

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

LARISSA PINTO DE ANDRADE

**PAPEL DA ENZIMA PIRUVATO QUINASE M2 (PKM2) NA MODULAÇÃO DA  
ATIVAÇÃO ASTROCITÁRIA**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2023

LARISSA PINTO DE ANDRADE

**PAPEL DA ENZIMA PIRUVATO QUINASE M2 (PKM2) NA MODULAÇÃO DA  
ATIVAÇÃO ASTROCITÁRIA**

**Versão corrigida**

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

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

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

RIBEIRÃO PRETO - SP

2023

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

### **Ficha Catalográfica**

Andrade, Larissa Pinto de

Papel da enzima Piruvato Quinase M2 (PKM2) na modulação da  
ativação astrocitária. Ribeirão Preto, 2023

71 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha.

1. Astrócitos. 2. Imunometabolismo. 3. Neuroinflamação.

**Nome:** Larissa Pinto de Andrade

**Título:** Papel da enzima Piruvato Quinase M2 (PKM2) na modulação da ativação astrocitária

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

Aprovado(a) em: \_\_\_\_\_.

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha. Instituição: FMRP - USP.

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

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

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

Prof. Dr. Rafael Freitas de Oliveira França. Instituição: FIOCRUZ.

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

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor (LID) do Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Doenças Inflamatórias, FAPESP, CAPES e CNPq.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marlise e Mauricio, por todo o suporte incondicional ao longo de todos os anos e por sempre oferecerem nada além de apoio para as minhas escolhas. Que sorte a minha ter vocês.

Às minhas irmãs, Tati e Mari, por todos os momentos juntas que temos; por todas nossas trocas; pela oportunidade de ser tia (e madrinha) e de viver coisas incríveis com pessoas que eu amo.

Aos meus amigos, por conseguirem tornar tudo tão mais leve mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado, Matheus, por todo o apoio, confiança - mesmo quando nem eu a tenho - e companheirismo. Obrigada por acreditar em mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thiago Cunha, pelas reuniões, momentos de discussões científicas e pela oportunidade de iniciar e seguir minha carreira acadêmica no seu grupo de pesquisa.

Aos meus colaboradores, que me ajudaram e socorreram nos experimentos, além dos momentos de discussões e *insights*.

A todo o Grupo Dor, pelas conversas descontraídas no café da manhã de toda semana, seguidas pelas discussões científicas do *lab meeting*.

Aos Professores Dr. Fernando Cunha e Dr. José Carlos Alves-Filho pelas conversas e aprendizados.

Aos membros componentes da banca examinadora pelo aceite e disponibilidade.

A todos os alunos e técnicos do Laboratório de Inflamação e Dor.

Aos técnicos do Departamento de Farmacologia, de Bioquímica e Imunologia e de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos que, de alguma forma, contribuíram com esse trabalho.

À Ana Cristine, secretária do PPG-IBA, por toda ajuda de sempre.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e à Universidade de São Paulo pela infraestrutura.

Ao Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias (CRID) pelo suporte e infraestrutura.

Ao CNPq, CAPES, FAPESP e FAEPA pelo auxílio financeiro por meio da concessão da bolsa de pesquisa e suporte para participação em eventos científicos.

*“Lights will guide you home.”*

- Coldplay (2005)

## RESUMO

Andrade, L. P. **Papel da enzima Piruvato Quinase M2 (PKM2) na modulação da ativação astrocitária.** 2023. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2023.

Os astrócitos são as células gliais presentes em maior quantidade no Sistema Nervoso Central (SNC) e têm sido cada vez mais descritos como componentes importantes em condições homeostáticas e patológicas. Essas células são as principais reguladoras do metabolismo energético no cérebro, sendo que este encontra-se afetado diante de disfunções no SNC. A glicose, após entrada nos astrócitos, pode ser oxidada via glicólise e, como reação final, ocorre a formação de ATP e piruvato pela ação catalítica da enzima Piruvato Quinase (PK). A isoforma PKM2, quando apresentada na forma dimérica, têm se mostrado importante no desenvolvimento de condições inflamatórias. Uma vez que a literatura demonstra tanto que as células imunes, quanto as células residentes do SNC, sofrem disfunções metabólicas devido à inflamação, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da PKM2 na modulação da ativação de astrócitos em condições inflamatórias. Inicialmente, foi feita a padronização e caracterização da cultura primária de astrócitos diante de diferentes estímulos inflamatórios e avaliação da liberação de mediadores inflamatórios astrocitários clássicos. Ao adotar o TNF como estímulo inflamatório, foi avaliado o perfil metabólico destas células por meio da expressão de enzimas glicolíticas e observou-se aumento da expressão de PKM2 diante desse estímulo. Verificou-se que o estímulo inflamatório adotado induz a translocação nuclear da PKM2 e que, quando utilizado o TEPP-46, há favorecimento da PKM2 sob sua forma tetramérica - de forma a agir como inibidor de atividade não-enzimáticas. Além disso, observou-se que TEPP-46 leva a redução de maneira concentração-dependente de quimiocinas características da ativação astrocitária, especialmente CXCL1, e aumento de CCL2. Quando utilizamos inibidores de ativação da via NF- $\kappa$ B e de atividade quinase da MAPK, também observamos o mesmo padrão de resposta. Quando utilizada maior concentração de um desses inibidores, verificou-se redução de viabilidade celular; entretanto, ao utilizar inibidor da via da necroptose, não se observou redução na liberação de mediadores pelos astrócitos, de modo a demonstrar que não há relação entre estas vias. Uma vez utilizado o modelo experimental EAE, verificou-se que a presença da PKM2 em astrócitos sugere um efeito protetor no desenvolvimento desse modelo, o que foi demonstrado a partir de *score* clínico e avaliação de desmielinização na medula espinal. Dessa forma, concluiu-se que a enzima Piruvato Quinase sob a isoforma M2 (PKM2) apresenta papel na modulação da ativação de astrócitos de maneira dual.

**Palavras-chave:** Astrócitos; Imunometabolismo; Neuroinflamação.



## ABSTRACT

Andrade, L. P. **Role of the enzyme Pyruvate Kinase M2 (PKM2) modulating astrocytes activation.** 2023. Master's dissertation - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil, 2023.

Astrocytes are the glial cells most present in the central nervous system (CNS) and have been increasingly described as important components in homeostatic and pathological conditions. Astrocytes are key regulators of energy metabolism in the brain, with their own metabolism being fully affected in CNS dysfunctions. After entering astrocyte, glucose can be oxidized via glycolysis and, as a final reaction, ATP and pyruvate formation occurs through the catalytic action of the enzyme Pyruvate Kinase (PK). The isoform PKM2, when standing as a dimer, has been shown to be important in development of inflammatory conditions. Since the literature demonstrates that both immune and CNS resident cells undergo metabolic dysfunctions due to inflammation, the aim of this study was to evaluate the role of PKM2 modulating astrocytes activation under inflammatory conditions. Initially, we standardized and characterized the astrocytes primary culture by evaluating the production of classical astrocytic mediators after diverse inflammatory stimuli. Adopting TNF as an inflammatory stimulus, we evaluated the metabolic profile of these cells through the expression of glycolytic enzymes and we noticed higher production of PKM2 in the face of these inflammatory stimuli. We verified that TNF stimuli induce PKM2 nuclear translocation and that TEPP-46, when used in astrocytes primary culture, has the capacity to maintain PKM2 under its tetrameric form, acting like a non-enzymatic activity inhibitor. Furthermore, we observed that TEPP-46 leads to concentration-dependent reduction of chemokines characteristic of astrocytic activation, especially CXCL1, and increase of CCL2. Next, we investigated which pathway could be involved in the astrocytes response. For this purpose, we used an inhibitor of NF- $\kappa$ B and MAPK activation and we noticed the same response as observed before. With a higher concentration of one of these inhibitors we observed decrease of cell viability; however, when using a necroptosis inhibitor, we did not see decrease in release of inflammatory, demonstrating that those pathways are not related. Using the experimental model EAE, we noticed that presence of PKM2 astrocytes has a protective role under the development of this model, demonstrated by clinical score and demyelination. In conclusion, the enzyme Pyruvate Kinase under the isoform M2 (PKM2) appears as a possible protein that modulates the astrocytic inflammatory response in dual ways.

**Keywords:** Astrocytes; Immunometabolism; Neuroinflammation.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

4-OHT - 4-Hidroxitamoxifeno

ADP - Adenosina Difosfato

ATP - Adenosina Trifosfato

BCA - cido Bicinconnico

BSA - Albumina de Soro Bovino

cDNA - Fita de DNA complementar

CFA - Adjuvante Completo de Freund

CCL - Ligante C-C

CXCL - Ligante C-X-C

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ERK - Quinase Regulada por Sinal Extracelular

IL - Interleucina

JNK - Quinase c-Jun N-terminal

mL - Microlitro

$\mu$ M - Micromolar

NF-kB - Fator Nuclear Kappa B

ng - Nanograma

nM - Nanomolar

PBS - Tampo Fosfato-Salino

PCR - Reao em Cadeia de Polimerase

RPM - Rotaes por Mnuto

RT-qPCR - PCR de Transcrição Reversa Quantitativa

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil-Sulfato de Sódio

STAT3 - Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3

TGF- $\beta$  - Fator de Crescimento Transformante- $\beta$

Linfócitos T<sub>H</sub> - T<sub>HELPER</sub>

TNF - Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$

UDP-N-acetilglucosamina - Uridina Difosfato N-acetilglucosamina

WT - *Wild Type*

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Os astrócitos possuem alta expressão de enzimas glicolíticas já em condição de homeostase.

**Figura 2.** Processo de enriquecimento da cultura primária de astrócitos.

**Figura 3.** TNF induz produção de mediadores pró-inflamatórios de maneira concentração e tempo-dependente em cultura primária de astrócitos.

**Figura 4.** Coquetel induz produção de mediadores pró-inflamatórios em cultura primária de astrócitos.

**Figura 5.** Há alteração da expressão gênica de PKM2 diante de estímulo inflamatório.

**Figura 6.** O tratamento com TEPP-46 leva à alteração na produção de mediadores inflamatórios.

**Figura 7.** O estímulo por TNF durante 1h já induz a translocação nuclear da PKM2, mas o tratamento com TEPP-46 ainda não possui efeito visível na reversão deste processo.

**Figura 8.** A translocação nuclear de PKM2 induzida pelo estímulo por TNF feito durante 3h é ainda mais notável, enquanto o efeito observado pelo tratamento com TEPP-46 também torna-se perceptível.

**Figura 9.** Inibidor de ativação da via NF-kB induz aumento na produção de CCL2 e redução de CXCL1 de forma semelhante à vista quando utilizado inibidor de ativação de PKM2.

**Figura 10.** Não há influência da via da necroptose na liberação de mediadores inflamatórios em cultura primária de astrócitos.

**Figura 11.** Ilustração esquemática referente a geração de animais  $Aldh1^{creER}/R26^{tdTomato}$ .

**Figura 12.** O tratamento com tamoxifeno induz ativação da Cre recombinase de forma específica em astrócitos.

**Figura 13.** Ilustração esquemática referente a geração de animais  $Aldh1^{creER}/PKM2^{fl/fl}$ .

**Figura 14.** A ausência da PKM2 favorece o desenvolvimento do modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental.

**Figura 15.** A ausência da PKM2 em astrócitos induz maior perda de integridade da medula espinal.

**Figura 16.** A ausência da PKM2 favorece a desmielinização, mas não a astrogliose, na medula espinal.

**Figura 17.** A ausência da PKM2 em cultura primária de astrócitos induz a liberação de mediadores inflamatórios.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 ASTRÓCITOS .....	15
1.1.1 Classificação .....	15
1.1.2 Funções biológicas dos astrócitos .....	16
1.1.3 Papel dos astrócitos na neuroinflamação .....	17
1.1.4 Importância do metabolismo de astrócitos .....	18
1.2 A VIA GLICOLÍTICA .....	19
1.2.1 PKM1/2: aspectos gerais .....	20
1.2.1.1 Especificidades da PKM2 .....	21
1.2.1.1.1 Moduladores conformacionais endógenos .....	22
1.2.1.1.2 Moduladores conformacionais exógenos .....	23
1.2.1.1.3 Funções nucleares da PKM2 .....	24
1.3 IMUNOPATOLOGIA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM) .....	26
1.3.1 Modelo experimental: Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) .....	27
1.4 HIPÓTESE .....	27
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	28
2.1 OBJETIVO GERAL .....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	29
3.1 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL .....	29
3.1.1 Depleção da enzima PKM2 em astrócitos .....	29

<b>3.1.2 Indução de modelo de neuroinflamação: Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)</b> .....	29
3.2 REANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA .....	30
3.3 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS .....	30
<b>3.3.1 Depleção da PKM2 em cultura primária de astrócitos</b> .....	31
3.4 CITOMETRIA DE FLUXO .....	31
3.5 RT-qPCR .....	31
3.6 ELISA .....	32
3.7 <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	32
3.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA .....	33
3.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	33
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	33
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ENZIMAS GLICOLÍTICAS EM CÉLULAS RESIDENTES DO SNC E EM CÉLULAS IMUNES .....	34
4.2 PADRONIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA DA CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS .....	35
4.3 AVALIAÇÃO DO PAPEL DA FORMA TETRAMÉRICA DA PKM2 <i>IN VITRO</i> DIANTE DE ESTÍMULO INFLAMATÓRIO .....	38
4.4 INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEIS VIAS ENVOLVIDAS NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA ASTROCITÁRIA POR PKM2 .....	42
4.5 VERIFICAÇÃO DE ATIVAÇÃO DA VIA DA NECROPTOSE, PARALELA À NF- $\kappa$ B, COMO SECUNDÁRIA AO ESTÍMULO INFLAMATÓRIO POR TNF .....	44
4.6 VALIDAÇÃO DE ANIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADOS .....	45

4.7 AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PKM2 EM ASTRÓCITOS NO DESENVOLVIMENTO DA EAE .....	47
4.8 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVAÇÃO ASTROCITÁRIA <i>IN VITRO</i> NA AUSÊNCIA DA PKM2 .....	51
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO I - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA .....</b>	<b>70</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ASTRÓCITOS

O sistema nervoso central (SNC) é composto por células as quais podem ser divididas em dois grupos: neurônios e células gliais; dentre esse segundo grupo, temos oligodendrócitos, microglias e astrócitos. As células gliais são conhecidas, classicamente, como células responsáveis por fornecer suporte aos neurônios. Sabe-se hoje, entretanto, que as funções destas células vão muito além desse cenário secundário aos neurônios (1).

Os astrócitos apresentam-se como as células gliais em maior quantidade no SNC, representando cerca de 30% do total destas (2). Essas células não são homogêneas ao longo de todo esse sistema: existem variações tanto em relação a morfologia, quanto a localização, bem como na expressão gênica - o que, por sua vez, possibilita a definição de marcadores diferenciais para diferentes subtipos astrocitários (3-6).

Em relação aos ditos marcadores diferenciais, um dos clássicos utilizado para marcação de astrócitos é o GFAP, sigla da proteína ácida fibrilar glial (*glial fibrillary acidic protein*), que possui expressão aumentada em astrócitos reativos, durante o processo denominado astrogliose (6). Entretanto, com o avanço das tecnologias de sequenciamento, novos marcadores com maior especificidade têm sido descritos; um exemplo disso é a enzima membro da família L1 de aldeído desidrogenase 1 (Aldh1L1), responsável por catalisar a formação de folato, que têm sido cada vez mais utilizada como marcador para os astrócitos. Essa enzima, no SNC, apresenta-se com expressão específica em astrócitos, com a vantagem, em relação ao GFAP, de ser expresso de forma homogênea ao longo das diferentes subpopulações astrocitárias (4,7).

#### 1.1.1 Classificação

Existem formas variadas de classificar os astrócitos; a classificação morfológica diferencia essas células entre protoplasmáticas e fibrosas, sendo que estas primeiras são caracterizadas como células predominantes da substância cinzenta do SNC, com maior número de ramificações, porém tamanho reduzido destas. Já as células fibrosas encontram-se principalmente na substância branca do SNC, com ramificações em menor quantidade, porém presentes com maior tamanho (3). Quanto às ramificações, estas são formadas pela GFAP e constituem as chamadas fibrilas gliais, presentes nos filamentos intermediários de astrócitos considerados maduros (3).



Recentemente, a literatura trouxe uma nova maneira de classificar os astrócitos quanto à reatividade destas células: a partir da nomenclatura derivada de macrófagos - M1 e M2 (8) -, trabalhos têm descrito a existência desses mesmos dois perfis de polarização para os astrócitos, sendo a polarização A1 referente às células com perfil pró-inflamatório - ou seja, “neurotóxico” -, enquanto a polarização A2 define-se como perfil antiinflamatório - “neuroprotetor”. A definição desses fenótipos está associada aos mediadores inflamatórios liberados por essas células e pela ativação induzida pela presença de determinados mediadores no microambiente que favoreçam algum desses fenótipos - como a presença de C1q, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ , liberados pela microglia diante de contexto inflamatório, que favorecem a polarização A1 astrocitária (9). Por outro lado, a polarização A2 parece estar relacionada à presença de IL-10 no microambiente do SNC (10).

### 1.1.2 Funções biológicas dos astrócitos

Classicamente, os astrócitos são descritos como células responsáveis por fornecer suporte físico aos neurônios e às outras células gliais (1,11); sabe-se, contudo, que as funções astrocitárias vão muito além dessa relação de suporte às células do SNC. Os astrócitos são importantes para o controle da homeostase molecular do SNC de diferentes formas: essas células são responsáveis por realizar o balanço iônico - e, conseqüentemente, o equilíbrio de pH - desse sistema, uma vez que expressam transportadores tais como aquaporina 4 (AQP4) - também utilizado como marcador astrocitário dada sua expressão específica (12) -, de K<sup>+</sup> (13), além de trocadores de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (14). A expressão de canais iônicos na membrana dos astrócitos, apesar de trazer semelhança entre essas células e os neurônios, não permite que as células gliais respondam por meio da formação e propagação de potenciais de ação; na verdade, os astrócitos respondem a estímulos pela liberação de Ca<sup>++</sup> intracelular (15).

Os astrócitos também têm função primordial na morfologia e fisiologia do SNC: essas células gliais possuem papel na sinaptogênese pelo controle da formação, maturação e eliminação de sinapses. Esses processos ocorrem continuamente ao longo da vida e possuem diversas formas de serem regulados, sendo uma delas por meio da liberação de hormônios por essas células, como o estradiol e progesterona, que possuem efeitos na atividade sináptica (16). Além disso, também há liberação de outros mediadores, como os chamados “gliotransmissores” - GABA, ATP, glutamato -, que agem sobre a excitabilidade neuronal, de modo a, posteriormente, alterar a plasticidade sináptica (17).

O glutamato é um neurotransmissor classicamente apontado como importante no acoplamento neuronal-astrocitário, dado que os astrócitos expressam a enzima glutamina

sintetase, responsável por catalisar a formação de glutamina a partir de glutamato e, dessa forma, possibilitar a captação desse metabólito pelos neurônios, para posterior formação e liberação do neurotransmissor na fenda sináptica (18,19). Ainda sobre a relação entre neurônios e astrócitos, outro ponto que têm sido cada vez mais discutido na literatura é a hipótese da “sinapse tripartite”, definida como a importância da interação direta ou indiretamente desses dois tipos celulares sobre a atividade e plasticidade neuronal (20).

Dentre as funções astrocitárias, também pode-se citar seu papel na regulação do fluxo sanguíneo principalmente pela liberação de fatores vasodilatadores, tais como prostaglandinas, óxido nítrico e ácido araquidônico. Dessa maneira, os astrócitos agem como sensores da atividade neuronal para, em caso de disfunções do SNC, seja feita regulação e controle do fluxo sanguíneo pela liberação desses mediadores citados (21).

Os astrócitos também integram a barreira hematoencefálica (BHE) juntamente com os vasos endoteliais. A BHE é uma barreira física formada a partir da expressão de diferentes junções celulares - *tight*, *adhering* e *gap junctions* - pelas células endoteliais, além de pericitos, neurônios e células gliais. Hoje, sabe-se que a região denominada *endfeet* dos astrócitos perivasculares expressa conexinas (*gap junctions*), as quais contribuem para a formação da BHE (22,23). Esta barreira é a interface entre o SNC e os vasos sanguíneos, de modo a funcionar como uma proteção ao sistema nervoso contra eventuais antígenos e patógenos circulantes, bem como possíveis alterações iônicas no fluxo sanguíneo por meio da formação de um ambiente “imunologicamente privilegiado”. Nesse contexto, os astrócitos perivasculares possuem papel na manutenção dessa barreira, sendo que, em caso de disfunções no SNC, é amplamente descrito a ocorrência de alterações na permeabilidade da BHE, tendo como uma das causas para isso a alteração morfológica dos astrócitos ali presentes, além de alterações na expressão das *gap junctions*, de forma a interferir no controle realizado por essas junções celulares (24,25).

### **1.1.3 Papel dos astrócitos na neuroinflamação**

Além das diversas funções exercidas para manutenção da homeostase do SNC, o papel dos astrócitos têm sido amplamente descrito no desenvolvimento de processos patológicos. Essas células, uma vez consideradas “*immune-like*” - ou seja, possuem perfil semelhante às células imunológicas - são capazes de detectar os estímulos nocivos nesse sistema e responder pela liberação de diferentes mediadores pró ou antiinflamatórios, de acordo com o microambiente e a polarização astrocitária, dos quais pode-se citar IL-6, TNF, IL-10, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , CXCL1, CXCL2, CXCL9 e CXCL10, por exemplo (26-28). Essa resposta astrocitária

pode ocorrer por meio da ativação de diferentes vias de sinalização, destacando-se STAT3, NF- $\kappa$ B, ERK e JNK (29,6). A liberação desses mediadores leva, portanto, ao recrutamento de leucócitos, de modo a induzir uma resposta inflamatória aumentada localmente (30). Por outro lado, a liberação desses mediadores também induz resposta de células residentes do SNC, como microglia e neurônios (31,32).

