

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
CURSO DE CIENCIAS BIOMEDICAS**

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR DE SUCCINATO GPR91  
NA PATOGÊNESE DA PSORÍASE EXPERIMENTAL**

**ALUNA: THAINÁ NORBIATO SILVA**

**RIBEIRÃO PRETO, SP  
2018**

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR DE SUCCINATO GPR91  
NA PATOGÊNESE DA PSORÍASE EXPERIMENTAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Ciências Biomédicas, Ênfase em Ciências Básicas em Saúde, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

**Aluna:** Thainá Norbiato Silva

**Orientador:** Prof Dr José Carlos Farias Alves Filho

**Co-orientador:** Dr Flávio Protásio Veras

RIBEIRÃO PRETO, SP  
2018

## AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo suporte incondicional e indispensável, em especial à minha irmã e parceira de vida Beatriz, e minha irmã de coração Fernanda.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto, por todo o compartilhamento de experiências e aprendizados nos altos e baixos ao longo da graduação.

Ao meu co-orientador e amigo Dr. Flávio Protásio, por ter me guiado e me ensinado muito além de protocolos e técnicas de laboratório.

Aos meus colegas do Laboratório de Inflamação e Dor, em especial o “Time Psoríase”, pelas discussões científicas e vivências compartilhadas. Bem como o corpo técnico do Laboratório, por nos auxiliar e contribuir na minha formação profissional.

Ao corpo docente do curso de Ciências Biomédicas e todos os professores que me servem de inspiração e que tive o privilégio de compartilhar a sala de aula, por serem peças ativas na minha formação como cientista.

Ao meu orientador, Prof Dr José Carlos Alves Filho, por ter me aceitado como sua aluna, por ser um exemplo de profissional e por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho.

Aos professores Dr Fernando de Queiroz Cunha e Dr Thiago Mattar Cunha, por compartilhar os recursos do Laboratório e auxiliar em suas especialidades no cotidiano científico.

A FAPESP e o Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias (CRID), pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho (2017/16179-0).

## RESUMO

Psoríase (Pso) é uma doença inflamatória da pele que afeta 2-5% da população mundial, caracterizada pela hiperproliferação e maturação precoce de queratinócitos (KC). Estudos prévios apresentam a participação do sistema imune na doença, entretanto, os mecanismos da patogênese de Pso ainda não são completamente elucidados. Succinato é um intermediário metabólico do ciclo de Krebs; no sistema imune, o receptor de succinato GPR91 é expresso principalmente por células dendríticas (DCs) e sua ativação promove a migração e produção de citocinas nestas células. O objetivo deste estudo é a investigação da participação do receptor GPR91 na patogênese de psoríase. Para investigar os efeitos do receptor, camundongos foram submetidos ao modelo experimental de psoríase induzida por imiquimode. Nossos dados iniciais adquiridos por imunofluorescência e PCR quantitativo mostraram que após o protocolo experimental, animais WT passaram a expressar GPR91 na pele lesionada. Notavelmente, após a indução de psoríase, observamos grande redução da inflamação da pele, redução de características histopatológicas da psoríase através de histologia com coloração H&E, menor ativação de KC determinada pela menor expressão de marcadores como LCN-2 e Ki67, e redução da concentração tecidual de citocinas pró-inflamatórias na pele de camundongos GPR91<sup>-/-</sup>. Em adição, os animais nocautes apresentaram menor frequência de DCs CD11c<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> na pele e nos linfonodos, bem como menor frequência de células T (CD4<sup>+</sup> e  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>) produtoras de IL-17 nos linfonodos, através de estudos de citometria de fluxo. Finalmente, encontramos redução nos níveis de citocinas do eixo IL-23/IL-17 na pele dos animais GPR91<sup>-/-</sup> em nível de RNA mensageiro e proteína. Em conclusão, nossos dados sugerem que o receptor GPR91 é importante para o desenvolvimento de psoríase experimental através da ativação de DCs e, conseqüentemente, da diferenciação de células T produtoras de IL-17.

**Palavras chave:** Psoríase; células dendríticas; succinato; eixo IL-23/IL-17.

## ABSTRACT

Psoriasis (Pso) is an inflammatory disease of the skin, characterized by accelerated proliferation and early maturation of keratinocytes (KC). Prior studies suggest the participation of the immune system in the disease, however, the mechanisms of Pso pathogenesis remain unclear. Succinate is a metabolic intermediate of the citric acid cycle; in the immune system, the succinate receptor GPR91 is mainly expressed by dendritic cells (DCs) and its activation promotes cell migration and cytokine production. The aim of this study is to investigate the role of GPR91 in the pathogenesis of Pso. Therefore, mice were submitted to the experimental model of imiquimod-induced psoriasis. After Pso induction, we found increased expression of GPR91 in lesioned skin of WT mice, by performing immunofluorescence assay and quantitative PCR. Notably, we observed strong reduction of skin inflammation score, reduction of histopathological features of Pso by H&E staining, decreased KC activation observed by the reduction of LCN-2 and Ki67, reduced pro-inflammatory cytokine level in the tissue of GPR91<sup>-/-</sup> mice. Moreover, knock-out mice showed reduction of CD11c<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> DCs in skin and lymph nodes, as well as decreased frequency of IL-17-producing T cells and  $\gamma\delta$ -T cells in the lymph nodes, performed by flow cytometry. Finally, we found reduced levels of mRNA and protein of both cytokines of the IL-23/IL-17 axis in the skin of GPR91<sup>-/-</sup> mice. Taken together, our results suggest that GPR91 receptor is important to development of experimental psoriasis by enhancing DCs activation and therefore the differentiation of IL-17 producing T cells.

**Key words:** Psoriasis; dendritic cells; succinate; IL-23/IL17 axis.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Análise da expressão de GPR91 após psoríase experimental.

**Figura 2.** Manifestações clínicas da psoríase em camundongos.

**Figura 3.** Alterações histológicas do modelo de psoríase;

**Figura 4.** Parâmetros de ativação de queratinócitos após o modelo de psoríase.

**Figura 5.** Concentração tecidual de citocinas em animais submetidos ao modelo de psoríase experimental.

**Figura 6.** Localização de células dendríticas em camundongos tratados com IMQ.

**Figura 7.** Análise da frequência de DC na pele e linfonodo de animais submetidos ao modelo de psoríase.

**Figura 8.** Análise da população de células T produtoras de IL-17.

**Figura 9.** Avaliação do eixo IL-23/IL-17 na psoríase experimental.

## LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA: DNA complementar

DC: célula dendrítica

DDC: célula dendrítica dermal

DLN: linfonodo drenante

ELISA: ensaio imuno-absorção enzimática

GPCR: receptor acoplado a proteína G

GPP: psoríase pustular generalizada

GPR91: receptor acoplado a proteína G 91

HLA: antígeno leucocitário humano

iDC: célula dendrítica imatura

IFN: interferon

IL: interleucina

IMQ: imiquimode

KC: queratinócito

LCN: lipocalina

mRNA: RNA mensageiro

PASI: índice de área e severidade de psoríase

PsA: artrite psoriásica

Pso: psoríase

Scn: succinato

SDH: succinato desidrogenase

TNF: fator de necrose tumoral

WT: *wild-type*

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. Psoríase**

### **1.1.1. Aspectos gerais e epidemiológicos**

Psoríase (Pso) é uma doença inflamatória crônica da pele com um espectro de fenótipos clínicos, e resultado de diferentes interações entre fatores genéticos, ambientais e imunológicos [1]. A doença é caracterizada pela inflamação da pele, com formação de placas e constante descamação da lesão, como resultado da hiperproliferação de queratinócitos (KC) [2]. Características histológicas comuns incluem acantose (espessamento da camada espinhosa da epiderme), papilomatose (projeções irregulares da derme), paraqueratose (presença de células nucleadas na camada córnea), hipogranulose (ausência da camada granulosa) e infiltrado inflamatório na derme e epiderme [3]. A hiperproliferação e maturação precoce de KCs é responsável por tais manifestações clínicas: enquanto o tempo de maturação fisiológico do KC é de 28 a 30 dias, durante a Pso um KC pode levar apenas 5 dias para se mover da camada basal para a camada córnea da epiderme [3].

Afetando de 2 a 4% da população mundial, a prevalência de Pso pode ser influenciada por idade, fatores geográficos e sexo. A prevalência é mais alta em adultos: a doença se distribui de forma bimodal na população, uma vez que há um pico de prevalência nas idades de 30 a 39 anos, e outro após os 60 anos de idade [4]. Apesar de afetar pacientes mundialmente, foi observado menor número de pacientes em países tropicais [5]. A doença é distribuída de forma equivalente entre os gêneros, contudo, dados mostram que pacientes com menos de 18 anos de idade são predominantemente mulheres, enquanto homens compõem a maioria dos pacientes com mais de 18 anos [6].

A doença possui não apenas um fenótipo, podendo se manifestar de forma distinta nos pacientes. A psoríase em placa é a forma mais comum da doença, afetando de 85 a



90% dos pacientes, e é caracterizada pela presença de placas irregulares, avermelhadas e bem definidas, usualmente com descamação da superfície e com dimensões variáveis [7]; a classificação da psoríase em placa pode variar de acordo com a localização das lesões, a idade de início da doença e sua atividade [8]. Na psoríase gutata, as lesões são predominantemente menores - em formato de gota - e se distribuem pelo tronco e membros superiores; geralmente esta forma da doença ocorre em decorrência de infecção por bactérias *Streptococcus* [8]. As formas mais raras e mais agressivas da doença são a psoríase pustular generalizada (GPP), que pode vir acompanhada de inflamação generalizada e aumento de contagem de neutrófilos no sangue [7]; e a forma eritrodérmica, que é caracterizada por eritema difuso envolvendo cerca de 75% da pele do paciente, resultando em edema, mialgia e febre [9].

Por ser uma doença de múltiplos fenótipos, o tratamento varia de acordo com o tipo e severidade do caso de cada paciente. Assim como outras doenças imunomediadas, não há cura para a psoríase, e os tratamentos são geralmente direcionados à diminuição dos sinais e sintomas. O metotrexato, um fármaco imunossupressor e citostático, é geralmente a primeira escolha de tratamento. A fototerapia UVB/UVA e o uso de análogos de vitamina D são restringidos a casos brandos e moderados [1]. Nas últimas décadas, estudos direcionados a descoberta de possíveis alvos terapêuticos do sistema imune levaram ao desenvolvimento de imunoterápicos promissores: o alefacept, que se liga à molécula de adesão CD2 de linfócitos T ativados, reduziu pela metade o score clínico de 50% dos pacientes, de acordo com o PASI (Índice de Severidade e Área da Psoríase) [19]. O bloqueio da sinalização de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) com o uso de etanercept se mostrou eficaz, ao reduzir em 75% o PASI de metade dos pacientes [20]. Ensaio clínico mostraram que antagonismo do receptor de interleucina IL-17 (broda-

lumab) ou anticorpos desenhados diretamente à citocina IL-17A (secukinumab) reduziram em 90% o PASI de metade dos pacientes [21].

