>-/-</sup> de 10 semanas foram irradiados e em seguida reconstituídos com medula óssea oriundas de camundongos WT ou *S100a9*<sup>-/-</sup>. Após 2 meses, esses camundongos foram submetidos ao protocolo de psoriasiforme induzido por IMQ. (c) Imagens representativas de cortes histológicos de pele de camundongos quiméricos após aplicação tópica

de IMQ da orelha, corados com H&E e adquiridos com a objetiva de 20x. Barras de escala, 100  $\mu$ m.

Para avaliar a eficiência do transplante de células dos animais quiméricos produzidos, realizamos a transferência de células da medula óssea de camundongos GFP totais para camundongos WT previamente irradiados sob as mesmas condições mencionadas anteriormente. O repovoamento das células foi avaliado em diferentes órgãos por citometria de fluxo (**Figura 21a**). Dois meses após o transplante, as células GFP repopulam diferentes compartimentos dos camundongos WT transplantados, entre eles a medula óssea (MO), baço e sangue (**Figura 21b**), demonstrando que a geração dos animais quiméricos foi eficiente. A estratégia de gate para avaliar as células GFP transplantadas nos diferentes órgãos de animais é mostrada (**Figura 21c**).



**Figura 21. Células GFP transplantadas repopulam diferentes compartimentos em camundongos WT irradiados.** (a) Detalhamento esquemático da reconstituição de células da medula óssea GFP nos camundongos WT irradiados. (b) Análise da frequência de células GFP na medula óssea, baço e sangue periférico, dois meses após o transplante em animais WT

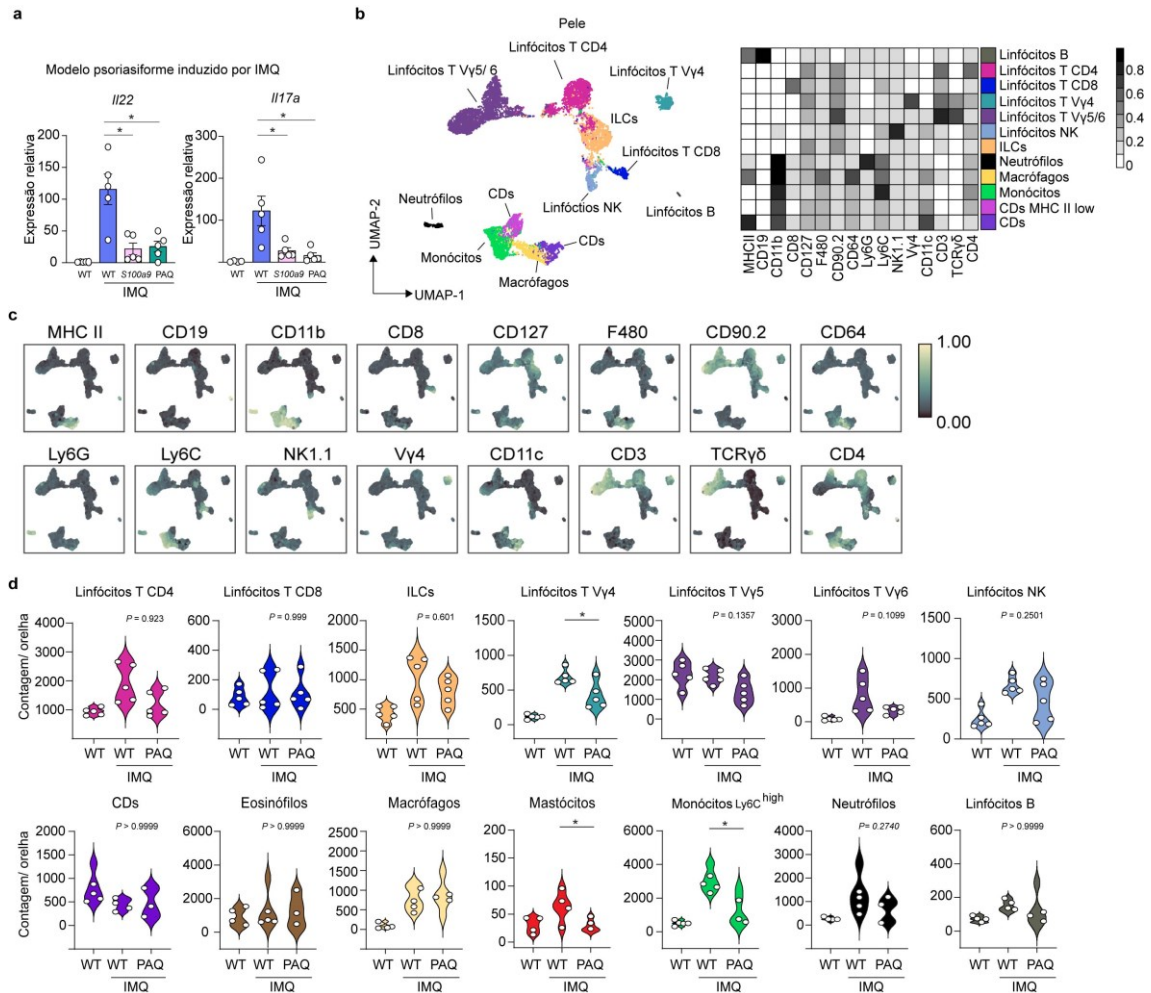
irradiados, analisados por citometria de fluxo. (c) Estratégia de gate para avaliar as células GFP nos camundongos WT irradiados/transplantados.

### **5.7. S100A9 induz a cronificação da inflamação psoriasiforme através do aumento cutâneo da imunidade do tipo 3**

Logo em seguida, procuramos identificar o(s) mecanismo(s) responsável(is) pelos efeitos pró-inflamatórios de S100A9 no modelo psoriasiforme induzido por IMQ. Para isto, primeiramente analisamos a expressão de citocinas centrais para o desenvolvimento e manutenção da psoríase no modelo, como IL-17A e IL-22 (GRIFFITHS et al., 2021a), na ausência ou bloqueio farmacológico de S100A9. Interessantemente, notamos que a ausência genética ou bloqueio farmacológico de S100A9 limita a expressão de *Il17a* e *Il22* na pele, em comparação com o grupo WT após aplicação tópica de IMQ (**Figura 22a**). Estes dados nos levaram a investigar quais populações produtoras de IL-17A e IL-22 poderiam estar sendo afetadas por S100A9. Para ter uma visão panorâmica da resposta inflamatória da pele, utilizamos citometria de fluxo espectral de alto parâmetro, e assim analisamos as principais alterações na resposta imune celular cutânea no modelo psoriasiforme induzido por IMQ após o bloqueio farmacológico de S100A9. A análise guiada por algoritmo identificou doze clusters de células na pele (**Figura 22b-c**) dentro do compartimento hematopoiético, entre células linfóides e mielóides, que foram distinguidas pela expressão mediana dos respectivos marcadores representados no heatmap e no UMAP com as sobreposições (**Figura 22b-c**). Em concordância à redução da inflamação psoriasiforme em camundongos tratados farmacologicamente com PAQ, detectamos uma redução substancial no número total de monócitos Ly6C<sup>high</sup> e mastócitos na pele (**Figura 22d**). Além disso, notavelmente, podemos observar que entre todo o



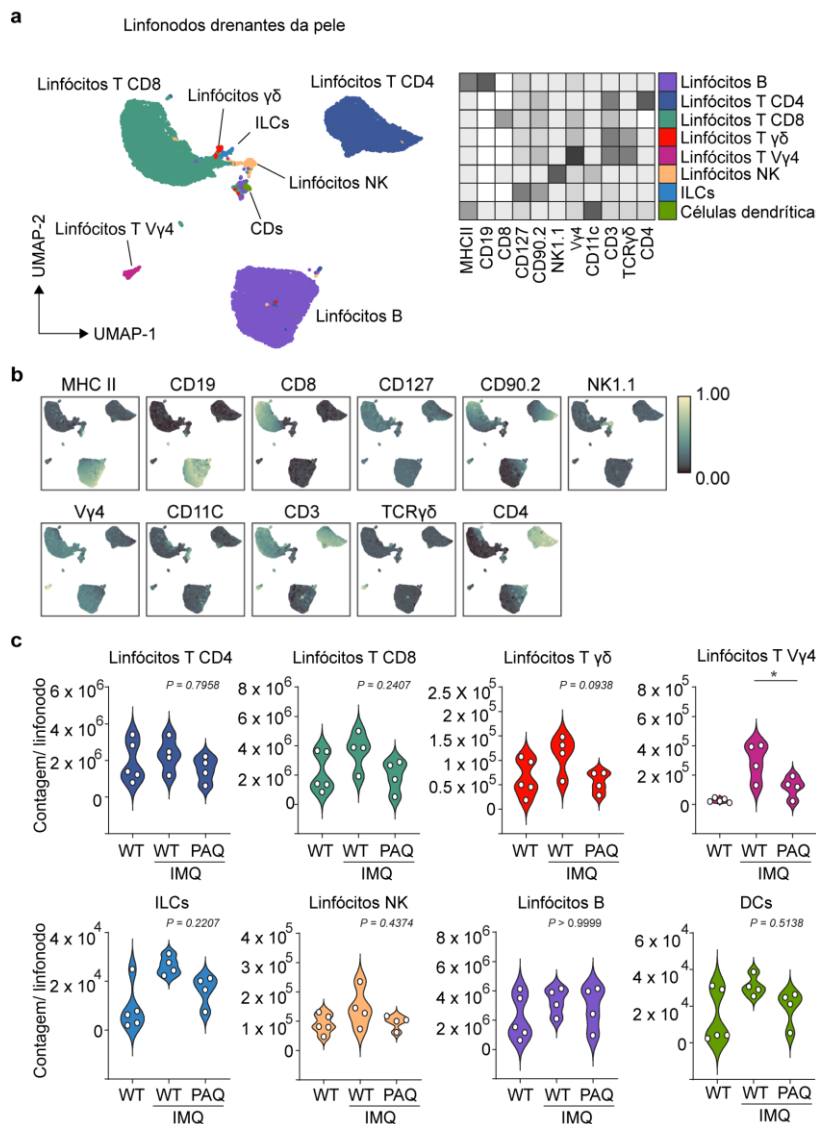
compartimento linfóide produtor de IL-17A e IL-22, os linfócitos T V $\gamma$ 4 são a única população afetada, com redução significativa do número total, após bloqueio farmacológico com PAQ (Figura 22d).



**Figura 22. S100A9 sustenta o acúmulo de linfócitos T V $\gamma$ 4, monócitos e mastócitos na pele em modelo psoriasiforme.** (a-d) Camundongos WT, *S100a9*<sup>-/-</sup> e WT-PAQ receberam tratamento tópico com IMQ antes das análises. Camundongos não tratados com IMQ foram utilizados como controles. (a) Níveis de expressão relativa de RNAm de *Il22* e *Il17a*, normalizados pelo *Gapdh*, nos lisados de pele inteira de camundongos WT, *S100a9*<sup>-/-</sup> e WT-PAQ avaliado por qPCR. (b) Disposição de populações de células imunes CD45<sup>+</sup> na orelha de camundongos WT e WT-PAQ 5 dias após aplicação tópica de IMQ, analisado por citometria de fluxo de alta dimensão. UMAP com agrupamento FlowSOM sobreposto e heatmap correspondente demonstrando o nível de expressão do marcador relativo entre as populações de células identificadas. (c) Valores da mediana da expressão dos marcadores sobrepostos, apresentados no UMAP. (d) Números de células CD45<sup>+</sup> avaliadas por citometria de fluxo. Os gráficos representam a média  $\pm$  SEM de dados obtidos de 2 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni em a e d.  $P < 0,05$  (\*) foi considerado estatisticamente significativo.

Além da resposta inflamatória cutânea, buscamos compreender de que forma S100A9 poderia modular a resposta inflamatória nos linfonodos drenantes

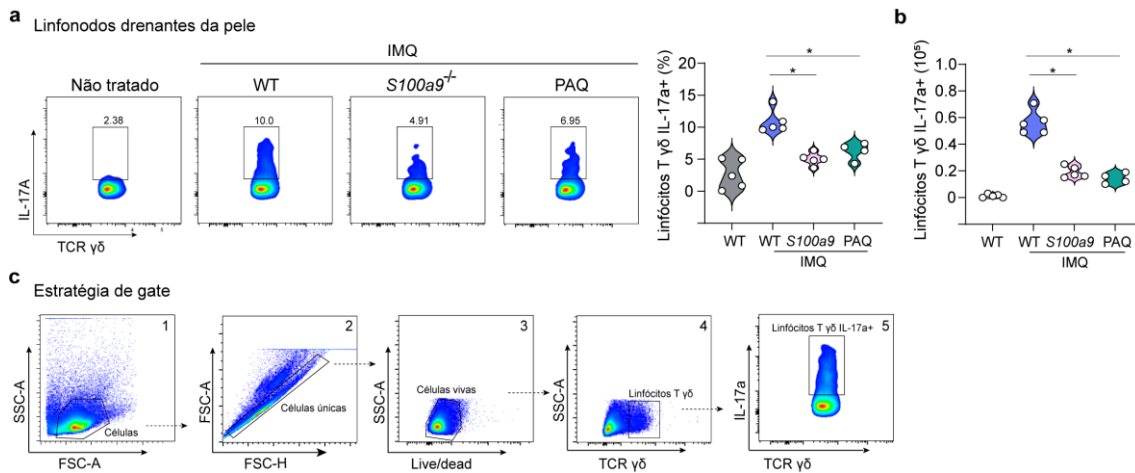
da pele após aplicação tópica de IMQ na pele. Através de análise guiada por algoritmo, identificamos oito clusters de células nos linfonodos drenantes da pele dentro do compartimento hematopoiético (**Figura 23a**), entre células linfóides e mielóides, que foram distinguidos pela expressão mediana dos respectivos marcadores representados no heatmap e no UMAP com as sobreposições (**Figura 23a-b**). Suportando os dados descritos anteriormente, observamos que o tratamento farmacológico com PAQ reduziu o número total de linfócitos T V $\gamma$ 4, em comparação com os camundongos WT que receberam IMQ (**Figura 22c**).



**Figura 23. S100A9 induz o acúmulo de linfócitos T V $\gamma$ 4 nos linfonodos drenantes da pele em modelo psoriasiforme.** (a-c) Camundongos WT e WT-PAQ receberam tratamento tópico com IMQ antes das análises. Camundongos não tratados com IMQ foram utilizados como controles. (a) Disposição de populações de células imunes CD45<sup>+</sup> nos linfonodos drenantes da

pele de camundongos WT e WT-PAQ 5 dias após aplicação tópica de IMQ, analisado por citometria de fluxo de alta dimensão. UMAP com agrupamento FlowSOM sobreposto e heatmap correspondente demonstrando o nível de expressão do marcador relativo entre as populações de células identificadas. (b) Valores da mediana da expressão dos marcadores sobrepostos, apresentados no UMAP. (c) Números de células CD45<sup>+</sup> avaliadas por citometria de fluxo de alta dimensão. Os gráficos representam a média  $\pm$  SEM de dados obtidos de 2 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni em c.  $P < 0,05$  (\*) foi considerado estatisticamente significativo.

Já é bem descrito que os linfócitos T  $\gamma\delta$  são células centrais na patogênese da psoríase, tanto em humanos (CAI et al., 2011a; SUTTON et al., 2009), quanto no modelo psoriasiforme induzido por IMQ (CAI et al., 2011b). Camundongos  $TCR\gamma\delta^{-/-}$  são protegidos em modelo psoriasiforme induzido por IMQ (CAI et al., 2011b). Os linfócitos T  $\gamma\delta$  podem ser subdivididos em três subtipos na pele, os linfócitos T V $\gamma$ 4, 5 ou 6 (PANTELYUSHIN et al., 2012; XU et al., 2021), sendo os linfócitos T V $\gamma$ 4 conhecidos como a fonte primária de IL-17A na inflamação psoriasiforme (CAI et al., 2011b). Baseado nos nossos dados, demonstrando que S100A9 induz o acúmulo de linfócitos T V $\gamma$ 4 na pele e nos linfonodos drenantes da pele, decidimos investigar se além do número absoluto, estas células poderiam ter sua função afetada por S100A9. Interessantemente, podemos perceber que a ausência genética ou bloqueio farmacológico de S100A9 limita em frequência e número absoluto de linfócitos T  $\gamma\delta$  produtores de IL-17a, nos linfonodos drenantes da pele, em comparação com o camundongos WT, após protocolo psoriasiforme induzido por IMQ (**Figura 24a-b**). A estratégia de gate também é mostrada (**Figura 24c**). Desta maneira, nossos dados até agora revelam algo completamente inesperado, demonstrando um papel de S100A9 em um compartimento celular crítico no desenvolvimento e manutenção da inflamação psoriasiforme, os linfócitos T  $\gamma\delta$ .