Além da liberação de mediadores inflamatórios, em condições patológicas os astrócitos considerados reativos passam por modificações morfológicas, que caracterizam o processo de astrogliose. A astrogliose é caracterizada por diversas modificações astrocíticas: uma dessas alterações é o aumento da expressão da proteína GFAP, utilizada como marcador de ativação dessas células, apresentado por meio do aumento das ramificações fibrilares dessas células (6). Os astrócitos também passam por processos de hipertrofia e de proliferação, de modo a alterar a morfologia observada na homeostase do SNC, bem como a permeabilidade da BHE (33).

Durante a astrogliose, descreve-se que os astrócitos perdem algumas de suas funções homeostáticas e, dessa forma, favorecem o aumento da resposta inflamatória local e menor controle da lesão. Nesse contexto, sabe-se que os astrócitos ficam menos hábeis a controlar a manutenção da estrutura da BHE, de modo a permitir infiltrado de células imunológicas, bem como de antígenos e outras moléculas que não se apresentam no SNC em uma situação de homeostase. Kim e colaboradores (2022) demonstram que uma das maneiras pela qual esse processo ocorre é pelo eixo TNF/STAT3, que favorece a transcrição de  $\alpha$ 1ACT ( $\alpha$ -antitripsina) e, dessa maneira, induz a disfuncionalidade da BHE (34). O processo de astrogliose também influencia no controle da sinaptogênese e na formação de neuritos, de modo a alterar a excitabilidade e atividade neuronal (33).

#### **1.1.4 Importância do metabolismo de astrócitos**

Dentre as funções exercidas pelos astrócitos que visam o controle da homeostase do sistema nervoso central, destaca-se o papel do metabolismo dessas células. Ainda que os neurônios realizem a metabolização de glicose, os astrócitos têm maior taxa de realização de glicólise que as células neuronais e, dessa forma, são consideradas altamente ativas metabolicamente, de modo a fornecer suporte aos neurônios pela liberação de metabólitos (35-37). A proximidade dos astrócitos perivascularres aos vasos sanguíneos facilita o processo de captação de glicose por essas células via GLUT1, o transportador de glicose presente nas projeções astrocíticas (38).

Dois metabólitos a serem citados como importantes no acoplamento neuronal-astrocitário são o glutamato e o lactato. Pellegrin e Magistretti (1994) (18) demonstram que o glutamato liberado pelos neurônios pode ser internalizado pelos astrócitos por meio da ativação do canal de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e, dessa maneira, induzir a metabolização de glicose e formação de lactato. Além disso, esse neurotransmissor internalizado pelos astrócitos via transportador de glutamato ainda pode ser metabolizado em glutamina por meio da ação catalítica da enzima glutamina sintetase, posteriormente externalizado pelos astrócitos e internalizado pelos neurônios (18).

O lactato, por sua vez, pode ser liberado pelos astrócitos e internalizado pelos neurônios, onde será utilizado como substrato energético por essas células (37). Essa comunicação é possível pela presença de transportadores de lactato, de modo a possibilitar essa comunicação bidirecional entre neurônios e astrócitos. Sabe-se também que a regulação do transporte e do fornecimento desse metabólito para o SNC é possibilitado pela presença de *gap junctions* nos astrócitos perivascularares, de modo a formar redes de comunicação ao longo de todo o sistema (38-40).

A metabolização de lactato pelos astrócitos ainda se apresenta como importante na formação e consolidação de memória de longo prazo como descrito por Suzuki e colaboradores (2011) pela formação e manutenção da *long-term potentiation* (LTP) (41). Nesse contexto, demonstra-se que o glicogênio age como substrato para formação de lactato pelas células gliais, sendo este um metabólito classicamente conhecido como utilizado para reserva energética.

Em relação ao glicogênio, os astrócitos são as principais células que atuam como reservas desse metabólito no SNC (42,43). Assim, em situações de privação de glicose, trabalhos demonstram sua importância para manutenção da função axonal e transmissão sináptica, de modo a favorecer a manutenção da homeostase do SNC mesmo em situações de hipoglicemia sistêmica (44). Além disso, a metabolização de ácidos graxos por astrócitos também se mostra importante para a atividade sináptica, dada a expressão exclusiva do complexo ácido graxo sintase nos astrócitos (45).

## 1.2 A VIA GLICOLÍTICA

O SNC é o sistema que possui maior demanda energética, de modo que o consumo de glicose utilizada por esse representa cerca de 25% do total utilizado pelo corpo (46). Em astrócitos, após a entrada da glicose pelo transportador GLUT1, essa molécula é catalisada em glicose-6-fosfato, que pode ser utilizada em diferentes vias metabólicas: via das pentoses, via

das hexosaminas, via das pentoses fosfato, fosforilação oxidativa ou glicólise - foco do presente trabalho.

A via glicolítica é o maior ramo do metabolismo celular, sendo responsável por, em média, 50% da metabolização da glicose feita pelos astrócitos (47). Esta via pode ser dividida entre duas fases: a “fase preparatória” e a “fase de pagamento”. O primeiro momento inicia-se pela conversão de glicose em glicose-6-fosfato; posteriormente, há a conversão desse metabólito em frutose-6-fosfato e, em seguida, formação de frutose-1,6-bifosfato (F1,6BF). Ao final dessa primeira fase, a F1,6BF é catalisada em dihidroxiacetona fosfato e/ou gliceraldeído-3-fosfato, metabólitos que podem converter-se entre si. Esses processos catalíticos ocorrem pelo uso de energia via ATP, cujo fosfato é adicionado ao metabólito formado, de modo a levar a liberação de ADP. Por conta dessa primeira fase não levar a geração de ATP, mas sim somente o uso desse, ela é considerada como “fase preparatória” da glicólise (48).

No segundo momento, passa-se a haver produção de ATP e NADH e, por conta disso, considera-se a “fase de pagamento”. Nessa fase, há formação de 1,3-difosfoglicerato, havendo liberação de NADH. Posterior a isso, há síntese de 3-fosfoglicerato e, em seguida, 2-fosfoglicerato, junto à formação de ATP. Depois dessa reação, obtêm-se o metabólito fosfoenolpiruvato (PEP), que atua como substrato da enzima Piruvato Quinase (PK), responsável por catalisar a formação de piruvato - e liberação de duas moléculas de ATP (48). Sendo assim, a enzima piruvato quinase é considerada uma das enzimas-chave do metabolismo glicolítico.

### 1.2.1 PKM1/2: aspectos gerais

A PK, em mamíferos, pode estar presente sob quatro diferentes isoformas, sendo dois os genes envolvidos: *Pklr* e *Pkm*. Sobre esse primeiro, há tradução das isoformas PKL e PKR, sendo que PKL localiza-se especialmente no fígado e, de forma mais baixa, nos rins, enquanto a segunda isoforma está presente majoritariamente em hemácias (48). Já o gene *Pkm* pode levar a formação de duas isoformas dessa enzima: PKM1 e PKM2. Esse processo ocorre por meio de *splicing* alternativo, uma vez que, para a PKM1, o processo de transcrição deve conter o éxon 9 e para PKM2, o éxon 10 desse gene. Devido a essa diferença, pode-se discriminar ambas proteínas pela diferença de tamanho entre elas: a PKM2 possui 56 aminoácidos codificados a mais do que a PKM1 pelos diferentes locais de *splicing* de cada uma delas, aminoácidos esses os quais possibilitam a interação com o metabólito F1,6BF (48-50).

Quanto à localização de ambas isoformas, sabe-se que a PKM1 encontra-se principalmente em tecidos de alta demanda energética, tais como músculo esquelético, cérebro e coração, enquanto a PKM2 possui maior presença em células em alto estado de proliferação, como células tumorais e tecidos embrionários (49,51-54).

Além de diferentes localizações, as isoformas PKM1 e PKM2 também possuem outras distinções: a PKM1 é uma proteína constitutivamente com alta atividade catalítica e presente sob a forma de tetrâmero. Já a PKM2 possui atividade catalítica variável de acordo com interações alostéricas que, por sua vez, modificam a forma a qual essa enzima se apresenta: dimérica ou tetramérica, sendo a segunda com maior atividade enzimática e maior afinidade ao PEP (55).

#### 1.2.1.1 Especificidades da PKM2

A PKM2 apresenta-se em diferentes compartimentos celulares de acordo com a forma a qual se encontra. Na forma tetramérica, essa enzima encontra-se no citoplasma da célula, onde exerce suas funções catalíticas primárias; por outro lado, a forma dimérica está presente no ambiente nuclear (53). Uma das formas pelo qual o processo de translocação do citoplasma para o núcleo ocorre é pela existência de Pin1, uma isomerase, que se associa à sequência de localização nuclear - no inglês, *nuclear localization signal* (NLS). A NLS, codificada pelo éxon 10, sofre fosforilação no resíduo de serina na posição 37 (Ser<sup>37</sup>) catalisado pela proteína ERK1/2, cuja fosforilação induz a modificação estrutural da PKM2 para dímero. A partir dessa modificação, essa enzima passa a ter afinidade com  $\alpha$ -importina que, por sua vez, possibilita que a PKM2 siga para o interior do núcleo ao passar pelo complexo de poro nuclear - *nuclear pore complex* (NPC) (56-58).

A PKM2, antes de passar pela alteração conformacional entre tetrâmero e dímero, possui dois estados de ativação sob a forma tetramérica: os chamados estado T ou estado R (“*T-state*” e “*R-state*”), diferenciados por algumas alterações conformacionais e induzidos por moduladores alostéricos - melhor descritos a seguir. O estado T caracteriza-se por possuir menor atividade catalítica, uma vez que se trata de uma conformação mais “frouxa”, a qual não favorece a interação com ativadores da atividade catalítica da enzima - como o F1,6BF -, de modo a induzir a quebra da forma tetramérica em dimérica. De maneira contrária, o estado R apresenta-se como uma conformação ideal - “compacta” - para a interação do PEP no sítio ativo dessa enzima e conseqüente favorecimento de sua atividade catalítica (59).

### 1.2.1.1.1 Moduladores conformacionais endógenos

Além da fosforilação em Ser<sup>37</sup>, existem outras maneiras da modulação conformacional da PKM2 que pode ocorrer por meio de interações alostéricas por componentes endógenos. Segundo Iansante e colaboradores (2015), a fosforilação do resíduo de treonina na posição 365 (Thr<sup>365</sup>) feita pela JNK1 induz menor atividade metabólica da PKM2, de modo a favorecer o efeito Warburg - descrito como a conversão de lactato a partir de piruvato mesmo em condições normais de O<sub>2</sub> (60-62). De maneira semelhante, a fosforilação do resíduo de tirosina na posição 105 (Tyr<sup>105</sup>) demonstra apresentar função de inibição da atividade catalítica da PKM2 por meio da redução de interação com F1,6BF (63). Já Lv e colaboradores (2013) mostram que, diante de tumorigênese, existem estímulos que favorecem a acetilação da PKM2 no resíduo de lisina na posição 433 (Lys<sup>433</sup>), de modo a induzir redução na afinidade pelo metabólito F1,6BF e, dessa maneira, inibição da conformação tetramérica da PKM2 e redução da atividade enzimática dessa proteína (64).

A O-GlcNAcilação - uma modificação pós-traducional que se caracteriza pela adição do metabólito UDP-N-acetilglucosamina, produto final gerado na via das hexosaminas (65,66) - também têm sido demonstrada como importante reguladora alostérica da PKM2. Wang e colaboradores (2017) demonstram que a ocorrência dessa modificação em Ser<sup>405</sup> e Thr<sup>406</sup> favorece a desestabilização tetramérica, de forma a colaborar com o efeito Warburg (67).

Ainda no contexto tumoral, evidencia-se que, além de modificações pós-traducionais, a presença de diferentes moléculas também é capaz de modular a conformação estrutural da PKM2. Anastasiou e colaboradores (2011) demonstram que a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) inibe a atividade enzimática da PKM2 pela oxidação do resíduo de cisteína na posição 358 (Cys<sup>358</sup>). Esse processo apresenta-se favorável no desenvolvimento do tumor uma vez que, inibida a formação tetramérica da PKM2, há acúmulo de metabólitos anteriores ao piruvato - o que permite uma maior ativação da via das pentoses nessas células e induz a manutenção de um ambiente redutor dada a alta produção de NADPH por essa via (68).

Além desses fatores, o hormônio tireoidiano T3 também pode inibir as atividades citoplasmáticas da PKM2 por meio da interação com essa proteína quando presente no núcleo celular (69), o que demonstra a ampla gama de moduladores conformacionais da PKM2.

Assim como os moduladores que favorecem a inibição da atividade enzimática da PKM2, também existe uma grande quantidade de moduladores endógenos que induzem o efeito contrário sobre essa proteína. Como já dito anteriormente, a interação com F1,6BF

favorece a atividade catalítica da PKM2 uma vez que se trata de um ligante natural da via glicolítica (48).

Sabe-se ainda que altos níveis da PKM2 tetramérica podem levar a uma autorregulação conformacional. Nesse sentido, uma vez que essa proteína encontra-se majoritariamente em sua forma dimérica, ou seja, localizada nuclearmente sob baixa atividade catalítica, há uma regulação positiva da formação e da disponibilização de F1,6BF. Dessa forma, a presença desse metabólito favorece a tetramerização da PK (70). Como dito acima, a grande presença da PKM2 em sua forma de dímero ainda induz o acúmulo de metabólitos anteriores ao piruvato - uma vez que a atividade catalítica dessa proteína no núcleo celular é reduzida, de modo a induzir desvio para formação de metabólitos por outras vias, como nucleotídeos e lipídeos -, o que ainda favorece o estado de proliferação celular, como ocorre classicamente em células tumorais (71).

Por fim, tem-se descrito que alguns aminoácidos, por si, são capazes de induzir modulações na PKM2. Como exemplo, pode-se citar a influência da presença da serina, a qual favorece a ativação catalítica da PKM2, enquanto a ausência desse aminoácido induz menor atividade dessa proteína (72).

#### *1.2.1.1.2 Moduladores conformacionais exógenos*

Além dos moduladores endógenos de ativação da PKM2, moléculas exógenas também foram formuladas e/ou descobertas para modulações farmacológicas dessa proteína. Dentre elas, têm-se a TEPP-46, a qual é descrita na literatura como ativadora da PKM2, uma vez que interage com dímeros dessa proteína e, assim, favorece sua formação tetramérica e maior afinidade com PEP, de forma a elevar a atividade catalítica (73,74). De maneira semelhante, a molécula DASA-58 também promove a formação tetramérica da PKM2, o que favorece a maior afinidade pelo PEP (74). Ambas moléculas possuem efeito semelhante ao F1,6BF, ativador endógeno dessa enzima.

É importante ressaltar que essas moléculas são consideradas ativadoras em relação à função glicolítica da PKM2; entretanto, ao adotar as demais funções dessa proteína como foco, essencialmente as funções nucleares - melhor descritas a seguir -, pode-se encontrar na literatura o uso dessas moléculas como substâncias inibidoras das atividades da PKM2, ao inibir, portanto, suas atividades não-glicolíticas.

De forma contrária, também existem moléculas que são responsáveis por inibir a atividade quinase da PKM2. Dentre elas, pode-se citar o Shikonin, molécula a qual foi isolada da espécie de planta *Lithospermum erythrorhizon*, e possui efeito na inibição da taxa



glicolítica celular, mensurada a partir do aumento da produção de lactato e consumo de glicose, em células tumorais e macrófagos (75,76).

#### 1.2.1.1.3 Funções nucleares da PKM2

A PKM2, uma vez que pode ter sua conformação estrutural regulada, permite que haja também regulação de suas atividades. Quando presente em sua forma dimérica, a proteína tem sua função quinase ativada, diferente da observada na via glicolítica, pela ação em diferentes alvos no núcleo celular. Diversos fatores se apresentam como importantes na regulação dessas funções nucleares da PKM2, como o EGFR (*epidermal growth factor receptor*), o qual induz a ubiquitinação de PKC $\epsilon$  que, por sua vez, fosforila IKK $\beta$  - ativando, portando, a via NF-kB, de modo a induzir a expressão da enzima PKM2 (77). Além da indução via NF-kB, também se demonstra que o EGFR é responsável por promover a fosforilação da histona H3 diretamente pela PKM2, o que induz a regulação positiva de c-Myc e ciclina D1, favorecendo a tumorigênese (78).

Além disso, a PKM2 dimérica também interage com fatores de transcrição importantes no controle e formação da resposta inflamatória. O Hif-1 $\alpha$ , por exemplo, é um fator encontrado positivamente regulado em situações de hipóxia, uma vez que existe inibição de sua degradação proteassomal (79). Nesse contexto, observa-se a dimerização entre Hif-1 $\alpha$  e Hif-1 $\beta$ , de modo a formar um complexo e interagir com a sequência de elemento de resposta à hipóxia (HRE), o qual está presente no gene *Pkm* e que, dessa forma, favorece a transcrição desse gene (80). De acordo com Azoitei e colaboradores (2016), a hipóxia contribui para a translocação nuclear de PKM2 e de p65, o que favorece a interação entre essas moléculas e induz a transcrição gênica do fator de hipóxia, bem como de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (81).

A expressão de Hif-1 $\alpha$  ainda demonstra ser regulada pela via STAT3. Esse processo apresenta-se pela formação do eixo STAT3/PKM2/Hif-1 $\alpha$ , de forma que, a PKM2, uma vez estimulada via Hif-1 $\alpha$ , também possibilita a ativação de STAT3. Por sua vez, a ativação da via STAT3 via fosforilação induz a ativação de Hif-1 $\alpha$ , o que possibilita um processo de retroalimentação positiva desse eixo (82,83).

Ainda em contexto geral de inflamação, Veras e colaboradores (2022) apontam que, na psoríase, a PKM2 também pode modular a resposta inflamatória desencadeada nesta patologia. Foi observado que os queratinócitos, células tidas como principais nessa doença, diante da produção de mediadores e favorecimento da lesão tecidual por meio do recrutamento de células imunes, apresentam alta expressão da PKM2. Além disso, a depleção

da PKM2 especificamente nos queratinócitos promove uma melhora no quadro patológico, o que sugere uma relevância dessa proteína na resposta inflamatória gerada por essas células. Por fim, verificou-se que esse processo ocorre pela modulação da via NF- $\kappa$ B por meio da formação do complexo PKM2/Act1/TRAF6, que, por sua vez, age como modulador da resposta dos queratinócitos estimulados pela IL-17 (84).

A PKM2, além dessas funções gerais relacionadas a inflamação, também possui ações diretas sobre ativação e diferenciação de células imunes. Sobre a imunidade inata, sabe-se que os macrófagos são células que têm sua polarização M1 favorecida pela forma dimérica da PKM2, enquanto a polarização M2 é favorecida pela forma tetramérica. Esse processo é demonstrado pelo uso de ativador da PKM2, que induz a troca do fenótipo M1 de macrófagos para M2, de modo a reduzir o quadro de inflamação da esteatohepatite (85).

Ao utilizar um modelo de neuroinflamação, Dhanesha e colaboradores (2022), demonstram que existe aumento da expressão da PKM2 em neutrófilos. Essa proteína, por sua vez, fosforila STAT3 quando ambas interagem no núcleo celular, o que favorece ainda mais o desenvolvimento da patologia. De forma contrária, diante da inibição da translocação nuclear da PKM2, observa-se redução da inflamação e dos sinais gerados pela doença (86).

Além de células da imunidade inata, a imunidade adaptativa também pode ser regulada pela PKM2. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> passam por processos de diferenciação ao longo de sua ativação - classicamente, T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 - e sabe-se que a PKM2 possui um papel essencial na diferenciação dessas células em T<sub>H</sub>17. Segundo Damasceno e colaboradores (2020), em um contexto neuroinflamatório, a PKM2 age sobre a diferenciação de células T<sub>H</sub>17 por meio da fosforilação de STAT3 em Tyr<sup>705</sup> nessas células - atividade exercida no núcleo celular sob a forma dimérica. Diante da ausência da PKM2, bem como na manutenção dessa proteína em sua forma tetramérica, demonstra-se redução do quadro clínico dos animais submetidos ao modelo de neuroinflamação (87).

Existem também evidências da regulação desse processo pela PKM2 em células residentes do SNC. Li e colaboradores (2023) demonstram em modelo de epilepsia que a redução da expressão de PKM2 em células microgliais promove redução da ativação e, conseqüentemente, da liberação dos fatores C1q, TNF, e IL-1 $\alpha$  por essas células. Tendo em vista que esses mediadores são conhecidos como importantes na polarização A1 astrocitária, apresenta-se também redução de ativação dos astrócitos, observada através da menor liberação de fator C3, componente do sistema complemento (88).

### 1.3 IMUNOPATOLOGIA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM)

Como visto, sabe-se que a PKM2, além de regular atividade de células imunológicas, também possui esse papel regulador sobre células do SNC. Dessa forma, um dos contextos patológicos em que se dá grande destaque é a esclerose múltipla (EM), a qual une esses dois grupos celulares.

A EM é uma doença neuroinflamatória crônica definida como neurodegenerativa e de caráter autoimune, a qual pode ser desencadeada por fatores genéticos e/ou ambientais (89). Sabe-se que, no mundo, a doença atinge cerca de 2.500.000 de pessoas, enquanto, no Brasil, aproximadamente 40.000 indivíduos convivem com essa patologia. O diagnóstico costuma acontecer entre 20 e 50 anos de idade e a prevalência dessa doença em mulheres é três vezes maior que em homens (90).