Estudos recentes sugerem ligação de Pso com diversas comorbidades: artrite psoriásica, obesidade [10,11], síndrome metabólica [12], disfunção erétil [13] e fatores de risco para doenças cardiovasculares [14]. Em adição, a qualidade de vida de tais pacientes pode diminuir em decorrência de fatores psicossociais relacionados à estética das lesões na pele, em especial na região genital [15], bem como dor associada à doença [16], distúrbios psicológicos como depressão, alexitimia, abuso de álcool e ansiedade [17] e suicidalidade [18].

### **1.1.2. Etiologia da psoríase:**

#### **1.1.2.1. Fatores genéticos e ambientais:**

Há constante investigação acerca de elucidar possíveis polimorfismos e biomarcadores característicos de psoríase. Estudos sugerem possíveis loci de susceptibilidade para o desenvolvimento de Pso, nos cromossomos 1q21, 3q21, 4q, 7p, 8, 11, 16q, 17q e 20p [22]. No locus 17q em especial, o gene SLC9A3R1, cuja variante é relativamente frequente na população, pode ser um fator de predisposição à Pso, uma vez que participa na formação da sinapse imune [23]. Além disso, a presença do antígeno leucocitário humano (HLA)-Cw0602 foi encontrada em aproximadamente 50% dos pacientes [24].

Apesar dos fatores genéticos de susceptibilidade serem consistentes, os estudos sugerem que o surgimento ou agravamento da doença são diretamente relacionados com estímulos ambientais ou fatores de risco que afetam a homeostasia da pele. A infecção por bactérias do gênero *Streptococcus* [25], características do estilo de vida, como estresse, tabagismo e alcoolismo [26], e terapias direcionadas ao sistema imunológico, como o uso de interferons (IFNs) [27] estão relacionadas com a ocorrência de Pso.

### 1.1.2.2. Fatores imunológicos

Muito foi questionado acerca da população celular responsável pela patogênese da psoríase, em especial determinar se a doença é iniciada por ação de queratinócitos (KC) ou leucócitos. Estudos evidenciaram a importante contribuição do sistema imune para a instalação da Pso. Em primeiro momento, na década de 1970, o tratamento com ciclosporina A, agente derivado de fungos do gênero *Tolypocladium* com ação imunossupressora, se mostrou eficaz contra a Pso [28]. Anos mais tarde na década de 1990, o tratamento com anticorpo anti-CD4 também gerou resultados positivos [29]. Em adição, estudos mostraram melhora nas lesões psoriásicas após o recebimento de células tronco hematopoiéticas de um indivíduo saudável [30]; de forma complementar, se tal indivíduo recebe transplante de medula óssea de um paciente com psoríase, há o aparecimento de lesões [31,32].

Após décadas de estudo, é consenso na comunidade científica que uma ativação do sistema imune, conhecida como fase de sensibilização, ocorre por mediação de células dendríticas (DC), que promovem a ativação de linfócitos T efetores e linfócitos T de memória; a migração de células efetoras para a pele, a liberação de citocinas inflamatórias e geração de lesões caracteriza a fase efetora da doença [32]. A presença de linfócitos e outras células recrutadas, como macrófagos e neutrófilos, afeta a homeostasia do microambiente da epiderme, culminando na hiperproliferação de KC.

Um mecanismo de iniciação da doença bem caracterizado envolve a liberação de peptídeo microbiano LL-37 após infecções de pele; LL-37 pode se ligar a fragmentos de DNA ou RNA próprios, formando um complexo com capacidade de ativar TLR7 e TLR9. DC plasmocitoides são ativadas pelo complexo [33], podendo se tornar ativas e proliferarem, bem como promover a ativação de DC dermais (DDC).

DDCs compõem um subtipo celular de particular importância na patogênese da Pso. São observados aumentos de até 10 vezes no número de DDCs na pele lesionada de pacientes, quando comparada com pele não-lesionada do mesmo indivíduo; e aumento de até 30 vezes, quando comparada com pele de indivíduos saudáveis [34]. Na pele, tais células são responsáveis pela produção de citocinas importantes para a manutenção da doença, como IL-23 e TNF [32]. O tratamento de pacientes com bloqueador da sinalização de TNF gerou melhora no quadro clínico [35], bem como o tratamento com bloqueadores da sinalização de IL-23 [36].

Outro mecanismo importante para a patogênese da Pso desempenhado pelas DDC é a ativação de células linfoides. Uma vez ativadas na pele, DDCs migram para os linfonodos, onde a secreção de IL-23 promove a polarização de linfócitos para um perfil Th17. O eixo IL-23/IL-17 atualmente é tido como central no desenvolvimento da doença, e o padrão de resposta adaptativa no contexto de Pso já é classificados como Th17 [37,38].

Uma vez diferenciados, os linfócitos Th17 migram para o tecido: estudos clínicos mostram a presença de linfócitos Th17 no sangue e infiltrados na derme [39]. Linfócitos T- $\gamma\delta$  também estão presentes na derme e são importante fonte de IL-17 [40]. A citocina IL-17 possui grande papel na fase efetora da doença [41], uma vez que realiza a ponte entre o sistema imunológico e epitelial: KCs respondem à IL-17 se tornando ativos, proliferando e produzindo mediadores como CXCL5, que promove o recrutamento de neutrófilos ao local, e antimicrobianos como os peptídeos da família s100 [42].

## **1.2. RECEPTOR GPR91**

### **1.2.1. O ligante succinato:**

O succinato (Scn) é um pequeno ácido de dois carbonos que integra o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, também conhecido como ciclo de Krebs. Scn é produzido na matriz mitocondrial, a partir de succinil-CoA pela ação da enzima succinil-CoA sintase. Uma vez formado, Scn passa a ser substrato para a enzima succinato desidrogenase (SDH), que produz fumarato para a continuação do ciclo de Krebs, e libera um elétron que percorre a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Além disso, a formação de Scn pode resultar do metabolismo de aminoácidos glicogênicos como isoleucina, treonina, metionina e valina [43].

### **1.2.2. Descoberta do receptor:**

Receptores acoplados à proteína G (GPCR) representam a maior família de receptores transmembrana e são responsáveis pela transmissão de sinal de uma variedade de mediadores químicos, como hormônios, peptídeos e citocinas.

Até 2004, o receptor GPR91 era considerado um receptor órfão, uma vez que seu ligante não havia sido identificado. He e colaboradores então apresentaram, a partir de experimentos de cromatografia de alta eficiência, que o succinato era responsável pelo aumento da concentração intracelular de cálcio, através da produção de inositol trifosfato no citosol [44]. De forma complementar, experimentos seguintes mostraram que nenhum outro intermediário do ciclo de Krebs, bem como nenhum outro dos 800 ligantes de GPCRs previamente conhecidos, era capaz de se ligar a GPR91, mostrando o succinato como seu ligante seletivo [44]. Dessa forma, além de suas funções metabólicas, foi mostrada a atividade do succinato como molécula sinalizadora, através de seu receptor GPR91.

Desde sua identificação, pesquisadores buscam elucidar os papéis fisiológicos da interação succinato-GPR91, e sua participação em doenças. Em primeiro momento, He e colaboradores mostraram que GPR91 era altamente expresso em fígado e rins; levemente expresso em baço, intestino delgado e útero; e nenhuma expressão em coração, timo, linfonodos e encéfalo foi identificada [44]. Nos anos seguintes, estudos demonstraram participação do GPR91 em diversos fenômenos: em liberação de renina em células renais [45], inibição da lipólise em adipócitos [46], angiogênese da retina [47], e proliferação de eritróides e megacariócitos [48].

### **1.2.3. GPR91 no sistema imune:**

Apesar dos estudos da interação succinato-GPR91 em diversos sistemas, pouco foi estudado no contexto do sistema imune. Em 2008, estudo de Rubic e colaboradores apresentaram um perfil de expressão de GPR91 em leucócitos: células dendríticas imaturas (iDC) são o subtipo celular que mais expressa o receptor; macrófagos apresentam expressão baixa; enquanto em linfócitos B e T, neutrófilos e monócitos a expressão não foi detectada [49].

Mecanicamente, o mesmo estudo sugeriu a função do receptor nas iDC: o succinato promoveu ação quimiotática sobre as células, induziu a produção de citocinas e acentuou a ativação de linfócitos T pelas mesmas [49]. Ainda no contexto imunológico, foi demonstrado que o succinato pode ser classificado como biomarcador para a identificação de artrite reumatoide, a partir de amostras de líquido sinovial [50]; e que a ausência de GPR91 em camundongos atenua o desenvolvimento de modelos experimentais de artrite reumatóide através da menor expansão de linfócitos Th17, apresentando o receptor como um possível alvo terapêutico [51].

## **2. HIPÓTESE**

De acordo com o exposto acima, a atividade do receptor GPR91 em leucócitos, em particular em células dendríticas, pode contribuir para o desenvolvimento de doenças imunomediadas. Em adição, a observação de que tais células participam ativamente na patogênese da psoríase, nos levou a questionar se o receptor teria papel importante no processo. Logo, nossa hipótese é que o receptor GPR91 participa no desenvolvimento da psoríase, contribuindo positivamente para a patogênese da mesma.

### **3. OBJETIVOS**

O objetivo geral do estudo foi avaliar a participação do receptor de succinato GPR91 no desenvolvimento da psoríase experimental.

#### **3.1. Objetivos específicos**

- Analisar a expressão de GPR91 em modelo de psoríase experimental
- Avaliar o impacto da deleção gênica de GPR91 nos parâmetros inflamatórios gerais da psoríase experimental
- Elucidar mecanismos da participação do GPR91 na modulação da resposta inflamatória
- Investigar o papel de GPR91 na resposta imune celular durante o desenvolvimento de psoríase experimental



## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Animais**

Os animais utilizados neste trabalho são camundongos da linhagem C57BL/6, originados do Biotério Central da Universidade de São Paulo Campus Ribeirão Preto. Também foram utilizados camundongos deficientes para o receptor de succinato (GPR91<sup>-/-</sup> ou Scnr<sup>-/-</sup>), com background C57BL/6, provenientes do Biotério de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Todos os experimentos foram realizados em concordância com o Comitê de Ética para Animais de Experimentação (Protocolo 167/2015).

### **4.2. Modelo experimental de psoríase**

Para realizar a psoríase experimental, camundongos de 8 a 10 semanas são tricotomizados na região dorsal com 24 horas de antecedência do início do protocolo. Os animais são submetidos à aplicação tópica de imiquimode 5% em creme (Ixirum®) diariamente. A dose aplicada varia de 60mg no dorso, ou 20mg em cada orelha; e são repetidas diariamente de 3 a 6 dias consecutivos. O local de aplicação e a duração do protocolo variam de acordo com o experimento. A manifestação clínica é monitorada diariamente, analisando e medindo alterações na espessura da pele com auxílio de paquímetro.