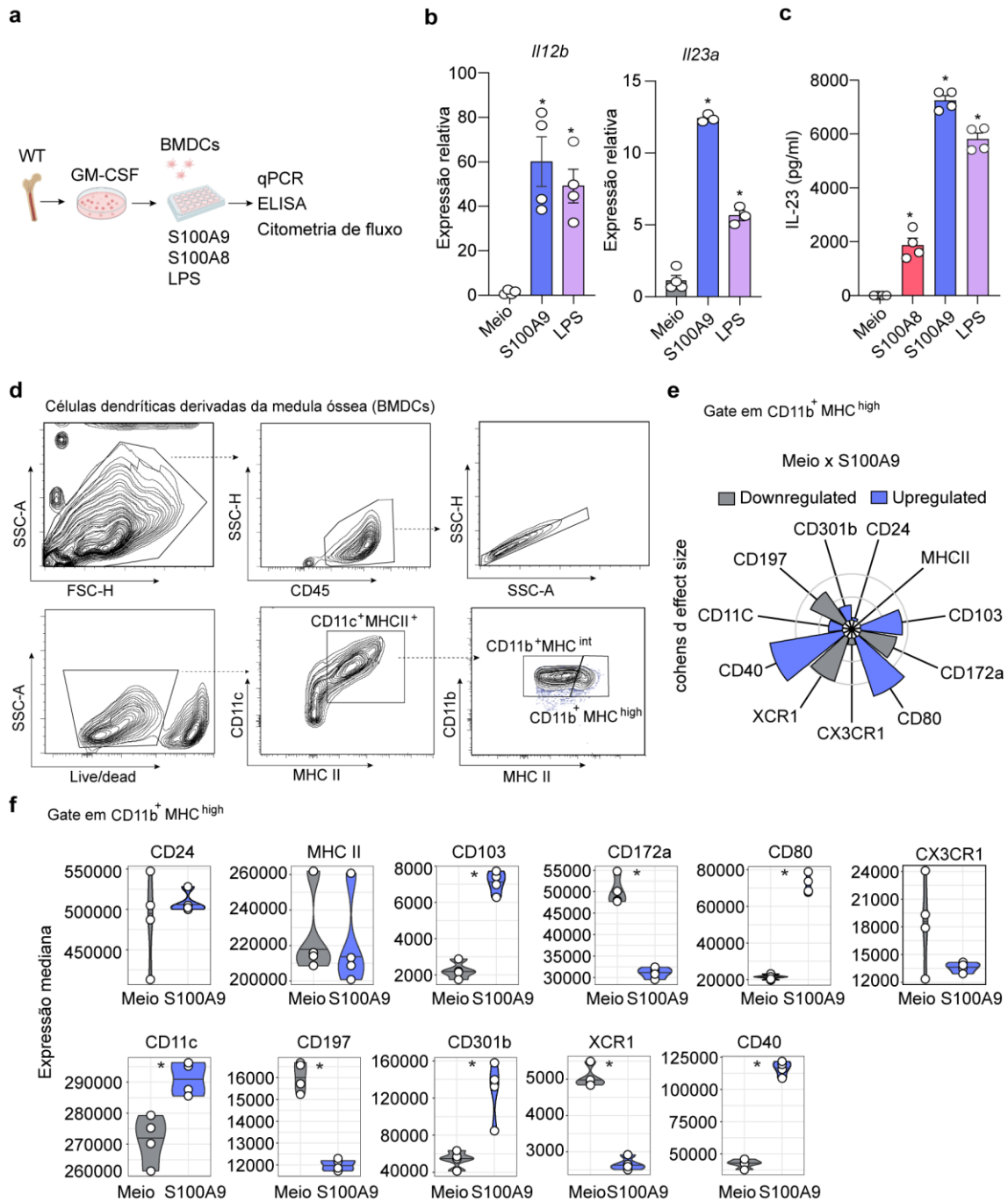


**Figura 24. S100A9 sustenta a produção de IL-17a em linfócitos T  $\gamma\delta$  nos linfonodos drenantes da pele em modelo psoriasiforme induzido por IMQ.** (a-c) Camundongos WT,  $S100a9^{-/-}$  e WT-PAQ receberam tratamento tópico com IMQ durante 6 dias, antes das análises. Camundongos não tratados com IMQ foram utilizados como controles. (a) Análise da frequência de linfócitos T  $\gamma\delta$  produtores de IL-17a nos linfonodos drenantes da pele, avaliado por citometria de fluxo, também representado no gráfico de barra. (b) Número total de linfócitos T  $\gamma\delta$  produtores de IL-17a nos linfonodos drenantes da pele. Os gráficos representam a média  $\pm$  SEM de dados obtidos de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com teste de comparação múltipla de bonferroni em a e b.  $P < 0,05$  (\*) foi considerado estatisticamente significativo.

### 5.8. S100A9 induz produção de IL-23, ativação e reprogramação metabólica de células dendríticas via TLR4 *in vitro*

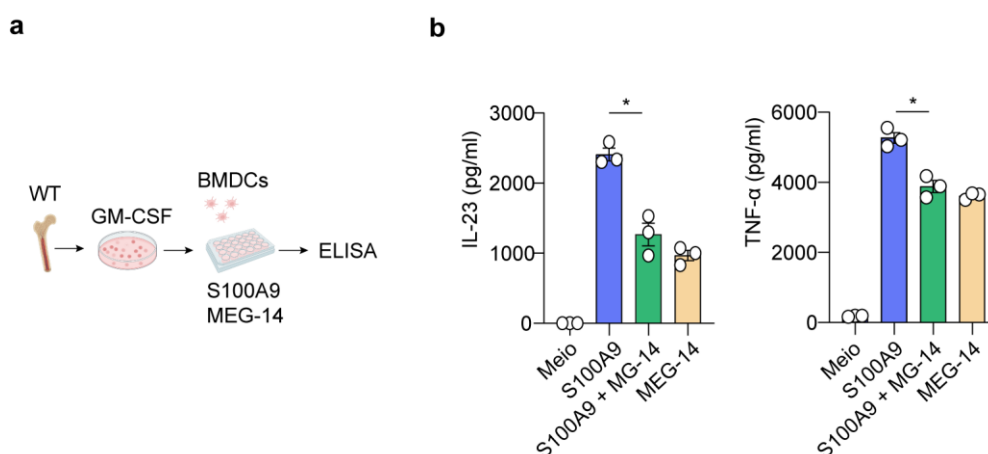
Já é bem descrito que a ativação e produção de IL-17A por linfócitos T  $\gamma\delta$  pode se dar independente da ativação do TCR, dependente de IL-23, por exemplo (CAI et al., 2011b; PANTELYUSHIN et al., 2012). As células dendríticas são a fonte primária de IL-23, e desempenham um papel central no modelo psoriasiforme induzido por IMQ e na psoríase em humanos (VAN DER FITS et al., 2009a). Neste sentido, nos perguntamos se S100A9 poderia ter um papel direto nestas células. Assim, geramos células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) de camundongos WT e as estimulamos com S100A9, S100A8, que forma um heterodímero com S100A9 (VOGL et al., 2018) ou LPS, usado como controle positivo do experimento (**Figura 25a**). Notadamente, observamos que o estímulo com S100A9 ou LPS induziu o aumento da expressão gênica de

*Il23a* e *Il12b*, subunidade p40 compartilhada pela IL-23 e IL-12, em comparação com as células sem estímulo (**Figura 25b**). Além disso, S100A9, S1008 e LPS induziram uma produção robusta de IL-23 no sobrenadante de BMDCs (**Figura 25c**). Através de uma análise multiparamétrica, avaliamos o perfil fenotípico de diferentes populações geradas em cultura com GM-CSF (**Figura 25d**). As células produzidas em cultura apresentam perfis e marcadores de superfície diferentes, conforme representado através da estratégia de gate (**Figura 25d**), também já descritos previamente (XU et al., 2021). Através desta análise, foi possível avaliar o papel de S100A9 diretamente na subpopulação com um perfil fenotípico mais próximo de células dendríticas. Embasando os dados prévios, S100A9 foi capaz de induzir a expressão diferencial de distintos marcadores em BMDCs, com aumento da expressão de CD80 e CD40, moléculas clássicas de ativação, além do aumento de CD103, CD11c e CD301b, representados no “radar plot” e quantificados pela mediana de expressão (**Figura 25e-f**). Deste modo, indo ao encontro de nossa hipótese inicial, nossos dados demonstram que S100A9 tem um efeito direto em células dendríticas, induzindo maior expressão e produção de IL-23, e maior ativação destas células, avaliada por diferentes marcadores.



**Figura 25. S100A9 induz a expressão de IL-23 e ativação de células dendríticas *in vitro*.** Células da medula óssea foram coletadas e estimuladas em cultura com GM-CSF (20ng/ml) durante 7 dias. (a) Ilustração esquemática da cultura de BMDCs *in vitro* e as análises que foram realizadas. (b) Níveis de expressão relativa de RNAm de *Il12b* e *Il23a*, normalizados por *Actb*, em BMDCs, oriundas de camundongos WT, 6 horas após estímulo com LPS (100ng/ml) ou S100A9 (1ug/ml), avaliado por qPCR. (c) Produção de IL-23 por BMDCs 24 horas após estímulo com S100A8 (1ug/ml), S100A9 (1ug/ml) ou LPS (100ng/ml), avaliado por ELISA. (d) Estratégia de gate representativas para as BMDCs *in vitro*. (e) O gráfico de radar representa a mediana da expressão dos marcadores de superfície das BMDCs 24 horas após estímulo com S100A9 (1ug/ml), comparado ao meio, avaliado por citometria de fluxo de alta dimensão. (f) Quantificação da intensidade mediana de fluorescência dos marcadores utilizados em BMDCs após estímulo com S100A9 (1ug/ml). Os gráficos representam a média ± SEM de dados obtidos de 2-3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni em b e c, e teste *t* de Student não pareado em f.  $P < 0,05$  (\*) foi considerado estatisticamente significativo.

O uso de proteínas recombinantes requer um cuidado quanto a pureza, para garantir que o efeito avaliado é da proteína em si e não por conta de algum contaminante durante o seu processo de produção, haja vista que muitas dessas proteínas são produzidas em bactérias. Desta forma, decidimos excluir qualquer viés de contaminação e avaliar se o efeito observado em células dendríticas seria de fato dependente de S100A9. Para isto, utilizamos uma proteína que neutraliza S100A9, a MEG-14, que é expressa no esôfago do *Schistosoma mansoni*, e já foi descrita como um possível mecanismo de escape do parasita aos efeitos inflamatórios de S100A9 (ORCIA et al., 2017). Após protocolo de diferenciação de BMDCs, estas células foram estimuladas com S100A9, na presença de MEG-14 ou não (**Figura 26a**). Podemos observar que apesar de apresentar um efeito imunogênico e induzir a produção de citocinas em BMDCs, a MEG-14 freia a produção de IL-23 e TNF- $\alpha$  na presença de S100A9 em BMDCs, demonstrando assim que os eventos observados até agora são do efeito biológico de S100A9.

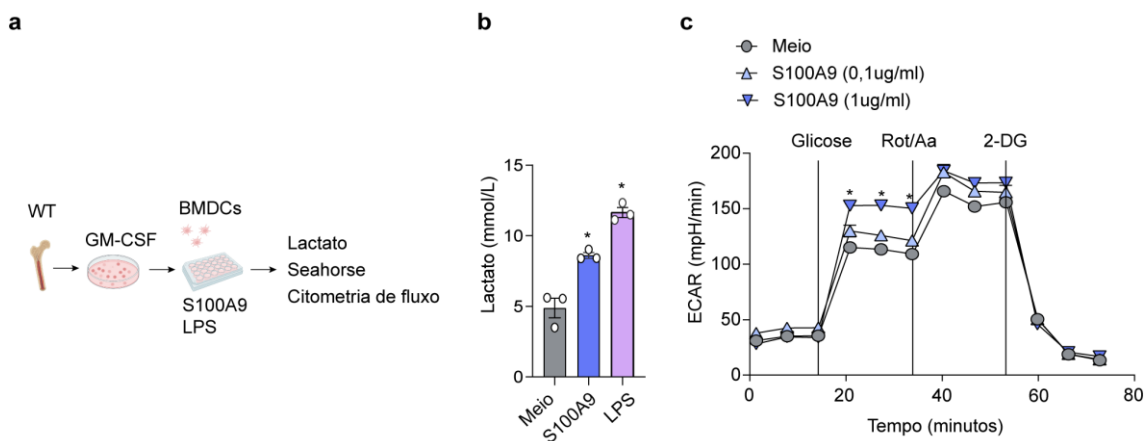


**Figura 26. MEG-14 neutraliza o efeito de S100A9 em células dendríticas *in vitro*.** Células derivadas da medula óssea de camundongos WT foram diferenciadas em BMDCs na presença de GM-CSF durante 7 dias (20ng/ml), e posteriormente estimuladas com S100A9 (1ug/ml) e/ou MEG-14 (200ug/ml). (a) Ilustração esquemática da cultura de BMDCs *in vitro* e as análises que foram realizadas. (b) Produção de IL-23 e TNF- $\alpha$  por BMDCs 24 horas após estímulo com S100A9 e/ou MEG (200ug/ml), avaliado por ELISA. Os gráficos representam a média  $\pm$  SEM de dados obtidos de 2 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni em b.  $P < 0,05$  (\*) foi considerado estatisticamente significativo.

Já é bem descrito que em condições de ativação, células podem reprogramar seu metabolismo, e utilizar mais a glicólise aeróbica, evento que ficou conhecido como efeito Warburg (KOPPENOL; BOUNDS; DANG, 2011; PALSSON-MCDERMOTT; O'NEILL, 2013). Trabalhos já publicados demonstraram que células tumorais ou células do sistema imune reprogramam seu metabolismo quando ativadas, o que resulta no aumento da expressão de genes glicolíticos, bem como no aumento do consumo de glicose (KOPPENOL; BOUNDS; DANG, 2011; PALSSON-MCDERMOTT; O'NEILL, 2013). Nesta direção, em dados prévios do nosso grupo, observamos que o bloqueio da captação de glicose, *in vivo*, reduz a inflamação psoriasiforme induzida por IMQ (dados não mostrados). Através de análises *in silico*, notamos uma correlação positiva entre *S100A9* e genes pró-glicolíticos como *HIF1A*, *LDHA* e *SLCA1* na pele lesionada de pacientes com psoríase (dados não mostrados). Levando em consideração os efeitos pró-inflamatórios de *S100A9*, *in vivo* e *in vitro*, e sua correlação positiva com genes pró-glicólise, decidimos investigar quais seriam as repercussões metabólicas desta molécula em células dendríticas. Utilizamos diferentes estratégias para avaliar o perfil metabólico de células dendríticas na presença de *S100A9* (**Figura 27a**). *S100A9* induziu maior produção de lactato em BMDCs, comparado com o meio. O LPS foi utilizado como controle do experimento (**Figura 27b**). Além disso, através do seahorse, conseguimos avaliar a cinética da Taxa de Acidificação Extracelular (ECAR) e Taxa de Consumo de oxigênio (OCR), para avaliar a Glicólise e Fosforilação Oxidativa em células dendríticas. Inicialmente, podemos observar que existe uma taxa basal de acidificação do meio, que aumenta substancialmente na presença de glicose (**Figura 27c**). No entanto, este aumento foi considerável e mais



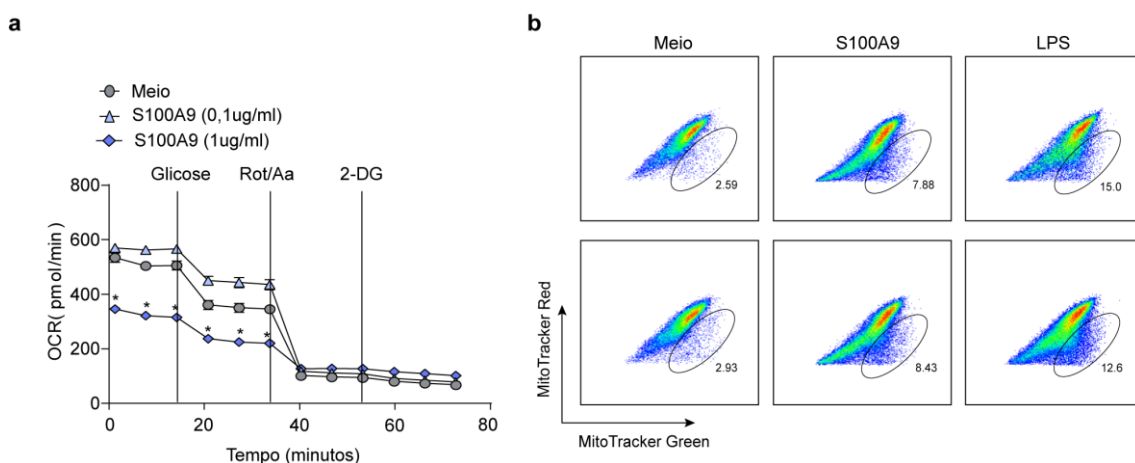
significante, quando essas células foram previamente estimuladas com S100A9 na maior concentração (**Figura 27c**). Na presença de rotenona e antimicina a, que são inibidores da cadeia respiratória, há um aumento ainda maior da ECAR, mas sem diferença entre os grupos previamente estimulados. Essa ECAR cai a níveis basais, em todos os grupos, quando o fluxo glicolítico é interrompido após adição do análogo da glicose, o 2-DG (**Figura 27c**).