A EM é caracterizada pela desmielinização axonal do SNC, de modo a levar a comprometimentos neurológicos, como alterações motoras, visuais e sensoriais (91). De forma geral, os processos os quais levam ao desenvolvimento da esclerose múltipla são, inicialmente, a resposta inflamatória a autoantígenos; a desmielinização do SNC; a perda axonal devido ao processo de desmielinização e a astrogliose. Esses processos, por sua vez, também ocorrem induzidos pela quebra da BHE, que favorece o infiltrado celular e a amplificação da resposta inflamatória (92). Esse infiltrado compõe-se, inicialmente, por células T CD4<sup>+</sup> - T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>17 - e T CD8<sup>+</sup> - o que caracteriza a EM como uma doença mediada por linfócitos T (93,94). Entretanto, uma vez que essas células migram para o SNC, a liberação de mediadores inflamatórios por essas favorece o recrutamento de células mielóides, como neutrófilos e monócitos (92).

Além desses fatores, ainda ocorrem etapas inflamatórias-independentes, como a alterações mitocondriais e acúmulo de proteínas disfuncionais - muitas vezes ocorrendo por conta da disfunção de processos dessas organelas, como a autofagia (93).

Dado o fato da EM ser uma doença multifatorial, as estratégias terapêuticas adotadas como tratamento dessa doença são diversas: dentre elas, pode-se citar o uso de glicocorticoides,  $\beta$ -interferons (IFN- $\beta$ ) e anticorpos monoclonais anti-receptores esfingosina-1-fosfato (S1PRs) (91-97). Assim como a grande variação das estratégias adotadas, a resposta de cada indivíduo a estas torna-se extremamente variável, alterando, por sua vez, a eficácia de cada uma delas.

### 1.3.1 Modelo experimental: Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)

A utilização de modelos experimentais facilita o estudo e a compreensão de diversas patologias e, da mesma forma, ocorre com a esclerose múltipla. Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) é o modelo animal mais utilizado na literatura para estudo da EM, uma vez que trata-se de um modelo autoimune, neuroinflamatório e desmielinizante - assim como a esclerose múltipla (98). A indução desse modelo é feita a partir da administração de autopeptídeos presentes na bainha de mielina, como glicoproteína da mielina de oligodendrócitos - *myelin oligodendrocytes protein* (MOG) - e proteína básica de mielina - *myelin basic protein* (MBP) (99,100).

Uma vez administrado o peptídeo a ser reconhecido como autoantígeno, a apresentação desse peptídeo é feita por células apresentadoras de antígenos (APCs) (101-103). A partir disso, linfócitos T autorreativos passam pelo processo de expansão clonal, com posterior migração para o SNC junto a outras células da imunidade inata, quimioatraídas por mediadores inflamatórios liberados por células gliais ativadas, como astrócitos e microglias. Esse infiltrado celular é facilitado pelo aumento da permeabilidade da BHE, uma vez que, durante a EAE, existe redução da associação dos pés perivascularres astrocitários à lâmina basal endotelial, de modo a favorecer a permeabilidade à essa barreira, além da ocorrência de alterações nas junções celulares tanto em células endoteliais, quanto em astrócitos (24,98).

## 1.4 HIPÓTESE

Achados da literatura têm demonstrado o papel da PKM2 em contextos inflamatórios diversos, inclusive no SNC. Por outro lado, os astrócitos são descritos cada vez mais como componentes importantes na formação do ambiente neuroinflamatório. Sabendo-se que, diante de situações inflamatórias, as células residentes do SNC passam por alterações metabólicas, é plausível que a PKM2 em astrócitos possa estar envolvida na formação e manutenção desse ambiente inflamatório. Dessa forma, a hipótese do presente trabalho é que a enzima glicolítica Piruvato Quinase sob a isoforma M2 (PKM2) possua função pró-inflamatória na ativação de astrócitos observada em condições inflamatórias.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o papel da enzima glicolítica Piruvato Quinase sob a isoforma M2 (PKM2) na ativação astrocitária em condições inflamatórias.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.2.1** Investigar a expressão de enzimas glicolíticas em astrócitos e demais células presentes no SNC;

**2.2.2** Padronizar a cultura primária de astrócitos e caracterizar sua resposta frente a estímulos inflamatórios;

**2.2.3** Examinar a influência da PKM2 na liberação de mediadores inflamatórios em cultura primária de astrócitos;

**2.2.4** Verificar o possível mecanismo pelo qual a PKM2 pode modular a liberação de mediadores diante de estímulo inflamatório;

**2.2.5** Avaliar o papel da PKM2 em astrócitos no desenvolvimento do modelo de neuroinflamação;

**2.2.6** Explorar o papel da PKM2 na liberação de mediadores em cultura primária de astrócitos sob estímulo inflamatório.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Os animais utilizados neste trabalho foram camundongos *Aldh1<sup>creER</sup>* (104), *PKM2<sup>fl/fl</sup>* (105) e *Rosa-CAG-LSL-tdTomato* (106) obtidos a partir do *Jackson Laboratory*, os quais foram cruzados para geração da linhagem de camundongos deficientes para PKM2 especificamente em astrócitos (*Aldh1<sup>creER</sup>/PKM2<sup>fl/fl</sup>*) e camundongos *reporter* para Cre recombinase em astrócitos (*Aldh1<sup>creER</sup>/R26<sup>tdTomato</sup>*) gerados no Centro de Criação de Camundongos Especiais II (CCCE2) do campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Além disso, também foram utilizados animais WT de linhagem C57BL/6, obtidos no Biotério Central do campus de Ribeirão preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética na Utilização de Animais da Faculdade de Ribeirão Preto (CEUA - FMRP/USP), número de protocolo 1103/2022 (ver Anexo I).

##### 3.1.1 Depleção da enzima PKM2 em astrócitos

Para depleção da enzima PKM2 em astrócitos dos animais geneticamente modificados, foi administrado 100 µL de tamoxifeno (Sigma-Aldrich) intraperitonealmente (i.p.) nos animais com seis semanas de idade, na concentração 75 mg/kg, em doses diárias durante cinco dias consecutivos.

##### 3.1.2 Indução de modelo de neuroinflamação: Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)

A indução de EAE foi feita em camundongos C57BL/6 WT e *Aldh1<sup>creER</sup>/PKM2<sup>fl/fl</sup>* com 12 semanas de idade, ou seja, seis semanas após o fim do tratamento com tamoxifeno nos animais geneticamente modificados. Os animais foram imunizados por via subcutânea (s.c.) com emulsão contendo 300 µg do antígeno peptídeo MOG<sub>35-55</sub> (Genemed Synthesis) em CFA (Sigma-Aldrich) suplementado com 5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA, Difco) em ambos os lados dos flancos posteriores. Adicionalmente, cada animal recebeu 200 ng de toxina pertussis (Sigma-Aldrich) em 200 µL de solução salina por via i.p. nos dias 0 e 2 após imunização.

Os sinais clínicos da EAE foram monitorados diariamente de acordo com *score* clínico em escala padronizada: 0. Nenhum sinal clínico; 1. Cauda flácida; 2. Marcha cambaleante, déficit de equilíbrio; 3. Paralisia parcial dos membros posteriores; 4. Paralisia completa dos membros posteriores e 5. Paralisia completa dos membros posteriores com fraqueza de membros anteriores.

Por conta da dificuldade dos animais se locomoverem ao longo do desenvolvimento da doença, foram colocados ração e suporte com água no fundo da caixa.

### 3.2 REANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

Os dados reanalisados referem-se ao sequenciamento RNA-*Single Cell* de medula espinal de animais os quais foram submetidos à EAE, disponibilizado para acesso no Gene Expression Omnibus (GEO) sob o número de acesso GSE1301119. Foram avaliadas expressão gênica de enzimas glicolíticas a partir desse banco de dados. Animais por grupo  $n = 6$ .

### 3.3 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS

Foram utilizados camundongos de linhagem WT C57BL/6 e  $Aldh1^{creER}/PKM2^{fl/fl}$  recém-nascidos (entre 0 e 2 dias). No dia anterior, todo o material necessário foi autoclavado. Os animais foram higienizados com álcool 70% e, após anestesia, foram decapitados e o córtex cerebral, excisado. Sob lupa estereoscópica e em meio asséptico, em DMEM incompleto, suplementado com penicilina, fungizona e glutamina, o córtex cerebral foi isolado e as meninges cerebrais foram removidas.

O isolamento dos astrócitos foi feito com dez dias de cultura, sendo que, para este processo, inicialmente deve ser retirada a camada de micróglia. Para isto, as garrafas foram colocadas num *shaker* orbital a 200 rpm por quatro horas, com intervalo de 15 minutos para troca de meio e recuperação do pH destas. Posteriormente, para o isolamento dos astrócitos de fato, as garrafas devem ser tripsinizadas e as células obtidas contadas para seu posterior plaqueamento. Para maior purificação da cultura, utilizou-se o *kit* anti-ACSA-2 *MicroBead* (Miltenyi Biotec).

#### 3.3.1 Depleção da PKM2 em cultura primária de astrócitos

Células da cultura primária de astrócitos de animais  $Aldh1^{creER}/PKM2^{fl/fl}$ , posteriormente ao isolamento e plaqueamento, foram deixadas em *resting* durante 48 horas. Após esse período, foi realizado o tratamento com 4-OHT (100  $\mu$ M) pelo período de 20 horas,

sendo que, após esse intervalo, o sobrenadante contendo a droga foi retirado e as células foram novamente deixadas em *resting* por 12 horas, com realização dos estímulos descritos posteriormente após 24 horas.

### 3.4 CITOMETRIA DE FLUXO

A fim de verificar a pureza da cultura, as células foram avaliadas para determinação de eventos ACSA positivos pela marcação com os anticorpos anti-L/D-APC H7 (Invitrogen, 1:5.000), anti-ACSA-PE (Miltenyi Biotec, 1:250) e anti-CD11b-FITC (Invitrogen, 1:250). Coletado o lisado celular obtido a partir de cultura primária de astrócitos, as células foram ressuspensas e incubadas em 100 µL de um mix dos anticorpos de superfície durante 15 minutos a 4°C, com posterior lavagem, centrifugação e ressuspensão em 100 µL de PBS 1x.

### 3.5 RT-qPCR

Após a coleta do lisado celular da cultura de astrócitos, as mesmas foram armazenadas em tampão de lise para posterior extração de RNA (RNeasy Micro Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha). A extração do RNA seguiu conforme recomendado pelo protocolo da empresa fabricante. Uma vez obtido o RNA, a síntese de cDNA foi realizada utilizando o *kit* de transcrição reversa High-Capacity (Invitrogen Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). Após obtenção do cDNA, a reação quantitativa do PCR em tempo real foi realizada no aparelho StepOne Plus RealTime PCR System, utilizando o sistema de fluorescência SYBR-green® Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, USA) com os *primers* para os respectivos alvos desejados (Tabela 1).

**Tabela 1.** Sequência dos pares de *primers* utilizados

Gene	Sequências 5' -> 3'
<i>Gapdh</i>	F: GGGTGTGAACACGAGAAAT R: CCTTCCACAATGCCAAAGTT
<i>Actb</i>	F: ATGCTCCCCGGGCTGTAT R: CATAGGAGTCCTTCTGACCCATTC
<i>Mcp1</i>	F: ATGAGTCGGCTGGAGAAC R: GTGGAAAAGAGAGTGGAT
<i>Cxcl1</i>	F: ACCCGCTCGCTTCTCTGT R: AAGGGAGCTTCAGGGTCAAG



<i>Pkm1</i>	F: GCTGTTTGAAAGAGCTTGTGC R: TTATAAGAGGCCTCCACGCT
<i>Pkm2</i>	F: TCGCATGCAGCACCTGATT R: CCTCGAATAGCTGCAAGTGGTA

### 3.6 ELISA

A determinação dos níveis de citocinas do sobrenadante das culturas foi realizada por método imunoenzimático, sendo utilizados os kits da empresa R&D Systems, realizados de acordo com as instruções. Inicialmente, fez-se o *coating overnight* da placa a 4°C com anticorpo de captura por meio do recobrimento dos poços com 50 µL/poço de PBS 1x diluindo anticorpos específicos para CCL2, CXCL1 e CXCL10. Foi feita também a curva padrão com concentrações a partir de 2.000 pg/mL - com exceção da quimiocina CXCL10, que possuía o ponto inicial da curva padrão a 6.000 pg/mL.

As placas devem passar pelo processo de bloqueio de ligações específicas pela adição de 100 µL de PBS-BSA 1% durante duas horas. As amostras de interesse foram colocadas *overnight* a 4°C e, após a lavagem, foi colocado 50 µL/poço do anticorpo de detecção conjugado a enzima peroxidase. Por fim, adicionou-se 50 µL/poço do complexo estreptavidina-biotina (1:40 em PBS-BSA 1%) e, após reação com Tetrametilbenzidina (KPL SeraCare), emitiu quimioluminescência, tendo sua densidade óptica lida após acréscimo de ácido sulfúrico. Os valores de concentração das proteínas foram fornecidos em pg/mL.

### 3.7 WESTERN BLOTTING

Após a coleta do lisado celular da cultura de astrócitos, as mesmas foram homogeneizadas em tampão RIPA. Uma alíquota do homogeneizado deve ser separada para dosagem de proteínas totais pelo método de BCA numa curva padrão entre 1,5 e 0,1 µg/mL. Amostras do homogeneizado foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose.

Estas membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com solução de bloqueio de leite desnatado 5% (Cell Signaling). Após a lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpos primários anti-PKM1 (Cell Signaling, 1:1.000 em BSA 5%) e anti-PKM2 (Cell Signaling, 1:1.000 em BSA 5%). Posteriormente, foi feita a incubação das membranas com anticorpo secundário anti-*rabbit* e anti-*mouse*, ambos conjugados com peroxidase (1:5.000 em leite 5%) e, então, foram reveladas com kit de quimioluminescência (ECL, Amersham

Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.). Como controle endógeno, utilizou-se o anticorpo primário anti- $\beta$ -actina (Cell Signaling, 1:1.000 em BSA 5%).

### 3.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Lâminas de células provenientes de cultura primária foram fixadas com paraformaldeído 2% tamponado (pH 7,0), incubadas com anticorpos primários primários anti-PKM2 (Abcam, 1:200) e anti-GFAP (Millipore, 1:200) e, posteriormente, com anticorpo secundário conjugado com fluorocromo. As expressões de marcadores fluorescentes foram analisadas por meio da Microscopia de Fluorescência DMI6000B-LMMC.

As amostras de animais foram obtidas após eutanasia e perfusão com PBS 1x via intracardíaca, seguido por paraformaldeído 4% tamponado (pH 7,0). Após a coleta, as amostras foram criopreservadas com sacarose 30% a 4°C. Em seguida, as amostras foram congeladas em meio preservante Tissue-Tek® O.C.T. e crio-seccionadas (60  $\mu$ m). As crio-seções foram incubadas com *FluoroMyelin™ Red Fluorescent Myelin Stain* (Invitrogen, 1:300) e anticorpo primário anti-GFAP (Millipore, 1:200) e, posteriormente, com anticorpo secundário conjugado com fluorocromo. As expressões de marcadores fluorescentes foram analisadas por meio da Microscopia Confocal (Leica TCS-SP5 AOBS).

### 3.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os animais foram eutanasiados e perfundidos com PBS 1x via intracardíaca, seguido por paraformaldeído 4% tamponado (pH 7,0). Após a coleta, as amostras foram emblocadas em parafina para posterior secção (5-10  $\mu$ m). Os cortes foram preparados em lâminas para coloração por Hematoxilina e Eosina (Sigma-Aldrich) para avaliação de infiltrado leucocitário e integridade do tecido.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

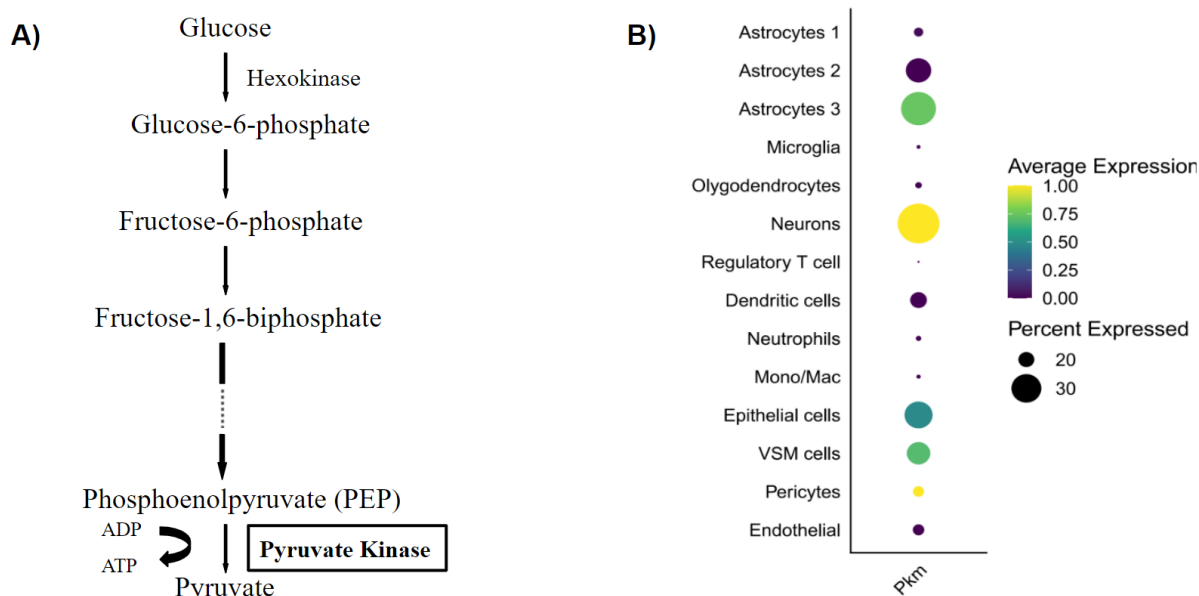
As análises dos resultados foram feitas por ANOVA de uma via (*one-way*) seguido por teste de Bonferroni (para três ou mais grupos), comparando todas as colunas. O teste ANOVA de duas vias (*two-way*) foi utilizado para avaliação do decurso temporal do *score* da EAE entre os grupos. Para avaliar diferentes grupos de variáveis não-pareadas, utilizou-se o teste T *Student*. Valores com  $P < 0.05$  foram considerados significativos estatisticamente. As análises estatísticas foram feitas com software GraphPad Prism 8.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ENZIMAS GLICOLÍTICAS EM CÉLULAS RESIDENTES DO SNC E EM CÉLULAS IMUNES

Inicialmente, fizemos uso de ferramentas de bioinformática e reanalizamos banco de dados disponível (GSE1301119) de *Single Cell* RNASeq (117) para investigar a expressão gênica das enzimas glicolíticas-chave em células residentes do SNC e em células imunes. O banco de dados utilizado foi gerado por dados da coleta de medula espinal de animais WT.

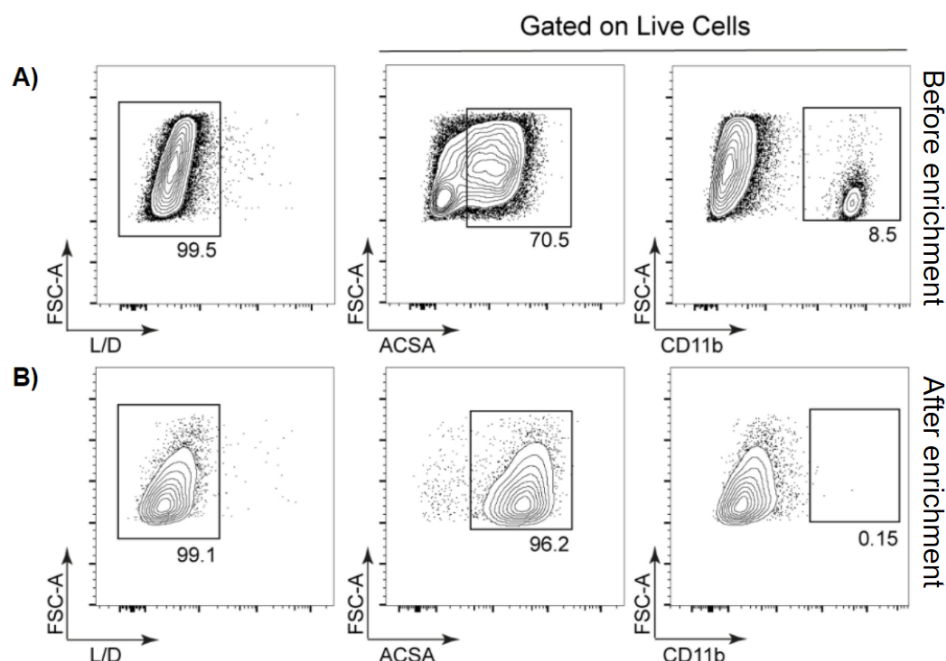
A partir da escolha da via glicolítica (Figura 1A), avaliamos a expressão gênica da enzima Piruvato Quinase sob a isoforma M (*Pkm*) - uma vez que o gene responsável pela transcrição das enzimas PKM1 e PKM2 é o mesmo, mas são transcritas diferencialmente devido a *splicing* alternativos em diferentes éxons: 9 e 10, respectivamente (50,52). Observamos que, em condições homeostáticas, os diferentes clusters de astrócitos expressam *Pkm*, sendo um dos grupos celulares com maior expressão desta enzima (Figura 1B). Dessa forma, considerando que o papel da PKM2 têm sido cada vez mais descrito em contextos inflamatórios, seguimos para melhores avaliações da influência dessa proteína na neuroinflamação.