Imiquimode (IMQ) é um ligante de TLR7 e TLR8, utilizado atualmente no tratamento de lesões cutâneas causadas por vírus do papiloma humano [52], queratose actínica [53] e carcinoma basocelular superficial [54]. Van der Fits e colaboradores observaram que a aplicação tópica de IMQ em camundongos induz inflamação da pele e lesões semelhantes à de pacientes com psoríase, bem como um infiltrado inflamatório

composto por células T CD4<sup>+</sup> e células dendríticas CD11c<sup>+</sup> [55]. Dessa forma, foi proposto e aceito o modelo experimental para estudo de psoríase em camundongos.

### **4.3. Análise de localização de proteínas de interesse**

A fim de analisar a localização e expressão de proteínas de interesse no tecido dos animais submetidos ao protocolo experimental de psoríase, ao final de 6 dias de protocolo, a pele lesionada do dorso dos animais foi dissecada em uma fração de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>, ou a orelha foi dissecada. As amostras foram fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% por 24 horas e em seguida desidratadas em solução de sacarose 30% por 24 horas. Posteriormente, o tecido foi congelado em meio de ótima temperatura de corte (TissueTek®), seccionado na espessura de 10 µm em criostato, e mantido em -20°C até o uso. As lâminas contendo os cortes foram incubadas em solução de glicina por 30 minutos em temperatura ambiente, a fim de minimizar o background durante a aquisição de imagens. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpos primários produzidos em coelho anti-GPR91 (Invitrogen - Carlsbad, EUA) ou anti-CD11c ou anti-Ki67 (Abcam – Cambridge, EUA) *overnight* a 4°C. Após cinco lavagens de 5 minutos com solução tamponada com fosfato (PBS), foi adicionado o anticorpo secundário anti-coelho conjugado ao fluorocromo AF594 (Abcam), durante um período de incubação de 2 horas em temperatura ambiente em caixa escura. As lâminas foram finalizadas com a adição de meio de montagem Vectashield® contendo DAPI (Vector Laboratories – Burlingame, EUA) para a marcação de ácidos nucleicos. O material foi analisado em microscópio de fluorescência DMI 6000B (Leica Microsystems – Wetzlar, Alemanha), e as imagens foram adquiridas com câmera digital Leica 365 FX (Leica Microsystems).

#### **4.4. Análise da expressão de genes de interesse**

Após o protocolo experimental de psoríase, a pele do dorso dos animais foi dissecada em uma fração de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, e brevemente macerada com auxílio de tesoura. As amostras passaram por um processo de digestão durante 60 minutos a 37°C e com agitação de 300rpm, em meio RPMI (Sigma-Aldrich - St Louis, EUA) contendo 1mg/ml de colagenase tipo II e 4mg/ml de liberase (Sigma-Aldrich). O tecido digerido foi macerado e as células foram separadas com auxílio de *cell strainer* de 100µm. As células foram armazenadas em solução de RLT (Quiagen - Hélder, Alemanha) contendo 10% de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) em -20°C até o uso. Para analisar o perfil de expressão de genes de interesse, foi realizado isolamento de RNA total das amostras de macerado de pele dos animais, utilizando kit de extração RNeasy Mini Kit, de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen). 300ng de RNA total foi utilizado para a síntese do cDNA (DNA complementar) utilizando kit cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems - Foster City, EUA). A reação em cadeia da polimerase para amplificação dos genes de interesse *Il17a*, *Gpr91*, *Il23* e *Lcn2* foi realizada utilizando os respectivos primers específicos (ThermoFisher Scientific – Waltham, EUA) e Sybr Green Gene Expression Assay no equipamento de PCR em tempo real StepOne (ThermoFisher Scientific). Os dados são apresentados de acordo com a expressão relativa aos resultados de animais controle.

#### **4.5. Quantificação de citocinas**

A fim de quantificar os níveis de citocinas no tecido dos animais, a pele foi dissecada e macerada em solução de 300µl de PBS contendo tampão de lise para a extração de proteínas RIPA (Sigma-Aldrich) com auxílio de homogeneizador Polytron PT 2500E (Kinematica - Bohemia, EUA). O macerado foi centrifugado e 50µL do sobrenadante

foi utilizado para o ensaio. A quantificação de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-23 e TNF- $\alpha$  foi realizada utilizando kits comerciais de ensaio de imuno-adsorção enzimática (ELISA), seguindo as instruções do fabricante (R&D Systems - Minneapolis, EUA). As amostras foram reveladas com solução substrato tetrametilbenzidina (TMB) e interrompida com solução de ácido sulfúrico. Os dados foram adquiridos a partir da leitura colorimétrica das amostras a 450nm em leitor de microplacas FlexStation 3 (Molecular Devices - San Jose, EUA).

#### **4.6. Estudo de população de células de interesse**

Após a indução experimental de psoríase, a pele do dorso dos animais foi dissecada em uma fração de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, e digerida no protocolo de digestão mencionado anteriormente. Os linfonodos drenantes da pele (linfonodos inguinais e axilares) foram dissecados, mas não passaram pelo processo de digestão enzimática. Para determinar as populações celulares na pele e nos linfonodos drenantes dos animais, 1x10<sup>6</sup> ou 2x10<sup>6</sup> células obtidas dos tecidos foram plaqueadas em microplacas de 96 poços. A marcação de moléculas de superfície (CD45, CD4, TCR $\gamma\delta$ , CD11c, EpCAM) foi realizada utilizando anticorpos conjugados a fluorocromo (BD Bioscience – San Jose, EUA) por 20 minutos a 25°C. Para a marcação de intracelular da citocina IL-17A, as células foram previamente estimuladas com ionomicina e forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), e a secreção das mesmas foi inibida com inibidor do aparato de Golgi, GolgiStop (BD Bioscience), durante 4 horas a 37°C. Após o estímulo, as células foram fixadas e permeabilizadas com kit BD Cytofix Cytoperm (BD Bioscience), para prosseguir com a marcação com anticorpo conjugado anti-IL-17A (BD Bioscience) por 30 minutos a 25°C. Os dados foram adquiridos em citômetro de fluxo BD FACS Verse (BD Biosci-

ence), e as populações celulares foram analisadas em software FlowJo (FlowJo LLC - Ashland, EUA).

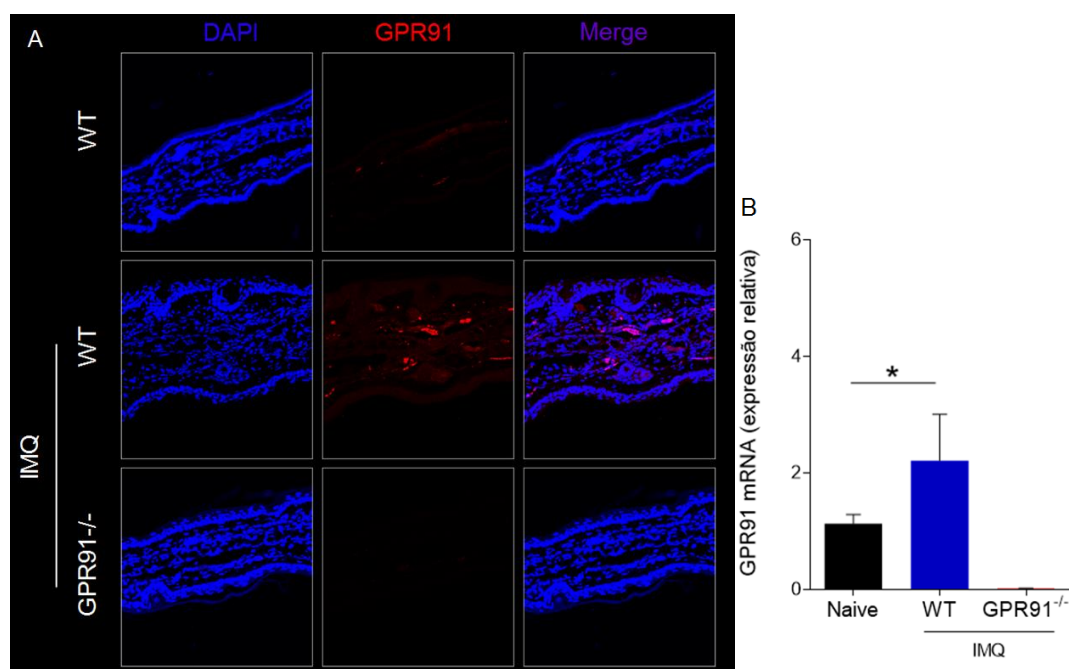
#### **4.7. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada por ANOVA, através do Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni e Teste t não paramétrico com nível de significância estabelecido em 5% (valor de  $p \leq 0,05$ ). A análise estatística e os gráficos foram construídos utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software - San Diego, EUA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Expressão de GPR91 é aumentada em modelo experimental de psoríase

Inicialmente, com o objetivo de avaliar a participação do receptor GPR91 no desenvolvimento da psoríase, camundongos *wild-type* (WT) e deficientes do receptor GPR91 (GPR91<sup>-/-</sup>) foram submetidos ao modelo experimental de psoríase induzida por IMQ, com aplicação de 20mg do composto em cada orelha dos animais pelo período de 6 dias. A expressão de GPR91 foi investigada através das técnicas de imunofluorescência (Figura 1A) e PCR tempo real (Figura 1B). Com este experimento, observamos que o animal controle (Naive) não apresenta expressão de GPR91 na pele. Contudo, após a indução de inflamação na pele, há o aumento da expressão do receptor em animais WT em uma razão de duas vezes; identificamos através de imunofluorescência que a expressão está restringida a região da derme, e não na epiderme; em adição, não foi identificada expressão do receptor nos animais GPR91<sup>-/-</sup>, mesmo após o protocolo experimental.