**Figura 27. S100A9 induz aumento da glicólise aeróbica em células dendríticas *in vitro*.** Células derivadas da medula óssea de camundongos WT foram diferenciadas em BMDCs na presença de GM-CSF (20 ng/ml) durante 7 dias, e posteriormente estimuladas com S100A9 ou LPS. (a) Ilustração esquemática da cultura de BMDCs *in vitro* e as análises que foram realizadas. (b) Produção de lactato em BMDCs após 24 horas de estímulo com S100A9 (1ug/ml) ou LPS (100ng/ml). (c) Após 6 horas de estímulo com S100A9 (0,1 ou 1ug/ml), essas células foram colocadas em meio sem glicose e a ECAR foi avaliada por 80 minutos, na presença de glicose, roteno/antimicina a ou 2-DG, através do seahorse, A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni em b e c.  $P < 0,05$  (\*) foi considerado estatisticamente significativo.

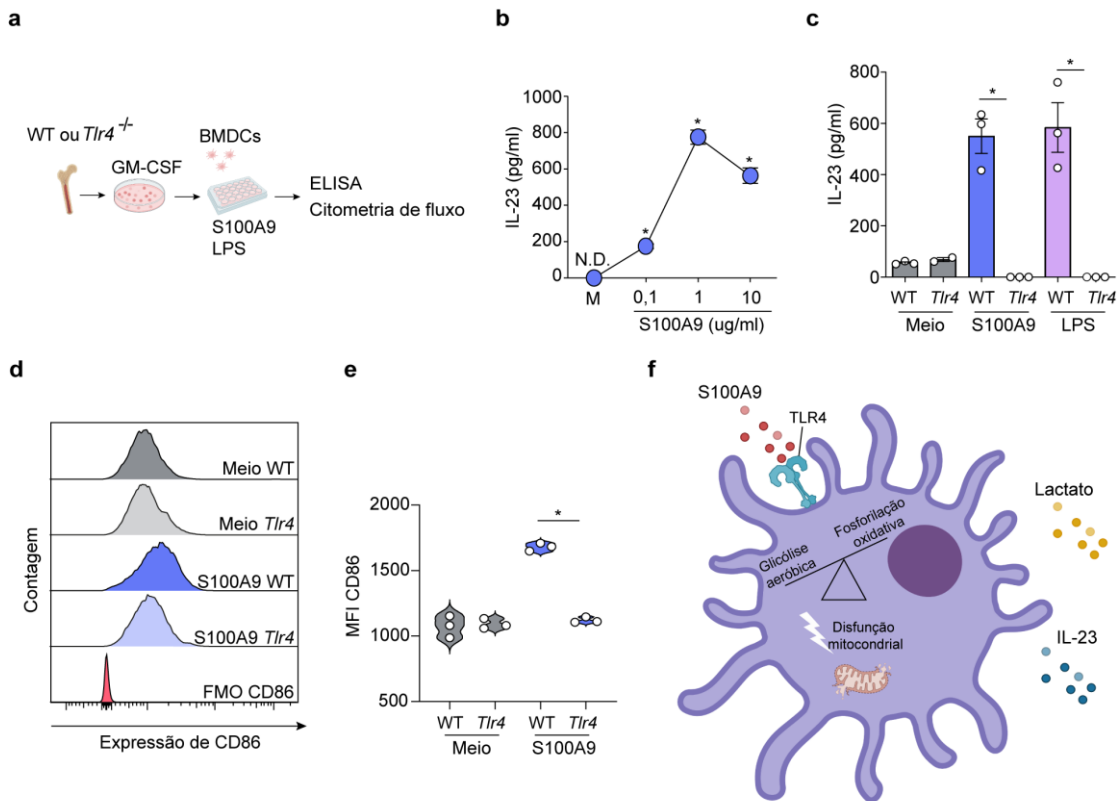
No mesmo ensaio, também foi possível avaliar a taxa de consumo de oxigênio dessas células. Conforme podemos constatar na figura 28, a taxa basal de consumo de oxigênio das células previamente estimuladas com S100A9 na maior concentração está significativamente mais baixa em relação a todos os outros grupos (**Figura 28a**). Este mesmo fenótipo se mantém quando a glicose é adicionada, até o momento em que a rotenona/antimicina a são adicionados, onde há uma redução e equiparação do consumo de oxigênio entre todos os grupos. Os níveis da OCR continuam equiparados entre todos os grupos e

chegam a níveis mais baixos quando o fluxo glicolítico é interrompido, após adição do análogo da glicose, o 2-DG (**Figura 28a**). Tanto a produção de lactato (**Figura 27b**), quanto aumento da ECAR (**Figura 27c**) e Redução do consumo de oxigênio, indicador de redução da fosforilação oxidativa (**Figura 28a**), na presença de S100A9, indicam uma reprogramação metabólica de BMDCs, com aumento da glicólise aeróbica e redução da fosforilação oxidativa. Para investigar se a redução da taxa de consumo de oxigênio na presença de S100A9 estaria relacionada com alguma perda de função da mitocôndria, inicialmente utilizamos duas sondas de forma combinada, uma que avaliou massa mitocondrial total (MitoTracker green) e outra que avaliou potencial de membrana (MitotrackerRed) em células dendríticas. A população MitoTrackerGreen<sup>+</sup> MitoTrackerRed<sup>-</sup>, onde foi feita a gate (**Figura 28b**), denota uma população mitocondrial que perdeu potencial de membrana, ou apresenta mitocôndria disfuncional (**Figura 28b**). Sendo assim, S100A9 induz redução do consumo de oxigênio e disfunção mitocondrial em células dendríticas, *in vitro*.



**Figura 28. S100A9 induz redução do consumo de oxigênio e disfunção mitocondrial em células dendríticas *in vitro*.** Células derivadas da medula óssea de camundongos WT foram diferenciadas em BMDCs na presença de GM-CSF (20 ng/ml) durante 7 dias, e posteriormente estimuladas com S100A9 ou LPS. (a) Após 6 horas de estímulo com S100A9 (0,1 ou 1ug/ml), essas células foram colocadas em meio sem glicose e a OCR foi avaliada por 80 minutos, na presença de glicose, roteno/antimicina a ou 2-DG, através do seahorse. (b) Após 24 horas de estímulo na presença de S100A9 (1ug/ml), essas células foram coletadas e marcadas com diferentes sondas, “mitotracker green” e “mitotracker red”, e analisadas por citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni em a e b.  $P < 0,05$  (\*) foi considerado estatisticamente significativo.

Alguns trabalhos têm demonstrado que S100A9 atua como uma alarmina/DAMP através de TLR4 (KOVAČIĆ et al., 2018; SILVA et al., 2020). Para investigar os possíveis mecanismos pelo qual S100A9 induz a ativação e reprogramação metabólica em células dendríticas, diferenciamos BMDCs de camundongos WT e *Tlr4*<sup>-/-</sup> e comparamos alguns parâmetros na presença de S100A9 ou LPS (**Figura 29a**). No primeiro momento testamos três concentrações diferentes de S100A9, e podemos observar que todas as concentrações utilizadas induziram a produção de IL-23 em BMDCs (**Figura 29b**). Desta maneira, escolhemos a concentração de S100A9 que induziu a maior produção de IL-23 em células dendríticas de camundongos WT, para assim comparar com BMDCs oriundas de camundongos *Tlr4*<sup>-/-</sup>. Curiosamente, observamos que a produção de IL-23 por BMDCs foi totalmente dependente de TLR4 (**Figura 29c**). O LPS, um clássico agonista de TLR4 foi utilizado como controle do experimento. Além disso, por citometria de fluxo, avaliamos a intensidade mediana de fluorescência de CD86, um marcador de ativação de células dendríticas, e podemos observar que assim como a produção de IL-23, a expressão de CD86 é totalmente dependente de TLR4 (**Figura 29d-e**). Desta forma, podemos concluir que S100A9 induz produção de IL-23 e ativação de BMDCs via TLR4 (**Figura 29f**).

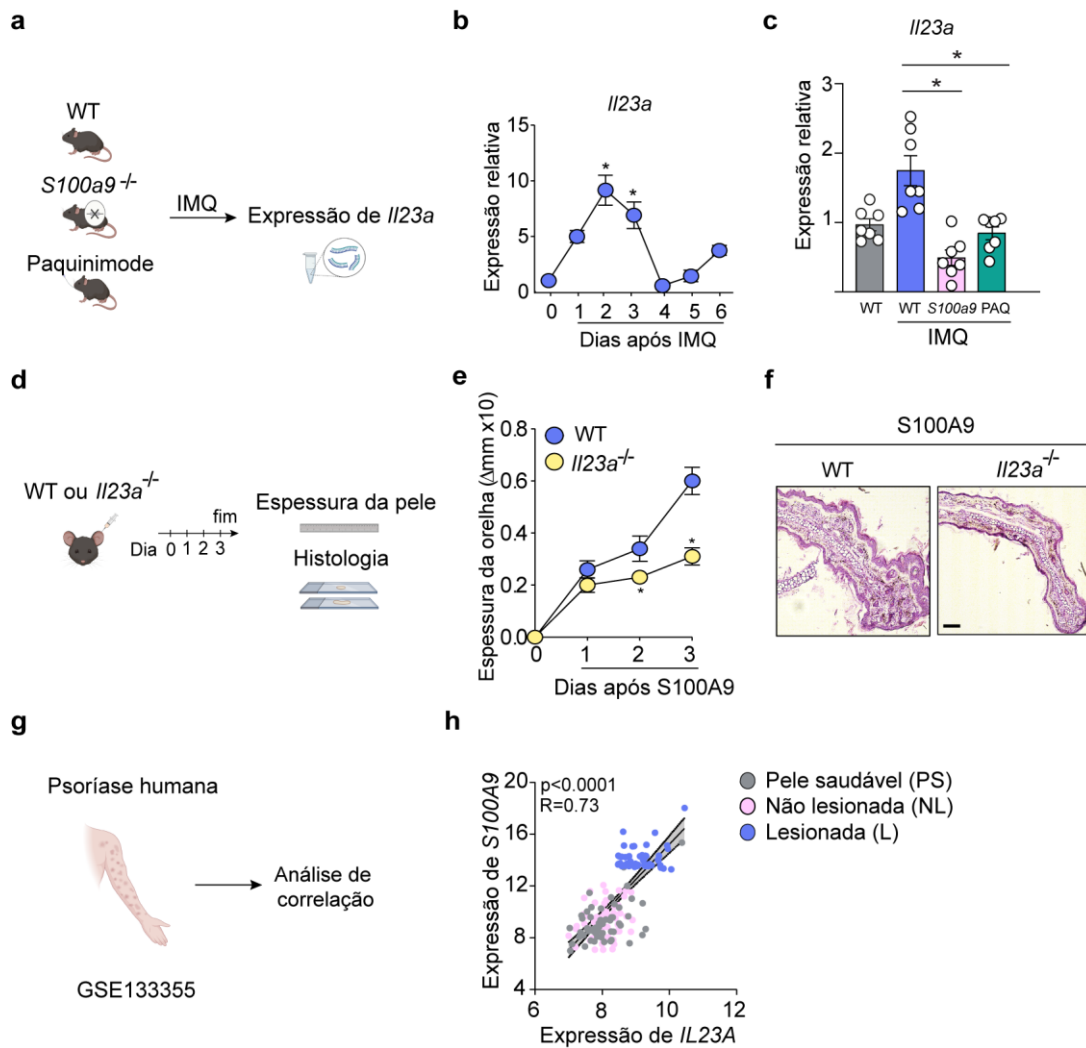


**Figura 29. S100A9 induz ativação de células dendríticas via TLR4 *in vitro*.** Células da medula óssea de camundongos WT ou *Tlr4*<sup>-/-</sup> foram diferenciadas na presença de GM-CSF (20ng/ml) durante 7 dias. (a) Ilustração esquemática da cultura de BMDCs *in vitro* e as análises que foram realizadas. (b) Produção de IL-23 por BMDCs WT 24 horas após estímulo com S100A9 (0,1, 1 e 10ug/ml). (c) Produção de IL-23 por BMDCs WT ou *Tlr4*<sup>-/-</sup> 24 horas após estímulo com S100A9 (1ug/ml) ou LPS (100ng/ml). (d-e) Histograma representativo e quantificação da intensidade mediana de fluorescência de CD86 em BMDCs WT ou *Tlr4*<sup>-/-</sup> após estímulo com S100A9 (1ug/ml). (f) Representação esquemática do efeito de S100A9 em induzir produção de IL-23, ativar e reprogramar o metabolismo de BMDCs via TLR4. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni em b, c e e.  $P < 0,05$  (\*) foi considerado estatisticamente significativo.

### 5.9. S100A9 induz inflamação psoriasiforme dependente de IL-23

Para investigar se os efeitos de S100A9 dependem de IL-23 na inflamação psoriasiforme, *in vivo*, utilizamos diferentes estratégias (Figura 30a e d). Inicialmente avaliamos o curso de expressão de *Il23a* durante todos os dias no modelo psoriasiforme induzido por IMQ. A expressão de RNAm de *Il23a* atinge o pico dois dias após aplicação tópica de IMQ (Figura 30b). Desta maneira, utilizamos camundongos *S100a9*<sup>-/-</sup> e WT-PAQ para avaliar a expressão de *Il23a* na pele (Figura 30a). De acordo com nossa hipótese e os dados previamente

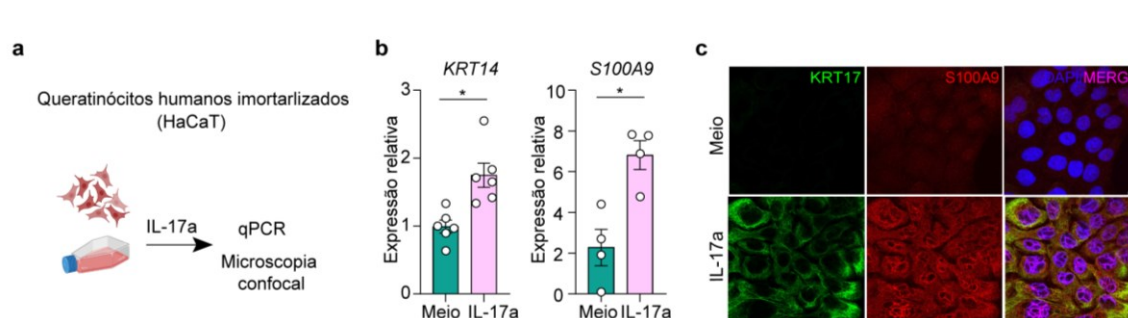
descritos, a ausência genética ou bloqueio farmacológico de S100A9 prejudica a expressão de *IL23a* na pele, comparado aos camundongos WT, dois dias após aplicação tópica de IMQ (**Figura 30c**). Para avaliar o efeito de S100A9 dependente de IL-23 em outro modelo psoriasiforme, injetamos S100A9 intradermal nas orelhas de camundongos WT ou *IL23a*<sup>-/-</sup> e podemos observar que a inflamação psoriasiforme mediada por S100A9 é atenuada em camundongos *IL23a*<sup>-/-</sup>, avaliada diariamente pela espessura da pele e por parâmetros histológicos, como espessura da derme e epiderme (**Figura 30e-f**). Além disso, encontramos uma correlação positiva entre a expressão gênica de *S100A9* e *IL23A* na pele lesionada de pacientes com psoríase, oriunda de um banco de dados público GSE133555 (**Figura 30g-h**). Sendo assim, nossos resultados demonstram que S100A9 induz produção de IL-23, ativação e reprogramação metabólica de células dendríticas via TLR4, *in vitro*, além de induzir inflamação psoriasiforme de forma dependente de IL-23. Estes dados revelam um papel até agora não descrito de S100A9, sustentando a inflamação psoriasiforme através do aumento da imunidade do tipo 3 dependente de IL-23.



**Figura 30. A inflamação psoriasiforme induzida por S100A9 depende de IL-23.** (a) Camundongos WT, *S100a9*<sup>-/-</sup> e WT-PAQ receberam tratamento tópico com IMQ antes das análises. Camundongos não tratados com IMQ foram utilizados como controles. (b) Níveis de expressão relativa de RNAm de *Il23a* normalizado pelo *Gapdh*, nos lisados de pele inteira de camundongos WT, avaliado por qPCR. (c) Níveis de expressão relativa de RNAm de *Il23a* normalizado pelo *Gapdh*, nos lisados de pele inteira de camundongos WT, *S100a9*<sup>-/-</sup> e WT-PAQ, avaliado por qPCR. (d) Injeção de S100A9 (500 ng/orelha) intradermal na orelha (10-15  $\mu$ l) de camundongos WT ou *Il23a*<sup>-/-</sup> por 3 dias. (e) Cinética da alteração da espessura (delta) da pele do dorso, medida com um paquímetro. (f) Imagens representativas de cortes de pele da orelha coradas com H&E, adquiridas com objetiva de 20x. Barras de escala, 100  $\mu$ m. (g) Ilustração esquemática da análise de correlação oriunda do banco de dados GSE133355. (h) Correlação entre *S100A9* e *IL23A* na pele de indivíduos saudáveis e pele lesionada e não lesionada de pacientes com psoríase oriundas do banco de dados GSE133355. Os gráficos representam a média  $\pm$  SEM de dados obtidos de 2-3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni em b e c, e ANOVA de duas vias com o teste de comparação múltipla e pós-teste de Bonferroni em e. O valor de P e o coeficiente de correlação (r) foram obtidos por meio do teste não paramétrico de correlação de postos de Spearman em h.  $P < 0,05$  (\*) foi considerado estatisticamente significativo.

### 5.10 O eixo cutâneo IL-23/IL-17 induz a expressão de S100A9 na psoríase

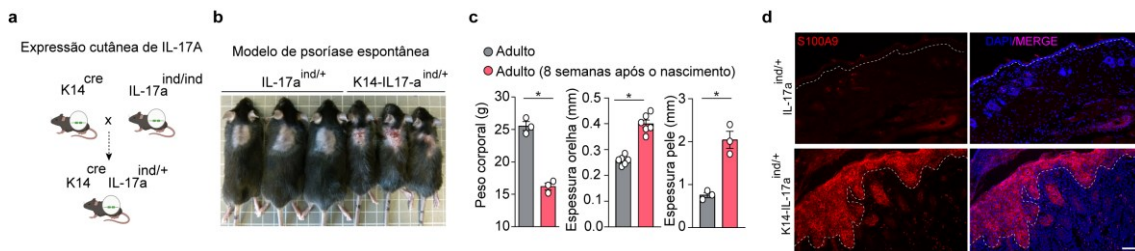
Nossos dados anteriores revelaram que os queratinócitos são a fonte primária de S100A9 na psoríase e no modelo psoriasiforme induzido por IMQ. No entanto, permanece desconhecido como a expressão de S100A9 é induzida. A IL-17a é um mediador crucial para a hiperativação e proliferação de queratinócitos na psoríase (MARTIN et al., 2013). Desta forma, fomos avaliar se IL-17a poderia induzir diretamente a expressão de S100A9. Para tanto, estimulamos uma linhagem celular de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) com IL-17a (**Figura 31a**). De fato, podemos observar que IL-17a induziu o aumento da expressão gênica e proteica de S100A9 em células HaCaT (**Figura 31b-c**). *KRT14* e *KRT17* foram utilizados como controle para avaliar a ativação dos queratinócitos (**Figura 31b-c**).



**Figura 31. IL-17A induz expressão de S100A9 em queratinócitos humanos imortalizados.** (a) Queratinócitos imortalizados de linhagem humana (HACAT) foram estimulados por 24 horas com IL-17a. (b) A expressão gênica de *KRT14* e *S100A9* avaliada por qPCR, normalizados por *ACTB*. (c) Células HaCaT foram estimuladas por 24 horas com IL-17a e avaliada a expressão de DAPI (Azul), KRT17 (verde) e S100A9 (vermelho) por microscopia confocal. Escala 100  $\mu$ m. Os gráficos representam a média  $\pm$  SEM de dados obtidos de 2 experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada pelo teste *t* de Student não pareado em b.  $P < 0,05$  (\*) foi considerado estatisticamente significativo.

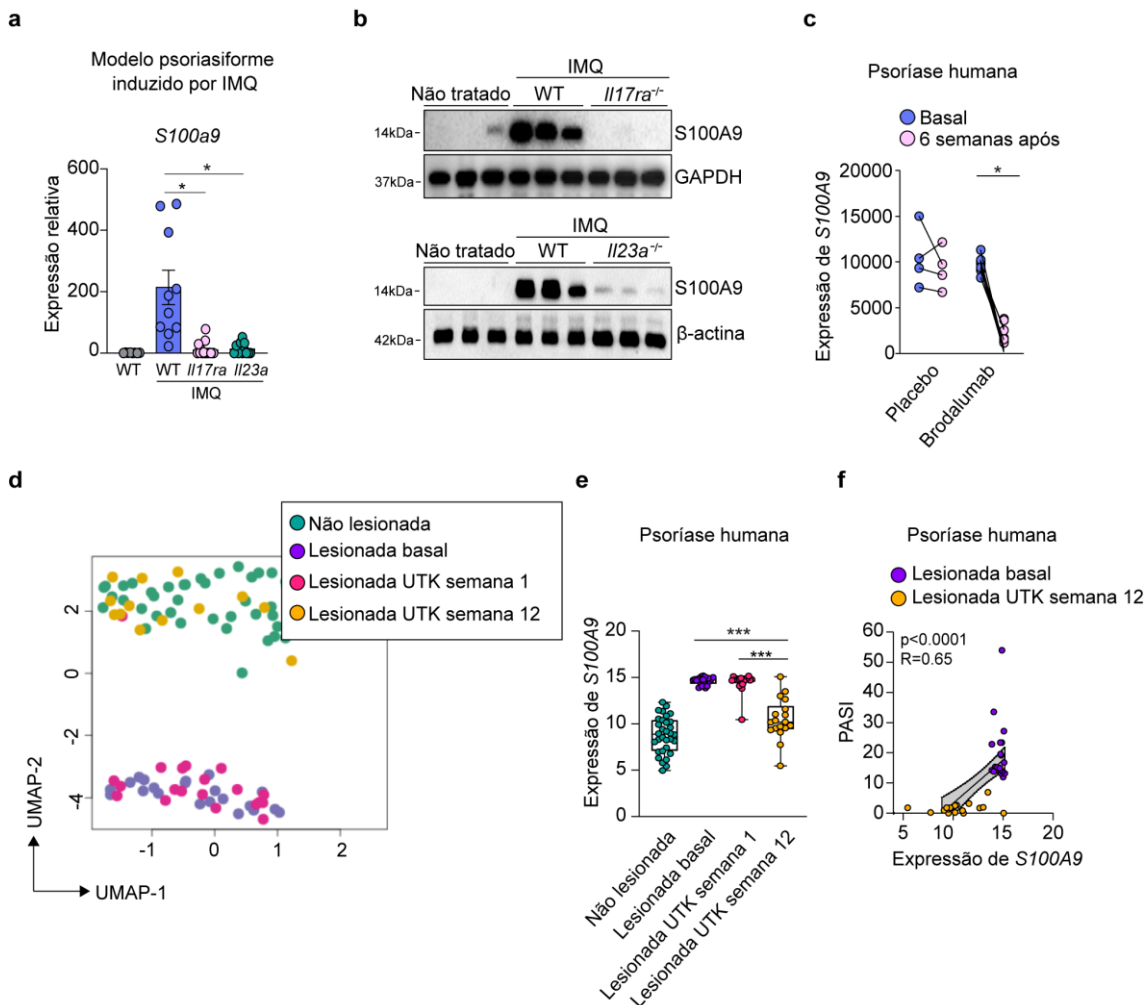
Para avaliar o efeito da IL-17a em induzir a expressão de S100A9, *in vivo*, utilizamos um modelo de camundongo transgênico, onde os queratinócitos passam a produzir IL-17a através do cruzamento de camundongos K14Cre com camundongos *Il17a<sup>Ind/+</sup>*, gerando assim camundongos K14-*Il17a<sup>Ind/+</sup>* (**Figura 32a**) (CROXFORD et al., 2014). Oito semanas após o nascimento, estes

camundongos desenvolvem uma inflamação sistêmica, com perda abrupta de peso (**Figura 32b-c**) e um processo inflamatório aberrante na pele, com aumento da espessura do dorso e da orelha (**Figura 32c-d**). Indo ao encontro dos dados *in vitro*, a expressão específico-cutânea de IL-17a induz o aumento da expressão de S100A9 na pele em modelo psoriasiforme espontâneo (**Figura 31d**).



Seguindo a mesma linha, a ablação genética dessa via revoga completamente a expressão gênica e proteica de S100A9 em comparação com camundongos WT (**Figura 33a-b**). Para transpor nossos dados em camundongos para humanos, reanalisamos um conjunto de dados transcriptômicos disponíveis publicamente (GSE53552) de pele lesionada de pacientes com psoríase vulgar, antes e após o tratamento farmacológico com o anticorpo monoclonal anti-IL17RA (brodalumabe) (SALINGER et al., 2014). Seis semanas após o tratamento, a expressão de S100A9 foi completamente abolida na pele destes pacientes (**Figura 33c**). Neste mesmo estudo, o placebo foi utilizado por uma parte dos pacientes com psoríase e não reduziu a expressão de S100A9 na pele destes pacientes (**Figura 33c**).





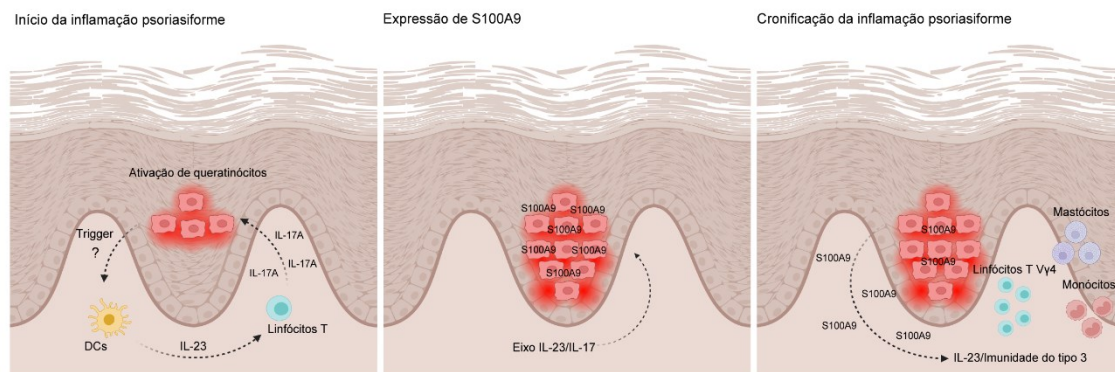
**Figura 33. O eixo IL-23/IL-17 induz a expressão de S100A9 na psoríase.** Camundongos WT, *Il17ra*<sup>-/-</sup> e *Il23a*<sup>-/-</sup> foram tratados topicamente com IMQ por 6 dias antes das análises. Camundongos WT não tratados foram utilizados como controles. (a) Níveis de expressão relativa de RNAm de *S100a9*, normalizado pelo *Gapdh*, nos lisados de pele inteira de camundongos WT, *Il17ra*<sup>-/-</sup> e *Il23a*<sup>-/-</sup>, avaliado por qPCR. (b) Western blot da expressão de S100A9 nos lisados de pele inteira de camundongos WT, *Il17ra*<sup>-/-</sup> e *Il23a*<sup>-/-</sup>, após 6 dias de aplicação tópica de IMQ. (c) Expressão de *S100A9* na pele de pacientes com psoríase, antes e após tratamento com brodalumabe, oriundas do banco de dados GSE53552. (d) Análise do perfil transcricional da pele lesionada com ou sem tratamento com ustequinumabe (UTK) na psoríase humana, oriunda do banco de dados GSE117239, representada pelo UMAP identificado com os diferentes grupos. (e) Expressão gênica de *S100A9* na pele não lesionada e na pele lesionada com ou sem tratamento com UTK na psoríase humana, oriunda do banco de dados GSE117239. (f) Correlação entre a expressão de *S100A9* e o PASI na pele antes e depois uma ou doze semanas de tratamento com UTK na psoríase humana, oriunda do banco de dados GSE117239. Os gráficos representam a média  $\pm$  SEM de dados obtidos de 2 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni em a e e, teste *t* de Student não pareado em c. O valor de *p* e o coeficiente de correlação (*r*) foram obtidos por meio do teste não paramétrico de correlação de postos de Spearman em f.  $P < 0,05$  (\*) foi considerado estatisticamente significativo.

Uma vez que o eixo de IL-17a é induzido de forma dependente de IL-23 em modelo psoriasiforme e na psoríase humana (CAI et al., 2011a; PANTELYUSHIN et al., 2012; VAN DER FITS et al., 2009a), nos questionamos

se IL-23 também estaria regulando a expressão de S100A9 na pele. Interessantemente, a ausência genética de *Il23a*<sup>-/-</sup> impede a expressão cutânea de S100A9 em níveis gênicos e proteicos após aplicação tópica de IMQ (**Figura 33a-b**). Para avaliar o papel da IL-23 na indução da expressão de S100A9 em humanos, reavaliamos um conjunto de dados transcriptômicos disponível publicamente (GSE117239) de pele lesionada de pacientes com psoríase vulgar antes e após o tratamento farmacológico com o anticorpo monoclonal anti-p40, o ustekinumabe (UTK), que tem como alvo a IL-12 e IL-23 (BRODMERKEL et al., 2019). Este estudo realizou uma análise retrospectiva dos pacientes, e desta forma conseguimos segregar as diferentes condições no UMAP de acordo com o perfil de expressão diferencial da pele destes pacientes, levando em consideração o tratamento e tempo deste. Curiosamente, constatamos que a pele não lesionada está clusterizada espacialmente separada da pele lesionada, conforme esperado (**Figura 33d**). Ainda, observamos que essa clusterização entre pele lesionada e não lesionada com os outros grupos varia de acordo com o tempo de tratamento com o UTK (**Figura 33d**). Enquanto a pele lesionada está mais próxima transcricionalmente da pele lesionada após uma semana de tratamento com UTK, a pele não lesionada tem um perfil transcricional mais próximo da pele de pacientes respondedores ao UTK, após doze semanas de tratamento (**Figura 33d**). Consistente com estas análises, observamos que a expressão de S100A9 na pele é totalmente dependente da sinalização de IL-23, pelo menos tardiamente (doze semanas) após o tratamento com UTK (**Figura 33e**). Além disso, interessantemente, os níveis reduzidos de S100A9 foram positivamente correlacionados com a responsividade ao UTK avaliada pelo PASI na pele de pacientes com psoríase (**Figura 33f**). Desta forma, podemos afirmar

que existe uma correlação negativa entre eficácia do tratamento com UTK e PASI ou expressão de *S100A9* na pele lesionada de pacientes com psoríase (**Figura 33e-f**). Dado o exposto, nossos dados demonstram que *S100A9* é induzida cutaneamente, de forma dependente do eixo IL-23/IL-17 em modelo psoriasiforme e na pele lesionada de pacientes com psoríase.

Em síntese, nosso estudo conseguiu explorar a função e os mecanismos pelo qual *S100A9* medeia a inflamação em diferentes modelos psoriasiformes. Já é sabido que após aplicação tópica de IMQ, há um aumento da expressão do eixo IL-23/IL-17. Nosso estudo demonstrou que a expressão de *S100A9* depende primeiramente da expressão deste eixo. Uma vez que *S100A9* é induzida, esta participa ativamente da cronificação da inflamação psoriasiforme, induzindo o aumento da resposta inflamatória cutânea através do aumento da imunidade do tipo 3 de forma dependente de IL-23 (**Figura 34**).



**Figura 34. S100A9 medeia a cronificação da inflamação psoriasiforme através do aumento de IL-23/imunidade do tipo 3.** Após aplicação tópica de IMQ, há um aumento da ativação de células dendríticas e Linfócitos T, com aumento do eixo IL-23/IL17, respectivamente. A indução desse eixo induz a expressão de *S100A9*. *S100A9* amplifica a resposta inflamatória na pele, através do aumento cutâneo de IL-23/Imunidade do tipo 3, bem como o aumento de Linfócitos T V $\gamma$ 4, monócitos e mastócitos, induzindo assim a cronificação da inflamação psoriasiforme.

**Discussão**

## 6. DISCUSSÃO

Apesar da importância global da psoríase, uma doença que afeta entre 2-3% da população mundial, os mecanismos moleculares relacionados com o desenvolvimento e cronificação desta doença ainda permanecem pouco compreendidos. Sendo assim, a ideia inicial deste estudo foi identificar alvos potencialmente relevantes na patogênese da psoríase. Para isto, reanalisamos de forma integrada diferentes bancos de dados públicos de pacientes com psoríase, e dessa forma identificamos o perfil transcricional comparando pele lesionada e não lesionada desses pacientes. A via de peptídeos antimicrobianos foi encontrada predominantemente aumentada, sendo enriquecida por diferentes genes, com destaque para os genes da família S100A, que também aparecem entre os principais genes diferencialmente na pele destes pacientes. Entre todos os genes identificados desta família, *S100A9* tem sido utilizado como um marcador de atividade de doença na psoríase (BENOIT et al., 2006c). Combinando citometria espectral de alto parâmetro, scRNAseq, geração de animais quiméricos e adicionais ferramentas *in vivo* e *in vitro*, demonstramos neste trabalho que *S100A9* exacerba a inflamação psoriasiforme, pelo aumento cutâneo da imunidade do tipo 3 dependente de IL-23. Além disso, demonstramos que a expressão de *S100A9* depende do eixo cutâneo IL-23/IL-17 na psoríase. Em conjunto, nossos achados estabelecem um novo mecanismo pelo qual *S100A9* medeia a cronicidade cutânea da inflamação psoriasiforme.

Evidências pré-clínicas demonstram que a liberação de fatores derivados de queratinócitos, incluindo peptídeos antimicrobianos, tem um papel central na patogênese da psoríase (GILLIET; LANDE, 2008; LANDE et al., 2007, 2015). Interessantemente, nossas análises *in silico* apontam a via de peptídeos

antimicrobianos como a principal via regulada positivamente na lesão cutânea de pacientes com psoríase, sendo enriquecida por diversos genes, com destaque para os membros da família S100A, incluindo *S100A7*, *S100A8*, *S100A9* e *S100A12*. As proteínas da família S100A são expressas de maneira específica em células e tecidos e estão envolvidas em múltiplas funções intracelulares e extracelulares (AUSTERMANN; ZENKER; ROTH, 2017; BRESNICK, 2018; ECKERT et al., 2004). Vinte e quatro proteínas S100A são conhecidas, das quais *S100A7*, *S100A8*, *S100A9* e *S100A12* podem atuar como padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou alarminas, e seus níveis de expressão são aumentados na pele lesionada e no soro de pacientes com psoríase (BENOIT et al., 2006c; WILSMANN-THEIS et al., 2016). Um dos poucos estudos que explorou o papel desta família na patogênese da psoríase, demonstrou que o heterodímero *S100A8/A9* migra para o núcleo e regula a expressão de C3 pelos queratinócitos, promovendo a proliferação dessas células e, posteriormente, inflamação da pele (SCHONTHALER et al., 2013). No entanto, um estudo recente demonstrou que a ablação genética de *S100A9* não afeta diretamente a maturação e o padrão de resposta inflamatória dos queratinócitos (CHRISTMANN et al., 2021). Reunindo todas estas evidências, nosso estudo teve como objetivo central explorar a lacuna existente entre os efeitos extracelulares de *S100A9* na resposta inflamatória cutânea no curso da psoríase.

O aumento da expressão cutânea de *S100A9* em pacientes com psoríase, especificamente na epiderme (ABTIN et al., 2010; ECKERT et al., 2004), vai ao encontro das nossas análises de scRNAseq, na qual identificamos os queratinócitos interfoliculares como a fonte predominante de *S100A9* na

doença em humanos. Estudos já demonstraram que moléculas derivadas de queratinócitos na psoríase, como os peptídeos antimicrobianos, podem ativar diretamente células imunes residentes, e desta forma iniciar ou amplificar a resposta inflamatória cutânea (LANDE et al., 2007). A catelicidina LL37, um peptídeo antimicrobiano derivado de queratinócitos ativados, forma um complexo com DNA/RNA próprio e desta forma ativa células dendríticas plasmocitóides dermais via TLR9, iniciando a cascata inflamatória cutânea IL-23/IL-17 na psoríase (LANDE et al., 2007, 2015). Seguindo esta linha, nosso trabalho demonstrou que a inflamação psoriasiforme induzida por S100A9 depende de IL-23 *in vivo*, e através de experimentos *in vitro*, demonstramos que S100A9 induz a produção de IL-23, ativação e reprogramação metabólica de células dendríticas.

Alguns estudos prévios demonstraram que S100A9 medeia seus efeitos via receptores RAGE e TLR4 (KOVAČIĆ et al., 2018; SILVA et al., 2020; TSAI et al., 2014). Mecanicamente, pelo menos *in vitro*, demonstramos que os efeitos de S100A9 em células dendríticas foram totalmente dependentes de TLR4. Entretanto, a ausência genética total de *Tlr4* em modelo psoriasiforme induzido por IMQ agrava ainda mais a inflamação de pele (dados não mostrados). Estes resultados se cruzam com um trabalho que mostra outro receptor 'toll', o TLR2, sendo importante como mecanismo regulador na inflamação psoriasiforme induzida por IMQ (NAKAO et al., 2020). Para avaliar o efeito específico da sinalização S100A9/TLR4 em células dendríticas, produzimos camundongos deficientes para TLR4 nestas células através de recombinação Cre-Lox. No entanto, não observamos diferenças nos sinais inflamatórios comparado ao grupo controle. Embora nosso estudo tenha conseguido aprofundar do ponto de

vista fisiopatológico e na função de S100A9 na resposta inflamatória cutânea em diferentes modelos psoriasiformes, os mecanismos pelo qual S100A9 medeia seus efeitos *in vivo* na pele precisam ser melhor explorados.

Nossos dados demonstram que S100A9 induz inflamação psoriasiforme pelo aumento da imunidade do tipo 3 na pele. Estes resultados estão de acordo com dados prévios da literatura, onde camundongos transgênicos expressando abundante mS100a7a15 nos queratinócitos basais apresentaram resposta imune Th17 exacerbada quando desafiados por estímulos exógenos (WOLF et al., 2010). Além disso, foi previamente demonstrado que as proteínas S100 induzem a ativação de monócitos e, posteriormente, a resposta imune Th17 na patogênese da doença do enxerto contra o hospedeiro (HANDGRETINGER et al., 2014). Ademais, foi demonstrado que S100A9 é necessário para induzir autorreatividade em células T CD8 (LOSER et al., 2010). Tomados em conjunto, estes dados sugerem uma participação não apenas de S100A9, mas de outras proteínas da família S100A na indução da resposta imune do tipo 3, em diferentes modelos de inflamação.

Níveis séricos de S100A9 têm sido correlacionados com a atividade da doença na psoríase (BENOIT et al., 2006c; WILSMANN-THEIS et al., 2016b). Nosso estudo também encontrou níveis plasmáticos aumentados de S100A9 em pacientes com psoríase, entretanto, esses níveis são comparativamente inferiores aos observados na lesão cutânea. Além do mais, identificamos o aumento de S100A9 apenas na pele, e não no plasma, em modelo psoriasiforme induzido por IMQ. Estes dados sugerem uma participação local de S100A9 na inflamação cutânea. Apesar disto, os níveis circulantes de S100A9 poderiam ser utilizados de forma estratégica nestes pacientes. Analisando a dinâmica da



expressão de S100A9, identificamos neste estudo que a expressão cutânea de S100A9 é totalmente dependente do eixo cutâneo IL-23/IL-17, tanto em humanos quanto em modelo psoriasiforme. Este eixo é alvo das mais recentes terapias farmacológicas usadas no tratamento da psoríase (GHORESCHI et al., 2021). Portanto, os níveis de S100A9 poderiam ser utilizados como potencial biomarcador para avaliar a responsividade de diferentes tratamentos farmacológicos contra o eixo IL-23/IL-17 em pacientes com psoríase.

Dado o exposto, nossos resultados combinados de amostras clínicas e murinas demonstram um mecanismo ainda não descrito de S100A9, conectando esta proteína com o eixo imune cutâneo IL-23/IL-17, através de um circuito autorregulador que amplifica e sustenta a cronificação da psoríase. Devido ao seu papel notável no agravamento da resposta inflamatória cutânea, além de um potencial biomarcador para avaliar responsividade de diferentes tratamentos farmacológicos, S100A9 também poderia ser um alvo futuro para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento de pacientes com psoríase.

A psoríase precisa ser vista como uma condição inflamatória que vai além das lesões dermatológicas ou articulares. Neste sentido, a terapia farmacológica adequada garante que os indivíduos tenham uma melhor qualidade de vida e corram menos riscos decorrentes de outras comorbidades. Estudos que busquem esclarecer os mecanismos da doença são de extrema relevância, não apenas para melhorar o entendimento patológico da psoríase, mas para buscar possíveis novos alvos que auxiliem tanto na terapêutica ou no diagnóstico da doença.

**Conclusão**

## 7. CONCLUSÃO

Neste trabalho identificamos o perfil da assinatura gênica na pele de pacientes com psoríase, com destaque para a proteína S100A9. Combinando amostras clínicas de pacientes e diferentes modelos pré-clínicos de psoríase, identificamos o aumento da expressão de S100A9 principalmente na lesão cutânea. Em diferentes modelos experimentais de psoríase, demonstramos que S100A9 exacerba a inflamação cutânea. Em humanos, demonstramos que os queratinócitos são a principal fonte de S100A9. Através de ensaios de transferência de medula óssea, demonstramos que células não hematopoiéticas produtoras de S100A9 são as principais responsáveis pelos efeitos inflamatórios observados no modelo experimental induzido por IMQ. Mecanicamente, nossos dados demonstram que S100A9 exacerba a resposta inflamatória da pele através do aumento da imunidade do tipo 3 dependente de IL-23. Além disso, demonstramos que a expressão de S100A9 depende do circuito cutâneo IL-23/IL-17. Conjuntamente, nossos achados estabelecem um novo mecanismo pelo qual S100A9 medeia a cronicidade cutânea da inflamação psoriasiforme.

## ***Referências bibliográficas***

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABTIN, Arby; ECKHART, Leopold; GLÄSER, Regine; GMEINER, Ramona; MILDNER, Michael; TSCHACHLER, Erwin. The antimicrobial heterodimer S100A8/S100A9 (Calprotectin) is upregulated by bacterial flagellin in human epidermal keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 130, n. 10, p. 2423–2430, 2010. DOI: 10.1038/jid.2010.158. Acesso em: 5 set. 2019.
- ABUABARA, K.; AZFAR, R. S.; SHIN, D. B.; NEIMANN, A. L.; TROXEL, A. B.; GELFAND, J. M. Cause-specific mortality in patients with severe psoriasis: a population-based cohort study in the U.K. **The British journal of dermatology**, [S. l.], v. 163, n. 3, p. 586–592, 2010. DOI: 10.1111/J.1365-2133.2010.09941.X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20633008/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- ANNUNZIATO, Francesco; ROMAGNANI, Chiara; ROMAGNANI, Sergio. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [S. l.], v. 135, n. 3, p. 626–635, 2015. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.11.001. Disponível em: <http://www.jacionline.org/article/S0091674914015851/fulltext>. Acesso em: 9 jan. 2023.
- ARMSTRONG, A. W.; HASKAMP, C. T.; ARMSTRONG, E. J. The association between psoriasis and obesity: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Nutrition & diabetes**, [S. l.], v. 2, n. 12, 2012. DOI: 10.1038/NUTD.2012.26. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23208415/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- ARMSTRONG, Ehrin J.; HASKAMP, Caitlin T.; ARMSTRONG, April W. Psoriasis and major adverse cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Journal of the American Heart Association**, [S. l.], v. 2, n. 2, 2013. DOI: 10.1161/JAHA.113.000062. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23557749/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- AUSTERMANN, Judith; ZENKER, Stefanie; ROTH, Johannes. S100-alarmins: potential therapeutic targets for arthritis. **Expert opinion on therapeutic targets**, [S. l.], v. 21, n. 7, p. 739–751, 2017. DOI: 10.1080/14728222.2017.1330411. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28494625/>. Acesso em: 13 dez. 2021.
- BENOIT, S.; TOKSOY, A.; AHLMANN, M.; SCHMIDT, M.; SUNDERKÖTTER, C.; FOELL, D.; PASPARAKIS, M.; ROTH, J.; GOEBELER, M. Elevated serum levels of calcium-binding S100 proteins A8 and A9 reflect disease activity and abnormal differentiation of keratinocytes in psoriasis. **British Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 155, n. 1, p. 62–66, 2006. a. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2006.07198.x. Acesso em: 8 dez. 2019.
- BENOIT, S.; TOKSOY, A.; AHLMANN, M.; SCHMIDT, M.; SUNDERKÖTTER, C.; FOELL, D.; PASPARAKIS, M.; ROTH, J.; GOEBELER, M. Elevated serum levels of calcium-binding S100 proteins A8 and A9 reflect disease activity and abnormal differentiation of keratinocytes in psoriasis. **British Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 155, n. 1, p. 62–66, 2006. b. DOI: 10.1111/J.1365-2133.2006.07198.X. Acesso em: 13 dez. 2021.
- BENOIT, S.; TOKSOY, A.; AHLMANN, M.; SCHMIDT, M.; SUNDERKÖTTER, C.; FOELL, D.; PASPARAKIS, M.; ROTH, J.; GOEBELER, M. Elevated serum levels of calcium-binding S100 proteins A8 and A9 reflect disease activity and abnormal differentiation of keratinocytes in psoriasis. **The British journal of dermatology**, [S. l.], v. 155, n. 1, p. 62–66, 2006. c. DOI: 10.1111/J.1365-2133.2006.07198.X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16792753/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

- BOEHNCKE, Wolf Henning; SCHÖN, Michael P. **Psoriasis. The Lancet** Lancet Publishing Group, , 2015. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61909-7. Acesso em: 2 set. 2020.
- BRESNICK, Anne R. S100 proteins as therapeutic targets. **Biophysical reviews**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 1617–1629, 2018. DOI: 10.1007/S12551-018-0471-Y. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30382555/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- BRODMERKEL, Carrie et al. Modulation of inflammatory gene transcripts in psoriasis vulgaris: Differences between ustekinumab and etanercept. **The Journal of allergy and clinical immunology**, [S. l.], v. 143, n. 5, p. 1965–1969, 2019. DOI: 10.1016/J.JACI.2019.01.017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30703387/>. Acesso em: 15 fev. 2022.
- CAI, Yihua et al. Pivotal Role of Dermal IL-17-Producing  $\gamma\delta$  T Cells in Skin Inflammation. **Immunity**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 596–610, 2011. a. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.08.001. Disponível em: </pmc/articles/PMC3205267/?report=abstract>. Acesso em: 30 jul. 2020.
- CAI, Yihua et al. Pivotal Role of Dermal IL-17-Producing  $\gamma\delta$  T Cells in Skin Inflammation. **Immunity**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 596–610, 2011. b. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.08.001. Acesso em: 8 dez. 2019.
- CAPON, F.; SEMPRINI, S.; DALLAPICCOLA, B.; NOVELLI, G. Evidence for interaction between psoriasis-susceptibility loci on chromosomes 6p21 and 1q21. **American journal of human genetics**, [S. l.], v. 65, n. 6, p. 1798–1800, 1999. DOI: 10.1086/302653. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10577939/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- CHEN, Hongyan; XU, Chengshan; JIN, Qing'e; LIU, Zhihua. S100 protein family in human cancer. **American journal of cancer research**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 89–115, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24660101>. Acesso em: 17 nov. 2019.
- CHENG, Pingyan et al. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 205, n. 10, p. 2235–2249, 2008. DOI: 10.1084/jem.20080132. Acesso em: 5 set. 2019.
- CHRISTMANN, Carolin; ZENKER, Stefanie; MARTENS, Leonie; HÜBNER, Janina; LOSER, Karin; VOGL, Thomas; ROTH, Johannes. Interleukin 17 Promotes Expression of Alarmins S100A8 and S100A9 During the Inflammatory Response of Keratinocytes. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 11, p. 3831, 2021. DOI: 10.3389/FIMMU.2020.599947/BIBTEX. Acesso em: 13 dez. 2021.
- CROXFORD, Andrew L. et al. IL-6 regulates neutrophil microabscess formation in IL-17A-driven psoriasiform lesions. **The Journal of investigative dermatology**, [S. l.], v. 134, n. 3, p. 728–735, 2014. DOI: 10.1038/JID.2013.404. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24067382/>. Acesso em: 13 dez. 2021.
- DE FILIPPO, Katia; NEILL, Daniel R.; MATHIES, Meg; BANGERT, Mathieu; MCNEILL, Eileen; KADIOGLU, Aras; HOGG, Nancy. A new protective role for S100A9 in regulation of neutrophil recruitment during invasive pneumococcal pneumonia. **FASEB Journal**, [S. l.], v. 28, n. 8, p. 3600–3608, 2014. DOI: 10.1096/fj.13-247460. Acesso em: 8 dez. 2019.
- DI MEGLIO, Paola; NESTLE, Frank O. Immunopathogenesis of psoriasis. **Clinical and Basic Immunodermatology: Second Edition**, [S. l.], p. 373–395, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-29785-9\_21. Acesso em: 20 nov. 2022.
- DONATO, Rosario. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. **Biochimica et biophysica acta**, [S. l.], v. 1450, n. 3, p. 191–231, 1999.

- DOI: 10.1016/S0167-4889(99)00058-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10395934/>. Acesso em: 13 dez. 2021.
- DROHAT, Alexander C.; AMBURGEY, Judith C.; ABILDGAARD, Frits; STARICH, Mary R.; BALDISSERI, Donna; WEBER, David J. Solution structure of rat apo-S100B(beta beta) as determined by NMR spectroscopy. **Biochemistry**, [S. l.], v. 35, n. 36, p. 11577–11588, 1996. DOI: 10.1021/BI9612226. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8794737/>. Acesso em: 10 jan. 2023.
- EBERL, Gérard; PRADEU, Thomas. Towards a General Theory of Immunity? **Trends in immunology**, [S. l.], v. 39, n. 4, p. 261–263, 2018. DOI: 10.1016/J.IT.2017.11.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29229264/>. Acesso em: 9 jan. 2023.
- ECKERT, Richard L.; BROOME, Ann Marie; RUSE, Monica; ROBINSON, Nancy; RYAN, David; LEE, Kathleen. S100 proteins in the epidermis. **The Journal of investigative dermatology**, [S. l.], v. 123, n. 1, p. 23–33, 2004. DOI: 10.1111/J.0022-202X.2004.22719.X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15191538/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- EHRCHEN, Jan M.; SUNDERKÖTTER, Cord; FOELL, Dirk; VOGL, Thomas; ROTH, Johannes. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 86, n. 3, p. 557–566, 2009. a. DOI: 10.1189/JLB.1008647. Acesso em: 13 dez. 2021.
- EHRCHEN, Jan M.; SUNDERKÖTTER, Cord; FOELL, Dirk; VOGL, Thomas; ROTH, Johannes. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 86, n. 3, p. 557–566, 2009. b. DOI: 10.1189/jlb.1008647. Acesso em: 5 set. 2019.
- ELKAYAM, O.; OPHIR, J.; YARON, M.; CASPI, D. Psoriatic arthritis: Interrelationships between skin and joint manifestations related to onset, course and distribution. **Clinical Rheumatology**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 301–305, 2000. DOI: 10.1007/PL00011173. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10941813/>. Acesso em: 20 set. 2020.
- FOELL, Dirk; ROTH, Johannes. Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. **Arthritis and Rheumatism**, [S. l.], v. 50, n. 12, p. 3762–3771, 2004. DOI: 10.1002/ART.20631. Acesso em: 20 nov. 2022.
- FRANK NESTLE, Psoriasis O.; KAPLAN, Daniel H.; BARKER, Jonathan. Psoriasis. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra0804595>, [S. l.], v. 361, n. 5, p. 496–509, 2009. DOI: 10.1056/NEJMRA0804595. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmra0804595>. Acesso em: 13 dez. 2021.
- FRANK NESTLE, Psoriasis O.; KAPLAN, Daniel H.; BARKER, Jonathan. **Mechanisms of Disease**. [s.l: s.n.]. . Acesso em: 1 set. 2020.
- FRITZ, Ginter; HEIZMANN, Claus W. 3D Structures of the Calcium and Zinc Binding S100 Proteins. **Handbook of Metalloproteins**, [S. l.], 2006. DOI: 10.1002/0470028637.MET046. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/0470028637.met046>. Acesso em: 9 jan. 2023.
- GERDES, S.; MROWIETZ, U. [Comorbidities and psoriasis. Impact on clinical practice]. **Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete**, [S. l.], v. 63, n. 3, p. 202–213, 2012. DOI: 10.1007/S00105-011-2230-X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22373901/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- GHOESCHI, Kamran; BALATO, Anna; ENERBÄCK, Charlotta; SABAT, Robert. Therapeutics targeting the IL-23 and IL-17 pathway in psoriasis. **The Lancet**, [S. l.], v.

397, n. 10275, p. 754–766, 2021. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00184-7. Disponível em: <http://www.thelancet.com/article/S0140673621001847/fulltext>. Acesso em: 13 dez. 2021.

GILLIET, Michel; LANDE, Roberto. **Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation**. *Current Opinion in Immunology*, 2008. DOI: 10.1016/j.coi.2008.06.008. Acesso em: 8 dez. 2019.

GLADMAN, D. D.; ANTONI, C.; MEASE, P.; CLEGG, D. O.; NASH, O. Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. *Annals of the rheumatic diseases*, [S. l.], v. 64 Suppl 2, n. Suppl 2, 2005. DOI: 10.1136/ARD.2004.032482. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15708927/>. Acesso em: 9 jan. 2023.

GONG, Tao; LIU, Lei; JIANG, Wei; ZHOU, Rongbin. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology* 2019 **20:2**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 95–112, 2019. DOI: 10.1038/s41577-019-0215-7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41577-019-0215-7>. Acesso em: 20 nov. 2022.

GOYETTE, Jesse; GECZY, Carolyn L. **Inflammation-associated S100 proteins: New mechanisms that regulate function**. *Amino Acids*, 2011. DOI: 10.1007/s00726-010-0528-0. Acesso em: 5 set. 2019.

GREB, Jacqueline E.; GOLDMINZ, Ari M.; ELDER, James T.; LEBWOHL, Mark G.; GLADMAN, Dafna D.; WU, Jashin J.; MEHTA, Nehal N.; FINLAY, Andrew Y.; GOTTLIEB, Alice B. Psoriasis. *Nature Reviews Disease Primers* 2016 **2:1**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 1–17, 2016. DOI: 10.1038/nrdp.2016.82. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp201682>. Acesso em: 20 nov. 2022.

GRIFFITHS, Christopher E. M.; ARMSTRONG, April W.; GUDJONSSON, Johann E.; BARKER, Jonathan N. W. N. Psoriasis. *The Lancet*, [S. l.], v. 397, n. 10281, p. 1301–1315, 2021. a. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32549-6. Disponível em: <http://www.thelancet.com/article/S0140673620325496/fulltext>. Acesso em: 20 nov. 2022.

GRIFFITHS, Christopher E. M.; ARMSTRONG, April W.; GUDJONSSON, Johann E.; BARKER, Jonathan N. W. N. Psoriasis. *The Lancet*, [S. l.], v. 397, n. 10281, p. 1301–1315, 2021. b. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32549-6. Disponível em: <http://www.thelancet.com/article/S0140673620325496/fulltext>. Acesso em: 13 dez. 2021.

GRIFFITHS, Christopher EM; BARKER, Jonathan NWN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet (London, England)*, [S. l.], v. 370, n. 9583, p. 263–271, 2007. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61128-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17658397/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

HANDGRETINGER, Holzer et al. Graft-versus-Host Disease Involved in the Pathogenesis of Cells and the Release of S100 Proteins Are Monocyte-Induced Development of Th17. [S. l.], 2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1400983. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/193/7/3355>. Acesso em: 3 maio. 2022.

HARRISON, Oliver J. et al. Commensal-specific T cell plasticity promotes rapid tissue adaptation to injury. *Science*, [S. l.], v. 363, n. 6422, 2019. DOI: 10.1126/SCIENCE.AAT6280/SUPPL\_FILE/AAT6280\_HARRISON\_SM.PDF.

Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aat6280>. Acesso em: 8 jan. 2023.

HEIZMANN, Claus W. S100 proteins: Diagnostic and prognostic biomarkers in laboratory medicine. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, [S. l.], v. 1866, n. 7, p. 1197–1206, 2019. DOI: 10.1016/J.BBAMCR.2018.10.015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30392897/>. Acesso em: 20 nov. 2022.



- HUGHES, Travis K. et al. Second-Strand Synthesis-Based Massively Parallel scRNA-Seq Reveals Cellular States and Molecular Features of Human Inflammatory Skin Pathologies. *Immunity*, [S. l.], v. 53, n. 4, p. 878- 894.e7, 2020. DOI: 10.1016/J.IMMUNI.2020.09.015. Acesso em: 13 dez. 2021.
- HUNTER, Michael J.; CHAZIN, Walter J. High level expression and dimer characterization of the S100 EF-hand proteins, migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14. *The Journal of biological chemistry*, [S. l.], v. 273, n. 20, p. 12427–12435, 1998. DOI: 10.1074/JBC.273.20.12427. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9575199/>. Acesso em: 13 jan. 2023.
- JIN, Shan et al. **DAMP molecules S100A9 and S100A8 activated by IL-17A and house-dust mites are increased in atopic dermatitis. Experimental Dermatology** Blackwell Publishing Ltd, , 2014. DOI: 10.1111/exd.12563. Acesso em: 8 dez. 2019.
- KABASHIMA, Kenji; HONDA, Tetsuya; GINHOUX, Florent; EGAWA, Gyohei. The immunological anatomy of the skin. *Nature Reviews Immunology* **2018 19:1**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 19–30, 2018. DOI: 10.1038/s41577-018-0084-5. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41577-018-0084-5>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- KANG, Jin Hyun; HWANG, Sae Mi; CHUNG, Il Yup. S100A8, S100A9 and S100A12 activate airway epithelial cells to produce MUC5AC via extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor- $\kappa$ B pathways. *Immunology*, [S. l.], v. 144, n. 1, p. 79–90, 2015. DOI: 10.1111/imm.12352. Acesso em: 17 nov. 2019.
- KARASON, Ari; GUDJONSSON, Johann E.; JÓNSSON, Hjörtur H.; HAUSSON, Valdimar B.; RUNARSDOTTIR, E. Hjaltey; STEFANSSON, Kari; VALDIMARSSON, Helgi; GULCHER, Jeffrey R. Genetics of psoriasis in Iceland: evidence for linkage of subphenotypes to distinct Loci. *The Journal of investigative dermatology*, [S. l.], v. 124, n. 6, p. 1177–1185, 2005. DOI: 10.1111/J.0022-202X.2005.23703.X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15955092/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- KILBY, Peter M.; VAN ELDIK, Linda J.; ROBERTS, Gordon C. K. The solution structure of the bovine S100B protein dimer in the calcium-free state. *Structure (London, England : 1993)*, [S. l.], v. 4, n. 9, p. 1041–1052, 1996. DOI: 10.1016/S0969-2126(96)00111-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8805590/>. Acesso em: 10 jan. 2023.
- KIMBALL, Alexa B.; WU, Eric Q.; GUÉRIN, Annie; YU, Andrew P.; TSANEVA, Magda; GUPTA, Shiraz R.; BAO, Yanjun; MULANI, Parvez M. Risks of developing psychiatric disorders in pediatric patients with psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, [S. l.], v. 67, n. 4, p. 651- 657.e2, 2012. DOI: 10.1016/J.JAAD.2011.11.948. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22243764/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- KOPPENOL, Willem H.; BOUNDS, Patricia L.; DANG, Chi V. **Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. Nature Reviews Cancer** Nature Publishing Group, , 2011. DOI: 10.1038/nrc3038. Disponível em: [www.nature.com/reviews/cancer](http://www.nature.com/reviews/cancer). Acesso em: 30 jul. 2020.
- KOVAČIĆ, Marijana et al. TLR4 and RAGE conversely mediate pro-inflammatory S100A8/9-mediated inhibition of proliferation-linked signaling in myeloproliferative neoplasms. *Cellular Oncology*, [S. l.], v. 41, n. 5, p. 541–553, 2018. DOI: 10.1007/s13402-018-0392-6. Acesso em: 5 set. 2019.
- KUMAR, S.; HAN, J.; LI, T.; QURESHI, A. A. Obesity, waist circumference, weight change and the risk of psoriasis in US women. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, [S. l.], v. 27, n. 10, p. 1293–1298, 2013. DOI:

- 10.1111/JDV.12001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23057623/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- KURD, Shanu Kohli; TROXEL, Andrea B.; CRITS-CHRISTOPH, Paul; GELFAND, Joel M. The risk of depression, anxiety, and suicidality in patients with psoriasis: a population-based cohort study. **Archives of dermatology**, [S. l.], v. 146, n. 8, p. 891–895, 2010. DOI: 10.1001/ARCHDERMATOL.2010.186. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20713823/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- KURPET, Katarzyna; CHWATKO, Grażyna. S100 Proteins as Novel Therapeutic Targets in Psoriasis and Other Autoimmune Diseases. **Molecules** **2022**, Vol. 27, Page 6640, [S. l.], v. 27, n. 19, p. 6640, 2022. DOI: 10.3390/MOLECULES27196640. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/19/6640/htm>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- LANDE, Roberto et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. **Nature**, [S. l.], v. 449, n. 7162, p. 564–569, 2007. DOI: 10.1038/nature06116. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17873860/>. Acesso em: 1 set. 2020.
- LANDE, Roberto; CHAMILOS, Georgios; GANGULY, Dipyaman; DEMARIA, Olivier; FRASCA, Loredana; DURR, Sophie; CONRAD, Curdin; SCHRÖDER, Jens; GILLIET, Michel. Cationic antimicrobial peptides in psoriatic skin cooperate to break innate tolerance to self-DNA. **European Journal of Immunology**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 203–213, 2015. DOI: 10.1002/eji.201344277. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201344277>. Acesso em: 8 dez. 2019.
- LEE, Young Ae et al. Genomewide scan in german families reveals evidence for a novel psoriasis-susceptibility locus on chromosome 19p13. **American journal of human genetics**, [S. l.], v. 67, n. 4, p. 1020–1024, 2000. DOI: 10.1086/303075. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10986047/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- LI, Danyang; WU, Minghua. Pattern recognition receptors in health and diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy** **2021** **6:1**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–24, 2021. DOI: 10.1038/s41392-021-00687-0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00687-0>. Acesso em: 12 jan. 2023.
- LOSER, Karin et al. The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells. **Nature Medicine** **2010** **16:6**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 713–717, 2010. DOI: 10.1038/nm.2150. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nm.2150>. Acesso em: 13 dez. 2021.
- MALLBRIS, Lotus; AKRE, Olof; GRANATH, Fredrik; YIN, Li; LINDELÖF, Bernt; EKBOM, Anders; STÄHLE-BÄCKDAHL, Mona. Increased risk for cardiovascular mortality in psoriasis inpatients but not in outpatients. **European Journal of Epidemiology** **2004** **19:3**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 225–230, 2004. DOI: 10.1023/B:EJEP.0000020447.59150.F9. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/B:EJEP.0000020447.59150.f9>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- MALOY, K. J.; KULLBERG, M. C. IL-23 and Th17 cytokines in intestinal homeostasis. **Mucosal Immunology** **2008** **1:5**, [S. l.], v. 1, n. 5, p. 339–349, 2008. DOI: 10.1038/mi.2008.28. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/mi200828>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- MARTIN, David A.; TOWNE, Jennifer E.; KRICORIAN, Gregory; KLEKOTKA, Paul; GUDJONSSON, Johann E.; KRUEGER, James G.; RUSSELL, Chris B. **The emerging role of IL-17 in the pathogenesis of psoriasis: Preclinical and clinical findings.** **Journal of Investigative Dermatology** Nature Publishing Group, , 2013. DOI: 10.1038/jid.2012.194. Acesso em: 2 set. 2020.

- MCCLINTOCK, Kimberly A.; SHAW, Gary S. A novel S100 target conformation is revealed by the solution structure of the Ca<sup>2+</sup>-S100B-TRTK-12 complex. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 278, n. 8, p. 6251–6257, 2003. DOI: 10.1074/jbc.M210622200. Disponível em: <http://www.jbc.org/article/S0021925820866204/fulltext>. Acesso em: 10 jan. 2023.
- MEASE, Philip. New pathways of treatment for psoriatic arthritis. **The Lancet**, [S. l.], v. 389, n. 10086, p. 2268–2270, 2017. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31427-7. Disponível em: <http://www.thelancet.com/article/S0140673617314277/fulltext>. Acesso em: 9 jan. 2023.
- MITCHELL, Kendall; YANG, Hsiu Ying T.; TESSIER, Philippe A.; MUHLY, W. Taylor; SWAIM, William D.; SZALAYOVA, Ildiko; KELLER, Jason M.; MEZEY, Eva; IADAROLA, Michael J. Localization of S100A8 and S100A9 expressing neutrophils to spinal cord during peripheral tissue inflammation. **Pain**, [S. l.], v. 134, n. 1–2, p. 216–231, 2008. DOI: 10.1016/j.pain.2007.10.024. Acesso em: 17 nov. 2019.
- MROWIETZ, Ulrich; ELDER, James T.; BARKER, Jonathan. The importance of disease associations and concomitant therapy for the long-term management of psoriasis patients. **Archives of dermatological research**, [S. l.], v. 298, n. 7, p. 309–319, 2006. DOI: 10.1007/S00403-006-0707-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17021761/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- MROWIETZ, Ulrich; STEINZ, Kirsten; GERDES, Sascha. Psoriasis: To treat or to manage? **Experimental Dermatology**, [S. l.], v. 23, n. 10, p. 705–709, 2014. DOI: 10.1111/EXD.12437. Acesso em: 20 nov. 2022.
- NAIR, Rajan P. et al. Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. **American journal of human genetics**, [S. l.], v. 78, n. 5, p. 827–851, 2006. DOI: 10.1086/503821. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16642438/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- NAIR, Rajan P. et al. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-κB pathways. [S. l.], 2009. DOI: 10.1038/ng.311. Acesso em: 13 dez. 2021.
- NAKAO, Momoko; SUGAYA, Makoto; FUJITA, Hideki; MIYAGAKI, Tomomitsu; MORIMURA, Sohshi; SHIBATA, Sayaka; ASANO, Yoshihide; SATO, Shinichi. TLR2 Deficiency Exacerbates Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation through Decrease in Regulatory T Cells and Impaired IL-10 Production. **International journal of molecular sciences**, [S. l.], v. 21, n. 22, p. 1–15, 2020. DOI: 10.3390/IJMS21228560. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33202847/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- NESTLE, Frank O.; DI MEGLIO, Paola; QIN, Jian Zhong; NICKOLOFF, Brian J. Skin immune sentinels in health and disease. **Nature Reviews Immunology** 2009 9:10, [S. l.], v. 9, n. 10, p. 679–691, 2009. DOI: 10.1038/nri2622. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri2622>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- OKADA, Yukinori et al. Fine mapping major histocompatibility complex associations in psoriasis and its clinical subtypes. **American journal of human genetics**, [S. l.], v. 95, n. 2, p. 162–172, 2014. DOI: 10.1016/J.AJHG.2014.07.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25087609/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- OLIVIERI, Ignazio; D'ANGELO, Salvatore; PALAZZI, Carlo; PADULA, Angela. Advances in the management of psoriatic arthritis. **Nature Reviews Rheumatology** 2014 10:9, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 531–542, 2014. DOI: 10.1038/nrrheum.2014.106. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrrheum.2014.106>. Acesso em: 9 jan. 2023.
- ORCIA, Débora et al. Interaction of an esophageal MEG protein from schistosomes with a human S100 protein involved in inflammatory response. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], v. 1861, n. 1, p. 3490–3497, 2017. DOI: 10.1016/j.bbagen.2016.09.015. Acesso em: 30 jul. 2020.

- PALLER, Amy S. et al. Association of pediatric psoriasis severity with excess and central adiposity: an international cross-sectional study. **JAMA dermatology**, [S. l.], v. 149, n. 2, p. 166–176, 2013. DOI: 10.1001/JAMADERMATOL.2013.1078. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23560297/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- PALSSON-MCDERMOTT, Eva M.; O'NEILL, Luke A. J. The Warburg effect then and now: From cancer to inflammatory diseases. **BioEssays**, [S. l.], v. 35, n. 11, p. 965–973, 2013. DOI: 10.1002/bies.201300084. Disponível em: <http://www.deepdyve.com/lp/wiley/the-warburg-effect-then-and-now-from-cancer-to-inflammatory-diseases-1xggO0XS0b>. Acesso em: 30 jul. 2020.
- PANTELYUSHIN, Stanislav; HAAK, Stefan; INGOLD, Barbara; KULIG, Paulina; HEPPNER, Frank L.; NAVARINI, Alexander A.; BECHER, Burkhard. Roryt+ innate lymphocytes and  $\gamma\delta$  T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 122, n. 6, p. 2252–2256, 2012. DOI: 10.1172/JCI61862. Disponível em: <http://www.jci.org>. Acesso em: 13 dez. 2021.
- PARISI, Rosa; SYMMONS, Deborah P. M.; GRIFFITHS, Christopher E. M.; ASHCROFT, Darren M. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. **The Journal of investigative dermatology**, [S. l.], v. 133, n. 2, p. 377–385, 2013. DOI: 10.1038/JID.2012.339. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23014338/>. Acesso em: 9 jan. 2023.
- PEPPER, Ruth J. et al. Leukocyte and serum S100A8/S100A9 expression reflects disease activity in ANCA-associated vasculitis and glomerulonephritis. **Kidney International**, [S. l.], v. 83, n. 6, p. 1150, 2013. DOI: 10.1038/KI.2013.2. Disponível em: </pmc/articles/PMC3675710/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- PRUENSTER, Monika; VOGL, Thomas; ROTH, Johannes; SPERANDIO, Markus. S100A8/A9: From basic science to clinical application. **Pharmacology & therapeutics**, [S. l.], v. 167, p. 120–131, 2016. DOI: 10.1016/J.PHARMTHERA.2016.07.015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27492899/>. Acesso em: 13 dez. 2021.
- RAHMAN, Proton. Current challenges in the genetics of Psoriatic arthritis: A report from the GRAPPA 2009 annual meeting. *Em: JOURNAL OF RHEUMATOLOGY 2011, Anais [...]. [s.l: s.n.] p. 564–566.* DOI: 10.3899/jrheum.101123. Acesso em: 20 set. 2020.
- RAMMES, Anke; ROTH, Johannes; GOEBELER, Matthias; KLEMPF, Martin; HARTMANN, Michael; SORG, Clemens. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 272, n. 14, p. 9496–9502, 1997. DOI: 10.1074/jbc.272.14.9496. Acesso em: 22 nov. 2019.
- ROMITI, Ricardo; AMONE, Marcelo; MENTER, Alan; MIOT, Helio A. Prevalence of psoriasis in Brazil - a geographical survey. **International journal of dermatology**, [S. l.], v. 56, n. 8, p. e167–e168, 2017. DOI: 10.1111/IJD.13604. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28345141/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- SAGOO, Gurdeep S. et al. Meta-analysis of genome-wide studies of psoriasis susceptibility reveals linkage to chromosomes 6p21 and 4q28-q31 in Caucasian and Chinese Hans population. **The Journal of investigative dermatology**, [S. l.], v. 122, n. 6, p. 1401–1405, 2004. DOI: 10.1111/J.0022-202X.2004.22607.X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15175030/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- SALINGER, David H.; WELCHER, Andrew A.; MARTIN KERKOF, David A.; TIMOUR, Martin; BAUTISTA, Edgar; KRUEGER, James G.; RUSSELL, Chris B.; RAND, Hugh; BIGLER, Jeannette. Monoclonal Antibody IL-17 Receptor – Brodalumab, a Human Anti Psoriatic Skin by Treatment with Gene Expression Profiles Normalized in. [S. l.], 2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1301737. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/192/8/3828>. Acesso em: 13 dez. 2021.

- SCHÖN, Michael P.; ERPENBECK, Luise. **The interleukin-23/interleukin-17 axis links adaptive and innate immunity in psoriasis.** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01323. Disponível em: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org). Acesso em: 21 set. 2020.
- SCHONTHALER, Helia B. et al. S100A8-S100A9 Protein Complex Mediates Psoriasis by Regulating the Expression of Complement Factor C3. *Immunity*, [S. l.], v. 39, n. 6, p. 1171–1181, 2013. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.11.011. Acesso em: 5 set. 2019.
- SEN CHAUDHURI, Arka; YEH, Yu Wen; ZEWDIE, Olifan; LI, Nga Shan; SUN, Jia Bin; JIN, Tao; WEI, Bin; HOLMGREN, Jan; XIANG, Zou. S100A4 exerts robust mucosal adjuvant activity for co-administered antigens in mice. *Mucosal Immunology* **2022 15:5**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 1028–1039, 2022. DOI: 10.1038/s41385-022-00535-6. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41385-022-00535-6>. Acesso em: 10 jan. 2023.
- SILVA, Cássia R. et al. S100A9 plays a pivotal role in a mouse model of herpetic neuralgia via TLR4/TNF pathway. *Brain, Behavior, and Immunity*, [S. l.], v. 88, 2020. DOI: 10.1016/j.bbi.2020.03.033. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32243898/>. Acesso em: 6 ago. 2020.
- SUN, Liang Dan et al. Association analyses identify six new psoriasis susceptibility loci in the Chinese population. *Nature genetics*, [S. l.], v. 42, n. 11, p. 1005–1009, 2010. DOI: 10.1038/NG.690. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20953187/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- SUNAHORI, Katsue et al. The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, [S. l.], v. 8, n. 3, 2006. DOI: 10.1186/ar1939. Acesso em: 5 set. 2019.
- SUTTON, Caroline E.; LALOR, Stephen J.; SWEENEY, Cheryl M.; BRERETON, Corinna F.; LAVELLE, Ed C.; MILLS, Kingston H. G. Interleukin-1 and IL-23 Induce Innate IL-17 Production from  $\gamma\delta$  T Cells, Amplifying Th17 Responses and Autoimmunity. *Immunity*, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 331–341, 2009. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.08.001. Acesso em: 8 dez. 2019.
- TOLLEFSON, Megha M.; CROWSON, Cynthia S.; MCEVOY, Marian T.; MARADIT KREMERS, Hilal. Incidence of psoriasis in children: A population-based study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, [S. l.], v. 62, n. 6, p. 979–987, 2010. DOI: 10.1016/j.jaad.2009.07.029. Disponível em: <http://www.jaad.org/article/S0190962209009463/fulltext>. Acesso em: 9 jan. 2023.
- TSAI, Su Yu; SEGOVIA, Jesus A.; CHANG, Te Hung; MORRIS, Ian R.; BERTON, Michael T.; TESSIER, Philippe A.; TARDIF, Mélanie R.; CESARO, Annabelle; BOSE, Santanu. DAMP Molecule S100A9 Acts as a Molecular Pattern to Enhance Inflammation during Influenza A Virus Infection: Role of DDX21-TRIF-TLR4-MyD88 Pathway. *PLoS Pathogens*, [S. l.], v. 10, n. 1, 2014. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003848. Acesso em: 19 nov. 2019.
- TSOI, Lam C. et al. Large scale meta-analysis characterizes genetic architecture for common psoriasis associated variants. *Nature communications*, [S. l.], v. 8, 2017. DOI: 10.1038/NCOMMS15382. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28537254/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- TUZLAK, Selma; DEJEAN, Anne S.; IANNACONE, Matteo; QUINTANA, Francisco J.; WAISMAN, Ari; GINHOUX, Florent; KORN, Thomas; BECHER, Burkhard. Repositioning TH cell polarization from single cytokines to complex help. *Nature Immunology*, [S. l.], v. 22, n. 10, p. 1210–1217, 2021. DOI: 10.1038/S41590-021-01009-W. Disponível em: [116](https://moh-</a></p></div><div data-bbox=)

it.pure.elsevier.com/en/publications/repositioning-tsubsub-cell-polarization-from-single-cytokines-to. Acesso em: 20 nov. 2022.

VAN DER FITS, Leslie et al. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 182, n. 9, p. 5836–5845, 2009. a. DOI: 10.4049/jimmunol.0802999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19380832/>. Acesso em: 30 jul. 2020.

VAN DER FITS, Leslie et al. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 182, n. 9, p. 5836–5845, 2009. b. DOI: 10.4049/jimmunol.0802999. Acesso em: 8 dez. 2019.

VEAL, C. D. et al. Identification of a novel psoriasis susceptibility locus at 1p and evidence of epistasis between PSORS1 and candidate loci. **Journal of medical genetics**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 7–13, 2001. DOI: 10.1136/JMG.38.1.7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11134234/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

VOGL, Thomas et al. Autoinhibitory regulation of S100A8/S100A9 alarmin activity locally restricts sterile inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 128, n. 5, p. 1852–1866, 2018. DOI: 10.1172/JCI89867. Acesso em: 17 nov. 2019.

VOGL, Thomas; GHARIBYAN, Anna L.; MOROZOVA-ROCHE, Ludmilla A. Pro-inflammatory S100A8 and S100A9 proteins: self-assembly into multifunctional native and amyloid complexes. **International journal of molecular sciences**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 2893–2917, 2012. DOI: 10.3390/IJMS13032893. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22489132/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

WEBER, David J.; ZIMMER, Danna B. The Calcium-Dependent Interaction of S100B with Its Protein Targets. **Cardiovascular Psychiatry and Neurology**, [S. l.], v. 2010, p. 17, 2010. DOI: 10.1155/2010/728052. Disponível em: [/pmc/articles/PMC2933916/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22489132/). Acesso em: 10 jan. 2023.

WILSMANN-THEIS, D.; WAGENPFEIL, J.; HOLZINGER, D.; ROTH, J.; KOCH, S.; SCHNAUTZ, S.; BIEBER, T.; WENZEL, J. Among the S100 proteins, S100A12 is the most significant marker for psoriasis disease activity. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, [S. l.], v. 30, n. 7, p. 1165–1170, 2016. a. DOI: 10.1111/jdv.13269. Acesso em: 8 dez. 2019.

WILSMANN-THEIS, D.; WAGENPFEIL, J.; HOLZINGER, D.; ROTH, J.; KOCH, S.; SCHNAUTZ, S.; BIEBER, T.; WENZEL, J. Among the S100 proteins, S100A12 is the most significant marker for psoriasis disease activity. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV**, [S. l.], v. 30, n. 7, p. 1165–1170, 2016. b. DOI: 10.1111/JDV.13269. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26333514/>. Acesso em: 13 dez. 2021.

WILSMANN-THEIS, D.; WAGENPFEIL, J.; HOLZINGER, D.; ROTH, J.; KOCH, S.; SCHNAUTZ, S.; BIEBER, T.; WENZEL, J. Among the S100 proteins, S100A12 is the most significant marker for psoriasis disease activity. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, [S. l.], v. 30, n. 7, p. 1165–1170, 2016. DOI: 10.1111/jdv.13269. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jdv.13269>. Acesso em: 21 jan. 2021.

WOLF, Ronald et al. Gene from a psoriasis susceptibility locus primes the skin for inflammation. **Science translational medicine**, [S. l.], v. 2, n. 61, 2010. DOI: 10.1126/SCITRANSLMED.3001108. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21148126/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

XU, Yingping; DIMITRION, Peter; CVETKOVSKI, Steven; ZHOU, Li; MI, Qing Sheng. Epidermal resident  $\gamma\delta$  T cell development and function in skin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 78, n. 2, p. 573–580, 2021. DOI: 10.1007/S00018-

- 020-03613-9/FIGURES/2. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-020-03613-9>. Acesso em: 18 nov. 2022.
- ZACHARIAE, Hugh; ZACHARIAE, Robert; BLOMQVIST, Kirsti; DAVIDSSON, Steingrimur; MOLIN, Lars; MØRK, Cato; SIGURGEIRSSON, Bardur. Quality of life and prevalence of arthritis reported by 5,795 members of the Nordic Psoriasis Associations. Data from the Nordic Quality of Life Study. **Acta dermato-venereologica**, [S. l.], v. 82, n. 2, p. 108–113, 2002. DOI: 10.1080/00015550252948130. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12125937/>. Acesso em: 9 jan. 2023.
- ZHANG, Xuejun et al. A large-scale screen for coding variants predisposing to psoriasis. **Nature genetics**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 45–50, 2014. DOI: 10.1038/NG.2827. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24212883/>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- ZIMMER, Danna B.; CORNWALL, Emily H.; LANDAR, Aimee; SONG, Wei. The S100 protein family: History, function, and expression. **Brain Research Bulletin**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 417–429, 1995. DOI: 10.1016/0361-9230(95)00040-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7620916/>. Acesso em: 20 set. 2020.
- ZREIQAT, Hala et al. S100A8 and S100A9 in experimental osteoarthritis. **Arthritis Research and Therapy**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–13, 2010. DOI: 10.1186/AR2917/FIGURES/6. Disponível em: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar2917>. Acesso em: 13 jan. 2023.

***Anexos***



## **9. ANEXOS**

### **9.1. Anexo 1: Prêmios recebidos durante o Doutorado**

2022 Menção honrosa de apresentação científica - IV Workshop on inflammation and VII INFLAMMA, Brazilian Society of Inflammation.

2022 Menção honrosa de pôster científico - categoria Doutorado - XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia - SBI (IMMUNO 2022).

2021 Melhor apresentação oral de Doutorado - XIV Workshop de Imunologia - IBA FMRP USP.

2021 Bolsa de estágio de Pesquisa FAPESP no exterior (Universidade de Zurique, Zurique, Suíça) - Jan 2021/Jan 2022.

2018 Melhor apresentação oral de Doutorado - XIII Workshop de Imunologia - IBA FMRP USP.

2018 Prêmio Thereza Kipnis (1º lugar) - Apresentação Oral - XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia - SBI (IMMUNO 2018).

2018 Menção Honrosa - "Prêmio Vânia Bonato" - Apresentação Oral - XI Curso de Inverno de Imunologia, IBA - FMRP USP - (Aula Ministrada: "A interação entre microbiota e o sistema imunológico").

2017 Prêmio José Ribeiro do Valle 2017 (3º lugar) - Apresentação Oral - 49º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental - SBFTE.

## 9.2. Anexo 2: Artigos publicados/ aceitos/ em revisão durante o doutorado

**Silva de Melo, Bruno Marcel;** Veras, Flavio.; Zwicky, Pascale, Lima, Diógenes; Ingelfinger, Florian; Varela, Timna; Prado, Douglas; Schärli, Stefanie; Publio, Gabriel; Hiroki, Carlos; Melo, Paulo; Saraiva, André; Norbiato, Thainá; Lima, Leonardo; Ryffel, Bernhard; Vogl, Thomas; Roth, Johannes; Waisman, Ari; Nakaya, Helder; Souza, Cacilda; Cunha, Fernando; Cunha, Thiago; Becher, Burkhard; Alves-Filho, José Carlos. **S100A9 drives the chronification of psoriasiform inflammation by inducing IL-23/type-3 immunity.** Accepted on *Journal of Investigative Dermatology*. 2023.

Tobias Wertheimer\*; Pascale Zwicky\*; Lukas Rindlisbacher; **Bruno Melo;** Florian Ingelfinger; Claudia Haftmann; Marijne Vermeer; Aakriti Sethi; Stefanie Schärli; Andreas Muschwackh; Gildas Lepennetier; Mohamed Oukka; Colin Sparano; Nicolas Nunez; André Fonseca da Silva; Sinduya Krishnarajah; Anna Huber; Thomas Korn; Sonia Tugues; Burkhard Becher. **Tumor-associated macrophages promotes an effector Treg program through the local production of IL-23.** Under review. 2022.

Flávio Veras\*; Gabriel Publio\*; **Bruno Melo;** Douglas Prado; Thainá Norbiato; Nery Cecilio; Carlos Hiroki; Luis Damasceno; Rebecca Jung; Diogenes Lima; Marcia Alves; Gabriel Vieira; Lucas Tavares; Susanne Karbach; Helder Nakaya; Thiago M. Cunha; Cacilda S. Souza; Fernando Cunha; Katiuchia Sales; Ari Waisman; José Alves-Filho. **Pyruvate kinase M2 mediates IL-17 signaling in keratinocytes driving psoriatic skin inflammation.** *Cell Reports*, v. 41, p. 111897, 2022.

Fernanda Crunfli; Victor Carregari; Flavio Veras; Pedro Vendramini; Aline Valença; André Antunes; Caroline Teles; Giuliana Zuccoli; Guilherme Oliveira; Lícia Costa; Verônica Cereda; Ana Codo; Pierina Parise; Daniel Teixeira; Gabriela Souza; Stéfanie Muraro; **Silva de Melo, Bruno Marcel;** Glauca Almeida; Mayara Firmino; *et al.* **Morphological, cellular, and molecular basis of brain infection in COVID-19 patients.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 119, p. 1-12, 2022.

Zwicky, Pascale; Ingelfinger, Florian; **Silva de Melo, Bruno Marcel;** Ruchti, Fiorella; Schärli, Stefanie; Puertas, Nicole; Lutz, Mirjam; Phan, Truong San; Kündig, Thomas M.; Levesque, Mitchell p.; Maul, Julia-tatjana; Schlapbach, Christoph; Leibundgut-landmann, Salomé; Mundt, Sarah; Becher, Burkhard. **IL-12 regulates type 3 immunity through interfollicular keratinocytes in psoriasiform inflammation.** *Science Immunology*, v. 6, p. 1-14, 2021.

Alves-filho, José Carlos; **Silva de Melo, Bruno Marcel;** Ryffel, Bernhard. **MMP-9 Mediates Cross-Talk between Neutrophils and Endothelial Cells in Psoriasis.** *Journal of Investigative Dermatology*, v. 141, p. 716-718, 2021.

Santiago-Carvalho, Igor; Almeida-santos, Gislane de; Bomfim, Caio César Barbosa; Souza, Paula Carolina de; Silva, Juan Carlo Santos E; **Silva de Melo, Bruno Marcel;** Amaral, Eduardo Pinheiro; Cione, Marcos Vinícios Pinheiro; Lasunskaja, Elena; Hirata, Mario Hiroyuki; Alves-Filho, José Carlos Farias; Nakaya, Helder Imoto; Alvarez, José Maria; Dimpério Lima, Maria Regina. **P2x7 Receptor Signaling Blockade Reduces Lung Inflammation and Necrosis During Severe Experimental Tuberculosis.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, p. 1, 2021.

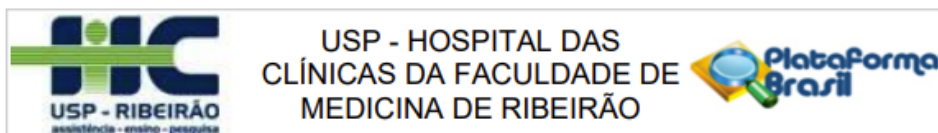
Silva, Cássia R.\*; **Silva de Melo, Bruno Marcel\*;** Silva, Jaqueline R.; Lope, Alexandre H.; Pereira, Janaina A.; Cecilio, Nery T.; Berlink, Jonilson; Souza, Giovani G.; Lucas, Guilherme; Vogl, Thomas; Cunha, Fernando Q.; Alves-Filho, José C.; Cunha, Thiago M. **S100A9 plays a pivotal role in a mouse model of herpetic neuralgia via TLR4/TNF pathway.** *Brain Behavior and Immunity*, v. 85, p. 1-94, 2020.

Rodrigues, Tamara Silva; Alvarez, Annie Rocio Piñeros; Gembre, Ana Flávia; Forni, Maria Fernanda Pereira de Araújo de; **Silva de Melo, Bruno Marcel;** Alves-Filho, José Carlos Farias; Câmara, Niels Olsen Saraiva; Bonato, Vânia Luiza Deperon. **Infected alveolar epithelial cells modulate dendritic cell function through the HIF-1 $\alpha$ -NOS2 axis.** *Journal of Leukocyte Biology*. v. 108, p. JLB.3MA0520-113R, 2020.

### 9.3. Anexo 3: Aprovação da CEUA

	<p><b>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO</b>  <b>FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO</b>  <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b></p> 	
<h2 style="margin: 0;">CERTIFICADO</h2>		
<p>Certificamos que o Protocolo intitulado “<i>Papel da via S100A9/TLR4 na modulação metabólica e funcional de queratinócitos e comunicação com o eixo IL-23/IL-17: implicações na patogênese da psoríase</i>”, registrado com o número <b>077/2019</b>, sob a responsabilidade do <b>Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho</b>, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao <i>filo Chordata, subfilo Vertebrata</i> (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi <b>APROVADO</b> pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 01 de julho de 2019.</p>		
<p>Este Protocolo prevê a utilização de 396 camundongos C57BI 6 machos pesando 20g e 09 camundongos C57BI 6 machos pesando 3g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do <i>Campus</i> de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 77 camundongos MRP-14 machos pesando 20g e 18 camundongos TLR-4 KO machos pesando 20g oriundos do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 21 camundongos K14-CRE/TLR4 flox/flox machos pesando 20g, 21 camundongos CD11C-CRE/TLR4 flox/flox machos pesando 20g e 09 camundongos K14-Cre/TLR4 flox/flox machos pesando 3g oriundos do Biotério de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 01/07/2019 a 20/08/2021.</p>		
<hr/> <small>Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil - 14049-900 - Tel.: (16) 3315-3301 / 3315.3275 - e-mail: ceua@fmrp.usp.br</small>		

## 9.4. Anexo 4: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) HCFMRP/USP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** S100A9: Potencial biomarcador de atividade da Artrite Psoriásica e da Psoríase cutânea

**Pesquisador:** BRUNO MARCEL SILVA DE MELO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 65644117.1.0000.5440

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.167.143

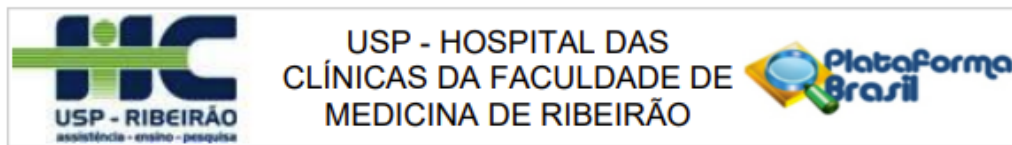
#### Apresentação do Projeto:

A psoríase (PsO) e artrite psoriásica (PsA) são doenças inflamatórias crônicas que afetam a pele e as articulações, respectivamente, em decorrência da desregulação dos elementos presentes na epiderme e na derme, apresentando uma elevada morbidade, custos aos sistemas de saúde e perda de produtividade. A patogênese caracteriza-se por falhas nos mecanismos de tolerância imunológica acarretando na proliferação de células T auto-reativas. As células T produtoras de IL-17 desempenham um papel crítico na patogênese e perpetuação da doença. Proteínas da família S100 pertencem a um grupo de peptídeos antimicrobianos que são encontrados em várias condições inflamatórias. Dessa família, destaca-se a S100A9, que parece estar associada com várias desordens inflamatórias, incluindo a artrite psoriásica e psoríase. Essas moléculas podem ser produzidas por células mielóides, tais como neutrófilos, macrófagos e monócitos, bem como células epiteliais e podem atuar via receptores Toll 4, RAGE e CD36. A família das proteínas S100, bem como S100A9 parece ser importante para o desenvolvimento e manutenção de várias doenças inflamatórias, como a psoríase, e pode ser usada como potencial biomarcador de doença ativa.

#### Objetivo da Pesquisa:

**OBJETIVO GERAL:** Avaliar o papel de S100A9 como potencial biomarcador de atividade da psoríase cutânea e da artrite psoriásica.

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
**Bairro:** MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 2.167.143

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

AVALIAR OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE S100A9 EM INDIVÍDUOS COM PSORÍASE CUTÂNEA E ARTRITE PSORIÁSICA

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos decorrentes da obtenção de amostras são: cicatriz (1-2 mm) no local da biópsia (frequente), infecção (raro) e alergia à anestesia (muito raro). Na ocorrência de efeitos indesejáveis, o paciente será atendido pela pesquisadora médica colaboradora ou equipe da Dermatologia do HCFMRP-USP. Estes procedimentos não irão prejudicar, retardar ou alterar o tratamento e o seguimento médico que o paciente esteja realizando.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Doença de tratamento difícil e que afeta significativamente a qualidade dos afetados. A identificação de agentes que possam controlar a doença poderão ter aplicabilidade clínica importante.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os autores acertaram os detalhes do TCLE e anexaram a concordância da farmacologia para as análises a serem realizadas naquele departamento

#### **Recomendações:**

Ndn

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

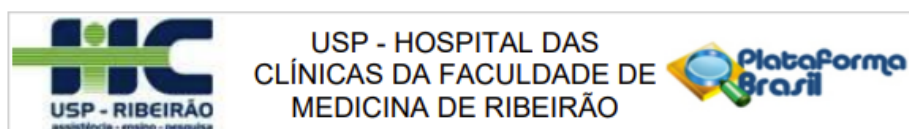
Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa Versão 4 - 14/06/2017, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e para Guarda de Material (ARTRITE PSORIÁSICA) Versão 4 data 14/junho/2017; o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e para Guarda de Material (CONTROLES) Versão 4 data 14/junho/2017, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

<b>Endereço:</b> CAMPUS UNIVERSITÁRIO			
<b>Bairro:</b> MONTE ALEGRE			<b>CEP:</b> 14.048-900
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> RIBEIRAO PRETO		
<b>Telefone:</b> (16)3602-2228	<b>Fax:</b> (16)3633-1144	<b>E-mail:</b> cep@hcrp.usp.br	

Página 02 de 04



Continuação do Parecer: 2.167.143

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_861149.pdf	16/06/2017 12:38:41		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_TERMOS_PARA_BIORREPOSITO RIO_S100A9_PSO_V4.docx	16/06/2017 12:38:17	BRUNO MARCEL SILVA DE MELO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_TERMOS_PARA_BIORREPOSITO RIO_S100A9_CONTOLES_V4.docx	16/06/2017 12:38:02	BRUNO MARCEL SILVA DE MELO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_TERMOS_PARA_BIORREPOSITO RIO_S100A9_Artrite_V4.docx	16/06/2017 12:37:51	BRUNO MARCEL SILVA DE MELO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_4.docx	16/06/2017 12:34:08	BRUNO MARCEL SILVA DE MELO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_S100A9_PSORRIASE_4.docx	16/06/2017 12:33:48	BRUNO MARCEL SILVA DE MELO	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_AO_CEP_15_05_2017.pdf	15/05/2017 10:11:54	BRUNO MARCEL SILVA DE MELO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DECLARACAO_INFRAESTRUTURA.pdf	15/05/2017 10:07:55	BRUNO MARCEL SILVA DE MELO	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_3.docx	15/05/2017 10:00:54	BRUNO MARCEL SILVA DE MELO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	BIO.pdf	10/03/2017 16:37:03	BRUNO MARCEL SILVA DE MELO	Aceito
Outros	ORCAMENTO_UPC_APROVADO.pdf	10/03/2017 16:30:51	BRUNO MARCEL SILVA DE MELO	Aceito
Outros	CARTAZ_RECRUTAMENTO_CONTROLES.docx	06/02/2017 15:03:24	BRUNO MARCEL SILVA DE MELO	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	06/02/2017 14:51:46	BRUNO MARCEL SILVA DE MELO	Aceito

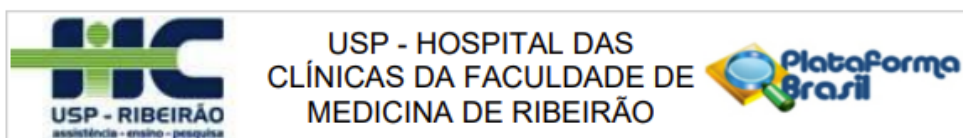
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 2.167.143

RIBEIRAO PRETO, 11 de Julho de 2017

---

**Assinado por:**  
**MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
**Bairro:** MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Página 04 de 04