**Figura 1. Os astrócitos possuem alta expressão de enzimas glicolíticas já em condição de homeostase. A)** Metabólitos envolvidos na via glicolítica, com ênfase a reação final catalisada pela enzima Piruvato Quinase. **B)** Os astrócitos são as células que mais expressam *Pfkm*. **C)** Dentre as células residentes do SNC, os diferentes *clusters* de astrócitos estão entre os tipos celulares que mais expressam *Pkm*. Animais por grupo n = 6.

## 4.2 PADRONIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA DA CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS

Antes de avaliar o papel da PKM2 em astrócitos, porém, realizamos uma série de experimentos *in vitro* de forma a gerar um ambiente inflamatório e mimetizar processos neuroinflamatórios. Foi feita a padronização da cultura primária de astrócitos a partir do protocolo mais utilizado na literatura, com pequenas modificações (107,108). No primeiro protocolo testado, ao avaliarmos a pureza da cultura após 10 dias do cultivo das células por citometria de fluxo, obtivemos a porcentagem de astrócitos (ACSA<sup>+</sup>) aproximadamente 70%, enquanto a de micróglia (CD11b<sup>+</sup>) representava 5-10% (Figura 2A). Para melhorar o enriquecimento da população de astrócitos (ACSA<sup>+</sup>), as células coletadas foram marcadas por microesferas magnéticas utilizando o *kit* anti-ACSA-2 *MicroBead* e este processo permitiu adquirir uma pureza entre 90 e 97% de células ACSA-2<sup>+</sup> (Figura 2B).

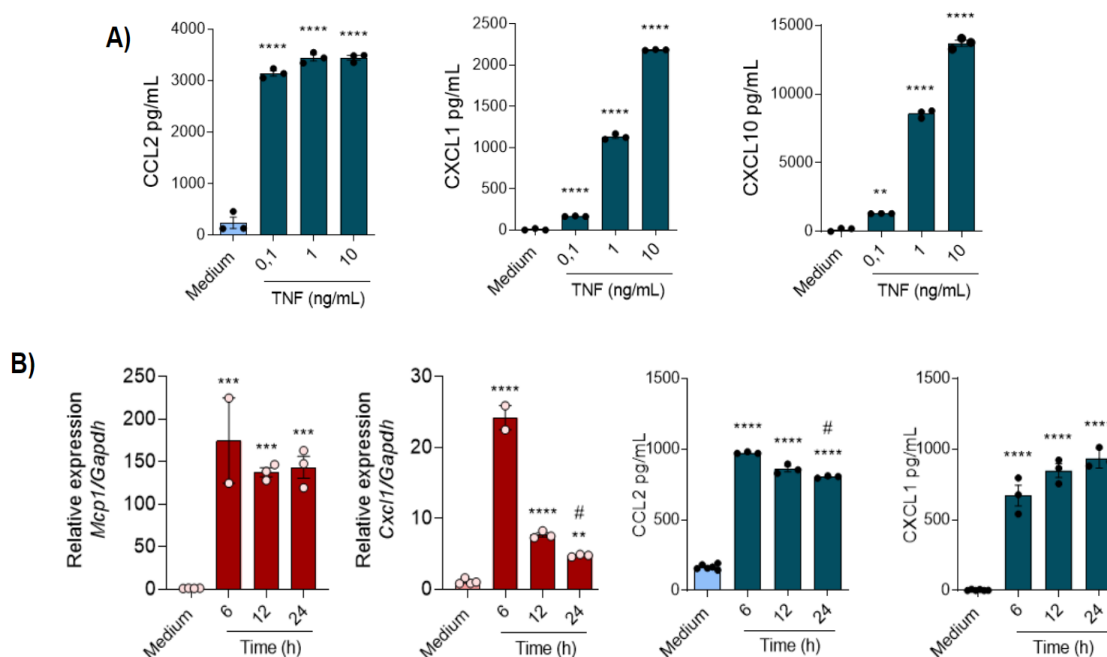


**Figura 2. Processo de enriquecimento da cultura primária de astrócitos.** **A)** Citometria de fluxo antes da purificação pelo uso de microesferas magnéticas. **B)** Citometria de fluxo após o processo de purificação. As células foram obtidas a partir de córtex de animais neonatos e foram marcadas com marcador de viabilidade (*Fixable Viability Dye*) e os anticorpos ACSA e CD11b. Os dados foram adquiridos no aparelho FACS Verse (BD Biosciences) e analisados por meio do programa Flowjo X.

Após a padronização da cultura, iniciamos a avaliação do padrão de resposta dos astrócitos *in vitro* diante de estímulo inflamatório. Para isso, utilizamos o TNF, o qual é amplamente utilizado na literatura, uma vez que estas células possuem receptores TNFR1 para este mediador e, assim, alteram seu estado para ativado e respondem pela liberação de outros mediadores inflamatórios (109). Por uma curva de concentração-resposta (0.1, 1 e 10 ng/mL), avaliamos a produção dos mediadores CCL2, CXCL1 e CXCL10 por ELISA (Figura

3A). Em relação a CXCL1 e CXCL10, houve aumento da produção destes mediadores de forma concentração-dependente; já quando observamos a produção de CCL2, esta apresentou-se aumentada de forma constante independente da concentração de estímulo utilizada. De acordo com estes dados, definiu-se, portanto, que a concentração de 10 ng/mL de TNF seria a ideal a ser utilizada como estímulo inflamatório na cultura primária de astrócitos.

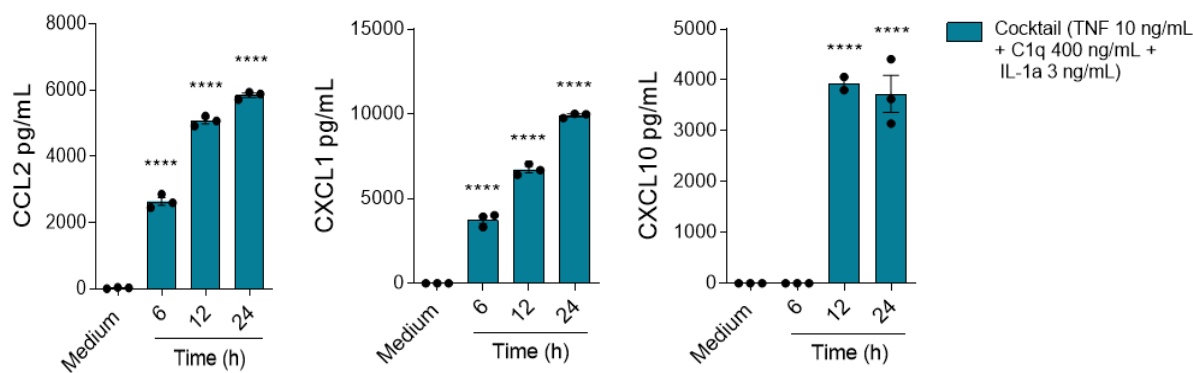
Ainda para caracterização do padrão de resposta da cultura primária diante do estímulo inflamatório por TNF, foi feita avaliação da resposta destas células em decurso temporal (6, 12 e 24h) após estímulo inflamatório por TNF (10 ng/mL) (Figura 3B). Observamos que a expressão de mRNA por RT-qPCR de *Mcp1*, da mesma forma quando observado diante da curva concentração-resposta, houve um aumento que permaneceu constante ao longo do tempo. Já quando avaliada a expressão de *Cxcl1*, houve um maior aumento 6h após o estímulo, que se reverteu nos períodos de 12 e 24h. Por outro lado, quando avaliamos a liberação destes mediadores no sobrenadante da cultura primária de astrócitos por ELISA, observamos que tanto CXCL1, como CXCL10, encontravam-se constantes ao longo do decurso temporal, exceto a produção de CCL2, que se reduziu levemente 24h após o estímulo. Assim, definimos que 12 horas seria o período ideal para manter o estímulo inflamatório e mensurar os mediadores produzidos no sobrenadante da cultura primária por ELISA.



**Figura 3. TNF induz produção de mediadores pró-inflamatórios de maneira concentração e tempo-dependente em cultura primária de astrócitos. A)** Há aumento na produção de CCL2, de CXCL1 e de CXCL10 em astrócitos na presença de estímulo inflamatório por TNF (0.1, 1 e 10 ng/mL). **B)** Há aumento na expressão gênica e proteica de CCL2 e de CXCL1 em astrócitos na presença de estímulo inflamatório por TNF

ao longo do tempo (6, 12 e 24h). Análise estatística feita por One-way ANOVA seguida por Teste de Bonferroni,  $**p<0,01$ ,  $***p<0,001$  e  $****p<0,0001$  em relação ao grupo controle (Meio) e  $\#p<0,05$  em relação do grupo 12h. As barras de erro representam média  $\pm$  S.E.M.

Conforme demonstrado por Liddelow e colaboradores (2017) (9), utilizamos o estímulo inflamatório composto por TNF (10 ng/mL), IL-1 $\alpha$  (3 ng/mL) e C1q (400 ng/mL) na cultura primária de astrócitos para avaliação da liberação de CCL2, CXCL1 e CXCL10 por ELISA (Figura 4). Quando feito decurso temporal de 6, 12 e 24h, observamos aumento da produção dos três mediadores avaliados, ainda que não tenha ocorrido de forma tempo-dependente com significância estatística. Assim, concluímos que esse coquetel também pode ser utilizado como estímulo inflamatório para cultura primária de astrócitos, uma vez que induz ativação destas células via produção de mediadores específicos.

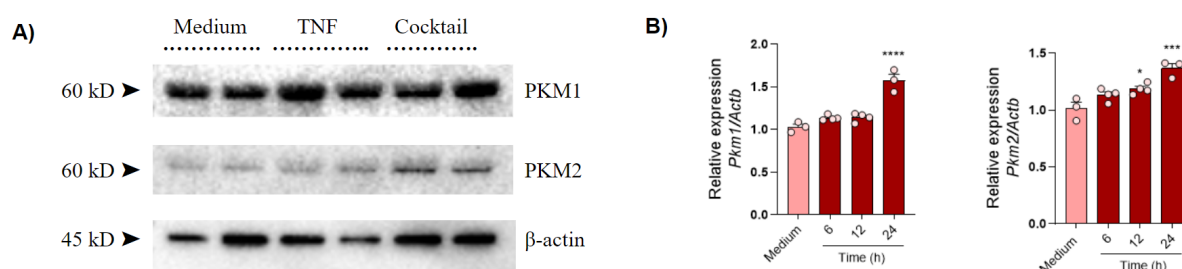


**Figura 4. Coquetel induz produção de mediadores pró-inflamatórios em cultura primária de astrócitos.** Há aumento na produção de CCL2, de CXCL1 e de CXCL10 em astrócitos na presença de estímulo inflamatório composto por TNF (10 ng/mL), C1q (400 ng/mL) e IL-1 $\alpha$  (3 ng/mL) após 12h. Análise estatística feita por One-way ANOVA seguida por Teste de Bonferroni,  $****p<0,0001$  em relação ao grupo controle (Meio). As barras de erro representam média  $\pm$  S.E.M.

### 4.3 AVALIAÇÃO DO PAPEL DA FORMA TETRAMÉRICA DA PKM2 *IN VITRO* DIANTE DE ESTÍMULO INFLAMATÓRIO

Finalizada a caracterização da resposta da cultura primária de astrócitos frente a diferentes estímulos inflamatórios, seguimos para melhor compreensão da expressão de enzimas em astrócitos em resposta aos estímulos padronizados anteriormente. Para isso, inicialmente foi comparada a expressão proteica de PKM1 e de PKM2 por *Western Blotting* após estímulo feito por TNF (10 ng/mL) e pelo coquetel de estímulos (TNF 10 ng/mL, C1q 400 ng/mL e IL-1 $\alpha$  3 ng/mL) (Figura 5A) durante o período de 12h. De maneira qualitativa, observa-se tendência de aumento da expressão de PKM2 diante dos estímulos inflamatórios, enquanto a PKM1 parece manter-se constante.

Posteriormente, foi feita avaliação da expressão de *Pkm1* e *Pkm2* em cultura primária de astrócitos após estímulo inflamatório por TNF (10 ng/mL) (Figura 5B). Observamos que a expressão de *Pkm2* aumenta de forma tempo-dependente a partir de 12h após o estímulo, enquanto a *Pkm1* apresenta aumento de sua expressão passadas 24h do estímulo.



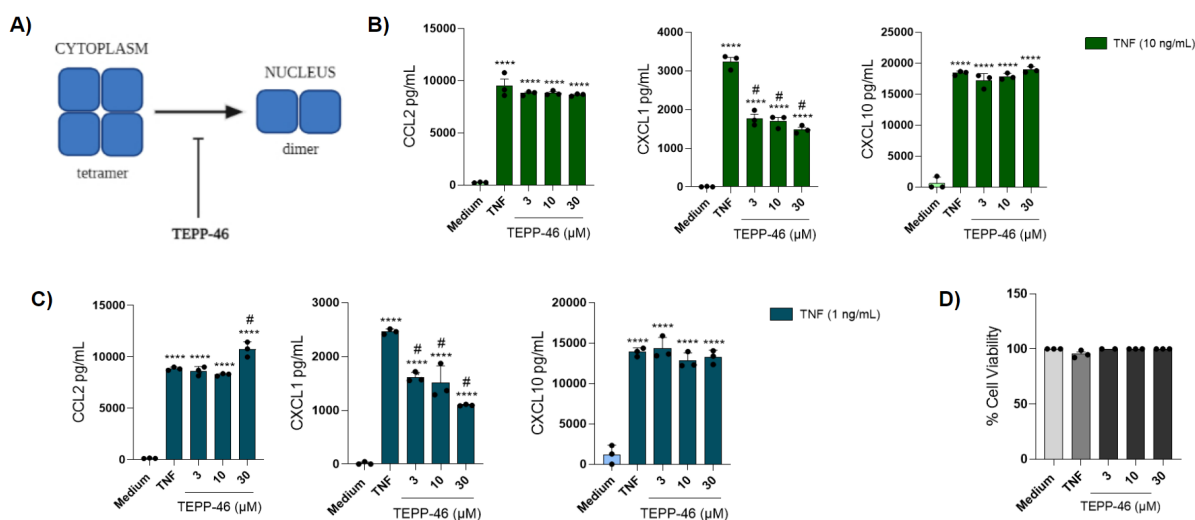
**Figura 5. Há alteração da expressão gênica de PKM2 diante de estímulo inflamatório. A)** Existe tendência de aumento da expressão de PKM2 diante dos estímulos inflamatórios. Imagem representativa de um experimento. **B)** Observa-se maior expressão de *Pkm1* em cultura primária de astrócitos estimulada com TNF (10 ng/mL) 24h após o estímulo, enquanto *Pkm2* tem a expressão aumentada a partir de 12h após o estímulo. Análise estatística feita por One-way ANOVA seguida por Teste de Bonferroni, \* $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  em relação ao grupo controle (Meio). As barras de erro representam média  $\pm$  S.E.M.

Após a caracterização da resposta da cultura primária de astrócitos diante de diferentes estímulos inflamatórios, definimos que os experimentos seguintes seguiram apenas com o TNF. Passamos, então, a investigar se a PKM2 poderia modular a ativação astrocitária e, para isso, utilizamos o TEPP-46 - o qual mantém a PKM2 em sua forma tetramérica e, portanto, inibe sua atividade nuclear (Figura 6A).

Para avaliar se a inibição de atividades não-glicolíticas da PKM2 feito pelo tratamento com TEPP-46 levaria a alteração no padrão de resposta da cultura primária de astrócitos ao estímulo por TNF (10 ng/mL), fizemos uma curva concentração-resposta do inibidor (3, 10 e 30  $\mu$ M) (Figura 6B) para mensuração de mediadores inflamatórios por ELISA. Com isso, observamos um efeito específico na redução da produção da quimiocina CXCL1 de forma

concentração-dependente, enquanto que, CCL2 e CXCL10 não apresentaram alteração diante do tratamento. Dessa forma, decidimos testar uma menor concentração de estímulo inflamatório para verificar se poderíamos observar uma ativação máxima dos astrócitos em cultura diante do tratamento.

Dessa forma, repetimos a curva concentração-resposta (3, 10 e 30  $\mu$ M), porém com estímulo inflamatório por TNF em menor concentração (1 ng/mL) (Figura 6C). Em relação a CXCL1, observamos o mesmo padrão de produção, com redução de forma concentração-dependente. Já a produção de CCL2 apresentou-se elevada diante das concentrações de 30  $\mu$ M, enquanto CXCL10 seguiu sem alteração na sua produção. Observamos também que a redução na liberação de CXCL1 não ocorreu por morte celular, uma vez que, quando avaliada a viabilidade da cultura primária de astrócitos, esta manteve-se constante (Figura 6D).

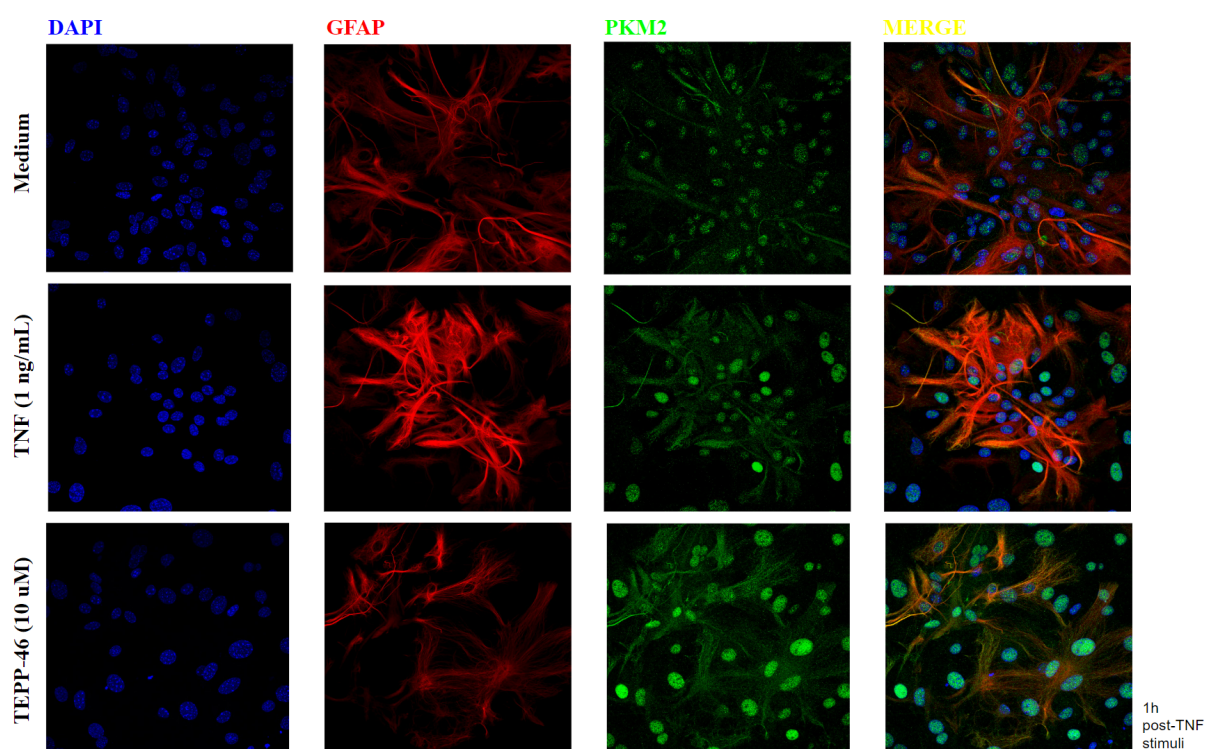


**Figura 6. O tratamento com TEPP-46 leva à alteração na produção de mediadores inflamatórios.** A) O TEPP-46 possui papel de favorecimento na forma tetramérica na PKM2, presente no citoplasma celular. B) O uso de TEPP-46 em cultura primária de astrócitos sob estímulo inflamatório por TNF (10 ng/mL) durante 12h induz diminuição na produção de CXCL1 de forma concentração-dependente e leve redução de CCL2 diante da maior concentração de droga utilizada. C) Quando utilizada menor concentração do estímulo inflamatório por TNF (1 ng/mL), observou-se alterações mais notórias na produção de CCL2 e CXCL1. D) Não houve alteração na viabilidade de celular das células em cultura diante do tratamento com TEPP-46. Análise estatística feita por One-way ANOVA seguida por Teste de Bonferroni, \*\*\*\* $p < 0,0001$  em relação ao grupo controle (Meio) e # $p < 0,05$  em relação ao grupo TNF. As barras de erro representam média  $\pm$  S.E.M.