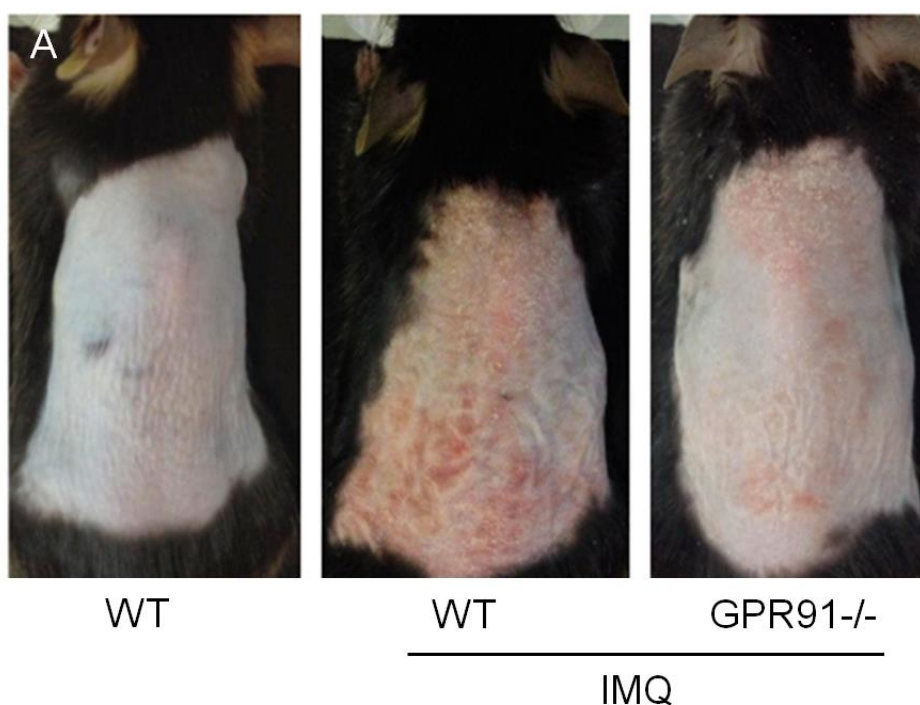


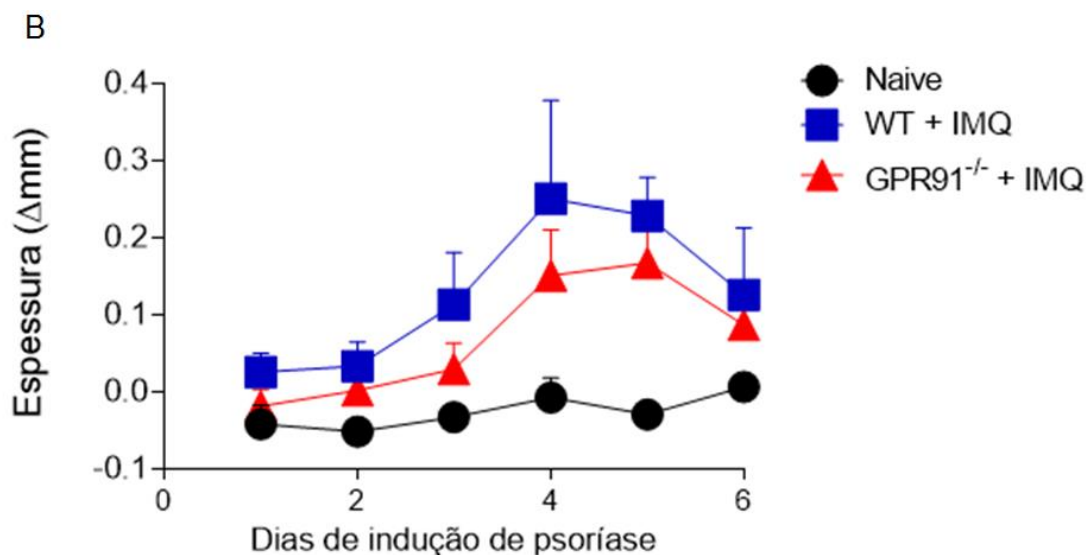
**Figura 1. Análise da expressão de GPR91 após psoríase experimental.** Camundongos WT e GPR91<sup>-/-</sup> foram submetidos ao modelo experimental de psoríase, através da aplicação tópica de IMQ por 6 dias. (A) Cortes da pele da orelha dos animais foram marcados com anticorpo primário

rio anti-GPR91 (vermelho) e DAPI (azul), e as imagens foram adquiridas em aumento de 20x. **(B)** Amostras de pele dos animais foram avaliadas para a expressão gênica de GPR91. Dados representam média  $\pm$  erro padrão ( $n = 5$ ), utilizando análise de variância ANOVA seguido de teste de Bonferroni.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo, e representado por \*.

## 5.2. Deleção gênica de GPR91 atenua o desenvolvimento de psoríase experimental

Considerando o aumento da expressão de GPR91 após a indução de psoríase experimental em animais WT, foi formulada a hipótese de que a deleção gênica do receptor apresentaria efeito protetor frente ao protocolo experimental. Para investigar esta hipótese, camundongos WT e GPR91<sup>-/-</sup> foram submetidos à aplicação de IMQ na região dorsal durante 6 dias. Após o sexto dia de indução, foi observado menor desenvolvimento de placa psoriásica em animais GPR91<sup>-/-</sup>, em comparação com animais WT, um indicativo de menor inflamação na pele (Figura 2A). Além disso, foi realizada a medição diária da espessura da pele dos camundongos, e observamos que o aumento da espessura foi menor em animais GPR91<sup>-/-</sup> quando comparados com animais WT (Figura 2B).



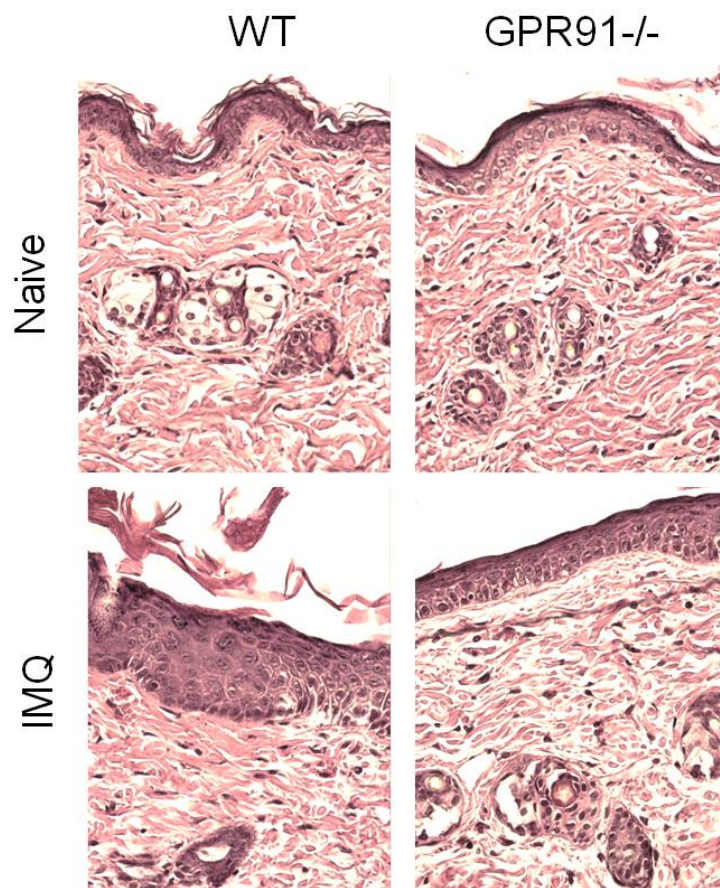


**Figura 2. Manifestações clínicas da psoríase em camundongos.** Animais WT e GPR91<sup>-/-</sup> foram submetidos ao protocolo de psoríase induzida por IMQ por 6 dias consecutivos. (A) A lesão psoriásica foi registrada ao sexto dia de indução, e (B) a espessura da pele foi medida diariamente; gráfico mostra a variação da espessura da pele em comparação ao dia 0 do experimento. Dados representam média  $\pm$  erro padrão (n = 5).

### 5.3. Deficiência de GPR91 atenua parâmetros histopatológicos de psoríase

O estudo de Schön e colaboradores mostra que as alterações microscópicas - incluindo o espessamento da camada córnea, acantose e infiltrado leucocitário na derme - são características de lesões psoriásicas [3]. Desta forma, animais WT e GPR91<sup>-/-</sup> foram submetidos à aplicação de IMQ na região dorsal por 6 dias, com a finalidade de investigar os parâmetros histopatológicos de psoríase através da microscopia óptica com coloração de hematoxilina e eosina. Observamos que animais controle apresentam histologia normal da pele, apresentando de uma a duas camadas de células na epiderme; enquanto os animais submetidos à ação de IMQ (WT e GPR91<sup>-/-</sup>) apresentam aumento do número de camadas de células da epiderme, resultando em maior espessura, bem como em infiltrado de leucócitos na derme. Contudo, é notável que o espessamento da epiderme é mais amplo em animais WT do que em animais GPR91<sup>-/-</sup> (Figura 3).





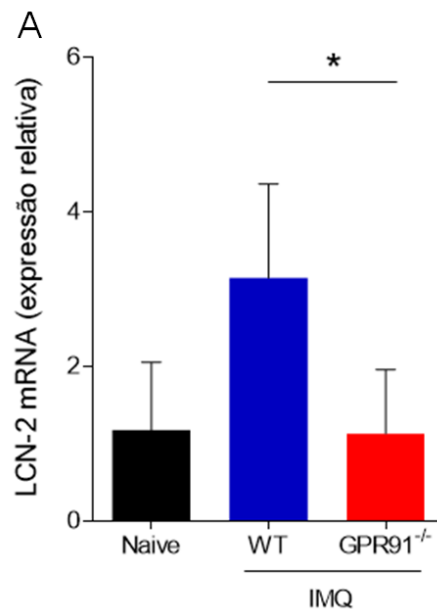
**Figura 3. Alterações histológicas do modelo de psoríase.** Camundongos WT e GPR91<sup>-/-</sup> foram submetidos ao modelo experimental de psoríase, através da aplicação tópica de IMQ por seis dias na região dorsal. Cortes da pele dos animais foram marcados segundo o protocolo de coloração H&E.