Alterada a concentração do estímulo inflamatório, buscamos avaliar se esta concentração, ainda que menor, seria capaz de induzir ativação de atividades não-glicolíticas da PKM2, representada pela translocação desta proteína do citoplasma para o núcleo celular. Para isso, utilizamos o estímulo inflamatório por TNF (1 ng/mL) em dois tempos, 1 e 3h, e verificamos que houve aumento na presença da PKM2 no núcleo dos astrócitos de cultura primária por meio de ensaio de imunofluorescência já após 1h de estímulo (Figura 7). O

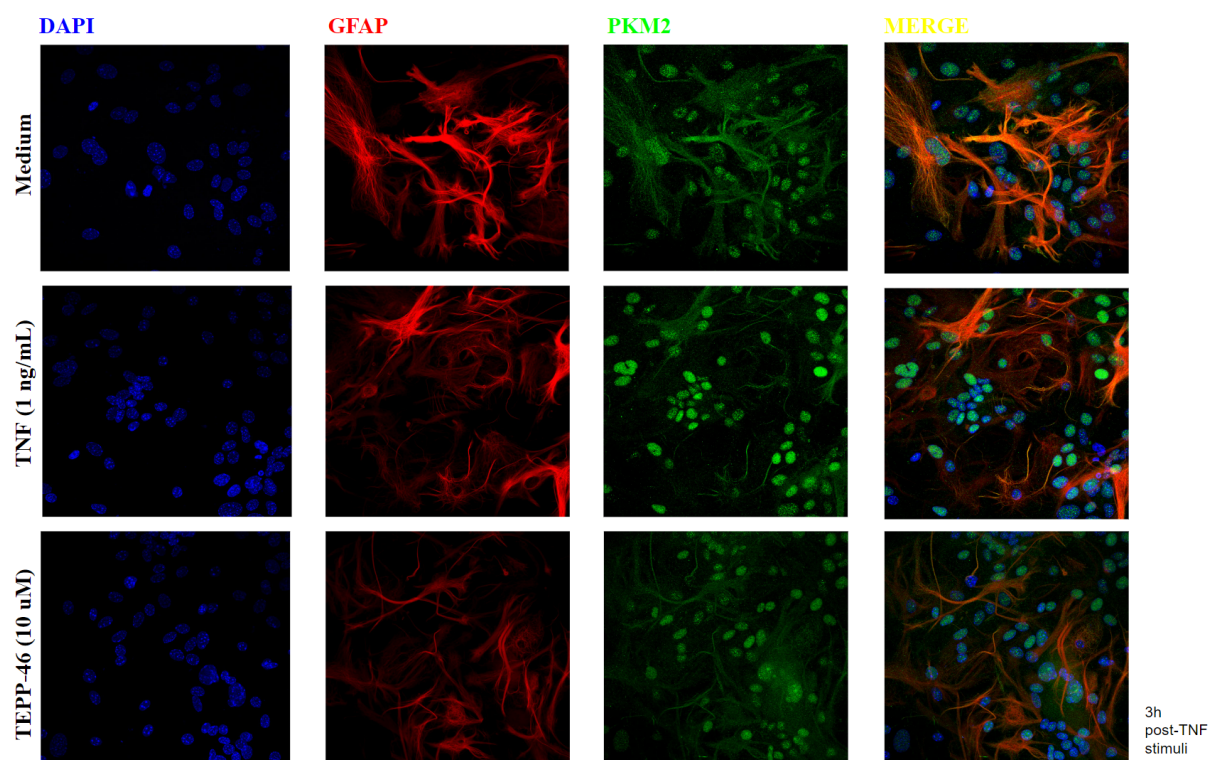


próximo passo do trabalho foi validar se o TEPP-46 estaria, de fato, favorecendo a estabilização da PKM2 em sua tetramérica e, portanto, sua permanência no citoplasma celular. Quando feito o estímulo por TNF (1 ng/mL) e o tratamento com TEPP-46 (10  $\mu$ M) - concentração a qual foi definida mediante experimentos anteriores (Figura 5) - com duração de 1h, observamos que, apesar do aumento da proteína no citoplasma dos astrócitos, essa ainda estava altamente presente no núcleo dessas células (Figura 6).



**Figura 7. O estímulo por TNF durante 1h já induz a translocação nuclear da PKM2, mas o tratamento com TEPP-46 ainda não possui efeito visível na reversão deste processo.** O estímulo inflamatório por TNF (1 ng/mL) em cultura primária de astrócitos durante 1h já possibilita a visualização da ativação de atividades não-glicolíticas da PKM2, uma vez que esta já encontra-se em maior quantidade no núcleo do astrócito - ou seja, em sua forma dimérica. Entretanto, o tratamento com TEPP-46 (10  $\mu$ M) feito durante 1h ainda não nos possibilita verificar se de fato este favorece a presença da PKM2 no citoplasma celular. A expressão de marcadores fluorescentes foi analisada usando Microscopia de Fluorescência DMI6000B-LMMC com aumento de 63x.

Ao realizar, entretanto, esse mesmo ensaio com estímulo feito durante 3h, verificamos um aumento ainda maior da presença da PKM2 no núcleo astrocitário (Figura 8), de modo que podemos concluir que o estímulo por TNF (1 ng/mL) foi capaz de induzir a dimerização e, conseqüentemente, a ativação de atividades não-glicolíticas da PKM2 no núcleo celular. Por outro lado, quando feito estímulo por TNF (1 ng/mL) e tratamento com TEPP-46 (10  $\mu$ M) durante 3h, observou-se uma nítida redução da presença da enzima PKM2 no núcleo celular, assemelhando-se ao que havia sido visto nas células não estimuladas com TNF (Figura 8). Dessa forma, concluiu-se que o estímulo inflamatório induz a translocação nuclear da PKM2 e que o TEPP-46, de fato, favorece a estabilização desta proteína no citoplasma.



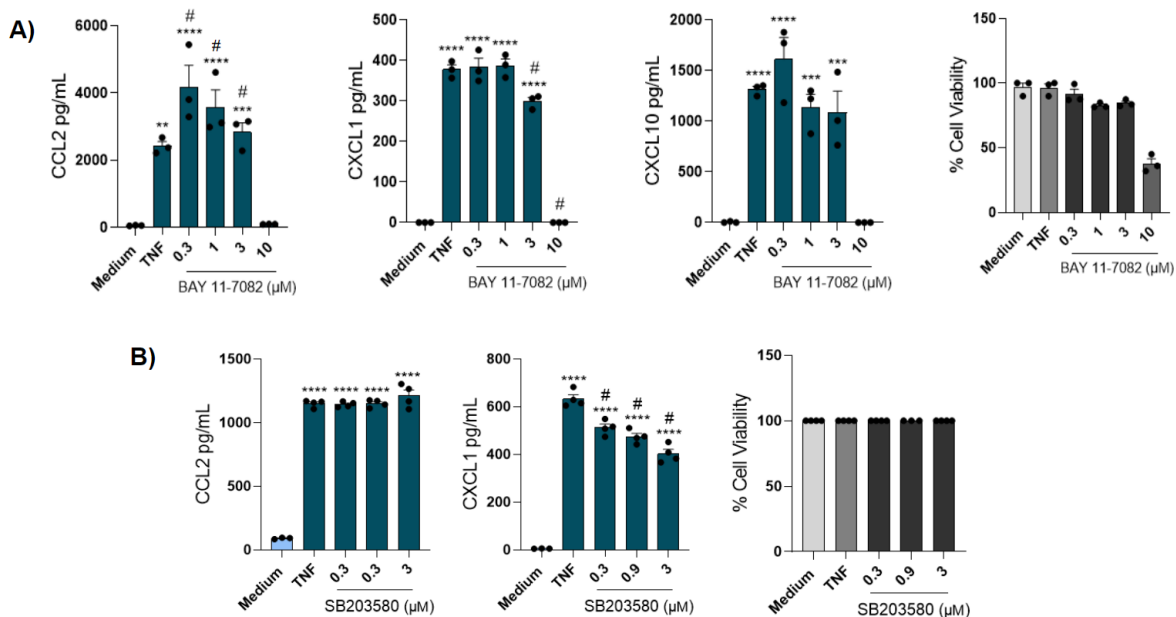
**Figura 8.** A translocação nuclear de PKM2 induzida pelo estímulo por TNF feito durante 3h é ainda mais notável, enquanto o efeito observado pelo tratamento com TEPP-46 também torna-se perceptível. O estímulo inflamatório por TNF (1 ng/mL) em cultura primária de astrócitos durante 3h favorece maior atividade não-glicolítica dessa proteína, uma vez que a translocação nuclear está aumentada. Por outro lado, feito o tratamento com TEPP-46 (10  $\mu$ M), observou-se que, de fato, a droga tem papel na manutenção da PKM2 no citoplasma da célula, logo, na sua conformação tetramérica. A expressão de marcadores fluorescentes foi analisada usando Microscopia de Fluorescência DMI6000B-LMMC com aumento de 63x.

#### 4.4 INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEIS VIAS ENVOLVIDAS NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA ASTROCITÁRIA POR PKM2

Uma vez observado que o estímulo inflamatório por TNF induz a ativação da PKM2 para atividades não-glicolíticas, o próximo passo foi investigar o mecanismo pelo qual a PKM2 estaria regulando a ativação de astrócitos. Algumas vias já foram descritas na literatura relacionando-se a ativação de astrócitos diante de inflamação, especialmente STAT3 (110) e NF-kB (111,112). Diante disso, decidimos realizar os experimentos a seguir tendo a via NF-kB como alvo inicial e, para tal processo, utilizamos ferramentas farmacológicas para melhor avaliar como essa via poderia modular a ativação dos astrócitos em cultura.

Foi feito, inicialmente, tratamento com BAY 11-7082, que possui efeito inibitório irreversível da via NF-kB pelo impedimento da fosforilação, e consequente degradação, de I $\kappa$ B $\alpha$  (113) (Figura 9A). Em cultura primária de astrócitos estimuladas por TNF (1 ng/mL), foi feita uma curva concentração-resposta (0.3, 1, 3 e 10  $\mu$ M) desta droga e foi possível observar, por meio do ensaio de ELISA, aumento da liberação de CCL2 diante das concentrações de 0.3, 1 e 3  $\mu$ M, enquanto CXCL1 apresentou diminuição diante da concentração 3  $\mu$ M. Em relação ao CXCL10, não observamos alteração na sua produção. Ao realizar o ensaio de viabilidade celular MTT, constatamos uma redução na viabilidade dos astrócitos em cultura quando utilizada maior concentração do inibidor BAY 11-7082 (10  $\mu$ M).

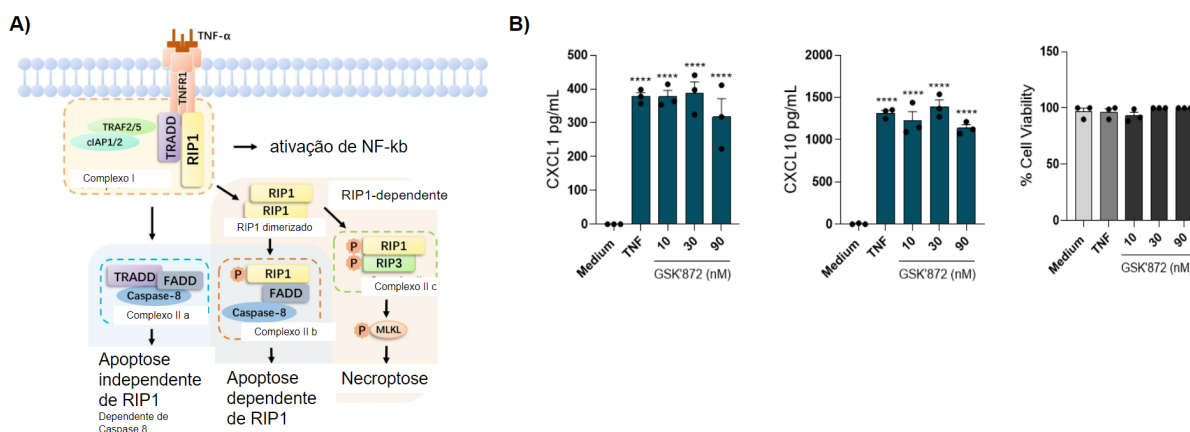
Posteriormente, utilizamos também o SB203580, que possui ação inibitória sobre a atividade quinase da p38 MAPK por meio da competição por ATP (114) e, dessa forma, possui como um de seus efeitos a inibição da ativação da via NF-kB (Figura 9B). Semelhantemente ao BAY 11-7082, observou-se redução na produção de CXCL1 de forma concentração-dependente. Entretanto, uma vez que o SB203580 não é considerado somente um inibidor de ativação da via NF-kB, não pode-se concluir que a atividade moduladora nos astrócitos em cultura ocorre por essa via, podendo ocorrer também via p38.



**Figura 9. Inibidor de ativação da via NF- $\kappa$ B induz aumento na produção de CCL2 e redução de CXCL1 de forma semelhante à vista quando utilizado inibidor de ativação de PKM2.** A) O tratamento com BAY 11-7082 (0.3, 1, 3 e 10  $\mu$ M), assim como TEPP-46, induziu aumento na produção de CCL2 e redução em CXCL1. Observa-se também queda na viabilidade celular quando utilizada a maior concentração deste inibidor (10  $\mu$ M). B) Utilizando um inibidor de ativação da via NF- $\kappa$ B que possui ação diferente do utilizado anteriormente, SB203580 (0.3, 0.9 e 3  $\mu$ M), seguimos observando redução na produção de CXCL1. Análise estatística feita por One-way ANOVA seguida por Teste de Bonferroni, \* $p < 0,05$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  em relação ao grupo controle (Meio) e # $p < 0,05$  em relação ao grupo TNF. As barras de erro representam média  $\pm$  S.E.M.

#### 4.5 VERIFICAÇÃO DE ATIVAÇÃO DA VIA DA NECROPTOSE, PARALELA À NF-kB, COMO SECUNDÁRIA AO ESTÍMULO INFLAMATÓRIO POR TNF

Uma vez identificada uma das possíveis vias de modulação da PKM2, nos perguntamos porque a redução de viabilidade celular estaria ocorrendo quando utilizado o inibidor BAY 11-7082 (10  $\mu$ M) (Figura 9A). Hipotetizamos que esse processo poderia ocorrer devido a um desvio para a via da necroptose nestas células gliais em cultura por conta da inibição farmacológica, uma vez que esta via é paralela à NF-kB - sendo que a via da necroptose é iniciada pela ativação da atividade quinase de RIPK1 e é um processo dependente de RIP3K (115) (Figura 10A). Para melhor avaliar esse processo, utilizamos o GSK'872 - que possui ação sobre a atividade quinase de RIP3K (116) e não observamos redução da produção dos mediadores avaliados (Figura 10B). Dessa forma, concluiu-se que a via da necroptose não está relacionada à ativação astrocitária induzida pelo estímulo inflamatório por TNF.



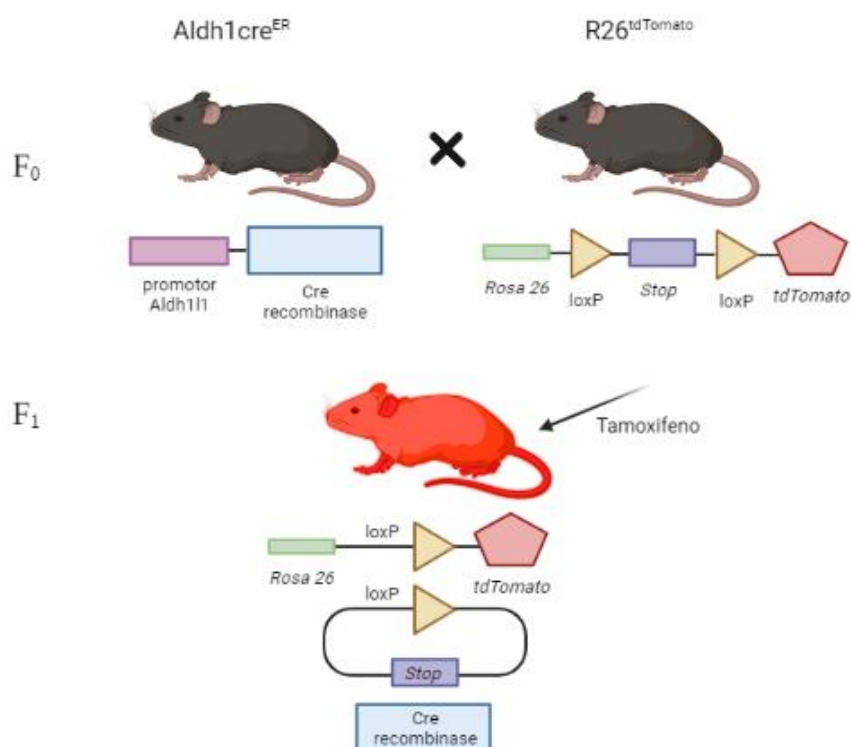
**Figura 10. Não há influência da via da necroptose na liberação de mediadores inflamatórios em cultura primária de astrócitos.** A) O estímulo por TNF pode induzir ativação da via da necroptose, a qual é dependente de RIP1 e RIP3. O modulador farmacológico GSK'872 possui ação sobre a RIP3K, de modo a inibir a ativação dessa via. Adaptado de Cao; Mu *Pharmacological Research*, 2021. B) O tratamento com GSK'872 (10, 30 e 90 nM) sob estímulo inflamatório por TNF (1 ng/mL) durante 12h não induz redução na produção de quimiocinas. Análise estatística feita por *One-way* ANOVA seguida por Teste de Bonferroni, \*\*\*\* $p < 0,0001$  em relação ao grupo controle (Meio). As barras de erro representam média  $\pm$  S.E.M.

#### 4.6 VALIDAÇÃO DE ANIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADOS

A partir dos dados anteriores que reforçam nossa hipótese da influência da via glicolítica e, especialmente, considerando o papel da PKM2 na formação e controle da resposta inflamatória, buscamos realizar experimentos em animais *knockout* condicionais para avaliar o papel dessa enzima em astrócitos; para isso, inicialmente foi necessário realizar a validação da construção gênica destes animais.

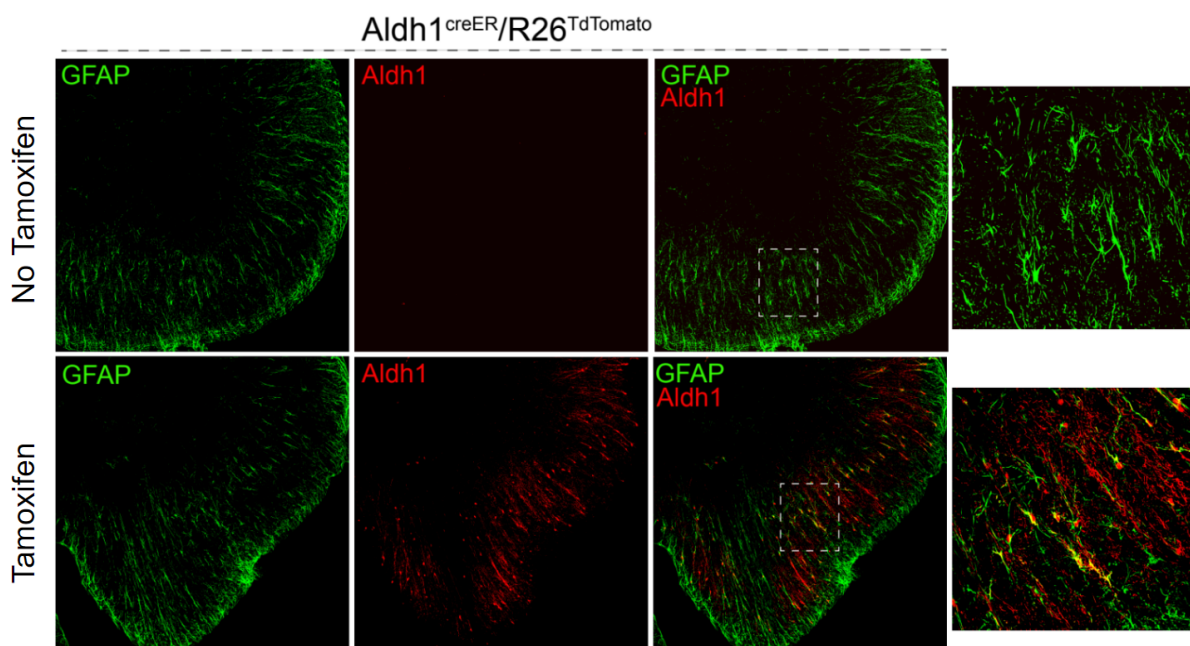
Os camundongos utilizados foram  $Aldh1^{creER}$  - ou seja, animais cuja Cre recombinase, uma topoisomerase derivada de bacteriófago, está sob ação do promotor da enzima aldeído desidrogenase 1 (*Aldh1*), que tem sido cada vez mais utilizada como marcador específico para astrócitos medulares (4,118). Além disso, a Cre recombinase utilizada nessa construção é denominada “induzível”, uma vez que sua ativação é dependente da ativação de receptor de estrógeno (ER) pelo tratamento com tamoxifeno (104).

Para validar a depleção a ser feita pela Cre recombinase específica em astrócitos, os animais  $Aldh1^{creER}$  foram cruzados inicialmente com animais  $R26^{tdTomato}$  - os quais possuem, no *locus* Rosa 26, uma sequência *stop códon* entre sequências loxP, de modo a reprimir a expressão *tdTomato*. Uma vez feito o cruzamento, de forma a gerar camundongos  $Aldh1^{creER}/R26^{tdTomato}$ , o tratamento com tamoxifeno ativa a Cre recombinase dependente de ER, o que leva à recombinação e, posteriormente, deleção do *stop códon* e permissão da expressão *tdTomato* (Figura 11).



**Figura 11. Ilustração esquemática referente a geração de animais  $Aldh1^{creER}/R26^{tdTomato}$ .** A geração  $F_0$ , formada por animais  $Aldh1^{creER}$  e  $R26^{tdTomato}$ , deve ser cruzada entre si para geração de animais que possuam expressão  $Rosa26/tdTomato$  sob promotor  $Aldh111$ . Tal processo é induzido via ativação da Cre recombinase dependente de ER feita pelo tratamento com tamoxifeno nos animais da geração  $F_1$ .

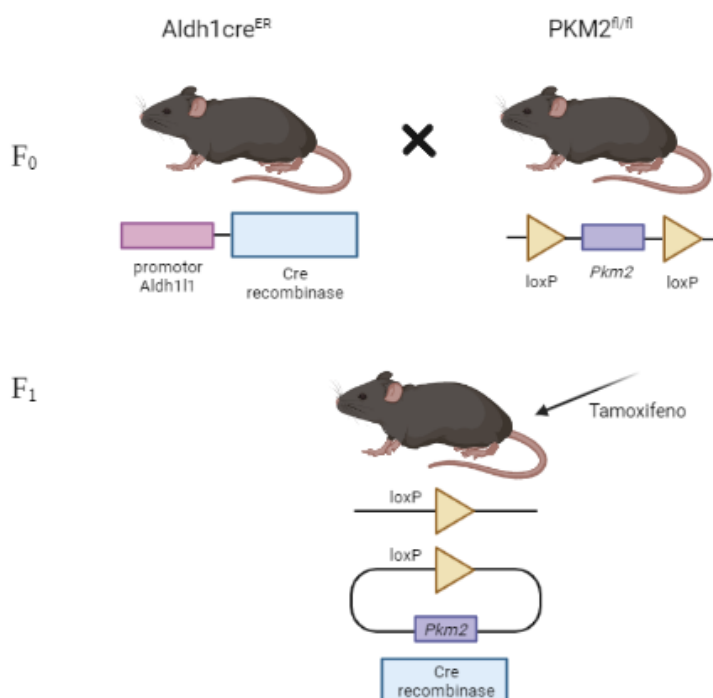
Feito o tratamento com tamoxifeno dos animais  $Aldh1^{creER}/R26^{tdTomato}$  com seis semanas de idade, esperou-se três semanas para que o processo de recombinação ocorresse e, após esse período, realizamos o ensaio de imunofluorescência na medula espinal desses animais. Além da marcação  $tdTomato$ , que, segundo a construção do animal, deve ser específica para os astrócitos, estas células também foram marcadas com anticorpo anti-GFAP, para confirmar a expressão de Cre recombinase em astrócitos (6) (Figura 12). Feito isso, observou-se colocalização entre a marcação anti-GFAP e a marcação  $tdTomato$ , indicando que a recombinação ocorre especificamente em astrócitos. Além disso, verificamos ausência de células que expressem  $Aldh1$  e  $tdTomato$  em animais cujo tratamento não foi realizado, o que indica que não houve recombinação gênica e que esse processo ocorre dependente da ativação via ER.



**Figura 12. O tratamento com tamoxifeno induz ativação da Cre recombinase de forma específica em astrócitos.** Camundongos  $Aldh1^{creER}/R26^{tdTomato}$  com seis semanas foram tratados com Tamoxifeno para induzir a ativação da Cre recombinase. As amostras foram incubadas com conjugado anti-GFAP-488 (Millipore, MAB3402X) e  $R26^{tdTomato}$  foi marcado quando a Cre recombinase foi ativada. A expressão de marcadores fluorescentes foi analisada usando Microscopia Confocal (Leica TCS-SP5 AOBS) com aumento de 40x.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PKM2 EM ASTRÓCITOS NO DESENVOLVIMENTO DA EAE

Uma vez validada a ferramenta genética a ser utilizada, prosseguimos para a geração dos animais *knockout* condicionais para nossa proteína de interesse - Aldh1<sup>creER</sup>/PKM2<sup>fl/fl</sup>. Para isso, utilizamos camundongos cuja PKM2 poderia ser depletada de astrócitos após tratamento com tamoxifeno (Figura 13).



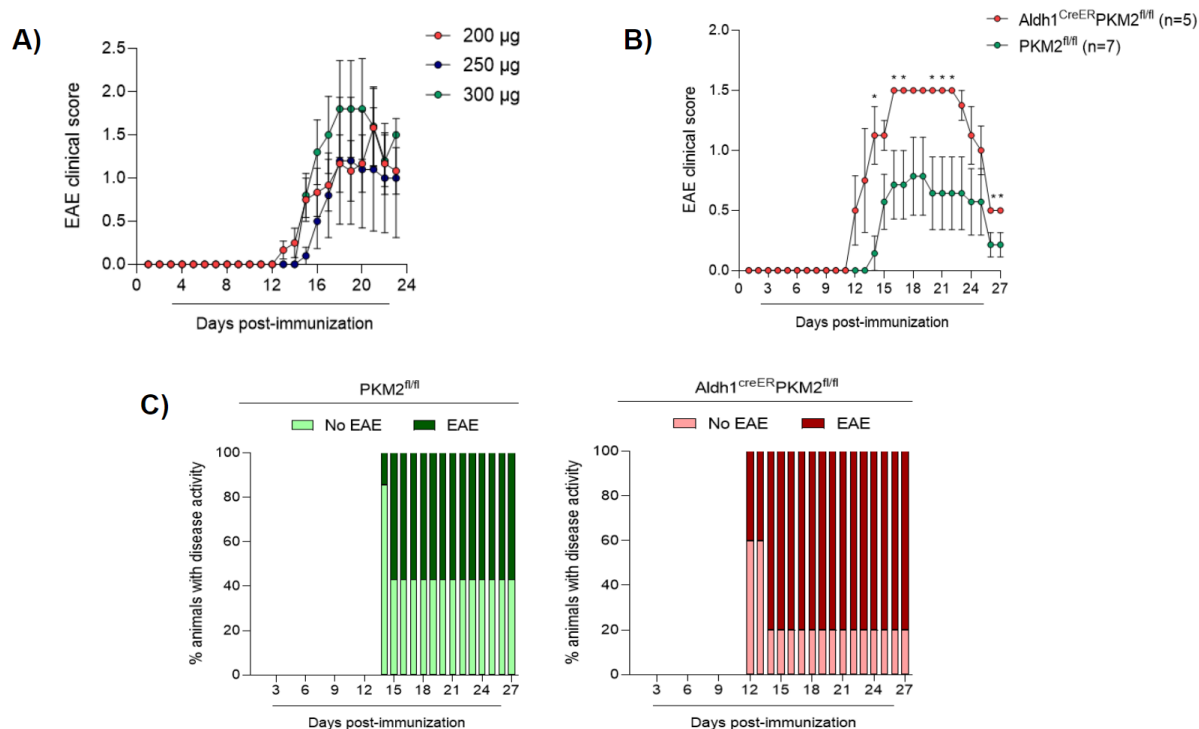
**Figura 13. Ilustração esquemática referente a geração de animais Aldh1<sup>creER</sup>/PKM2<sup>fl/fl</sup>.** O cruzamento é feito entre animais Cre<sup>ERT2</sup>, que possuem a Cre recombinase sob o promotor da proteína aldeído desidrogenase 1 (Aldh111) e com ação induzida pela ativação do receptor de estrógeno mediante o tratamento com tamoxifeno, e animais com a sequência loxP flanqueando o gene *Pkm2* no éxon 10, onde localiza-se a sequência referente à *Pkm2* (geração F<sub>0</sub>). Quando feito o cruzamento, a geração F<sub>1</sub> pode ser composta tanto por animais nos quais houve a inserção da Cre recombinase, quanto por animais nos quais não houve a inserção.

Após a geração desses animais, realizamos a indução do modelo de neuroinflamação (EAE). Inicialmente, padronizamos em animais C57BL/6 WT a concentração do peptídeo MOG<sub>35-55</sub> a ser administrada para indução desse modelo (Figura 14A). Durante o decurso temporal, foi feita a curva de concentração de 200, 250 e 300 µg desse peptídeo e observou-se que a concentração que melhor induziu *score* clínico nos camundongos foi a maior - de 300 µg. Assim, seguimos com este valor para a realização do experimento nos animais *knockout* condicionais.

Ao induzir EAE nos animais, observamos que o grupo cuja ablação da PKM2 foi feita iniciou os sintomas da doença dois dias antes do grupo controle. Além disso, também foi notável que o grupo que não possuía PKM2 nos astrócitos obteve pior quadro da doença,



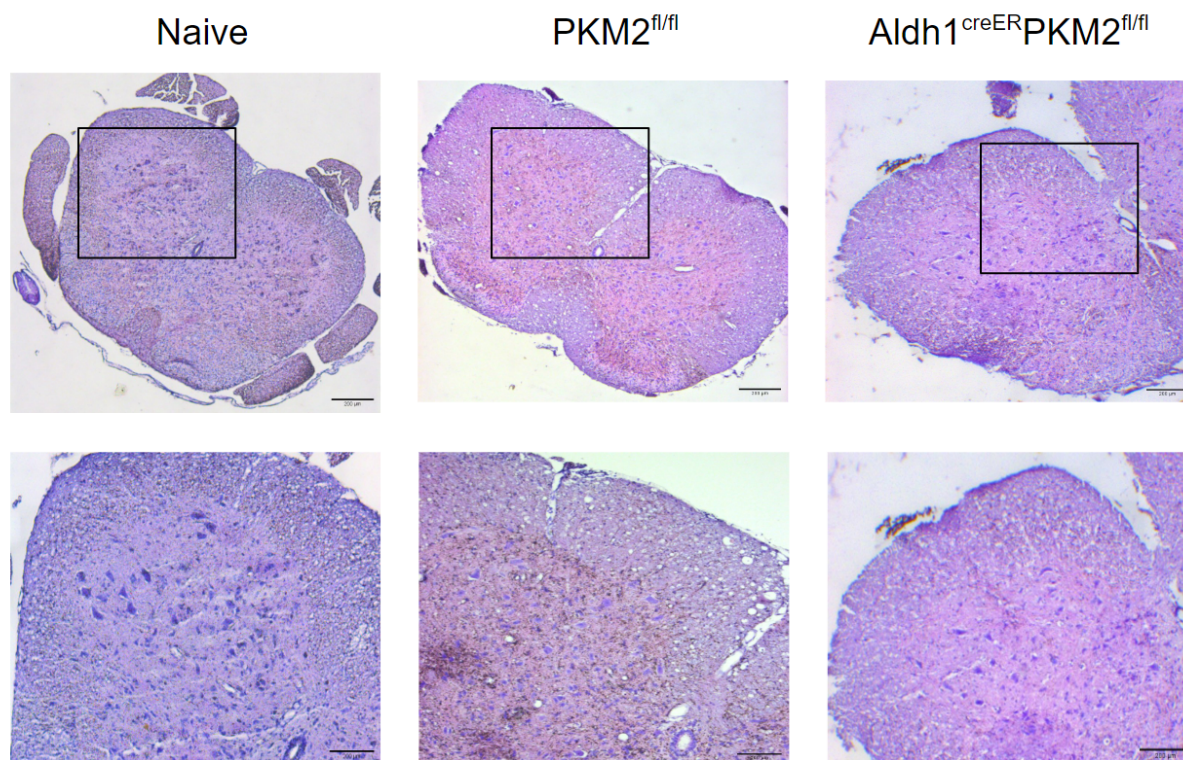
demonstrado por meio do maior *score* clínico alcançado (Figura 14B), sendo que a piora no quadro ainda apresentou-se pela maior incidência da doença no grupo cuja PKM2 estava ausente (Figura 14C). Com base nesse experimento, concluímos que a presença da enzima PKM2 em astrócitos sugere papel protetor diante do contexto neuroinflamatório.



**Figura 14. A ausência da PKM2 favorece o desenvolvimento do modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental.** **A)** Padronização das concentrações de MOG<sub>35-55</sub> para o modelo de EAE em animais *Wild Type* para definição da concentração a ser utilizada (n=5 por grupo). **B)** Ao utilizar a concentração de MOG<sub>35-55</sub> de 300 µg para indução do modelo, sugere-se um papel protetor da enzima PKM2 em astrócitos. **C)** A ausência da PKM2 favorece maior incidência da doença nos grupos avaliados. Análise estatística feita por Two-way ANOVA seguida por teste de Bonferroni, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 e \*\*\*\*p<0,0001. As barras de erro representam média ± S.E.M.

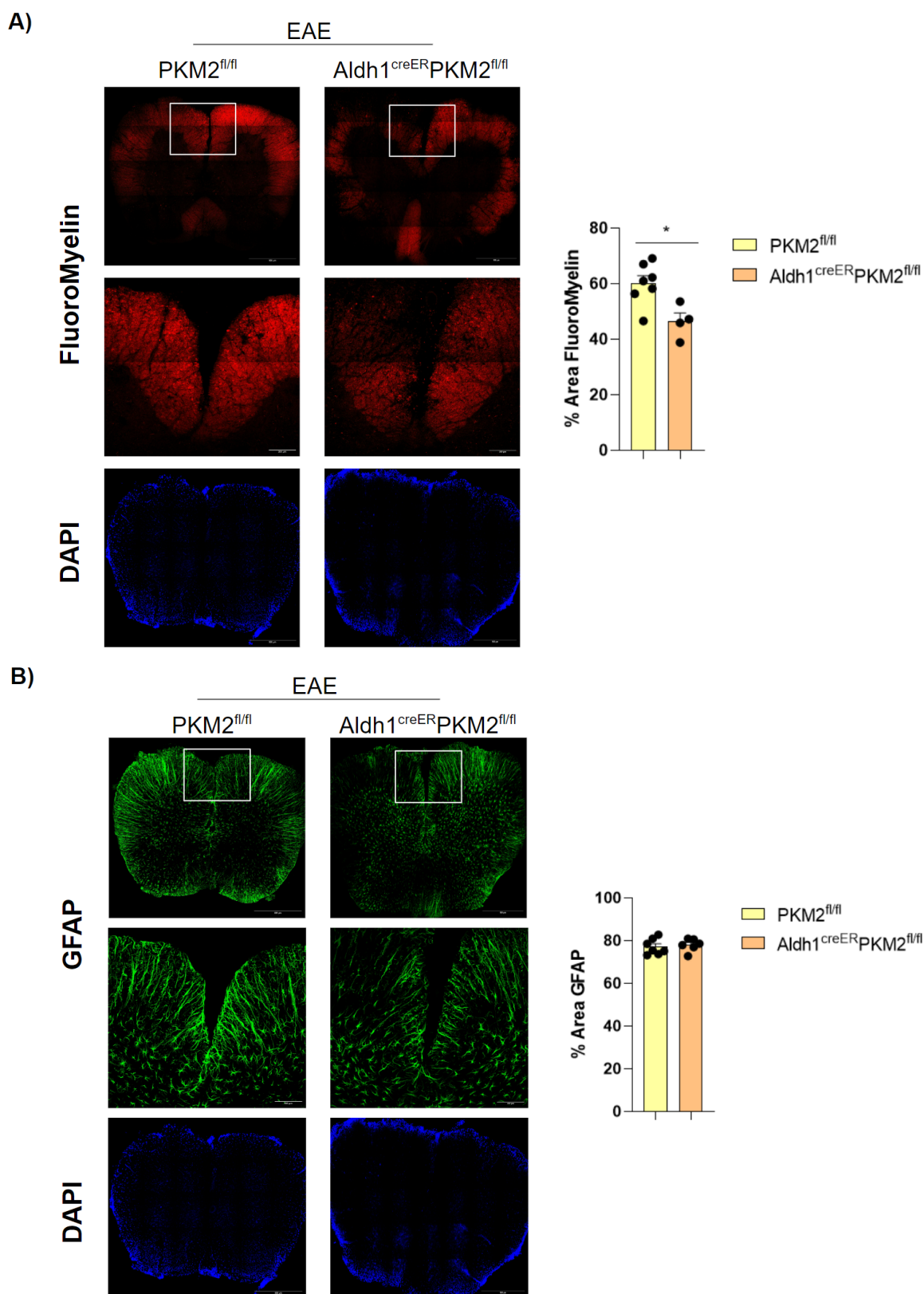
Ao final do decurso temporal realizado (Figura 14B), coletamos a medula espinal dos animais PKM2<sup>fl/fl</sup> e Aldh1<sup>CreER</sup>/PKM2<sup>fl/fl</sup> para análises histopatológicas (Figura 15). Observou-se que, nos animais cuja PKM2 estava ausente nos astrócitos, havia redução da integridade do tecido - ainda que ao final do decurso temporal, já em processo de recuperação -, quando comparado com os animais controle.

## EAE



**Figura 15. A ausência da PKM2 em astrócitos induz maior perda de integridade da medula espinal.** Animais *knockout* condicionais tratados com tamoxifeno que passaram pela indução da EAE demonstraram maior favorecimento ao desenvolvimento da doença quando feita a depleção da enzima PKM2 em astrócitos. Imagens feitas em Microscópio de Dissecção a laser (sem fluorescência) com aumento de 5x e 10x.

Além das análises histopatológicas, foram realizadas também análises pelo ensaio de imunofluorescência das medulas espinais de animais  $\text{PKM2}^{\text{fl/fl}}$  e  $\text{Aldh1}^{\text{creER}}/\text{PKM2}^{\text{fl/fl}}$  nos quais foi induzida EAE (Figura 14). Por meio da marcação por Fluoromielina, permitiu-se comparar a presença de mielina no tecido entre ambos os grupos e notou-se maior desmielinização nos animais cuja PKM2 estava ausente (Figura 16A). Adicionalmente, realizamos marcação com GFAP nessas amostras, para verificar a astrogliose, um dos parâmetros observados na EAE (Figura 16B) (6,33). Observamos que a porcentagem de área marcada por GFAP não se altera na ausência da PKM2, ou seja, o quadro de astrogliose permanece semelhante entre ambos os grupos. Assim, confirmou-se que a ausência da PKM2 favorece a redução da integridade do tecido medular, bem como o processo de desmielinização.

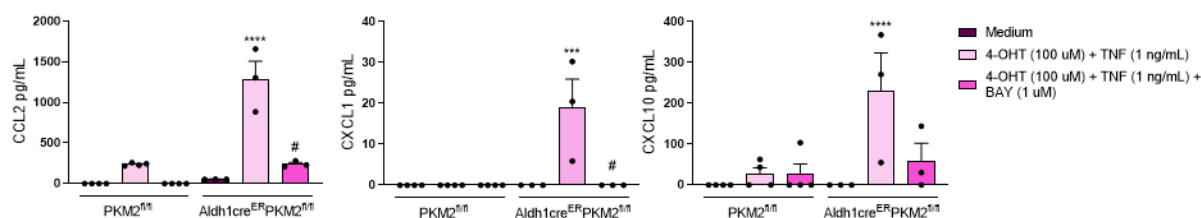


**Figura 16. A ausência da PKM2 favorece a desmielinização, mas não a astrogliose, na medula espinal. A)** Animais *knockout* condicionais tratados com tamoxifeno que passaram pela indução da EAE demonstraram maior desmielinização, principalmente, no corno ventral da medula espinal. **B)** Por outro lado, esses mesmos animais não apresentaram alteração na expressão de GFAP, marcador classicamente utilizado para avaliação de astrogliose. A expressão de marcadores fluorescentes foi analisada por meio da Microscopia Confocal (Leica TCS-SP5 AOBs) com aumento de 40x.

#### 4.8 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVAÇÃO ASTROCITÁRIA *IN VITRO* NA AUSÊNCIA DA PKM2

Para avaliar o papel da PKM2 em cultura primária de astrócitos de modo semelhante a como foi feito nos experimentos *in vivo* - ou seja, por meio da depleção gênica da enzima, e não somente por ferramenta farmacológica -, utilizamos animais neonatos (0 a 2 dias) PKM2<sup>fl/fl</sup> e Aldh1<sup>creER</sup>/PKM2<sup>fl/fl</sup> para realização da cultura primária. Para que fosse realizada a depleção da PKM2 dos astrócitos desses animais, seguimos a cultura primária como o padronizado, porém, adicionalmente, realizamos o tratamento com 4-OHT (100  $\mu$ M) - metabólito gerado a partir do tamoxifeno - para que houvesse ativação da Cre recombinase e posterior recombinação gênica nessas células (119).

Posterior ao tratamento com 4-OHT, seguiu-se o experimento com estímulo inflamatório por TNF (1 ng/mL) e tratamento com o BAY 11-7082 (10  $\mu$ M) - o que foi utilizado para verificar se, mesmo na ausência da PKM2, a inibição da via NF- $\kappa$ B seguiria com papel na regulação da ativação dessas células (Figura 17). Verificamos que, nos astrócitos os quais foi realizada a alteração gênica, houve maior produção de CCL2, CXCL1 e CXCL10 em relação às células cuja PKM2 se manteve expressa. Também se observou que, após a inibição da ativação da via NF- $\kappa$ B, houve redução na produção desses mediadores inflamatórios. Dessa forma, verificamos que, assim como no modelo experimental, a ausência da PKM2 favorece a ativação astrocitária, com possível associação à via NF- $\kappa$ B.



**Figura 17. A ausência da PKM2 em cultura primária de astrócitos induz a liberação de mediadores inflamatórios.** A partir de córtex de animais neonatos PKM2<sup>fl/fl</sup> e Aldh1<sup>creER</sup>/PKM2<sup>fl/fl</sup>, realizou-se tratamento com 4-OHT (100  $\mu$ M) durante 20h, com posterior período de *resting* das células de 18h. Após esse período, foi feito estímulo inflamatório com TNF (1 ng/mL) e tratamento com BAY 11-8072 (10  $\mu$ M) durante 12h e observou-se maior produção de CCL2, CXCL1 e CXCL10 nas células cuja PKM2 foi retirada. Análise estatística feita por One-way ANOVA seguida por Teste de Bonferroni, \*\*\* $p$ <0,001 e \*\*\*\* $p$ <0,0001 em relação ao grupo controle (Meio) e # $p$ <0,05 em relação ao grupo TNF. As barras de erro representam média  $\pm$  S.E.M.

## 5. DISCUSSÃO

Os astrócitos são células que, além de um papel clássico em fornecer suporte às demais células do SNC, também possuem função de manutenção da homeostase do sistema em condições patológicas (1,12,13). Dentre as maneiras pelas quais essas células gliais fazem isso, sabe-se que a modificação de vias metabólicas próprias é uma delas (44). Com base nisso, realizamos inicialmente análise de expressão de RNA de célula única (*Single Cell RNASeq*) da Piruvato Quinase M e, ao avaliar a expressão de *Pkm* geral, notamos que, no SNC, os astrócitos, junto aos neurônios, expressam-na em maior quantidade. É provável que isso tenha sido observado uma vez que a análise foi feita sem distinção entre *Pkm1* e *Pkm2*, pois o banco de dados que utilizamos não permitiu essa divisão. Dessa forma, ao lembrar que a PKM1 é expressa constitutivamente no cérebro, a expressão real de PKM2 em astrócitos pode ter sido mascarada por esse fato (49,52,54). No futuro, objetivamos trazer essa análise de bioinformática utilizando banco de dados que possibilite a distinção entre as isoformas M1 e M2, de modo a nos informar a expressão real de cada uma delas nas células do SNC. Diante desses dados, reforçamos a importância metabólica do astrócito em condições homeostáticas.