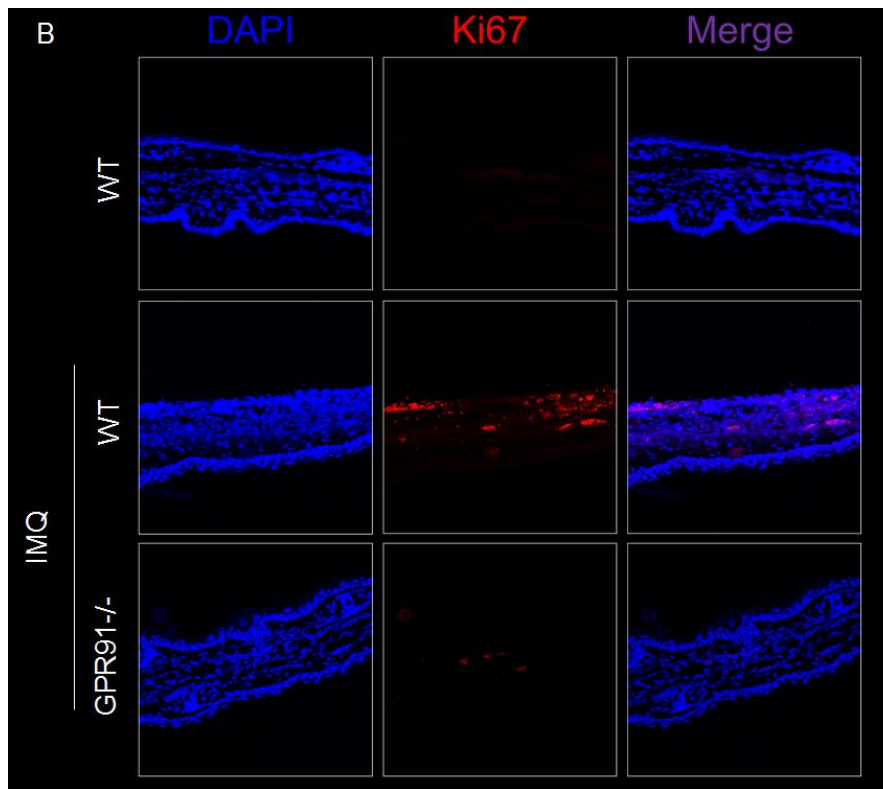
#### **5.4. Animais deficientes de GPR91 apresentam menor ativação e proliferação de queratinócitos**

Em vista do resultado anterior, no qual observamos o aumento da população de queratinócitos e consequente espessamento da epiderme, decidimos avaliar os parâmetros de ativação dos KC. Para tanto, analisamos a expressão gênica de lipocalina (LCN)-2 na pele dos animais após 3 dias de psoríase induzida por IMQ. LCN-2 é uma proteína antimicrobiana, encontrada em níveis elevados no soro de pacientes com psoríase, e altamente expressa em queratinócitos ativados [56]. Como resultado, a LCN-2 se mostrou mais expressa em animais WT, em uma razão de três vezes, quando comparado com

animais GPR91<sup>-/-</sup>, sugerindo que os queratinócitos de animais nocautes estariam em menor estado de ativação (Figura 4A).

Em adição, avaliamos a expressão e localização de Ki67. Trata-se de um marcador de proliferação celular que, segundo recentes estudos, passa a ser expresso por KC devido à ação de linfócitos T obtidos de lesões psoriásicas [57]. Animais WT e GPR91<sup>-/-</sup> foram submetidos ao protocolo de psoríase experimental com a aplicação de IMQ na orelha pelo período de 6 dias; finalizado o experimento, realizamos imunofluorescência nas amostras dos animais. Observamos que não há expressão de Ki67 na pele de animais controle; após o protocolo experimental de psoríase, há aumento na expressão do marcador na pele de animais WT, distribuído pela derme e epiderme; os animais GPR91<sup>-/-</sup> também expressam Ki67, porém em menor amplitude (Figura 4B). Tais resultados apresentam que a deleção gênica de GPR91 impacta a ativação e hiperproliferação de KC no modelo de psoríase experimental.



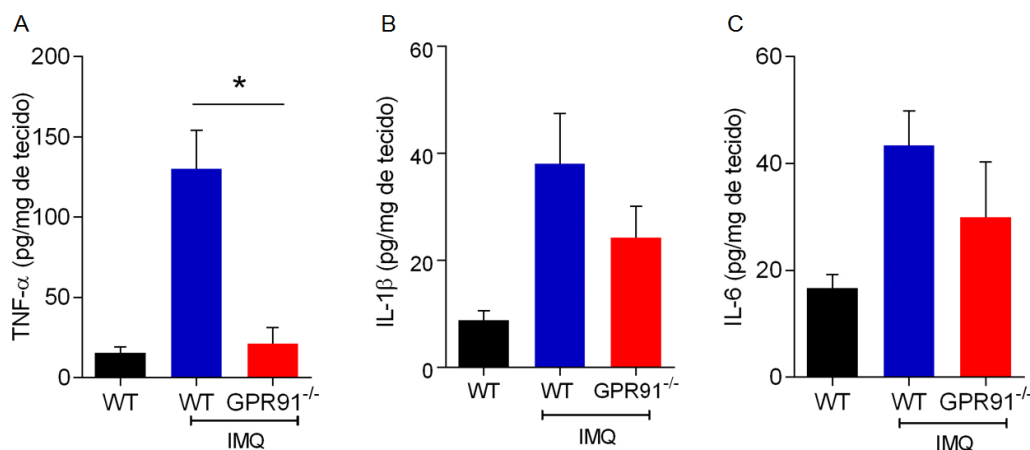


**Figura 4. Parâmetros de ativação de queratinócitos após o modelo de psoríase.** Animais WT e GPR91<sup>-/-</sup> foram submetidos ao protocolo experimental de psoríase. (A) Após 3 dias de indução, a pele dorsal dos animais foi utilizada para a quantificação da expressão de LCN-2. (B) Cortes da pele da orelha dos animais submetidos a 6 dias de modelo experimental foram marcados com anticorpo primário anti-Ki67 (vermelho) e DAPI (azul), e as imagens foram adquiridas em aumento de 20x. Dados representam média ± erro padrão (n = 5), utilizando análise de variância ANOVA seguido de teste de Bonferroni.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo, e representado por \*.

### 5.5. Deficiência de GPR91 afeta a produção de citocinas inflamatórias no contexto de psoríase

Como descrito anteriormente, citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17, dentre outras, são importantes moduladores da resposta imune durante a patogênese da Pso, e o aumento dos níveis de tais mediadores na pele de pacientes é um importante indicativo da inflamação da pele [32]. Dessa forma, nos tornou interessante investigar o perfil de citocinas presentes na pele dos animais. Para tanto, após 6 dias de aplicação diária de IMQ no dorso dos animais, a pele dos camundongos foi dissecada e utilizada para a quantificação dos níveis de citocinas através do ensaio ELISA. Nossos dados

mostram o aumento da concentração de citocinas inflamatórias importantes no desenvolvimento de Pso na pele dos animais após o protocolo experimental. TNF- $\alpha$  mostrou um aumento de seis vezes nos animais WT, enquanto os animais GPR91<sup>-/-</sup> foram protegidos deste efeito (Figura 5A). A concentração tecidual de IL-1 $\beta$  cresceu quatro vezes após a indução de psoríase experimental, porém a deleção gênica de GPR91 aboliu este efeito em aproximadamente metade (Figura 5B). De forma semelhante, a citocina IL-6 se mostrou 2 vezes mais concentrada na pele de animais submetidos à aplicação de IMQ; enquanto na ausência do receptor GPR91, este aumento foi atenuado (Figura 5C).

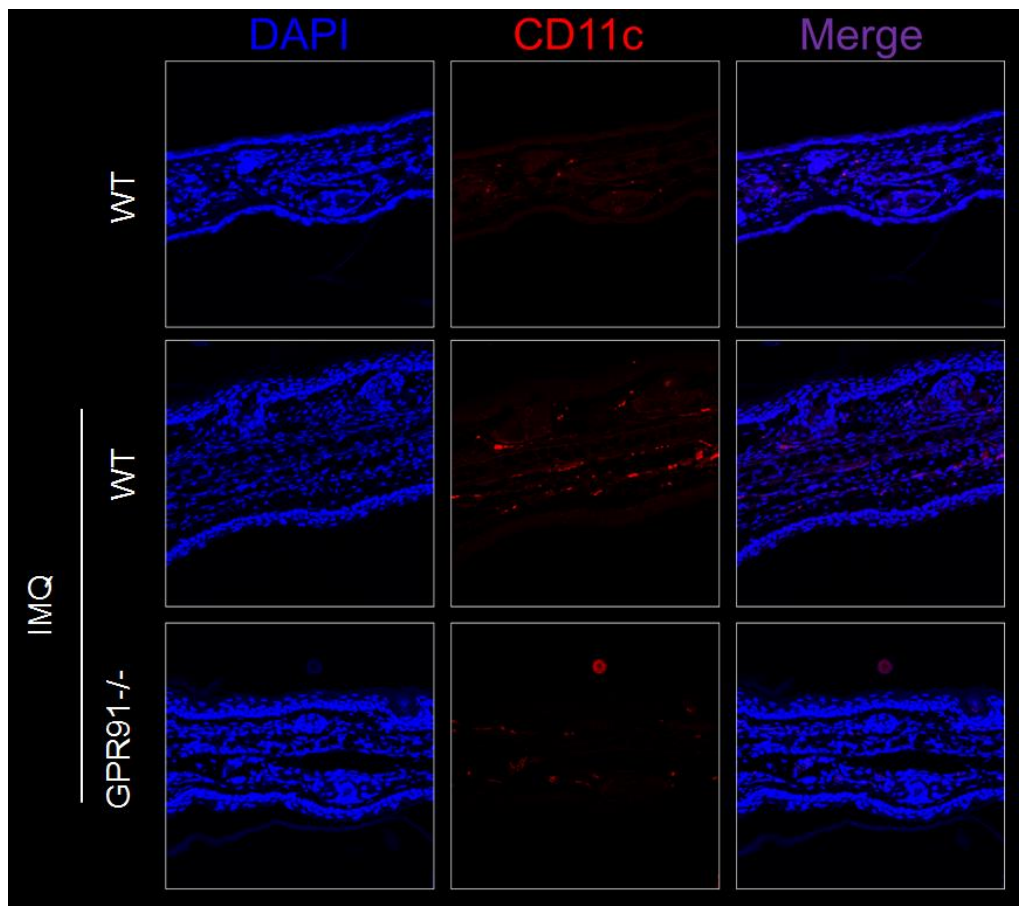


**Figura 5. Concentração tecidual de citocinas em animais submetidos ao modelo de psoríase experimental.** Após a indução de lesão psoriásica através da aplicação de IMQ por 6 dias, pele de camundongos WT e GPR91<sup>-/-</sup> foi utilizada para a dosagem de citocinas (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-1 $\beta$  e (C) IL-6. Dados representam média  $\pm$  erro padrão (n = 4 ou 6), utilizando análise de variância ANOVA seguido de teste de Bonferroni. p < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo, e representado por \*.

## 5.6. Deleção gênica de GPR91 prejudica proliferação de células dendríticas na pele

Células dendríticas são cruciais para o desenvolvimento da psoríase, e seu estado ativado no contexto da doença resulta em sua proliferação e acúmulo na pele [34]. Além

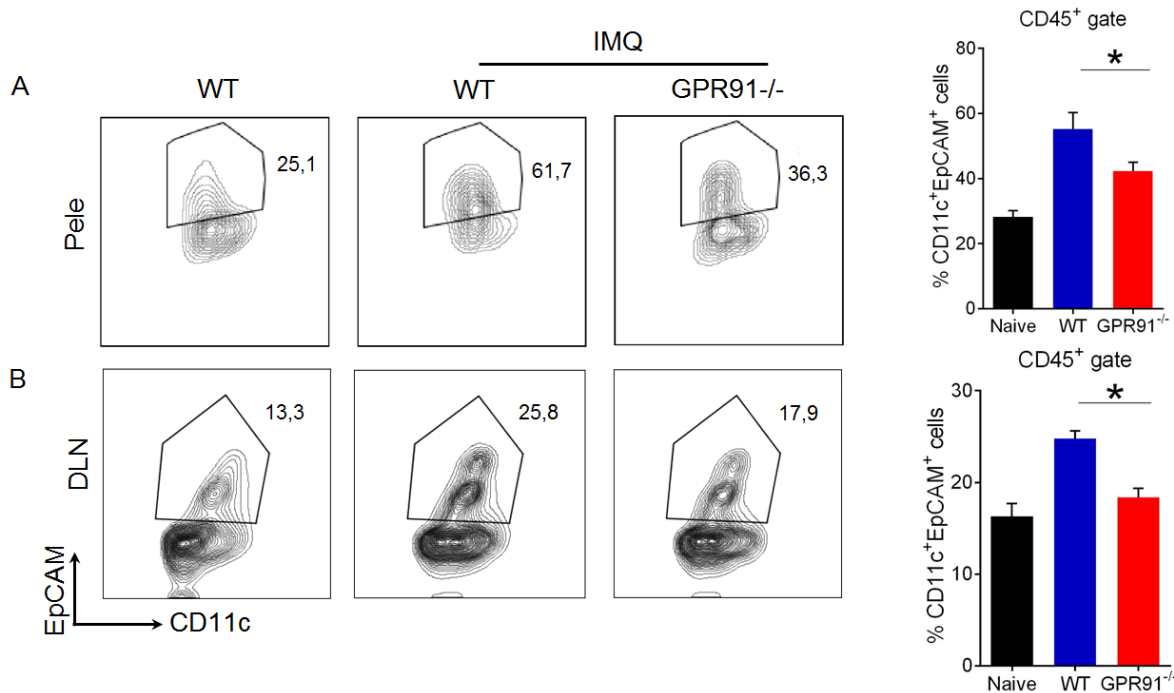
disso, nosso receptor de interesse, GPR91, apresentou seu maior nível de expressão em um subtipo de DC [49]. Neste sentido, nos tornou interessante investigar a presença de DC na pele de animais submetidos ao protocolo experimental de Pso, bem como avaliar o impacto da deleção gênica do receptor GPR91 neste contexto. Desta forma, animais WT e GPR91<sup>-/-</sup> receberam a aplicação de IMQ na orelha, durante 6 dias consecutivos; as amostras foram utilizadas para estudo de imunofluorescência, com marcação para a proteína CD11c, altamente expressa por a vasta maioria de subtipos de DC. Observamos expressão de CD11c em todos os grupos experimentais, sempre na região da derme. Animais controle expressam leves níveis de CD11c, enquanto a expressão em animais submetidos ao IMQ se mostrou mais intensa; animais GPR91<sup>-/-</sup> não responderam ao IMQ com aumento de expressão CD11c na pele (Figura 6).



**Figura 6. Localização de células dendríticas em camundongos tratados com IMQ.** Animais WT e GPR91<sup>-/-</sup> foram submetidos ao protocolo experimental de psoríase com aplicação de IMQ por 6 dias nas orelhas. Cortes da pele da orelha dos animais foram marcados com anticorpo primário anti-CD11c (vermelho) e DAPI (azul), e as imagens foram adquiridas em aumento de 20x.

### **5.7. GPR91 participa na migração de células dendríticas para o linfonodo drenante**

Uma vez que a deleção gênica de GPR91 prejudicou a proliferação de DC na pele, nos tornou interessante investigar o perfil das populações de DC nos dois ambientes onde ocorrem os fenômenos da patogênese da Pso: pele e linfonodos drenantes (DLN), através da técnica de citometria de fluxo. Os animais foram submetidos ao protocolo de Pso experimental, e células da pele (Figura 7A) e de linfonodos (Figura 7B) foram marcadas com anticorpos CD45, CD11c e EpCAM, a fim de se identificar DC originadas da pele. Nossos dados demonstram que o protocolo experimental de psoríase resultou em aumento de 33 e 10 pontos percentuais da população de células CD11c<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> na pele e nos linfonodos drenantes, respectivamente; além disso, a deleção gênica de GPR91 afetou o aumento da porcentagem de tais células em ambos os ambientes, resultando em aumento de apenas 12% na pele e 4% nos linfonodos. Nossos resultados corroboram com dados de Rubic, que sugeriu que a ativação do receptor GPR91 aprimora a capacidade migratória de DC [49].



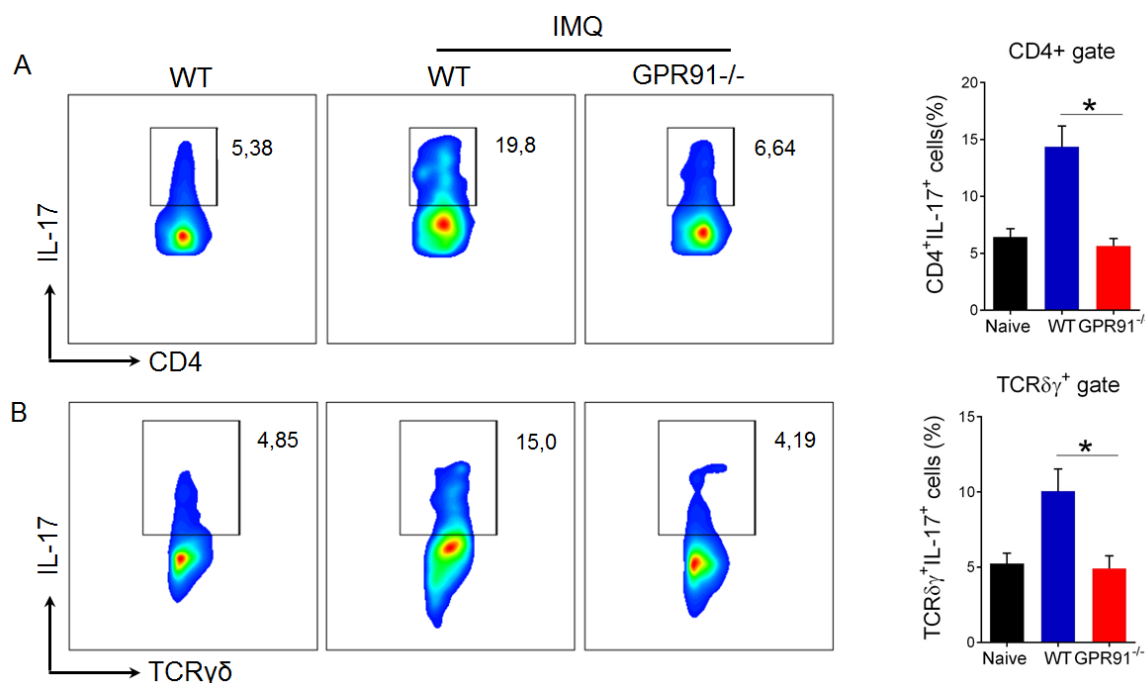
**Figura 7. Análise da frequência de DC na pele e linfonodo de animais submetidos ao modelo de psoríase.** Camundongos WT e GPR91<sup>-/-</sup> foram submetidos ao protocolo de psoríase induzida por IMQ, e (A) pele do dorso e (B) linfonodos drenantes foram coletados ao sexto dia, para análise em citômetro de fluxo. Dados mostram dot-plots representativos e quantificação da porcentagem de células dendríticas EpCAM<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> pré-selecionadas de células CD45<sup>+</sup>. Dados representam média ± SEM (n = 5), utilizando análise de variância ANOVA seguido de teste de Bonferroni. p < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo, e representado por \*.

### 5.8. Deficiência de GPR91 atenua a expansão de células produtoras de IL-17

Estudos mostram que pacientes apresentam níveis elevados de células Th17 circulantes no sangue, bem como no foco da lesão psoriásica [39]. Além disso, linfócitos do tipo T- $\gamma\delta$  são importante fonte de IL-17 na pele [40]. Desse modo, decidimos avaliar a frequência de células CD4<sup>+</sup> (Figura 8A) e TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> (Figura 8B) produtoras de IL-17 nos animais submetidos à psoríase experimental. Após o protocolo experimental, as células de DLN dos animais foram marcadas com os respectivos anticorpos e analisados em citômetro de fluxo. Observamos maior frequência de células produtoras de IL-17 (CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> e TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>) após a indução de inflamação de pele; como esperado, a ausência de GPR91 atenuou a expansão de ambos os tipos celulares no ambiente linfóide.



de. Com isso, nossos dados sugerem que o receptor possui papel na diferenciação e/ou ativação de células T produtoras de IL-17.



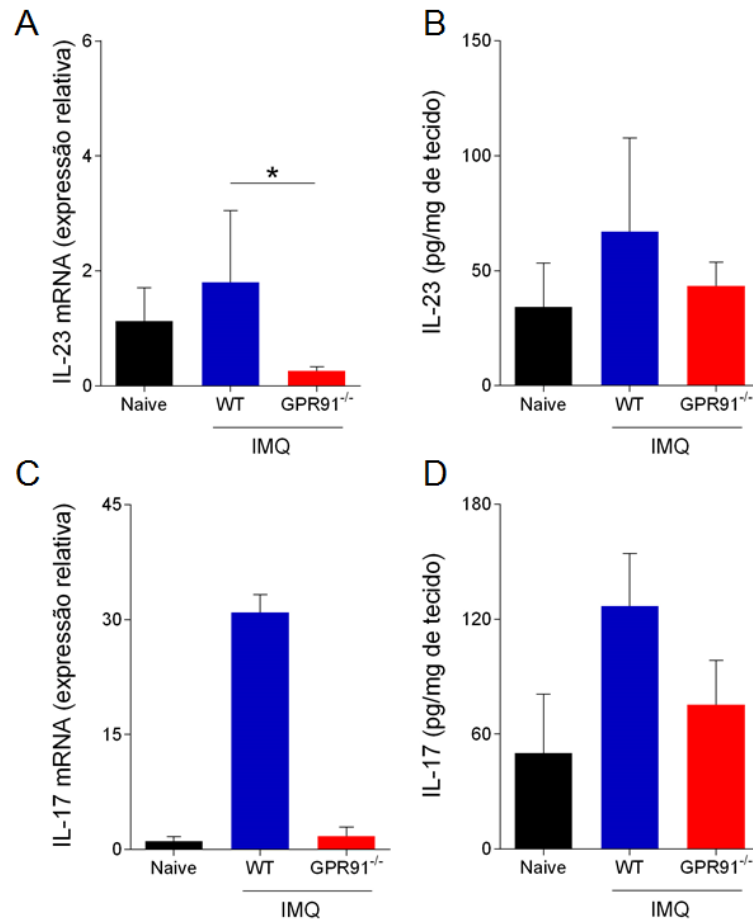
**Figura 8. Análise da população de células T produtoras de IL-17.** Camundongos WT e GPR91<sup>-/-</sup> foram submetidos ao protocolo de psoríase induzida por IMQ; ao sexto dia, DLN foram coletados, e células foram analisadas através de citometria de fluxo. Dados mostram dot-plots representativos e quantificação da porcentagem de (A) linfócitos CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> e (B) TCRγδ<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>. Dados representam média ± SEM (n = 5), utilizando análise de variância ANOVA seguido de teste de Bonferroni. p < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo, e representado por \*.

### 5.9. Deficiência de GPR91 prejudica o eixo IL-23/IL-17

O eixo de sinalização mediado pela liberação de IL-23 por DC para a polarização de linfócitos a um perfil inflamatório com produção de IL-17 possui importante papel na manutenção da fase efetora da psoríase [38]. Nesse sentido, decidimos avaliar os níveis de expressão gênica e concentração tecidual de ambas citocinas no contexto da doença. Observamos primeiramente pequena alteração em nível de mRNA da expressão de IL-23 após a indução de Pso (Figura 9A); enquanto a diferença de níveis proteicos foi de quase duas vezes entre os animais WT, os animais GPR91<sup>-/-</sup> foram protegidos do aumento desta concentração (Figura 9B). Conseqüentemente, a transcrição do gene de IL-



17 foi aumentada em quase 30 vezes após o protocolo, efeito que foi impedido na ausência de GPR91 (Figura 9C); os níveis de concentração da proteína na pele dos animais refletiu os dados de mRNA, no qual a ausência do receptor preveniu a liberação da citocina (Figura 9D).



**Figura 9. Avaliação do eixo IL-23/IL-17 na psoríase experimental.** A pele de camundongos WT e GPR91<sup>-/-</sup> foi utilizada para avaliação de expressão de IL-23 (A/B) e IL-17 (C/D) em nível de mRNA e de proteína. Dados representam média  $\pm$  SEM (n = 5), utilizando análise de variância ANOVA seguido de teste de Bonferroni.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo, e representado por \*.

## 6. DISCUSSÃO

A psoríase é uma doença de pele global, cuja patogênese não é totalmente compreendida. Por muitos anos, atribuía-se o desenvolvimento de Pso a distúrbios de células da pele; contudo, a partir da década de 1990, estudos passaram a elucidar a participação do sistema imune na doença [32]. Células dendríticas, neutrófilos, macrófagos e linfócitos efetores, de memória e regulatórios são identificados em níveis elevados em lesões psoriásicas [3].

DCs desempenham papel importante no desenvolvimento e manutenção de Pso, através de mecanismos de quebra de tolerância, ativação de linfócitos e liberação de citocinas pró-inflamatórias na pele [58]. O estudo publicado por Rubic e colaboradores, que serviu como base teórica para este estudo, sugere que o receptor de succinato GPR91, altamente expresso em DCs, contribui para características indispensáveis de DCs, como capacidade migratória e produção de citocinas [49]. Em adição, trabalho recentemente publicado por nosso grupo de pesquisa apresenta a participação do receptor em modelos experimentais de artrite reumatoide [51]. Desta forma, formulamos a hipótese de que o receptor GPR91 também poderia exercer papel importante na patogênese de psoríase.

Em vista do exposto, o objetivo inicial deste trabalho foi avaliar o fenótipo que animais deficientes de GPR91 apresentariam frente ao protocolo experimental de psoríase. Utilizando modelo induzido por IMQ, observamos primeiramente os parâmetros clínicos de inflamação da pele característicos de Pso como vermelhidão, aumento da espessura da pele, lesões elevadas e com descamação; notamos que a deleção gênica do receptor resultava em menor score clínico da doença, quando em comparação com animais do tipo selvagem. Este resultado comprovou nossa hipótese inicial, fortalecendo a relação positiva entre GPR91 e psoríase. A nível molecular, o resultado que contribuiu

com nossa hipótese foi a observação de que o receptor se encontra mais expresso a nível de RNA mensageiro e de proteína em camundongos WT após o protocolo de psoríase induzida por IMQ.

Uma das alterações celulares mais características da psoríase é a hiperproliferação de queratinócitos, que reflete nos sinais clínicos comumente encontrados em pacientes, como formação de placas psoriásicas, edema, prurido e descamação das lesões. Dentre os achados histopatológicos que se associam a este fenômeno estão o espessamento da camada córnea da epiderme, incluindo presença de células nucleadas na mesma, projeções irregulares e infiltrado leucocitário na derme e espessamento da camada espinhosa [3]. Desta forma, analisamos a histopatologia da pele dos animais submetidos ao modelo experimental de Pso, de forma a analisar se a deleção gênica do receptor também teria efeito protetor frente à hiperproliferação de KCs. Nossos achados mostram que as características histopatológicas da psoríase se mostravam menos intensas nos animais nocautes; em adição, proteínas associadas à ativação de KC, como lipocalina-2 e o marcador de proliferação Ki67, são menos expressos em animais GPR91<sup>-/-</sup> do que em animais WT. Nesse sentido, os dados sugerem que o menor score clínico observado nos animais em primeiro momento era reflexo de menor ativação de KCs.

Dando continuidade ao estudo, buscamos avaliar parâmetros relacionados à patogênese da psoríase, de forma a caracterizar a doença no animal deficiente de GPR91. Sabe-se que mediadores da comunicação entre leucócitos, as citocinas, são capazes de modular a resposta imune, e alterações no seu perfil de expressão são característicos de doenças autoimunes e imunomediadas [58]. Deste modo, avaliamos a concentração de diversas citocinas inflamatórias na pele dos animais. Nossos resultados mostraram que a deficiência de GPR91 prejudicou a secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-23 e IL-17. Importante ressaltar que, apesar de o receptor ser expresso em apenas um tipo celular, as

células dendríticas, a produção citocinas liberadas por outros tipos de leucócitos também foi prejudicada. Esta observação nos sugere a importância de DCs para a patogênese e manutenção da doença.

Deste modo, o passo seguinte deste trabalho foi avaliar o efeito da deleção gênica de GPR91 nas populações de DCs após a indução de psoríase. Em primeiro momento, investigamos a localização e grau de expressão de CD11c, um marcador compartilhado pela vasta maioria de subtipos de DC: como esperado, observamos que na ausência de GPR91, há diminuição de células que expressam CD11c na pele lesionada. Avaliando o papel de DC na patogênese da psoríase mais profundamente, sabe-se que a migração de tais células para os linfonodos drenantes da pele representa um passo importante na iniciação da doença [34]. Deste modo, utilizando da técnica de citometria de fluxo, avaliamos a porcentagem de DC de origem dermal, identificada pelo fenótipo CD11c<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>, na pele e linfonodo dos animais submetidos à aplicação de IMQ. Observamos que animais GPR91<sup>-/-</sup> possuem menor porcentagem deste tipo celular em ambos os microambientes analisados. Entretanto, um dos pontos negativos deste trabalho é a ausência de experimentos que mostrem se a população de DCs em aumento na pele e linfonodo nos animais tratados expressa o receptor GPR91. Dentre as perspectivas futuras do estudo, procuramos: (i) avaliar a co-localização do receptor e CD11c em ensaios de imunofluorescência; (ii) determinar o fenótipo celular da DC que expressa o receptor em experimentos de citometria de fluxo, utilizando de outros marcadores de DDC, como CD207, CD326, CD103 e CD11b; e (iii) avaliar o perfil de ativação destas células, identificando a expressão de marcadores como MHC-II, CD80 e CD86.

Mecanicamente, considerando que a deleção gênica de GPR91 afetou negativamente a população de DDC nos linfonodos e na pele, surge o questionamento se o receptor GPR91 estaria participando nos eventos de migração das células, ou se o receptor

é importante para a proliferação das mesmas, em um contexto de inflamação. Uma das perspectivas futuras para a conclusão deste estudo é a realização de ensaios *in vitro* de migração de DCs obtidas de animais WT e GPR91<sup>-/-</sup> frente a estímulos como IMQ e succinato, bem como a produção de citocinas pelas células neste contexto, a fim de elucidar o mecanismo que GPR91 influencia a atividade de DC.

Um dos efeitos observados pela menor população de DDC nos linfonodos dos animais é a menor ativação e polarização de linfócitos para um perfil Th17. Este perfil celular é geralmente encontrado em aumento em contextos de doenças autoimunes e imunomediadas, como a psoríase [37] e a citocina IL-17 é um dos mediadores responsáveis pela ativação de KC, levando a sua hiperproliferação [42]. Observamos neste estudo que a deficiência de GPR91 afeta a porcentagem de células CD4<sup>+</sup> e TCRγδ<sup>+</sup> produtoras de IL-17 no ambiente linfoide. Além disso, mostramos que o eixo IL-23/IL-17 se mostrou reduzido na pele dos animais GPR91<sup>-/-</sup>. Entretanto, ainda necessitamos avaliar a população de linfócitos efetores produtores de IL-17 na pele dos animais, através da técnica de citometria de fluxo, a fim de avaliar a participação de GPR91 na migração destas células para o foco da lesão; um dos obstáculos do trabalho foi a marcação da citocina nas células da pele, e após diversas tentativas, conseguimos adequar o protocolo experimental do estímulo das células, utilizando o dobro da concentração de ionomicina e PMA.

Um estudo concluído recentemente no laboratório mostrou que a deficiência do receptor GPR91 afeta negativamente a polarização de linfócitos para o perfil Th17 em contexto de modelos experimentais de artrite reumatoide, bem como a adição de succinato à emulsão de imunização dos animais potencializou os parâmetros inflamatórios da doença [51]. Dessa forma, um dos objetivos iniciais deste trabalho seria a avaliação do efeito do succinato na patogênese da psoríase. Entretanto, encontramos um obstáculo no

delineamento experimental: a aplicação tópica de creme contendo succinato seria o veículo ideal para a avaliação dos efeitos do mesmo na pele dos animais durante o modelo experimental de psoríase; por outro lado, a presença de um creme na pele poderia agir como barreira física para a absorção de IMQ, e assim influenciar os resultados obtidos. Em dados não mostrados neste trabalho, realizamos a aplicação de creme 10% succinato na orelha dos animais durante 4 dias antes do início da aplicação de IMQ, e medimos diariamente a espessura da pele. Observamos tendência do efeito do pré-tratamento com succinato de potencializar os sinais visuais da inflamação, como vermelhidão e descamação da pele, em relação aos animais tratados com veículo; contudo, não houve diferença entre os dados de espessura da pele. Procuramos aperfeiçoar este experimento para o futuro, visando que seria de grande contribuição para o trabalho.

Em suma, o estudo presente mostra que o receptor de succinato GPR91 participa positivamente na patogênese da psoríase experimental, uma vez que a deficiência do receptor resultou em diminuição dos parâmetros clínicos e celulares já estabelecidos do modelo. Recentemente, ensaios clínicos para o tratamento de psoríase com drogas cujo alvo são mediadores e células do sistema imune vêm ganhando relevância: estudos com anticorpos anti-TNF- $\alpha$  [20], anti-IL-17 [21] e anti-IL-23 [36] mostraram redução dos sinais clínicos da doença, e a melhora da qualidade de vida dos pacientes. Com os dados deste estudo, observamos redução dos níveis das citocinas citadas, menor polarização de células produtoras de IL-17 e menor ativação e hiperproliferação de queratinócitos; em adição, os animais GPR91<sup>-/-</sup> não apresentaram nenhuma outra deficiência ou anormalidade decorrente da ausência do receptor. Deste modo, percebemos o potencial de GPR91 como um possível alvo terapêutico, sugerindo que o antagonismo do receptor possa agir no tratamento de psoríase e outras doenças imunomediadas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Di meglio P, Villanova F, Nestle FO. Psoriasis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(8).

[2] Krueger, G., & Ellis, C. N. (2005). Psoriasis—recent advances in understanding its pathogenesis and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53(1).

[3] Schön MP, Henning-Boehncke W. Psoriasis. *New England Journal of Medicine*, 2005.

[4] Parisi R, Symmons DP, Griffiths CE, Ashcroft DM. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J Invest Dermatol.* 2013;133(2):377-85.

[5] Hart PH, Gorman S, Finlay-jones JJ. Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D?. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(9):584-96.

[6] Tollefson MM, Crowson CS, Mcevoy MT, Maradit kremers H. Incidence of psoriasis in children: a population-based study. *J Am Acad Dermatol.* 2010;62(6):979-87.

[7] van de Kerkhof PCM, Nestle FO 2012. Psoriasis. In *Dermatology* (ed. Bologna JL, Jorizzo JL, Schaffer JV). Elsevier, Amsterdam.

[8] Griffiths CE, Christophers E, Barker JN, Chalmers RJ, Chimenti S, Krueger GG, Leonardi C, Menter A, Ortonne JP, Fry L 2007. A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. *Br J Dermatol* 156: 258–262 .

[9] Boyd AS, Menter A 1989. Erythrodermic psoriasis. Precipitating factors, course, and prognosis in 50 patients. *J Am Acad Dermatol* 21: 985–991.

[10] Hunjan MK, Maradit kremers H, Lohse C, Tollefson M. Association between obesity and pediatric psoriasis. *Pediatr Dermatol*. 2018;35(5):e304-e305.

[11] Soltani-arabshahi R, Wong B, Feng BJ, Goldgar DE, Duffin KC, Krueger GG. Obesity in early adulthood as a risk factor for psoriatic arthritis. *Arch Dermatol*. 2010;146(7):721-6.

[12] Ferdinando LB, Fukumoto PK, Sanches S, Fabricio LHZ, Skare TL. Metabolic syndrome and psoriasis: a study in 97 patients. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2018;64(4):368-373.

[13] Molina-leyva A, Salvador-rodriguez L, Martinez-lopez A, Ruiz-carrascosa JC, Arias-santiago S. Association Between Psoriasis and Sexual and Erectile Dysfunction in Epidemiologic Studies: A Systematic Review. *JAMA Dermatol*. 2018;



[14] Duffin KC. Identifying and Managing Complications and Comorbidities in Patients With Psoriasis. *Semin Cutan Med Surg.* 2015;34(2 Suppl):S30-3.

[15] Yang EJ, Beck KM, Sanchez IM, Koo J, Liao W. The impact of genital psoriasis on quality of life: a systematic review. *Psoriasis (Auckl).* 2018;8:41-47.

[16] Pithadia DJ, Reynolds KA, Lee EB, Wu JJ. Psoriasis-Associated Cutaneous Pain: Etiology, Assessment, Impact, and Management. *J Dermatolog Treat.* 2018;:1-21.

[17] Founta O, Adamzik K, Tobin AM, Kirby B, Hevey D. Psychological Distress, Alexithymia and Alcohol Misuse in Patients with Psoriasis: A Cross-Sectional Study. *J Clin Psychol Med Settings.* 2018.

[18] Liang SE, Cohen JM, Ho RS. Psoriasis and Suicidality: A Review of the Literature. *Dermatol Ther.* 2018;:e12771.

[19] Lebwohl M, Christophers E, Langley R, et al. An international, randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial of intramuscular alefacept in patients with chronic plaque psoriasis. *Arch Dermatol.* 2003;139(6):719-27.

[20] Leonardi CL, Powers JL, Matheson RT, et al. Etanercept as monotherapy in patients with psoriasis. *N Engl J Med*. 2003;349(21):2014-22.

[21] Krueger JG, Fretzin S, Suárez-fariñas M, et al. IL-17A is essential for cell activation and inflammatory gene circuits in subjects with psoriasis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(1):145-54.e9.

[22] Krueger JG, Bowcock A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64 Suppl 2:ii30-6.

[23] Itoh K, Sakakibara M, Yamasaki S, et al. Cutting edge: negative regulation of immune synapse formation by anchoring lipid raft to cytoskeleton through Cbp-EBP50-ERM assembly. *J Immunol*. 2002;168(2):541-4.

[24] Rahman P, Elder JT. Genetic epidemiology of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64 (suppl II) :ii37–9.

[25] Prinz JC 2001. Psoriasis vulgaris—A sterile antibacterial skin reaction mediated by cross-reactive T cells? An immunological view of the pathophysiology of psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 26: 326–332.

[26] Naldi L, Chatenoud L, Linder D, Belloni Fortina A, Peserico A, Virgili AR, Bruni PL, Ingordo V, Lo Scocco G, Solaroli C, et al. 2005. Cigarette smoking, body mass index, and stressful life events as risk factors for psoriasis: Results from an Italian case-control study. *J Invest Dermatol* 125: 61–67.

[27] Kim GK, Del Rosso JQ 2010. Drug-provoked psoriasis: Is it drug induced or drug aggravated? Understanding pathophysiology and clinical relevance. *J Clin Aesthet Dermatol* 3: 32–38.

[28] Mueller W, Herrmann B. Cyclosporin A for psoriasis. *N Engl J Med* 1979: 301: 555.

[29] Nicolas J F, Chamchick N, Thivolet J, Wijdenes J, Morel P, Revillard J P. CD4 antibody treatment of severe psoriasis. *Lancet* 1991: 338: 321.

[30] Eedy D J, Burrows D, Bridges J M, Jones F G. Clearance of severe psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation. *BMJ* 1990: 300: 908.

[31] Gardembas-Pain M, Ifrah N, Foussard C, Boasson M, Saint Andre J P, Verret J L. Psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation. *Arch Dermatol* 1990: 126: 1523.

[32] Sabat, R. , Philipp, S. , Höflich, C. , Kreutzer, S. , Wallace, E. , Asadullah, K. , Volk, H. , Sterry, W. and Wolk, K. (2007), Immunopathogenesis of psoriasis. *Experimental Dermatology*, 16: 779-798.

[33] Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*. 2007;449(7162):564-9.

[34] Zaba LC, Fuentes-duculan J, Eungdamrong NJ, et al. Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J Invest Dermatol*. 2009;129(1):79-88.

[35] Zaba LC, Cardinale I, Gilleaudeau P, et al. Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J Exp Med*. 2007;204(13):3183-94.

[36] Kim J, Krueger JG. Highly Effective New Treatments for Psoriasis Target the IL-23/Type 17 T Cell Autoimmune Axis. *Annu Rev Med*. 2017;68:255-269.

[37] Hawkes JE, Yan BY, Chan TC, Krueger JG. Discovery of the IL-23/IL-17 Signaling Pathway and the Treatment of Psoriasis. *J Immunol*. 2018;201(6):1605-1613.

[38] Di cesare A, Di meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2009;129(6):1339-50.

[39] Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2010;130(5):1373-83.

[40] Pantelyushin S, Haak S, Ingold B, et al. Ror $\gamma$ t<sup>+</sup> innate lymphocytes and  $\gamma\delta$  T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice. *J Clin Invest.* 2012;122(6):2252-6.

[41] Blauvelt A, Chiricozzi A. The Immunologic Role of IL-17 in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2018.

[42] Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, et al. 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8: 950–957.

[44] He W, Miao FJ, Lin DC, et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature.* 2004;429(6988):188-93.

[45] Toma, I. et al. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 118, p. 2526-2534, 2008.

[46] Regard, JG; Sato, IT; Coughlin, SR. Anatomical profiling of G-protein coupled receptor expression. *Cell*, v.135, p. 561-571, 2008.

[47] Sapiaha, P. et al. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nature Medicine*, v. 14, p. 1067-1076, 2008.

[48] Hakak, et al. The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 85, p. 837-843, 2009.

[49] Rubic T, Lametschwandtner G, Jost S, et al. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat Immunol*. 2008;9(11):1261-9.

[50] Kim, S. et al. Global metabolite profiling of synovial fluid for the specific diagnosis of rheumatoid arthritis from other inflammatory arthritis. *Plos One*, v.9, p. 1-9, 2014.

[51] Saraiva AL, Veras FP, Peres RS, et al. Succinate receptor deficiency attenuates arthritis by reducing dendritic cell traffic and expansion of T17 cells in the lymph nodes. *FASEB J*. 2018.

[52] Beutner, K. R., S. Tyring. 1997. Human papillomavirus and human disease. *Am. J. Med.* 102: 9-15.

[53] Szeimies, R. M., M. J. Gerritsen, G. Gupta, J. P. Ortonne, S. Serresi, J. Bichel, J. H. Lee, T. L. Fox, A. Alomar. 2004. Imiquimod 5% cream for the treatment of actinic keratosis: results from a phase III, randomized, double-blind, vehicle-controlled, clinical trial with histology. *J. Am. Acad. Dermatol.* 51: 547-555.

[54] Geisse, J. K., P. Rich, A. Pandya, K. Gross, K. Andres, A. Ginkel, M. Owens. 2002. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: a double-blind, randomized, vehicle-controlled study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 47: 390-398.

[55] Van der fits L, Mourits S, Voerman JS, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol.* 2009;182(9):5836-45.

[56] Hau CS, Kanda N, Tada Y, et al. Lipocalin-2 exacerbates psoriasiform skin inflammation by augmenting T-helper 17 response. *J Dermatol.* 2016;43(7):785-94.

[57] Li X, Fan X, Zhang K, Yin G, Liu Y. Influence of psoriatic peripheral blood CD4+ T and CD8+ T lymphocytes on C-myc, Bcl-xL and Ki67 gene expression in keratinocytes. *Eur J Dermatol.* 2007;17(5):392-6.

[58] Cravens PD, Lipsky PE. Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunol Cell Biol.* 2002;80(5):497-505.