Os astrócitos são células com algumas características semelhantes às células imunológicas, uma vez que sabidamente possuem capacidade de resposta frente ativação a estímulos nocivos e assim, amplificação e/ou controle da resposta inflamatória (1,6). Dessa forma, para estudar essa característica dos astrócitos em um ambiente isolado, inicialmente realizamos a padronização de cultura primária de astrócitos e, para o processo de purificação, utilizamos microesferas magnéticas anti-ACSA-2. Os marcadores ACSA podem ser do tipo 1 ou 2, sendo que eles se diferem pela sua natureza e momento de maior expressão - durante a diferenciação ou em células maduras: ACSA-1 é um epítipo de transportador de glutamato astrocitário e encontra-se expresso de forma constante ao longo do desenvolvimento da célula; já ACSA-2 trata-se de uma ATPase e é expresso em células maduras. Uma vez que utilizamos células já diferenciadas, após 10 dias de cultura, optamos por utilizar o anticorpo anti-ACSA-2, que levaria a uma maior purificação dessas células (120-122).

Apresentamos inicialmente que, diante de diferentes estímulos inflamatórios, essas células respondem pela liberação de CCL2, de CXCL1 e de CXCL10, mediadores pró-inflamatórios classicamente associados à ativação astrocitária (123). Essa ativação foi caracterizada pelo uso de dois estímulos amplamente utilizados na literatura; iniciamos com o TNF, um dos mais utilizados pelos trabalhos, uma vez que sabe-se que o receptor TNFR1 está

associado ao desencadeamento da resposta astrocitária em contextos neuroinflamatórios (124). Além do TNF, outro estímulo utilizado foi o denominado “coquetel”, composto por TNF, IL-1 $\alpha$  e C1q, o qual começou a ser utilizado após publicação de Liddelow e colaboradores (2017) que demonstraram que a micróglia ativada produz esses fatores e favorece a polarização de astrócitos no fenótipo A1 - pró-inflamatório (9). Considerando que desejávamos avaliar a produção de mediadores pró-inflamatórios, esse coquetel de estímulos foi bem utilizado para nosso trabalho.

Os astrócitos são células altamente ativas metabolicamente, característica essa que é facilitada graças à localização dessas células: o contato com grande parte das células endoteliais de vasos sanguíneos possibilita a captação de glicose circulante para início da metabolização intracelular por diferentes vias metabólicas (39,46). Uma dessas vias metabólicas pela qual a glicose vai ser catalisada é a via da glicólise. Como reação final dessa via ocorre a formação de piruvato, a qual ocorre por ação catalítica da enzima piruvato quinase (PK), que encontra-se presente sob quatro isoformas em mamíferos: PKL, PKR, PKM1 e PKM2, sendo que essas duas últimas são transcritas a partir do mesmo gene, mas os éxons para transcrição de cada uma delas são o 9 e o 10, respectivamente (49,53).

Observamos que, ao realizar os estímulos inflamatórios por TNF e pelo coquetel existe uma tendência ao aumento da expressão proteica de PKM2 em cultura primária de astrócitos; entretanto, não podemos concluir certamente que isso ocorre pois trata-se de um dado qualitativo. Para melhor avaliar esse processo posteriormente, o mais adequado seria repetir o experimento com período de estímulo menor que 12h, uma vez que já observamos produção dos mediadores após 6h do estímulo, o que pode indicar que a expressão da PKM2 estaria aumentada antes desse período. Por outro lado, também devemos considerar que a mudança na expressão da proteína alvo talvez não seja significativa, uma vez que seus efeitos na modulação da ativação astrocitária diante do estímulo inflamatório podem ocorrer por alterações na conformação da PKM2, mas sem alterar sua expressão. Em relação a expressão de PKM1, observamos que, mesmo nas células as quais não foram estimuladas, a expressão dessa proteína já encontrava-se elevada, o que corrobora com os dados da literatura que demonstram que a PKM1 possui expressão constitutiva no SNC (51).

A PKM2 mostra-se diferente das outras isoformas de PK pois apresenta-se de duas formas conformacionais diferentes: tetrâmero e dímero (49,51,53). Sabe-se que cada uma dessas formas possui diferentes atividades, sendo que a forma dimérica possui baixa atividade enzimática, menor afinidade por metabólitos glicolíticos e encontra-se no núcleo celular - região na qual chega devido a presença de complexo de poros nucleares (55,58). Os trabalhos

da literatura têm cada vez mais explorado novas funções da PKM2 sob sua forma dimérica - ou seja, funções nucleares dessa proteína. Nossos dados demonstram que, por meio da inibição de atividades nucleares da PKM2 pelo uso do TEPP-46 - o qual favorece a conformação tetramérica dessa proteína -, há aumento da liberação de CCL2 e redução de CXCL1. Em relação a CXCL1, essa quimiocina é descrita como importante no recrutamento de neutrófilos diante de resposta inflamatória e, relacionada a essa função, também descreve-se como importante na indução da liberação de proteases e de EROs (125). A partir disso, existem algumas formas pelas quais poderíamos posteriormente avaliar o papel da PKM2 nesse controle de ativação astrocitária - ao considerar, ainda, que existem indícios na literatura que a presença de EROs induz a formação dimérica dessa proteína (68). Já sobre CCL2, é classicamente sabido que essa quimiocina favorece o recrutamento de monócitos para os sítios inflamatórios (126), o que possivelmente pode ser outro mecanismo pelo qual a PKM2 modula a resposta de astrócitos ao estímulo inflamatório - mecanismo, o qual, corroboraria com nossos dados *in vivo*, melhor discutidos a seguir.

Antes de seguir com experimentos para entender melhor como a modulação via PKM2 estaria ocorrendo, confirmamos que há ativação da PKM2 diante do estímulo inflamatório, bem como realizamos a validação do inibidor utilizado - o TEPP-46. Observamos que o estímulo por TNF, de fato, induz a translocação nuclear da PKM2, o que reforça nossos achados de que essa proteína possui papel na ativação de astrócitos. Esse processo foi melhor observado quando o estímulo foi feito durante o período de 3h, o que é justificado pelo tempo necessário para que a maquinaria celular que possibilita a translocação nuclear da PKM2 seja ativada. Ainda referente à translocação nuclear de PKM2, é interessante que posteriormente seja feita avaliação da razão entre PKM2 fosforilada (pPKM2) e total, uma vez que a fosforilação é um dos moduladores conformacionais desta proteína. Em relação ao inibidor TEPP-46, verificamos seu efeito de favorecimento da tetramerização da PKM2 através da maior presença dessa proteína no citoplasma celular quando comparado ao observado após o estímulo inflamatório; observa-se, novamente, que o melhor efeito são 3h após o tratamento. Além disso, também é importante ressaltar que não seria esperado visualizar uma completa translocação nuclear da PKM2 diante do estímulo inflamatório, uma vez que, no citoplasma, essa proteína exerce funções primárias para a célula por meio da catálise da formação de piruvato, sendo necessário manter parte dessa proteína ainda presente no citoplasma para que essas funções essenciais para a célula sigam sendo exercidas (50).

Depois de validada a ferramenta farmacológica utilizada e confirmado que a PKM2 é ativada após o estímulo inflamatório, seguimos para a avaliação de possíveis vias que

estariam sendo moduladas pela PKM2. Uma vez de observarmos que a inibição da dimerização dessa proteína altera a liberação de mediadores pró-inflamatórios, acreditamos que a modulação observada ocorra por alguma das funções nucleares da PKM2. Dentre essas funções, têm-se a fosforilação de proteínas envolvidas em vias de ativação da resposta inflamatória, como STAT3 e NF-kB (81,86). Sabendo-se que existem trabalhos na literatura que, além de demonstrarem a ativação da via NF-kB em astrócitos, também relacionam esse processo às atividades metabólicas dessa célula, decidimos seguir inicialmente por essa via (110).

Para investigar o papel da via NF-kB na ativação astrocitária, fizemos uso de diferentes ferramentas farmacológicas para inibição dessa e verificamos que alteração na ativação de astrócitos diante do uso de inibidores, demonstrado a partir de modificações na liberação dos mediadores pró-inflamatórios. Mais uma vez, verificamos que esse efeito se mostra mais específico sobre a produção de CCL2 e de CXCL1, o que reforça a hipótese de que o eixo PKM2/NF-kB atue sobre funções dessas quimiocinas. Por outro lado, também consideramos o fato do inibidor SB203580 não possuir efeito somente sobre a via NF-kB; dessa forma, abre-se a possibilidade de que a modulação da ativação dessas células ocorra via p38 - uma vez que existem trabalhos na literatura que apresentam relação entre p38 e PKM2 (127,128).

Ao realizar ensaios de viabilidade dos astrócitos quando tratados com inibidor de ativação da via NF-kB que possui ação sobre o impedimento da degradação de I $\kappa$ B $\alpha$  (113), notou-se aumento na porcentagem de morte celular quando utilizadas concentrações maiores desses inibidores. Uma vez que o estímulo por TNF leva a ativação das vias *downstream* ao receptor TNFR1, como a via NF-kB e a via da necroptose - por meio das atividades de RIPK -, nos perguntamos se o estímulo inflamatório nessas células estaria ativando essa via paralela, de necroptose, e por isso estaríamos vendo aumento morte celular. Os dados demonstram que essa via não é ativada diante do estímulo inflamatório, uma vez que não houve alteração na produção dos mediadores pró-inflamatórios diante do uso de inibidor de ativação de RIP3K. Desse modo, demonstramos que o estímulo por TNF em astrócitos não ativa a via da necroptose e, provavelmente, a morte celular que observamos pelos ensaios de viabilidade ocorrem dada a toxicidade do inibidor quando utilizado em maiores concentrações. Além disso, o uso de moduladores farmacológicos possui o viés da possível existência de efeitos inespecíficos dessas drogas (*off target*), o que também pode induzir à morte celular.

Para iniciar os experimentos em animais, obtivemos a linhagem Aldh1<sup>creER</sup> para realização desses. Entretanto, nos deparamos com o fato do animal obtido a partir do Jackson



*Laboratory* possuir *background* genético N/N - isso significa que esse animal possui alterações gênicas que vão desde envolvimento em captação e metabolização de glicose, metabolismo mitocondrial, até alterações comportamentais (104,129). Diante dessa informação, e pelo fato de todos os animais os quais são fornecidos pelo Biotério Central possuírem o *background* J/J, foi necessária a realização de diversos cruzamentos até que obtivéssemos animais com *backgrounds* genéticos idênticos - J/J. Por conta disso, a geração de animais para uso com modelo experimental foi demorada e não conseguimos obter uma maior quantidade de dados *in vivo*.

Apesar desse percalço, o primeiro experimento realizado foi para validar a ativação da Cre recombinase dependente de ER, uma vez que nem todas animais possuem a inserção dessa enzima de forma correta, o que leva a recombinação gênica inespecífica - o que já foi demonstrado que ocorre no animal GFAP<sup>creER</sup> (130). Verificamos por meio de uso de animais *reporter* que a recombinação gênica desses animais acontece especificamente em astrócitos e dependente da ativação de ER, uma vez que a ativação de R26<sup>tdTomato</sup> só ocorreu nas células também GFAP<sup>+</sup> e nos animais cujo tratamento com tamoxifeno foi realizado.

Sabendo-se que células imunológicas, como macrófagos e linfócitos, bem como células residentes do SNC, como a microglia, possuem resposta modulada a partir da conformação estrutural a qual a PKM2 se encontra (86,88), buscamos investigar essa função moduladora da PKM2 em astrócitos. Para isso, diversos são os modelos utilizados; dentre eles modelos de neuroinflamação, como a EAE - caracterizado como um modelo crônico de neurodegeneração e desmielinizante, de forma semelhante à EM (98). O uso de animais com deficiência da PKM2 em astrócitos (104,105) nos permitiu investigar esse processo.

Nossos dados indicam que a presença da enzima PKM2 sugere função protetora no desenvolvimento da EAE, uma vez que os animais cuja depleção foi feita apresentaram um *score* clínico aumentado em relação aos animais controle. Ainda apresentamos que, além de alterações fenotípicas, o grupo dos animais cuja PKM2 estava ausente possuiu maior incidência de desenvolvimento da EAE em relação ao grupo controle. Observamos, ainda, que os animais cuja PKM2 estava ausente nos astrócitos possuíram maior desmielinização na medula espinal em relação aos animais do grupo controle. A partir da análise de marcação de GFAP, notamos que não houve diferença nessa marcação entre o grupo controle e o grupo cuja PKM2 estava ausente nos astrócitos; esse dado pode ser explicado pelo momento em que essas amostras foram analisadas e, possivelmente, verificaríamos alteração em relação à astrogliose no tecido medular durante o pico da doença (118,131).

Os dados discutidos acima corroboram com nossos dados *in vitro* em relação a produção de CCL2, uma vez que, após modulações farmacológicas de inibição de funções nucleares da PKM2 e de ativação da via NF- $\kappa$ B indicaram aumento na produção desse mediador; esse processo poderia indicar maior recrutamento de monócitos ao SNC no contexto da neuroinflamação e, dessa maneira, induzir maior gravidade da doença - o que reforçaria nossos achados. Por outro lado, a redução de CXCL1 observada em cultura após uso dos inibidores, em um primeiro momento, não confirma nossos dados *in vivo*; entretanto, pontua-se que o TEPP-46 não inibe completamente as atividades da PKM2, mas sim somente as atividades nucleares. Dessa forma, é possível que a ausência completa da enzima leve a um diferente fenótipo *in vivo* do que havíamos visto até então *in vitro*. Além disso, sabe-se que, apesar de tentarmos utilizar os moduladores farmacológicos com maior especificidade possível, ainda assim temos o viés de possíveis efeitos *off target*. Nossos dados *in vivo* ainda corroboram com dados da literatura que demonstram que a presença da PKM2 em diferentes condições inflamatórias favorece o desenvolvimento dessas - especialmente sob sua forma dimérica (84,85). Dessa forma, precisamos verificar, agora, de que forma esse processo pode estar ocorrendo; com base nas nossas evidências da participação da via NF- $\kappa$ B, é possível que ocorra fosforilação de proteínas envolvidas na ativação dessa via, como I $\kappa$ B (83).

Para avaliarmos o papel da PKM2 em astrócitos em cultura de forma semelhante ao feito na experimentação animal, realizamos cultura primária de astrócitos com células de animais *knockout* condicionais - de modo que, ao realizar o tratamento dessas células, seria feita a depleção da PKM2, assim como nos experimentos de modelo inflamatório. Diante do estímulo inflamatório, notamos aumento na liberação dos mediadores avaliados em relação às células não estimuladas. Ao observar cautelosamente, notamos que a produção desses mediadores não ocorreu em altos níveis; um dos pontos os quais pode justificar isso é o tratamento com 4-OHT, que pode estar em concentrações acima do necessário, de modo a influenciar na viabilidade celular (132) - o que deve ser verificado por meio de ensaios posteriormente. Apesar disso, verificamos que nas células *knockout* a ausência da PKM2 parece influenciar mais do que a possível queda de viabilidade de parte das células em cultura, pois, nas células PKM2<sup>fl/fl</sup>, os níveis dos mediadores liberados mantêm-se baixos em todos os grupos. Além disso, também realizamos o tratamento com inibidor de ativação da via NF- $\kappa$ B, que induziu redução da produção dos mediadores avaliados. Isso pode indicar que a ausência da PKM2 reprime a ativação da via NF- $\kappa$ B e, ao inibir a ativação dessa via, revertemos esse quadro.

Com base nos dados que temos até o momento, verificamos que a presença da PKM2 em astrócitos é capaz de modular a resposta inflamatória observada em modelo de neuroinflamação. Entretanto, ainda não conseguimos definir como esse processo está ocorrendo. Temos indícios de que haja envolvimento da via NF-kB *downstream* à PKM2, entretanto, ainda não sabemos exatamente como esse processo ocorre - e se outras vias estão envolvidas. Contudo, é importante lembrar que as funções astrocíticas não se restringem à amplificação e/ou controle da resposta inflamatória por meio da liberação de quimiocinas; essas células também possuem papel fundamental no controle da atividade sináptica, bem como na manutenção estrutural da BHE (21,23,24).

Dessa forma, abrem-se algumas possibilidades de mecanismos: uma vez que os astrócitos possuem suas atividades metabólicas associadas a diversas de suas funções, é possível que a regulação via NF-kB altere aspectos estruturais da BHE, o que permitiria maior infiltrado celular no SNC; a literatura demonstra que astrócitos reativos podem induzir distúrbios na integridade da BHE mediados por eixos vias relacionadas à PKM2, como a STAT3 (34). Além disso, possíveis alterações neurológicas poderiam estar relacionadas à excitabilidade neuronal, dada a alteração na liberação de metabólitos, que permitem o acoplamento e funcionalidade neuronal-astrocítica (18,33). Em resumo, verificamos que a enzima Piruvato Quinase sob a isoforma M2 (PKM2) apresenta papel na modulação de ativação de astrócitos, com evidências da possível participação da via NF-kB; entretanto, mais estudos precisam ser feitos para que seja elucidado o mecanismo pelo qual esse processo ocorre.

## 6. CONCLUSÃO

Avaliada a expressão de *Pkm* em células do SNC em homeostase, observou-se que os grupos de astrócitos eram alguns dos que possuíam maior expressão dessa enzima nessas condições. Em cultura primária de astrócitos, verificou-se que o estímulo inflamatório por TNF induziu a dimerização da PKM2, enquanto o favorecimento da forma dimérica dessa enzima levou à redução da liberação de mediadores inflamatórios, principalmente CXCL1. Notou-se, ainda, que não ocorreu ativação da via paralela à NF- $\kappa$ B, a via da necroptose, após estímulo inflamatório. Verificou-se que a PKM2 em astrócitos exerceu papel protetor no desenvolvimento da EAE, observado pelo *score* clínico alcançado e de desmielinização da medula espinal. Dessa forma, concluiu-se que a PKM2 surge como uma possível proteína na modulação da resposta inflamatória astrocitária.

## REFERÊNCIAS

1. JESSEN, K. R.; RICHARDSON, W. D. **Glial cell development: basic principles and clinical relevance (2nd ed.)**, Oxford: Oxford University Press (2001).
2. IGLESIAS, J.; MORALES, L.; BARRETO, G. E. **Metabolic and Inflammatory Adaptation of Reactive Astrocytes: Role of PPARs**. *Mol Neurobiol* 54, 2518-2538 (2017).
3. RAMON, Y.; CAJAL, S. **Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres**. Paris: A. Maloine (1909).
4. CAHOY, J. D. *et al.* **A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function**. *J. Neurosci.*, v.28, n.1, 264-278 (2008).
5. BATIUK, M. Y. *et al.* **Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution**. *Nat Commun* 11, 1220-1235 (2020).
6. SOFRONIEW, M. V. **Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation**. *Trends Neurosci* 32, 638-647 (2009).
7. DOUGHERTY, J. D. *et al.* **Analytical approaches to RNA profiling data for the identification of genes enriched in specific cells**. *Nucleic Acids Res.* 38, 4218-4230 (2010).
8. MILLS, C. D. *et al.* **M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm**. *J. Immunol.* 164, 6166-6173 (2000).
9. LIDDELOW, S. A. *et al.* **Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia**. *Nature* 541, 481-487 (2017).
10. ZHANG, H. Y. *et al.* **A1 astrocytes contribute to murine depression-like behavior and cognitive dysfunction, which can be alleviated by IL-10 or fluorocitrate treatment**. *J Neuroinflammation* 17, 1-13 (2020).
11. TSACOPOULOS, M.; MAGISTRETTI, P. J. **Metabolic coupling between glia and neurons**. *J. Neurosci.* 16, 877-885 (1996).
12. SIMARD, M.; NEDERGAARD, M. **The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis**. *Neuroscience* 129, 877-896 (2004).
13. ZADOR, Z. *et al.* **Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke**. *Handb Exp Pharmacol* 190, 159-170 (2009).
14. OBARA, M.; SZELIGA, M.; ALBRECHT, J. **Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: facts and hypotheses**. *Neurochem Int* 52, 905-919 (2008).
15. CHARLES, A. C. *et al.* **Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate**. *Neuron* 6, 983-992 (1991).

16. CERRO, S. D. *et al.* **Neuroactive steroids regulate astroglia morphology in hippocampal cultures from adult rats.** *Glia* 14, 65-71 (1995).
17. HALASSA, M. M.; FELLIN, T., HAYDON, P. G. **The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease.** *Trends Mol Med* 13, 54-63 (2007).
18. PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. **Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization.** *Proc. Nat L Acad. Sci. USA* 91, 10625-10629 (1994).
19. CORNELL-BELL, A. H. *et al.* **Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long range glial signaling.** *Science* 247, 470-473 (1990).
20. PEREA, G.; NAVARRETE, M.; ARAQUE, A. **Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information.** *Trends Neurosci* 32, 421-431 (2009).
21. AMRUTHESH, S. C. *et al.* **Metabolism of arachidonic acid to epoxyeicosatrienoic acids, hydroxyeicosatetraenoic acids, and prostaglandins in cultured rat hippocampal astrocytes.** *J Neurochem* 61, 150-159 (1993).
22. NAGASAWA, K. *et al.* **Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells.** *Journal of Cellular Physiology* 208, 123-132 (2006).
23. EZAN, P. *et al.* **Deletion of astroglial connexins weakens the blood-brain barrier.** *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 32, 1457-1467 (2012).
24. ABBOTT, N. J. **Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability.** *J. Anat.* 200, 629-638 (2002).
25. CHI, O. Z.; LIU, X.; WEISS, H. R. **Effects of endothelin-1 on blood-brain barrier permeability during focal cerebral ischemia in rats.** *Exp Brain Res* 141, 1-5 (2001).
26. BIALAS, A. R.; STEVENS, B. **TGF-beta signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement.** *Nat Neurosci* 16, 1773-1782 (2013).
27. FOLEY, J. C.; MCIVER, S. R.; HAYDON, P. G. **Gliotransmission modulates baseline mechanical nociception.** *Mol. Pain* 7, 1-5 (2011).
28. JI, R. R.; DONNELLY, C. R.; NEDERGAARD, M. **Astrocytes in chronic pain and itch.** *Nature Reviews Neuroscience* 20, 667-685 (2019).
29. JI, R. R.; BERTA, T.; NEDERGAARD, M. **Glia and pain: is chronic pain a gliopathy?** *Pain* 154, 10-28 (2013).
30. FARINA, C.; ALOISI, F.; MEINL, E. **Astrocytes are active players in cerebral innate immunity.** *Trends Immunol* 28, 138-145 (2007).
31. MANTHORPE, M.; RUDGE, J. J.; VARON, S. **Astroglial cell contributions to neuronal survival and neuritic growth.** *In Biochem Physiol Pharm Astrocytes.* Orlando, FL, Academic Press 315-376 (1986).
32. TEDESCHI, B.; BARRETT, J. N.; KEANE, R. W. **Astrocytes produce interferon that enhances the expression of H-2 antigens on a subpopulation of brain cells.** *J Cell Biol* 102, 2244-2253 (1986).

33. BUSH, T. G. *et al.* **Leukocyte infiltration, neuronal degeneration and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice.** *Neuron* 23, 297-308 (1999).
34. KIM, H. *et al.* **Reactive astrocytes transduce inflammation in a blood-brain barrier model through a TNF-STAT3 signaling axis and secretion of alpha 1-antichymotrypsin.** *Nat Commun* 13, 1-18 (2022).
35. DITTMANN, L. *et al.* **Energy metabolism of nerve cells during differentiation. O<sub>2</sub> uptake, lactate production and ATP content of chick embryo brain cells before and after cultivation in the Rose chamber.** *Experimental Cell Research* 80, 425-431 (1973a).
36. DITTMANN, L. *et al.* **Respiration by cultivated astrocytes and neurons from the cerebral hemispheres.** *J Neurochem* 21, 191-198 (1973b).
37. ITOH, Y.; ESAKI, T.; SHIMOJI, K. *et al.* **Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo.** *Proc Natl Acad Sci* 100, 4879-4884 (2003).
38. LUNDGAARD, I. *et al.* **Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism.** *Nat Commun* 6, 1-12 (2015).
39. KACEM, K. *et al.* **Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study.** *Glia* 23, 1-10 (1998).
40. DIENEL, G. A. **Brain lactate metabolism: the discoveries and the controversies.** *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 1107-1138 (2012a).
41. SUZUKI, A. *et al.* **Astrocyte-Neuron Lactate Transport Is Required for Long-Term Memory Formation.** *Cell* 144, 810-823 (2011).
42. SHIMIZU, N.; KUMAMOTO, T. **Histochemical studies on the glycogen of the mammalian brain.** *Anat Rec* 114, 479-497 (1952).
43. OE, Y. *et al.* **Glycogen distribution in the microwave-fixed mouse brain reveals heterogeneous astrocytic patterns.** *Glia* 64, 1532-1545 (2016).
44. WENDER, R. *et al.* **Astrocytic Glycogen Influences Axon Function and Survival during Glucose Deprivation in Central White Matter.** *The Journal of Neurosci* 20, 6804-6810 (2000).
45. VAN DEIJK, A. L. *et al.* **Astrocyte lipid metabolism is critical for synapse development and function in vivo.** *Glia* 65, 670-682 (2017).
46. CLARKE, D. D.; SOKOLOFF, L. **Circulation and energy metabolism of the brain.** *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects* (6th ed). Lippincott-Raven; Philadelphia, PA, USA, 637-669 (1999).
47. HERTZ, L.; PENG, L.; DIENEL, G. A. **Energy Metabolism in Astrocytes: High Rate of Oxidative Metabolism and Spatiotemporal Dependence on Glycolysis/Glycogenolysis.** *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 27, 219-249 (2007).

48. NELSON, D.; COX, M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. Sixth Edition, New York: Worth Publishers Inc. (2013).
49. TAKENAKA, M. *et al.* **Isolation and characterization of the human pyruvate kinase M gene**. *Eur. J. Biochem* 198, 101-106 (1991).
50. DOMBRAUCKAS, J. D.; SANTARSIERO, B.D.; MESECAR, A. D. **Structural Basis for Tumor Pyruvate Kinase M2 Allosteric Regulation and Catalysis**. *Biochem* 44, 9417-9429 (2005).
51. IMAMURA, K.; TANAKA, T. **Multimolecular Forms of Pyruvate Kinase From Rat and Other Mammalian Tissues**. *Journal of Chemistry* 71, 1043-1051 (1972).
52. NOGUCHI, T. *et al.* **The L- and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters**. *Journal of Biological Chemistry* 267, 6421-6424 (1987).
53. NOGUCHI, T.; INOUE, H.; TANAKA, T. **The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing**. *Journal of Biological Chemistry* 261, 13807-13812 (1986).
54. NETKZER, R. *et al.* **Cell-cycle associated expression of M2-type isozyme of pyruvate kinase in proliferating rat thymocytes**. *Journal of Biological Chemistry* 267, 6421-6424 (1992).
55. IKEDA, Y.; TANAKA, T.; NOGUCHI, T. **Conversion of non-allosteric pyruvate kinase isozyme into an allosteric enzyme by a single amino acid substitution**. *J. Biol. Chem.* 272, 20495-20501 (1997).
56. YANG, W. *et al.* **ERK1/2-Dependent Phosphorylation and Nuclear Translocation of PKM2 Promotes the Warburg Effect**. *Nat Cell Biol* 14, 1295-1304 (2012).
57. MASON, D. A.; STAGE, D. E.; GOLDFARB, D. S. **Evolution of the Metazoan-Specific Importin a Gene Family**. *J Mol Evol* 68, 351-365 (2009).
58. LUFELI, C.; CAO, X. **Nuclear Import of Pin1 Is Mediated by a Novel Sequence in the Ppiase Domain**. *FEBS Lett* 583, 271-276 (2009).
59. WANG, P. *et al.* **Structural Insight Into Mechanisms for Dynamic Regulation of PKM2**. *Protein Cell* 6, 275-287 (2015).
60. IANSANTE, V.; CHOY, P.; FUNG, S. *et al.* **PARP14 promotes the Warburg effect in hepatocellular carcinoma by inhibiting JNK1-dependent PKM2 phosphorylation and activation**. *Nat Commun* 6, 7882 1-15 (2015).
61. WARBURG, O. **Versuche an überlebendem Carcinomgewebe**. *Biochem Zschr* 142, 317-333 (1923).
62. WARBURG, O.; POSENER, K.; NEGELEIN, E. **Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle**. *Biochem Zschr* 152, 319-344 (1924).
63. HITOSUGI, T. *et al.* **Tyrosine Phosphorylation Inhibits PKM2 to Promote the Warburg Effect and Tumor Growth**. *Sci Signal* 2, 1-9 (2009).



64. LV, L. *et al.* **Mitogenic and Oncogenic Stimulation of K433 Acetylation Promotes PKM2 Protein Kinase Activity and Nuclear Localization.** *Mol Cell* 52, 340-352 (2013).
65. TORRES, C. R.; HART, G. W. **Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc.** *J. Biol. Chem.* 259, 3308-3317 (1984).
66. HOLT, G. D.; HART, G. W. **The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc.** *J. Biol. Chem.* 261, 8049-8057 (1986).
67. WANG, Y. *et al.* **O-GlcNAcylation destabilizes the active tetrameric PKM2 to promote the Warburg effect.** *Proc Natl Acad Sci USA* 114, 13732-13737 (2017)
68. ANASTASIOU, D. *et al.* **Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses.** *Science.* 334, 1278-1283 (2012).
69. DAVIS, P. J.; DAVIS, F. B. **Nongenomic Actions of Thyroid Hormone.** *Thyroid* 6, 497-504 (1996).
70. GUPTA, V. *et al.* **Dominant negative mutations affect oligomerization of human pyruvate kinase M2 isozyme and promote cellular growth and polyploidy.** *J Biol Chem* 285, 16864-16873 (2010).
71. YANG, P. *et al.* **Pyruvate kinase M2 accelerates pro-inflammatory cytokine secretion and cell proliferation induced by lipopolysaccharide in colorectal cancer.** *Cellular Signaling* 27, 1525-1532 (2015).
72. CHANETON, B. *et al.* **Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2.** *Nature* 491, 458-462 (2012).
73. JIANG, J. *et al.* **ML265: A Potent PKM2 Activator Induces Tetramerization and Reduces Tumor Formation and Size in a Mouse Xenograft Model.** In: *Probe Reports From the NIH Molecular Libraries Program Bethesda (MD):National Center for Biotechnology Information (US)* (2010).
74. ANASTASIOU, D. *et al.* **Pyruvate Kinase M2 Activators Promote Tetramer Formation and Suppress Tumorigenesis.** *Nat Chem Biol* 8, 839-847 (2010).
75. CHEN, J. *et al.* **Shikonin and its Analogs Inhibit Cancer Cell Glycolysis by Targeting Tumor Pyruvate Kinase-M2.** *Oncogene* 30, 4297-4306 (2011).
76. NING, X. *et al.* **Discovery of Novel Naphthoquinone Derivatives as Inhibitors of the Tumor Cell Specific M2 Isoform of Pyruvate Kinase.** *Eur J Med Chem* 138, 343-352 (2017).
77. YANG, W. *et al.* **EGFR-induced and PKC $\epsilon$  monoubiquitylation-dependent NF- $\kappa$ B activation upregulates PKM2 expression and promotes tumorigenesis.** *Mol Cell* 48, 771-784 (2012).
78. YANG, W. *et al.* **PKM2 Phosphorylates Histone H3 and Promotes Gene Transcription and Tumorigenesis.** *Cell* 150, 685-696 (2012).

79. SELAK, M. A. *et al.* **Succinate Links TCA Cycle Dysfunction to Oncogenesis by Inhibiting HIF- $\alpha$  Prolyl Hydroxylase.** *Cancer Cell* 7, 77-85 (2005).
80. LUO, W. *et al.* **Pyruvate Kinase M2 Is a PHD3-Stimulated Coactivator for Hypoxia-Inducible Factor 1.** *Cell* 145, 732-744 (2011).
81. AZOITEL, N. *et al.* **PKM2 Promotes Tumor Angiogenesis by Regulating HIF-1 $\alpha$  Through NF- $\kappa$ b Activation.** *Mol Cancer* 15, 1-15 (2016)
82. DEMARIA, M.; POLI, V. **PKM2, STAT3 and HIF-1 $\alpha$ .** *JAK-STAT* 1, 194-196 (2012).
83. GAO, X. *et al.* **Pyruvate Kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase.** *Molecular Cell* 45, 309-322 (2012).
84. VERAS, F. P. *et al.* **Pyruvate kinase M2 mediates IL-17 signaling in keratinocytes driving psoriatic skin inflammation.** *Cell Reports* 41, 1-23 (2022).
85. KONG, Q. *et al.* **HSPA12A Is a Novel Player in Nonalcoholic Steatohepatitis via Promoting Nuclear PKM2- Mediated M1 Macrophage Polarization.** *Diabetes* 68, 361-376 (2019).
86. DHANESHA, N. *et al.* **PKM2 promotes neutrophil activation and cerebral thromboinflammation: therapeutic implications for ischemic stroke.** *Blood* 139, 1234-1245 (2022).
87. DAMASCENO, L. E. A. *et al.* **PKM2 promotes Th17 cell differentiation and autoimmune inflammation by fine-tuning STAT3 activation.** *J. Exp. Med.* 217, 1-16 (2020).
88. LI, X. *et al.* **Microglia PKM2 Mediates Neuroinflammation and Neuron Loss in Mice Epilepsy through the Astrocyte C3-Neuron C3R Signaling Pathway.** *Brain Sci* 13, 1-19 (2023).
89. CHU, F. *et al.* **The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis.** *J Neuroimmunol* 318, 1-7 (2018).
90. BRASIL. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria conjunta nº 1 de 7 de janeiro de 2022. **Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Múltipla.** [https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/protocolos-clinicos-e-diretrizes-terapeuticas-pcdt/arquivos/2022/portal\\_portaria-conjunta-no-1-pcdt\\_esclerose-multipla.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/protocolos-clinicos-e-diretrizes-terapeuticas-pcdt/arquivos/2022/portal_portaria-conjunta-no-1-pcdt_esclerose-multipla.pdf). Acesso em: 20 mar. 2023.
91. GAJOFATTO, A.; BENEDETTI, M. **Treatment strategies for multiple sclerosis: When to start, when to change, when to stop?** *World J. Clin. Cases* 3, 545-555 (2015).
92. DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. **Immunopathology of multiple sclerosis.** *Nat Rev Immunol* 15, 545-58 (2015).
93. LASSMANN, H. **Pathogenic mechanisms associated with different clinical courses of multiple sclerosis.** *Front Immunol* 9, 1-14 (2018).
94. BAILEY, S. L. *et al.* **CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4(+) T(H)-17 cells in relapsing EAE.** *Nat Immunol* 8, 172-180 (2007).

95. KALINCIK, T. **Multiple Sclerosis Relapses: Epidemiology, Outcomes and Management. A Systematic Review.** *Neuroepidemiology* 44, 199-214 (2015).
96. REDER, A; FENG, X. **How type I interferons work in multiple sclerosis and other diseases: Some unexpected mechanisms.** *J. Interf. Cytokine Res.* 34, 589-599 (2014).
97. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Esplanada. **Relatório de Recomendação: Fingolimode no tratamento da esclerose múltipla remitente-recorrente após falha terapêutica com betainterferona ou glatirâmer** (2017).
98. LEIDTKE, W. *et al.* **Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking glial fibrillary acidic protein is characterized by a more severe clinical course and an infiltrative central nervous system lesion.** *Am J Pathol* 152, 251-259 (1998).
99. MENDEL, I.; KERLERO, de R. N.; BEN-NUN, A. **A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor  $Y\beta$  expression of encephalitogenic T cells.** *European Journal of Immunology* 25, 1951-1959 (1995).
100. GOVERMAN, J. *et al.* **Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity.** *Cell.* 72, 551-560 (1993).
101. MCMAHON, E. J. *et al.* **Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis.** *Nat Med* 11, 335-339 (2005).
102. PONATH, G. *et al.* **Myelin phagocytosis by astrocytes after myelin damage promotes lesion pathology.** *Brain* 140, 399-413 (2017).
103. GRETER, M. *et al.* **Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis.** *Nat Med* 11, 328-334 (2005).
104. The Jackson Laboratory. **B6N.FVB-Tg(Aldh111-cre/ERT2)1Khakh/J.** <https://www.jax.org/strain/031008>. Acesso em: 24 mar. 2023.
105. The Jackson Laboratory. **B6;129S-Pkmtm1.1Mgyh/J.** <https://www.jax.org/strain/024048>. Acesso em: 24 mar. 2023.
106. The Jackson Laboratory. **B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J.** <https://www.jax.org/strain/007914>. Acesso em: 01 mai. 2023.
107. BOOHER, J.; SENSENBRENNER, M. **Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures.** *Neurobiology* 2, 97-105 (1972).
108. ROTHHAMMER, V. *et al.* **Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites.** *Nature* 557, 724-728 (2018).
109. WANG, J. *et al.* **Histamine antagonizes tumor necrosis factor (TNF) signaling by stimulating TNF receptor shedding from the cell surface and Golgi storage pool.** *J Biol Chem.* 24, 21751-60 (2003).
110. HERRMANN, J. E. *et al.* **STAT3 is a Critical Regulator of Astroglialosis and Scar Formation after Spinal Cord Injury.** *Journal of Neuroscience* 28, 7231-7243 (2008).

111. ROBB, J. L. *et al.* **The metabolic response to inflammation in astrocytes is regulated by nuclear factor-kappa B signaling.** *Glia*. 68, 2246-2263 (2020).
112. LI, Y. X.; SIBON, O. C. M.; DIJKERS, P. F. **Inhibition of NF- $\kappa$ B in astrocytes is sufficient to delay neurodegeneration induced by proteotoxicity in neurons.** *J Neuroinflammation* 15, 261-278 (2018).
113. PIERCE, J. W. *et al.* **Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo.** *J Biol Chem*. 272, 21096-103 (1997).
114. CENDA, A. *et al.* **SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1.** *FEBS Lett*. 364, 229-33 (1995).
115. DONDELINGER, Y. *et al.* **NF-kappaB-independent role of IKKalpha/IKKbeta in preventing RIPK1 kinase-dependent apoptotic and necroptotic cell death during TNF signaling.** *Mol. Cell* 60, 63-76 (2015).
116. KAISER, W. J. *et al.* **Toll-like Receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3 and MLKL.** *J Biol Chem*. 288, 31268-31279 (2013).
117. WHEELER, M. A. *et al.* **MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation.** *Nature* 578, 593-599 (2020).
118. YU, X.; NAGAI, J.; KHAKH, B. S. **Improved tools to study astrocytes.** *Nat Rev Neurosci* 21, 121-138 (2020).
119. SUN, D. *et al.* **Characterization of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen glucuronidation by human UGT1A4 variants.** *Breast cancer research* 8, 1-11 (2006).
120. FURUTA, A.; ROTHSTEIN, J. D.; MARTIN, L. J. **Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development.** *J. Neurosci*. 17, 8363-8375 (1997).
121. KANTZER, C.G. *et al.* **ACSA-2 and GLAST classify subpopulations of multipotent and glial-restricted cerebellar precursors.** *J Neurosci Res*, 228-2249 (2021).
122. JUNGBLUT, M. *et al.* **Isolation and characterization of living primary astroglial cells using the new GLAST-specific monoclonal antibody ACSA-1.** *Glia* 60, 843-1012 (2012).
123. CHOI, S. S. *et al.* **Human astrocytes: secretome profiles of cytokines and chemokines.** *PLoS One* 9, 1-11 (2014).
124. EUGSTER, H. P. *et al.* **Severity of symptoms and demyelination in MOG-induced EAE depends on TNFR1.** *Eur. J. Immunol* 29, 626-632 (1999).
125. JIN, L. *et al.* **CXCL1 contributes to host defense in polymicrobial sepsis via modulating T cell and neutrophil functions.** *J. Immunol*. 193, 3549-3558 (2014).
126. SOZZANI, S. *et al.* **Receptor-activated calcium influx in human monocytes exposed to monocyte chemoattractant protein-1 and related cytokines.** *J Immunol* 150, 1544-1553 (1993).

127. HUANG, L.; YU, Z.; ZHANG, Z. *et al.* **Interaction with Pyruvate Kinase M2 Destabilizes Tristetraprolin by Proteasome Degradation and Regulates Cell Proliferation in Breast Cancer.** *Sci Rep* 6, 1-11 (2016).
128. FENG, J. *et al.* **PKM2 gene regulates the behavior of pancreatic cancer cells via mitogen-activated protein kinase pathways.** *Mol Med Rep* 11, 2111-2117 (2015).
129. SIMON, M. M. *et al.* **A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains.** *Genome Biol.* 14, 1-22 (2013).
130. The Jackson Laboratory. **B6-Cg-Tg(GFAP-cre/ERT2)505Fmv/J.**  
<https://www.jax.org/strain/012849>. Acesso em: 24 mar. 2023.
131. HASSELMANN, J. P. C. *et al.* **Consistent induction of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice for the longitudinal study of pathology and repair.** *J Neurosci Methods* 284, 71-84 (2017).
132. BOLLIG, A. *et al.* **Regulation of intracellular calcium release and PP1 $\alpha$  in a mechanism for 4-hydroxytamoxifen-induced cytotoxicity.** *Mol Cell Biochem* 305, 45-54 (2007).

# ANEXO I - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto



São Paulo, 26 de Setembro de 2022

Ilmo(a)  
Dr(a). **Thiago Mattar Cunha**

Certificamos que a proposta intitulada "**Papel da enzima Piruvato Quinase M2 (PKM2) em astrócitos em condições neuroinflamatórias**", registrada com o nº **1103/2022**, sob a responsabilidade de **Thiago Mattar Cunha**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do/a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em reunião realizada em 26 de Setembro de 2022.

Vigência da Autorização: 14/10/2022 a 14/10/2024						
Finalidade	Pesquisa					
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Quantidade		
				M	F	M+F
Camundongo transgênico	Aldh1creER	8 semanas	20.0 g	0	108	108
Origem: biotério - Centro de Criação de Camundongos Especiais				<b>TOTAL</b>		108

Vigência da Autorização: 14/10/2022 a 14/10/2024						
Finalidade	Pesquisa					
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Quantidade		
				M	F	M+F
Camundongo	C57BL/6	8 semanas	20.0 g	0	90	90
Camundongo	C57BL/6	1 dias	2.0 g	200	205	405
Origem: biotério - Instalação Animal da Prefeitura da USP do Campus de Ribeirão Preto				<b>TOTAL</b>		495

Vigência da Autorização: 14/10/2022 a 14/10/2024						
Finalidade	Pesquisa					
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Quantidade		
				M	F	M+F
Camundongo transgênico	Aldh1creERPkm2fl	8 semanas	20.0 g	0	108	108
Origem: biotério - Centro de Criação de Camundongos Especiais II				<b>TOTAL</b>		108

Atenciosamente,

*Thiago Mattar Cunha*



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto



Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes  
Coordenador/a da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa

*Alceu Afonso Jordão Júnior*

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior  
Vice-Coordenador/a da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa