

**ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie
du Vivant (SSBCV)**

**UMR7355 – Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et
Moléculaires (INEM) - Université d'Orléans / Faculté de
Médecine de Ribeirão Preto – Université de São Paulo**

THÈSE EN COTUTELLE INTERNATIONALE présentée par :

Timna VARELA MARTINS

soutenue le : 09 septembre 2024

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans
et de l'Université de São Paulo**

Discipline/ Spécialité : Biologie. Immunologie

**Papel dos sensores citosólicos de DNA no
desenvolvimento e manutenção da psoríase.**

THÈSE dirigée par :

ALVES-FILHO José Carlos
RITEAU Nicolas
IRL2029

Associate Professor, University of São Paulo
Chargé de Recherche CNRS, UMR7355 et

RAPPORTEURS :

LAGENTE Vincent
BORTOLUCI Karina

Professeur de l'Université de Rennes, Institut NuMeCan
Associate Professor, Federal University of São Paulo

JURY :

ALVES-FILHO José Carlos
Présidente du jury
TOGBE Dieudonné
GUABIRABA BRITO Rodrigo
LAGENTE Vincent
OSÓRIO SILVEIRA LEIRIA Luiz
RAMALHO BORTOLUCI Karina
RITEAU Nicolas

Associate Professor, University of São Paulo

Professeure de l'Université d'Orléans, UMR7355
Chargé de Recherche INRAE, UMR ISP-213
Professeur de l'Université de Rennes, Institut NuMeCan
Assistant Professor, University of São Paulo - FMRP
Associate Professor, Federal University of São Paulo
Chargé de recherche CNRS, UMR7355 et IRL2029



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

TIMNA VARELA MARTINS

**Papel dos sensores de DNA citosólico no
desenvolvimento e na manutenção da psoríase**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2024

Papel dos sensores de DNA citosólico no desenvolvimento e na
manutenção da psoríase

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

Área de concentração: Imunologia
Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos
Farias Alves Filho

Co-Orientador: Prof. Dr. Nicolas
Riteau

Ribeirão Preto – SP

2024

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). 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 CATALOGRAFICA

Martins, Timna Varela

Papel dos sensores de DNA citosólico no desenvolvimento e na manutenção da psoríase. Ribeirão Preto, 2024. 108 p.

Tese de doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada. Área de concentração: Imunologia. – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: José Carlos Farias Alves Filho

1.Psoríase. 2.sensores de DNA. 3.AIM2. 4.STING. 5. Inflamação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: MARTINS, Timna Varela

Título: Papel dos sensores de DNA citosólico no desenvolvimento e na manutenção da psoríase.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra.

Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor, Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e no Laboratório Immuno-Neuro modulation da Universidade de Orleans. O trabalho recebeu auxílio financeiro do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Doenças Inflamatórias (CRID), FAPESP, CAPES, CNPq e eiffel fellowship.

EPÍGRAFE

Cada descoberta nova da
ciência é uma porta nova pela
qual encontro mais uma vez
Deus, o autor dela.

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Dalmir e Aurileide, os maiores incentivadores dos meus sonhos, e que não mediriam esforços para hoje terem uma filha doutora.

AGRADECIMENTOS

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

À atenção dedicada, orientação sábia e ensinamentos preciosos do Prof. Dr. José Carlos (Zeca), devo o crescimento tanto profissional quanto pessoal que alcancei durante esta jornada. Sua acolhida calorosa e incentivo constante foram como uma luz orientadora em momentos de desafio. Não encontro palavras que possam verdadeiramente expressar a gratidão que sinto por sua generosidade e apoio ao longo deste percurso.

Ao Prof. Dr. Nicolas Riteau, co-orientador desta tese, pela colaboração e por ter me recebido da melhor forma em seu laboratório no CNRS, em Orleans, França. Sua dedicação, comprometimento e contribuições foram fundamentais para o progresso e sucesso deste projeto. A troca de ideias e discussões científicas construtivas que tivemos foram elementos essenciais para alcançarmos os objetivos propostos.

Aos demais professores do Laboratório de Inflamação e Dor (LID), Fernando Cunha e Thiago Cunha, por também contribuírem para minha formação como cientista e pelo auxílio no desenvolvimento desse projeto.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada pelos ensinamentos e aulas ministradas durante as disciplinas.

Ao Prof. Dr. Bernhard Ryffel que acompanhou parte do meu Doutorado, seus insights e orientações, assim como suas críticas, foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, proporcionando uma base sólida para a minha pesquisa. Agradeço também aos colegas do INEM: Dorian de Moura, Rania Boussad, Sandra Carignon, Amanda Philippeau, Isabelle Maillet, Marc Le Bert e Khadija Hassen.

À Prof. Dra. Cacilda Sousa pela colaboração com as amostras de pacientes e sua disposição em compartilhar experiências foram valiosas para o aprimoramento deste estudo.

Ao Dr. Bruno Marcel, por sua calorosa recepção quando me juntei ao LID, por me introduzir à linha de pesquisa em psoríase e, principalmente, por sua paciência em me orientar e ensinar muitas das metodologias necessárias

para o desenvolvimento desta tese. Seus incentivos, conversas, risadas, até mesmo os momentos de desafio e lágrimas compartilhados ao longo dos últimos anos foram verdadeiramente inestimáveis. Obrigada pela amizade!

Ao Gabriel Victor Lucena, este trabalho também foi possível graças a você! Obrigada por compartilhar sonhos e planos comigo, além disso, serei sempre grata por todo o suporte que você me deu durante o meu doutorado. Que seu futuro seja brilhante e que nosso sentimento, respeito e admiração mútuos continue em qualquer relação que tenhamos. Desejo o melhor para você sempre! Obrigada por tudo, com você compartilhei o melhor!

A todos os colaboradores que generosamente contribuíram para o avanço deste projeto: Bruno Marcel, Gabriel Victor, Elidiane Aníbal, Isadora Marques, Marcos Rosa, Juliana Toller e Gabriel Públio.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia em especial aos técnicos do LID Kátia Santos (Katinha), Ieda Santos, Sérgio Rosa, Diva Souza, Marcela Grando e Marco Antônio pelo apoio técnico. Agradeço também aos responsáveis pelo biotério do Departamento de Farmacologia, Eliana e colaboradores, e do Centro de Criação de Camundongos Especiais, Dener, Júlio e todos os colaboradores.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia Básica e Aplicada (IBA), em especial à Ana S. Cristine Ferreira, secretária do IBA, pelo apoio, dedicação e solicitude. Agradeço também à Denise Ferraz, pelos ensinamentos e pela grande ajuda nos experimentos de citometria de fluxo.

A todos os funcionários do Departamento de Biologia Celular e Molecular, em especial: Roberta Rosales, Elizabethe e Vani Alves, por estarem sempre dispostas a ajudar e ensinar o manuseio de diferentes microscópios, desde do preparo das amostras, aquisição até as análises das imagens.

A todos os colegas e amigos que conheci no LID, em especial aqueles que tive a oportunidade de dar boas risadas e ao mesmo tempo discutir ciência: Rafaela Mano, Eduardo Damasceno, Juliana Toller, Bruno Marcel, Maria Cláudia, Camila Meirelles, Wagner, Beatriz Adjafre, Elidiane Aníbal, Isadora Marques, Bruna Manoela, Atante Mendes, Juliana Silva, Dani Nascimento, César Speack, Isaac, Gabriel Públio e Samara. Apreendi algo com cada um de vocês, cientistas brilhantes!

Aos meus amigos que a pós-graduação me deu: Ivaldo e Jeimison. Vocês foram muito mais que amigos, foram o meu porto-seguro. Obrigada por

todo suporte e amor! Carregarei para sempre em minha memória todos os nossos momentos juntos, desde de um cafezinho até vídeo chamadas quando estávamos quilômetros de distância. Vocês deixaram meus dias mais divertidos e leves. Vocês irão brilhar ainda mais e sempre irei aplaudir vocês.

Às amigas que carrego comigo desde os tempos do colégio e da graduação - Lívia Mendes, Jaqueline Freire, Amanda Monte, Giselle Maia, Luanny Oliveira, Christiane Damasceno, Patrícia Simões e Sâmela Abreu: mesmo que estejamos separadas fisicamente, sei que vocês estão sempre torcendo por mim, assim como eu torço por vocês. Para mim, a verdadeira amizade não é medida pela proximidade física, mas pela conexão que compartilhamos. Obrigada por serem parte importante da minha vida e por estarem sempre presentes, não importa onde estejamos neste mundo.

A banca pelo aceite em participar e ajudar na construção deste projeto, assim como na minha formação. Seus ensinamentos serão de grande valia pessoal e profissional.

Fontes financiadoras: CAPES, Excellence Eiffel scholarship, CNPq, FAEPA e Pró-Reitoria de Pós-Graduação, pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro que contribuíram diretamente para o desenvolvimento deste trabalho, bem como para a participação em eventos científicos, que foram de grande importância para minha formação acadêmica, científica e profissional.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, Dalmir e Aurileide, e minha irmã, Tafnes Varela, quero expressar minha profunda gratidão pelo apoio inabalável e amor incondicional que vocês me proporcionaram ao longo de toda a minha vida. O encorajamento constante e o suporte emocional foram fundamentais para que eu pudesse alcançar este marco importante em minha vida acadêmica. Vocês são verdadeiramente os pilares da minha vida, e esta conquista é tão de vocês quanto é minha. Amo vocês sem medidas!

Agradeço toda minha família Varela, em especial meus avós, Antônio Varela e Florismar Oliveira, por todas as orações e por entender minha ausência todos esses anos. Em extensão, agradeço aos meus tios e tias que sempre me incentivaram e vibraram por cada conquista minha.

Agradeço toda minha família Martins, em especial meus avós, Valmir Martins e Dona Dalva (*in memorian*), o apoio, amor e cuidado de vocês foram fundamentais para essa conquista. Vó Dalva, você vai ter uma neta doutora. Em extensão, agradeço minha Tia Dalvany e meu Tio Júnior, obrigada pelo cuidado e amor constante, espero poder retribuir todo amor e apoio que tenho recebido ao longo dos anos.

Título: Papel dos sensores citosólicos de DNA no desenvolvimento e manutenção da psoríase.

RESUMO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica e recorrente da pele, marcada por um aumento anormal na proliferação e diferenciação dos queratinócitos, juntamente com a ativação do sistema imunológico. No entanto, o mecanismo molecular que desencadeia essa resposta imunológica na pele psoriática, assim como, os mecanismos precisos subjacentes ao desenvolvimento e persistência da doença ainda não são totalmente compreendidos. Portanto, o objetivo inicial de nossa pesquisa foi identificar novos alvos com potencial impacto na patogênese da psoríase. Após a reanálise de diversos bancos de dados públicos de pacientes com psoríase, identificamos o perfil transcricional da pele desses pacientes. Identificamos a via de sinalização de sensores citosólicos de DNA associado a patógenos e, além disso, observamos o aumento dos níveis de DNA circulante livre no plasma de pacientes com psoríase. Combinando essas informações, e sabendo que o DNA é capaz de ativar sensores específicos no citoplasma celular e desencadear respostas imunes robustas, este trabalho teve como o objetivo principal avaliar a participação dos sensores de DNA AIM2 (*absent in melanoma 2*) e STING (*STimulator of INterferon Genes*) na imunopatogênese da psoríase. Encontramos o aumento da expressão de AIM2 tanto na epiderme psoriática humana quanto em um modelo murino de psoríase induzida pela aplicação tópica de imiquimode (IMQ). A ablação genética de AIM2 reduziu o desenvolvimento da psoríase induzida por IMQ ao diminuir a produção de citocinas do tipo 3 (como IL-17A e IL-23) e a infiltração de células imunes no local inflamatório. Além disso, demonstramos que a IL-17A induziu a expressão de AIM2 nos queratinócitos. Por fim, a ausência genética dos componentes do inflamassoma downstream AIM2, ASC e caspase-1 aliviou a inflamação cutânea induzida por IMQ. Em relação ao STING, identificamos que sua expressão é majoritária na derme da pele de pacientes com psoríase. A deficiência genética de STING induziu a uma exacerbação da resposta inflamatória ao aumentar os níveis de citocinas inflamatórias (como IL-17, IL-23 e IL-6), reduzir citocinas anti-inflamatórias (como IL-10) e aumentar a migração de células imunes na pele no modelo psoriasiforme. Também, evidenciamos que os linfócitos e a citocina IL-17A desempenham um papel crucial na regulação da resposta inflamatória mediada por STING. Além disso, observamos que IRF3, componente downstream da sinalização de STING, intensificou a inflamação na pele, sendo essa regulação independente de cGAS e IFNAR. Coletivamente, nossos dados mostram que os receptores citosólicos de DNA, STING e AIM2 desempenham um papel na modulação da resposta inflamatória da pele, sugerindo que esses receptores podem ser alvos farmacológicos importantes para doenças inflamatórias.

Palavras-chave: Psoríase. Pele. Inflamação. Sensores de DNA. STING. AIM2.

Title: Role of cytosolic DNA sensors in the maintenance and development of psoriasis

ABSTRACT

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease characterized by abnormal keratinocyte proliferation and immune system activation. The molecular mechanisms triggering this immune response in psoriatic skin remain incompletely understood. This study aimed to identify new targets for psoriasis pathogenesis. After reanalyzing public psoriasis patient data, we identified the cytosolic DNA sensor signaling pathway associated with pathogens and observed increased circulating free DNA in psoriasis patient plasma. The study focused on the DNA sensors AIM2 and STING in psoriasis immunopathogenesis. We found elevated AIM2 expression in both human psoriatic epidermis and a mouse model induced by imiquimod (IMQ). Genetic ablation of AIM2 reduced IMQ-induced psoriasis by decreasing type 3 cytokines (such as IL-17A and IL-23) and immune cell infiltration. IL-17A induced AIM2 expression in keratinocytes. The absence of AIM2 inflammasome components, ASC and caspase-1, alleviated IMQ-induced skin inflammation. For STING, we identified its predominant expression in the dermis of psoriasis skin. Genetic deficiency of STING worsened inflammation, increasing pro-inflammatory cytokines (IL-17, IL-23, IL-6) and immune cell migration. Lymphocytes and IL-17A were crucial in regulating the STING-mediated inflammatory response. Additionally, IRF3, a downstream component of STING signaling, enhanced skin inflammation independently of cGAS and IFNAR. Overall, our findings suggest that STING and AIM2 cytosolic DNA receptors play a role in modulating skin inflammation and could be potential pharmacological targets for inflammatory diseases.

Keywords: Psoriasis. Skin. Inflammation. DNA sensors. STING. AIM2.

Titre: Rôle des senseurs cytosoliques de l'ADN dans le maintien et le développement du psoriasis

RESUMÉ

La psoriasis est une maladie inflammatoire chronique de la peau caractérisée par une prolifération anormale des kératinocytes et une activation du système immunitaire. Les mécanismes moléculaires déclenchant cette réponse immunitaire dans la peau psoriasique restent encore mal compris. Cette étude visait à identifier de nouvelles cibles pour la pathogénie de la psoriasis. Après avoir réanalysé les données publiques de patients psoriasiques, nous avons identifié la voie de signalisation des capteurs d'ADN cytosoliques associée aux agents pathogènes et observé une augmentation de l'ADN libre circulant dans le plasma des patients psoriasiques. L'étude s'est concentrée sur les capteurs d'ADN AIM2 et STING dans l'immunopathogénie de la psoriasis. Nous avons trouvé une expression élevée d'AIM2 à la fois dans l'épiderme psoriasique humain et dans un modèle murin induit par l'imiquimod (IMQ). L'ablation génétique d'AIM2 a réduit la psoriasis induite par IMQ en diminuant les cytokines de type 3 (comme IL-17A et IL-23) et l'infiltration de cellules immunitaires. IL-17A a induit l'expression d'AIM2 dans les kératinocytes. L'absence des composants de l'inflammasome AIM2, ASC et caspase-1, a atténué l'inflammation cutanée induite par IMQ. Concernant STING, nous avons identifié son expression prédominante dans le derme de la peau psoriasique. La déficience génétique de STING a exacerbé l'inflammation en augmentant les cytokines pro-inflammatoires (IL-17, IL-23, IL-6) et la migration des cellules immunitaires. Les lymphocytes et IL-17A ont joué un rôle crucial dans la régulation de la réponse inflammatoire médiée par STING. De plus, IRF3, un composant en aval de la signalisation de STING, a intensifié l'inflammation cutanée indépendamment de cGAS et IFNAR. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que les récepteurs d'ADN cytosoliques STING et AIM2 jouent un rôle dans la modulation de l'inflammation cutanée et pourraient constituer des cibles pharmacologiques potentielles pour les maladies inflammatoires.

Mots-clés: Psoriasis. Peau. Inflammation. Capteurs d'ADN. STING. AIM2

**Laboratoire d'Immunologie et Neurogénétique
Expérimentales et Moléculaire**

INEM - UMR7355 CNRS - Université d'Orléans
3B, rue de la Férollerie

**CRID - Centro de Pesquisa em Doenças
Inflamatórias**

Av. Bandeirantes, R. Paineiras, 3900 - Vila
Monte Alegre, Ribeirão Preto - SP

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	9
RESUMO	13
ABSTRACT	14
RESUMÉ	15
LISTA DE FIGURAS	18
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Pele: características gerais e anatomia imunológica	21
1.2 Psoríase: aspectos gerais e manifestações	22
1.3 Distribuição global da psoríase	24
1.4 Etiologia da psoríase	25
1.5 Fisiopatologia da psoríase	27
1.6 Sensores de DNA	29
1.7 Absent in melanoma 2	30
1.8 Estimulador de Genes de Interferon (STING)	32
2. HIPÓTESE	38
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Geral	40
3.2 Objetivos Específicos	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Pacientes	42
4.2 Animais	42
4.3 Análises in silico	43
4.4 Modelo psoriasiforme	43
4.5 Processamento de tecidos para citometria de fluxo	44
4.6 Citometria de fluxo	44
4.7 Extração de RNA e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	44
4.8 Extração de DNA circulante e quantificação por qPCR	45
4.9 Histologia	46
4.10 Microscopia intravital	46
4.11 ELISA	46
4.12 Cultura de queratinócitos (células HaCat) in vitro	47
4.13 Cultura de queratinócitos primários	47
4.14 Western Blot	47
4.15 Análise estatística	48
Parte A: Papel do AIM2 no desenvolvimento e manutenção da psoríase	49
5. RESULTADOS	50

5.1 A via de sensores citosólicos de DNA representa a assinatura gênica na pele de pacientes com psoríase	50
5.2 As concentrações de DNA livre plasmático encontram-se elevadas em pacientes com psoríase.....	51
5.3 A expressão de AIM2 está elevada na pele de pacientes com psoríase e no modelo psoriasiforme	51
5.4 A expressão de AIM2 exacerba a inflamação cutânea de características semelhantes às da psoríase4.13 Cultura de queratinócitos primários	53
5.5 AIM2 é majoritariamente expresso na epiderme.....	57
5.6 A expressão de AIM2 é regulada por IL-17	58
5.7 A ativação direta do AIM2 induz diretamente a inflamação cutânea de características semelhantes às da psoríase	60
5.8 O inflamassoma AIM2 é necessário para a indução da inflamação cutânea semelhante à psoríase.....	63
Parte B: Papel do STING no desenvolvimento e manutenção da psoríase.....	66
6. RESULTADOS	67
6.1 A via de sinalização de interferon representa a assinatura gênica na pele de pacientes com psoríase.....	67
6.2 STING está expresso na pele de pacientes com psoríase vulgar	67
6.3 A deficiência de STING exacerba a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme6.1 A via de sinalização de interferon representa a assinatura gênica na pele de pacientes com psoríase.....	69
6.4 A presença de linfócitos é necessária para que STING module a inflamação cutânea	71
6.5 IL-17 é envolvida no controle da inflamação mediada por STING em modelo psoriasiforme	73
6.6 A sinalização de STING é dependente da expressão de IRF3 na inflamação cutânea da pele	74
7. DISCUSSÃO	79
8. CONCLUSÃO	88
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
10. ANEXOS	104
10.1 Anexo 1 – Prêmios recebidos durante o Doutorado	105
10.2 Anexo 2 – Artigos publicados e em revisão durante o doutorado	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Manifestações clínicas da psoríase .	24
Figura 2 - Distribuição global da prevalência da psoríase	25
Figura 3 - Visão geral da imunopatogênese simplificada da psoríase.	28
Figura 4 - A via de sensores citosólicos de DNA é predominantemente up regulada na pele de pacientes com psoríase.	50
Figura 5 - Os níveis de DNA livre de células estão elevados em pacientes psoriáticos.	51
Figura 6 - A expressão de AIM2 é induzida na lesão cutânea de pacientes com psoríase vulgar.	52
Figura 7 - A expressão de AIM2 é induzida na pele em modelo psoriasiforme.	53
Figura 8 - AIM2 exacerba a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme.	54
Figura 9 - Não existe diferença da morfologia da pele entre WT e Aim2 ^{-/-} . Camundongos WT (C57BL/6) e Aim2 ^{-/-} sem tratamento foram utilizados.	54
Figura 10 - AIM2 promove a liberação de mediadores inflamatórios.	55
Figura 11 - AIM2 promove a migração de células inflamatórias.	56
Figura 12 - AIM2 induz o acúmulo massivo de células Lysm ⁺ na pele agudamente.	57
Figura 13 - Caracterização da expressão de AIM2 na pele de pacientes e em modelo experimental de psoríase.	58
Figura 14 - O eixo IL-17A é necessário para induzir a expressão de AIM2 na pele com psoríase.	60
Figura 15 - Poly (dA:dT) e dsDNA são capazes de estimular queratinócitos.	61
Figura 16 - A injeção intradermal do ligante de AIM2 induz inflamação na pele semelhante à psoríase.	62
Figura 17 - A injeção intradérmica do ligante de AIM2 desencadeia uma inflamação cutânea dependente de ASC.	63
Figura 18 - ASC e Caspase-1 são necessários para o desenvolvimento da psoríase induzida por IMQ em camundongos.	64

Figura 19 - IL-1R é necessário para o desenvolvimento da psoríase induzida por IMQ em camundongos. topicamente com IMQ diariamente antes das....	65
Figura 20 - A via de sensores citosólicos de DNA e sinalização de interferon são dominantemente up regulada na pele de pacientes com psoríase.....	67
Figura 21 - A expressão de STING é aumentada na derme da área lesionada de pacientes com psoríase..	68
Figura 22 - STING reduz a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme. Camundongos WT (C57BL/6) e <i>Sting</i> ^{-/-} foram tratados topicamente com IMQ diariamente antes das análises.....	69
Figura 23 - STING modula os níveis de mediadores inflamatórios..	70
Figura 24 - STING reduz a migração de células inflamatórias..	71
Figura 25 - Linfócitos são importantes para a modulação da inflamação cutânea por STING em modelo psoriasiforme.	72
Figura 26 - Ausência de linfócitos e STING afeta os níveis de mediadores inflamatórios em modelo psoriasiforme.....	72
Figura 27 - IL-17 controla a inflamação gerada pela ausência de STING em modelo psoriasiforme.	74
Figura 28 - cGAS reduz a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme.....	75
Figura 29 - IRF3 induz a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme.....	76
Figura 30 - IFNAR reduz a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme.. .	77

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Le psoriasis est une maladie inflammatoire chronique de la peau, d'origine immunitaire, qui entraîne une défiguration et une incapacité, compromettant significativement la qualité de vie des patients. Sa principale caractéristique est l'épaississement de la peau dû à l'hyperprolifération des kératinocytes et à l'infiltration de cellules immunitaires dans le derme et l'épiderme (Nestle et al., 2009 ; Greb et al., 2016 ; Griffiths et al., 2021a). En plus des manifestations cutanées, la maladie peut affecter les ongles et les articulations et est associée à diverses comorbidités, telles que l'arthrite psoriasique, les maladies cardiovasculaires, le diabète, le syndrome métabolique et la dépression.

La maladie se manifeste sous différentes formes cliniques, notamment le psoriasis vulgaire, guttata, inversé, pustuleux et érythrodermique, la forme vulgaire étant la plus fréquente. Les symptômes incluent des démangeaisons, des sensations de brûlure et des douleurs, avec une étendue variable des lésions cutanées. La maladie suit une évolution cyclique, alternant entre des périodes d'exacerbation et de rémission (Greb et al., 2016 ; Griffiths & Barker, 2007). À l'échelle mondiale, elle touche plus de 125 millions de personnes, avec une distribution géographique inégale et une prévalence plus élevée chez les individus d'ascendance caucasienne (Parisi et al., 2013 ; Tollefson et al., 2010). Son apparition survient en moyenne à l'âge de 33 ans, avec des pics entre 18-39 ans et 50-69 ans (Greb et al., 2016 ; Griffiths et al., 2021b ; Parisi et al., 2013).

L'étiologie du psoriasis est multifactorielle, résultant de l'interaction entre des facteurs génétiques et environnementaux (Griffiths et al., 2021a). Le principal facteur génétique identifié est le locus de susceptibilité au psoriasis 1 (HLA-C), en particulier l'allèle HLA-C*06:02, qui augmente le risque de développer la maladie (Nair et al., 2006 ; Okada et al., 2014 ; Zhang et al., 2014). En outre, d'autres loci de susceptibilité ont également été décrits (Capon et al., 1999 ; Karason et al., 2005 ; Lee et al., 2000 ; Sagoo et al., 2004 ; Veal et al., 2001). Parmi les facteurs environnementaux, on retrouve le stress, les infections, la consommation d'alcool, le tabagisme et l'utilisation de certains médicaments, qui peuvent agir comme déclencheurs chez les individus génétiquement prédisposés (Griffiths & Barker, 2007 ; Kumar et al., 2013). Cependant, le mécanisme exact par lequel ces facteurs déclenchent le psoriasis n'est pas encore totalement compris.

La physiopathologie du psoriasis implique une réponse immunitaire exacerbée au sein de la peau, résultant de l'interaction entre les kératinocytes et les cellules immunitaires. Leur activation entraîne la production de médiateurs inflammatoires, le recrutement de cellules dendritiques et l'activation des lymphocytes T, favorisant ainsi la libération de cytokines pro-inflammatoires (Boehncke & Schön, 2015 ; Nestle et al., 2009 ; Greb et al., 2016 ; Griffiths et al., 2021a). L'axe IL-23/IL-17 joue un rôle central dans ce processus, stimulant l'hyperprolifération des kératinocytes et perpétuant l'inflammation cutanée (Ehrchen et al., 2009a ; Gong et al., 2019 ; Greb et al., 2016 ; Jin et al., 2014).

Le système immunitaire inné est fondamental pour la réponse contre les micro-organismes, détectant les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) par le biais de récepteurs de reconnaissance des motifs (PRRs). Parmi ces récepteurs, on distingue les récepteurs de type Toll (TLRs), ceux de type NOD-like (NLRs) et ceux de type RIG-I-like (RLRs), chacun reconnaissant différentes classes de pathogènes dans des compartiments cellulaires distincts (Kanneganti, 2020). La reconnaissance des acides nucléiques, tels que l'ADN et l'ARN, est un mécanisme de défense essentiel, car

de nombreux micro-organismes libèrent leur matériel génétique dans le cytoplasme des cellules hôtes (Tan et al., 2018).

La détection de l'ADN cytoplasmique, qu'il soit endogène ou exogène, est un signal d'alerte d'infection ou de dommage cellulaire, activant des capteurs spécifiques qui déclenchent des réponses immunitaires intenses (Wu & Chen, 2014). Deux des principales voies de reconnaissance de l'ADN cytoplasmique impliquent l'activation de la protéine AIM2 et de « Stimulateur des Gènes de l'Interféron » (STING). AIM2 forme un inflammasome qui active la caspase-1, favorisant la production d'IL-1 β et d'IL-18 (Kumari et al., 2020). Quant à la voie STING, activée par des senseurs d'ADN tels que cGAS qui produisent des dinucléotides cycliques qui activent STING, elle entraîne notamment la production d'interférons de type I (Hopfner & Hornung, 2020). Ces deux voies jouent un rôle important dans l'immunité innée et peuvent être impliquées dans la pathogenèse du psoriasis.

L'activation de AIM2 joue un rôle essentiel dans la défense contre les pathogènes intracellulaires et extracellulaires, notamment les bactéries et les virus à ADN (Rathinam et al., 2010 ; Botto et al., 2019 ; Reinholz et al., 2013). Cependant, ce même mécanisme est également impliqué dans la pathogenèse des maladies auto-immunes, telles que la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux systémique (Kumari et al., 2020 ; Zhang et al., 2013 ; Yang et al., 2021). Dans le contexte du psoriasis, AIM2 a été identifié comme un gène de susceptibilité associé à la maladie (Zuo et al., 2015). Des études ont montré que son expression est augmentée dans les kératinocytes des lésions cutanées des patients atteints de psoriasis, favorisant la libération d'IL-1 β , ce qui suggère un rôle clé dans la pathogenèse de la maladie (Dombrowski et al., 2011). Toutefois, les mécanismes exacts par lesquels AIM2 module la réponse immunitaire dans le psoriasis ne sont pas encore complètement élucidés.

Tout comme AIM2, la voie STING est également impliquée dans la réponse immunitaire et inflammatoire. STING est activé par les dinucléotides cycliques (CDNs), tels que le cGAMP, produits par des senseurs d'ADN comme cGAS. Son activation déclenche une cascade de signalisation aboutissant à la production d'interférons de type I et d'autres cytokines inflammatoires (Ishikawa & Barber, 2008 ; Ablasser et al., 2013a ; Hopfner & Hornung, 2020). En plus de son rôle dans la défense antivirale, la signalisation via STING a été associée à la régulation de l'auto-immunité et de l'inflammation. Des études indiquent que son activation pourrait avoir des effets thérapeutiques dans des maladies comme la sclérose en plaques (Lemos et al., 2014 ; Johnson et al., 2021) et la colite (Canesso et al., 2018 ; Ahn et al., 2017), en modulant la production de cytokines inflammatoires et immunosuppressives.

Dans le psoriasis, cependant, le rôle de STING reste encore mal compris. Certaines recherches suggèrent que STING et IRF3 sont surexprimés dans les lésions psoriasiques et que l'inhibition de la voie STING pourrait réduire l'inflammation cutanée dans des modèles animaux (Xiaohong et al., 2022 ; Sauer et al., 2011). Malgré ces travaux, les mécanismes précis par lesquels STING influence la réponse inflammatoire dans le psoriasis restent peu clairs, soulignant la nécessité de recherches supplémentaires pour mieux comprendre sa fonction dans ce contexte.

Compte tenu de ces éléments, l'objectif principal de cette étude était d'évaluer la participation d'AIM2 (partie A) et de STING (partie B) dans l'immunopathogenèse du psoriasis.

Malgré les avancées dans la compréhension du psoriasis et le développement de thérapies efficaces, les mécanismes moléculaires impliqués dans sa pathogenèse ne sont pas encore totalement élucidés. Notre étude visait à identifier des cibles liées au développement et au maintien de la maladie. Pour ce faire, nous avons réanalysé cinq bases de données publiques, comparant l'expression des gènes entre la peau affectée et non affectée, et avons identifié l'activation des capteurs cytosoliques d'ADN comme une voie de régulation clé (Figure 4).

Parmi ces capteurs, nous avons étudié le rôle d'AIM2, dont l'expression était augmentée dans la peau lésée des patients atteints de psoriasis, mais pas dans la peau non lésée (Figure 6). De plus, nous avons constaté que les patients atteints de psoriasis présentent des niveaux élevés d'ADN libre de cellules (cfDNA) dans le plasma, suggérant son implication dans l'inflammation via l'activation de AIM2 (Figure 5). Pour approfondir cette caractérisation, nous avons utilisé un modèle murin d'inflammation cutanée induite par l'imiquimod (IMQ), qui reproduit certains aspects des lésions psoriasiques humaines. Nous avons observé une augmentation progressive de l'épaisseur de la peau et de l'expression d'AIM2, avec un pic aux jours 2 et 3 après l'application de l'IMQ, renforçant l'association de ce capteur avec l'inflammation dans le psoriasis (Figure 7).

Afin d'examiner le rôle d'AIM2 dans l'inflammation cutanée induite par l'IMQ, nous avons utilisé des souris déficientes en AIM2 (Aim2^{-/-}). Nous avons observé que ces animaux présentaient une inflammation réduite, mise en évidence par une moindre épaisseur de la peau et une infiltration cellulaire inflammatoire réduite (Figures 8-9). De plus, la délétion d'AIM2 a entraîné une diminution de l'expression des gènes associés à l'activation des kératinocytes (Krt14, Lcn2 et S100a9) ainsi qu'une réduction des cytokines et chimiokines inflammatoires, telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-17A, l'IL-18, l'IL-23 et CXCL1/KC (Figure 10). Une analyse par cytométrie de flux a révélé que l'absence de AIM2 entraînait une infiltration moindre de neutrophiles, de macrophages, de cellules dendritiques et de cellules T productrices d'IL-17A dans la peau enflammée (Figure 11). Pour confirmer son rôle dans l'inflammation, nous avons injecté un ligand de AIM2 (poly dA:dT) dans la peau de souris, observant une réponse inflammatoire rapide et intense (Figure 12). L'immunofluorescence sur des biopsies de patients atteints de psoriasis a montré une forte expression d'AIM2 dans l'épiderme lésé, principalement dans les kératinocytes. Ces résultats confirment qu'AIM2 joue un rôle clé dans l'inflammation psoriasique et contribue à la progression de la maladie (Figure 13).

Nos données démontrent que AIM2 est exprimé dans l'épiderme des patients atteints de psoriasis et dans le modèle psoriasiforme induit par l'IMQ. Nous avons étudié l'influence de l'IL-17A sur la régulation de AIM2 et observé que sa stimulation augmentait l'expression de AIM2 dans les kératinocytes humains (HaCaT). De plus, l'analyse des biopsies de patients traités par brodalumab a révélé une réduction significative de l'ARNm de AIM2, mettant en évidence une induction dépendante de l'IL-17. Les souris déficientes en IL-17RA (Il17ra^{-/-}) présentaient une inflammation cutanée réduite, des niveaux moindres de cytokines inflammatoires et une expression plus faible de AIM2 dans la peau après induction par l'IMQ. Ces résultats indiquent que l'induction de AIM2 dans le psoriasis se produit de manière dépendante de l'IL-17 (Figures 16-17).

Enfin, nous avons examiné si la fonction d'AIM2 dépendait des composants de l'inflammasome dans le psoriasis. Les souris déficientes en ASC (Pycard^{-/-}) ou en caspase-1 (Casp1^{-/-}) présentaient une réduction de l'hyperplasie cutanée et une

inflammation moindre, similaire à l'absence de AIM2 (Figure 18). En outre, l'absence d'ASC ou de caspase-1 a empêché la production d'IL-1 β , d'IL-17 et d'IL-23. De manière cohérente, l'absence du récepteur de l'IL-1 β (IL-1R) a également réduit l'inflammation et la production de ces cytokines. Ces résultats indiquent que AIM2 favorise l'inflammation cutanée dans le psoriasis de manière dépendante de l'inflammasome.

Ensuite, nous avons étudié le rôle de STING dans le psoriasis, étant donné l'augmentation des niveaux d'ADN libre et l'activation des voies de signalisation de l'ADN et de l'interféron. Des analyses par immunofluorescence ont révélé une expression accrue de STING dans le derme des zones lésées des patients atteints de psoriasis. Dans le modèle murin d'inflammation cutanée induite par l'IMQ, l'absence de STING (Sting $^{-/-}$) a entraîné un épaississement accru de la peau, un érythème, une desquamation et une infiltration inflammatoire. De plus, les souris Sting $^{-/-}$ présentaient des niveaux élevés d'IL-17, d'IL-23 et d'IL-6, mais des concentrations plus faibles d'IFN- β et d'IL-10. La cytométrie de flux a indiqué que la déficience en STING augmentait la migration des neutrophiles, des cellules dendritiques, des monocytes et des cellules T CD4 $^{+}$ vers la peau. Ces résultats suggèrent que STING joue un rôle régulateur essentiel dans l'inflammation cutanée, en modulant les médiateurs inflammatoires et le recrutement cellulaire (Figures 21-24).

Enfin, nous avons évalué le rôle de STING dans la régulation de l'inflammation cutanée du psoriasis et sa relation avec les lymphocytes et les médiateurs inflammatoires. L'absence de STING a exacerbé l'inflammation et augmenté le nombre de cellules T CD4 $^{+}$. Cependant, l'inflammation a été réduite chez les souris Sting $^{-/-}$ Rag2 $^{-/-}$, suggérant une dépendance aux lymphocytes. La neutralisation de l'IL-17 chez les Sting $^{-/-}$ a également réduit l'inflammation, indiquant que STING contrôle la production d'IL-17.

Concernant la voie classique d'activation de STING, les souris déficientes en cGAS présentaient un épaississement cutané moindre que les Sting $^{-/-}$, indiquant que STING agit indépendamment de cGAS. En revanche, l'absence d'IRF3 a intensifié l'inflammation, suggérant que la régulation inflammatoire par STING dépend d'IRF3. De plus, l'absence du récepteur de l'IFN de type I (IFNAR) a réduit l'inflammation, indiquant que STING agit indépendamment de la signalisation de l'IFN de type I. Ainsi, nos données suggèrent que STING contrôle l'inflammation cutanée via IRF3, mais sans dépendre de cGAS ou d'IFN de type I (Figures 25-30).

Nous concluons que les senseurs d'ADN AIM2 et STING jouent des rôles opposés dans l'inflammation associée au psoriasis. Chez l'humain, nous avons observé une signature génique activée pour les capteurs cytosoliques de l'ADN et une augmentation du DNA libre plasmatique. Dans le modèle préclinique, AIM2 était principalement exprimé dans l'épiderme, tandis que STING l'était dans le derme. AIM2 favorise l'inflammation psoriasiforme en augmentant les cytokines, les chimiokines et la prolifération des kératinocytes, son expression étant induite par l'IL-17A. En revanche, STING exerce un effet protecteur, réduisant les cytokines pro-inflammatoires, augmentant les cytokines anti-inflammatoires et limitant la migration des cellules immunitaires. De plus, STING régule l'inflammation via IRF3, indépendamment de cGAS et d'IFNAR. Ces résultats suggèrent qu'AIM2 et STING sont des modulateurs clés de l'inflammation cutanée et des cibles thérapeutiques potentielles pour les maladies inflammatoires médiées par l'IL-17.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pele: características gerais e anatomia imunológica

A pele representa o maior órgão do corpo humano e desempenha um papel fundamental como uma barreira protetora contra agressões externas. Contudo, essa função protetora não se limita apenas à defesa física, mas também engloba importantes funções imunológicas. Portanto, a proteção fornecida pelo tegumento não é apenas passiva, mas também envolve a participação ativa e integrada do sistema imunológico local. O sistema imunológico da pele trabalha constantemente para manter um equilíbrio entre as respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. A integridade estrutural e funcional da pele é crucial para que ela possa desempenhar de forma eficaz suas diversas funções (MARANDUCA et al., 2020; KABASHIMA et al., 2018).

A epiderme, a camada mais superficiais da pele, desempenha a função de barreira cutânea. É constituída por 4-5 camadas de células, incluindo a camada basal, camadas córneas, camada granular, camada clara ou translúcida (presente apenas nas palmas das mãos e plantas dos pés) e a camada espinhosa. A epiderme funciona como três linhas de defesa: uma barreira física que limita a agressão mecânica e a penetração de patógenos; uma barreira química, com papel antimicrobiano; e uma barreira contra a perda de água e eletrólitos. Cerca de 90% da epiderme é composta por queratinócitos, além deles, estão presentes células do sistema imune, como as células de Langerhans (LCs), que são um subconjunto exclusivo de células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs), e residem entre os queratinócitos. Além das LCs, dois subconjuntos de linfócitos T podem ser encontrados na epiderme: os linfócitos T $\gamma\delta$ do subtipo V γ 5 e linfócitos T CD8 residentes de memória (KABASHIMA et al., 2018; NESTLE et al., 2009).

Logo abaixo da epiderme encontra-se a derme e está conectada a ela por meio de uma camada de tecido adiposo chamada hipoderme. Na derme, uma variedade de células está presente, incluindo fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imunológico, como células dendríticas dérmicas (DCs), DCs plasmocitoides, macrófagos, mastócitos, linfócitos T $\gamma\delta$ dos subtipos V γ 4 e V γ 6, e células linfoides inatas (ILCs) (KABASHIMA et al., 2018; NESTLE et al., 2009). Em condições de equilíbrio, há uma quantidade reduzida de neutrófilos, monócitos e linfócitos T TCR $\alpha\beta$ circulando pela derme.

No entanto, em resposta a estímulos inflamatórios, células imunes se acumulam rapidamente nesta camada. Anatomicamente, a derme é caracterizada por uma matriz extracelular (MEC) abundante, composta por fibras de colágeno e elastina que preenchem os espaços extracelulares. A MEC fornece um suporte estrutural favorável à migração de células do sistema imunológico. Os vasos sanguíneos e linfáticos estão distribuídos estrategicamente ao longo da MEC (KABASHIMA et al., 2018; NESTLE et al., 2009).

A homeostase cutânea é mantida pela coordenação e comunicação permanentes entre as células epiteliais e as células imunes na pele. Qualquer interrupção na microbiota da pele e/ou nos mecanismos de reparo da pele leva a processos cutâneos inflamatórios, a um desequilíbrio entre fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios e ao surgimento de doenças dermatológicas inflamatórias, como a psoríase (MARANDUCA et al., 2020; KABASHIMA et al., 2018).

1.2 Psoríase: aspectos gerais e manifestações clínicas

A psoríase é uma doença inflamatória crônica, mediada pelo sistema imunológico, não contagiosa, dolorosa e que causa desfiguração e incapacitação, reduzindo a qualidade de vida dos pacientes. Essa doença afeta principalmente a pele, e é caracterizada pelo aumento da espessura cutânea decorrente da ativação acentuada de queratinócitos e células do sistema imune que infiltram a derme e epiderme (FRANK NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009; GREB et al., 2016; GRIFFITHS et al., 2021a). Além da pele, pode ocorrer a manifestação da psoríase nas unhas e articulações, e também estar associada com o alto risco de desenvolver comorbidades, tais como, artrite psoriática, distúrbios cardiovasculares, diabetes, síndrome metabólica e depressão.

A psoríase pode apresentar-se em diversas formas clínicas, como psoríase vulgar, psoríase gutata, psoríase inversa, psoríase pustulosa e psoríase eritrodérmica, e é possível que um mesmo indivíduo desenvolva múltiplos fenótipos (GRIFFITHS & BARKER, 2007). A psoríase vulgar é a manifestação mais comum e os sintomas que são compartilhados por todos os fenótipos são coceira, queimação e dor. A extensão do envolvimento da pele é variável e a maioria dos tipos de psoríase tem uma evolução cíclica, com exacerbação da lesão por algumas semanas ou meses, depois a redução por

algum tempo ou até mesmo entrando em um período de remissão (GREB et al., 2016; GRIFFITHS & BARKER, 2007).

Psoríase vulgar – É marcada por áreas delimitadas de placas eritematosas e endurecidas, cobertas por uma escama prateada. Os locais frequentemente afetados incluem os joelhos, cotovelos, couro cabeludo e tronco (GREB et al., 2016; GRIFFITHS & BARKER, 2007) (Figura 1a)

Psoríase gutata – É o segundo tipo mais comum. Caracterizada por pequenas manchas vermelhas, geralmente em forma de gota, que aparecem na pele. Essas manchas podem se espalhar pelo corpo e são frequentemente acompanhadas por descamação. A psoríase gutata geralmente ocorre em crianças e adultos jovens e pode ser desencadeada por infecções bacterianas, como infecções estreptocócicas da garganta (GREB et al., 2016; GRIFFITHS & BARKER, 2007) (Figura 1b).

Psoríase inversa – Caracterizada por placas eritematosas nas dobras corporais, a psoríase inversa é distinta por sua ausência de descamação devido ao aumento da umidade nessas áreas. Muitos indivíduos com esse tipo de psoríase podem também apresentar outros subtipos simultaneamente (GREB et al., 2016; GRIFFITHS & BARKER, 2007) (Figura 1c).

Psoríase pustulosa – Caracterizada por pústulas estéreis sobre uma base eritematosa, a psoríase pustulosa é predominantemente observada em adultos. Comumente localizada nas mãos e pés, essa condição tende a progredir através de um ciclo que inclui eritema, formação de pústulas e descamação subsequente (GREB et al., 2016; GRIFFITHS & BARKER, 2007) (Figura 1d).

Psoríase eritrodérmica – Esta é a forma mais grave de psoríase, podendo ser potencialmente fatal. Caracteriza-se pela presença de eritema disseminado em, pelo menos, 90% do corpo, resultando em intensa coceira e dor, além de uma descamação excessiva da pele. Afeta aproximadamente 3% dos pacientes com psoríase, geralmente manifestando-se em indivíduos com psoríase vulgar instável (GREB et al., 2016; GRIFFITHS & BARKER, 2007) (Figura 1e).



Figura 1 - Manifestações clínicas da psoríase. Ilustração representativa de pacientes com: A) Psoríase vulgar, B) Psoríase gutata, C) Psoríase inversa, D) Psoríase pustulosa, E) Psoríase eritrodérmica. Adaptado de Greb et al 2016.

1.3 Distribuição global da psoríase

A psoríase afeta mais de 125 milhões de adultos e crianças em todo o mundo (GREB et al., 2016). Entretanto sua prevalência é conhecida em apenas 19% dos países ao redor do mundo, e essa prevalência é distribuída de forma desigual entre diferentes regiões geográficas. É mais comum em indivíduos de origem caucasiana. A incidência da doença varia consideravelmente, desde 0,1% no leste da Ásia até 1,5% na Europa Ocidental, sendo mais alta em países de alta renda (PARISI et al., 2013; TOLLEFSON et al., 2010) (Figura 2). Em relação ao Brasil, a escassez de estudos sobre a prevalência da psoríase dificulta a obtenção de dados precisos, embora se estime que aproximadamente 1% da população seja afetada por essa condição. Um levantamento realizado pela Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD) indicou que os residentes da região sul do país apresentam o dobro da incidência em comparação com aqueles na região norte (DI MEGLIO & NESTLE, 2017; ROMITI et. al., 2017).

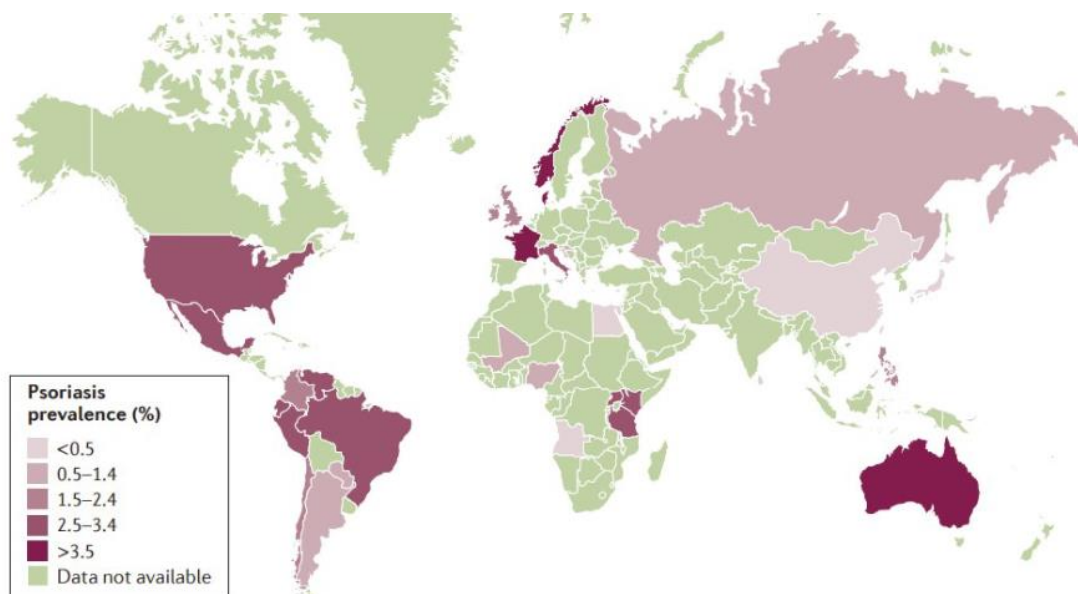


Figura 2 - Distribuição global da prevalência da psoríase. Uma revisão sistemática de estudos internacionais de base populacional demonstrou uma prevalência global de psoríase em adultos variando de 2,7% nos Estados Unidos a 8,5% na Noruega. As taxas de prevalência mais baixas foram observadas em índios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

A psoríase não faz distinção entre homens e mulheres e geralmente se manifesta em torno dos 33 anos de idade, embora o início possa ser influenciado por fatores genéticos e ambientais. Embora possa ocorrer em qualquer idade, há evidências de duas fases distintas de início da doença, conhecidas como distribuição bimodal. A primeira fase ocorre entre os 18 e 39 anos, enquanto a segunda fase é observada entre os 50 e 69 anos (GREB et al., 2016; GRIFFITHS et al., 2021b; PARISI et al., 2013). Além disso, esta doença apresenta um alto impacto econômico com custos direto entre 51,7 a 63,2 bilhões dólares e custos indiretos entre 23,9 a 35,4 bilhões dólares (BREZINSKI, DHILLON, & ARMSTRONG, 2015).

1.4 Etiologia da Psoríase

A causa da psoríase é multifacetada, resultante da interação entre elementos genéticos e ambientais (GRIFFITHS et al., 2021a). A relação entre fatores genéticos e psoríase foi inicialmente estabelecida por meio de estudos epidemiológicos com gêmeos e famílias. A hereditariedade é o principal determinante de risco para o desenvolvimento da psoríase, com gêmeos monozigóticos apresentando um risco duas a três vezes maior em comparação com gêmeos dizigóticos (SUN et al., 2010; TSOI et al., 2017; ZHANG et al.,

2014). Estudos de associação do genoma têm desempenhado um papel crucial na identificação de locais de susceptibilidade de alto risco para a psoríase, com mais de 80 locais genéticos contribuindo para aproximadamente 30% da hereditariedade da doença. O perfil genético da psoríase é fortemente influenciado pela variação no locus de susceptibilidade à psoríase 1 (HLA-C; anteriormente conhecido como PSORS1), que engloba genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), responsáveis pela codificação dos antígenos leucocitários humanos (HLAs). Entre esses padrões genéticos, o HLA-C*06:02 é considerado o principal fator de risco genético para o desenvolvimento da psoríase na população (NAIR et al., 2006; OKADA et al., 2014; ZHANG et al., 2014). A presença de pelo menos um alelo aumenta o risco de psoríase em quatro a cinco vezes (SUN et al., 2010; TSOI et al., 2017; ZHANG et al., 2014). Outros padrões genéticos, como o HLA-B13, HLA-B17, HLA-B37, HLA-Bw16, HLA-Bw57 e HLA-DR7, também estão associados a um maior risco de desenvolvimento da psoríase (OKADA et al., 2014). Além dos loci do MHC, foram identificados outros 17 loci de susceptibilidade, incluindo mutações nas regiões de susceptibilidade à psoríase 2 (PSORS2) na região 17q24-q25, que abrange o gene CARD14, PSORS4 no complexo de diferenciação da epiderme, PSORS7 no cromossomo 1p, que inclui o loci do receptor de IL-23 (IL23R), e PSORS6 no cromossomo 19p13, que abrange o loci das tirosinas quinases (CAPON et al., 1999; KARASON et al., 2005; LEE et al., 2000; SAGOO et al., 2004; VEAL et al., 2001).

A psoríase pode ser desencadeada em pessoas com predisposição genética por uma variedade de estímulos ambientais, como estresse, infecções (especialmente estreptocócicas), consumo de álcool, tabagismo, exposição a medicamentos como lítio, antimaláricos e anti-inflamatórios não esteroides, e, em certos casos, exposição à luz solar (GRIFFITHS; BARKER, 2007; KUMAR et al., 2013). Entretanto, apesar de se saber os fatores que contribuem para o desenvolvimento da psoríase, o gatilho exato ainda é desconhecido. Ou seja, ainda não foi identificado um único fator desencadeante universal. Essa falta de compreensão completa do gatilho da psoríase continua sendo um desafio significativo na pesquisa e no tratamento da doença.

1.5 Fisiopatologia da psoríase

Até meados dos anos 90 acreditava-se que a patogênese da psoríase estava principalmente ligada à ativação e proliferação de queratinócitos. No entanto, atualmente compreendemos que o sistema imunológico desempenha um papel central no desenvolvimento e na persistência da doença (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015; FRANK NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009; GREB et al., 2016; GRIFFITHS et al., 2021a). Sendo marcada por eventos celulares que resultam na desregulação dos componentes celulares responsáveis pela resposta imune da barreira da pele, levando a uma resposta inflamatória crônica (LOWES et al., 2007). Dentre essas desregulações, a que vem sendo citada como a principal desencadeadora da doença, é o ‘crosstalk’ de forma exacerbada entre queratinócitos e células do sistema imune na pele.

Estudos pré-clínicos fornecem evidências de que a liberação de mediadores pelos queratinócitos desempenha um papel central no início da patogênese da psoríase, especialmente através da ativação das células dendríticas (DCs) e subsequente ativação dos linfócitos T. A catelicidina LL-37, liberada por queratinócitos ativados, forma um complexo com o DNA próprio, reconhecido pelas células dendríticas plasmocitoides (pDCs) via TLR9, induzindo a produção de interferon alfa (IFN- α). Essas citocinas, juntamente com outras secretadas pelos queratinócitos, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , ativam diretamente as DCs na derme, resultando na produção de IL-12 e IL-23. Isso leva à ativação de linfócitos T naive em linfócitos Th1 e Th17 nos gânglios linfáticos drenantes da pele, respectivamente. Além disso, os linfócitos T $\gamma\delta$ residentes na derme podem ser ativados na pele, iniciando a cascata inflamatória. Os linfócitos T ativados produzem citocinas como IL-17A, IL-22, IFN- γ e TNF- α , que ativam diretamente os queratinócitos, induzindo a produção de citocinas e quimiocinas adicionais, como TNF- α e CXCL-1, essenciais para o recrutamento de neutrófilos e linfócitos T adicionais, ampliando ainda mais a cascata inflamatória na psoríase (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015; GRIFFITHS et al., 2021b; PANTELYUSHIN et al., 2012) (Figura 3)

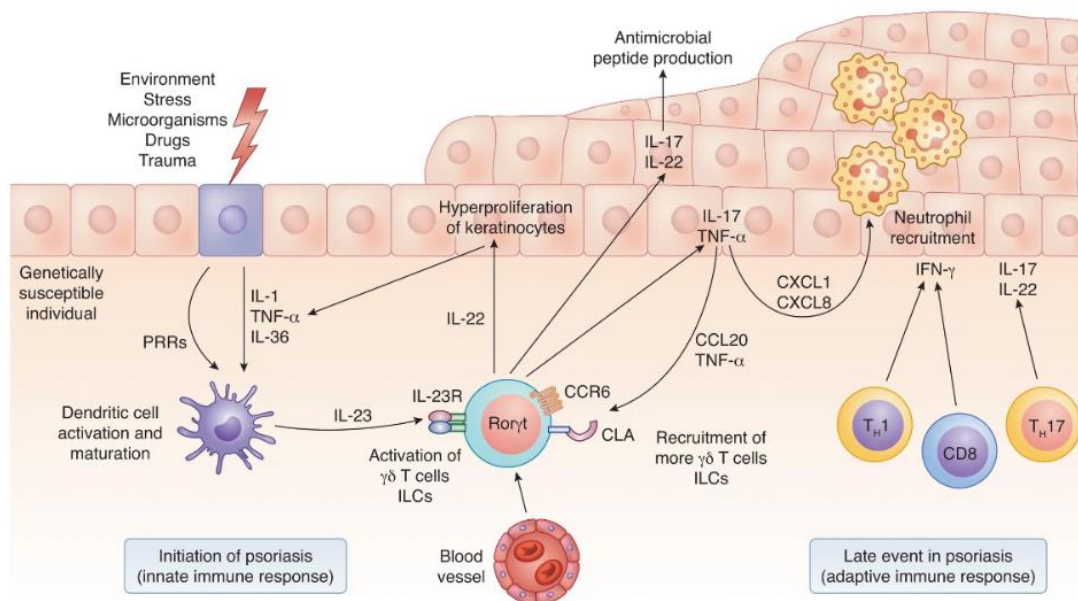


Figura 3 - Visão geral da imunopatogênese simplificada da psoríase. Diversos estressores pode desencadear a ativação das células dendríticas (DCs) diretamente, através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), ou indiretamente, por meio do estresse nos queratinócitos (resultando na liberação de IL-1, TNF- α e IL-36). As DCs sensíveis ao estresse são capazes de produzir IL-23, que por sua vez ativa os linfócitos T $\gamma\delta$ e as células linfoides inatas (ILCs) para a produção de IL-17 e IL-22, constituindo um evento inicial na psoríase mediado pela resposta imune inata. Além disso, os linfócitos T helper 1 (Th1) e Th17 são ativados nos linfonodos drenantes da pele e, por meio de um gradiente de quimiocinas, migram de volta para a pele, onde produzem citocinas como IFN- γ e IL-17a, respectivamente. Essas citocinas ativam diretamente os queratinócitos e amplificam a resposta inflamatória na psoríase. Adaptado de Becher, B. et al, 2012.

A fisiopatologia da psoríase é complexa e multifatorial, envolvendo uma rede intrincada de células e mediadores moleculares. Entretanto, um corpus crescente de evidências na literatura sugere que a doença é predominantemente mediada por vias imunológicas cutâneas, especialmente o eixo IL-23/IL-17. A ativação desse eixo desencadeia uma cascata de eventos que inclui a ativação de queratinócitos. Essas células liberam uma variedade de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, peptídeos antimicrobianos e alarminas, que contribuem para a amplificação e manutenção da resposta inflamatória característica da psoríase (EHRCHEN et al., 2009a; GONG et al., 2019; GREB et al., 2016; JIN et al., 2014). Terapias direcionadas especificamente para esta cascata de sinalização têm demonstrado eficácia clínica substancial no manejo de pacientes com formas moderadas a graves da condição (GHORESCHI et al., 2021).

1.6 Sensores de DNA

O sistema imunológico inato constitui a primeira linha de defesa do organismo hospedeiro, reconhecendo infecções microbianas através dos receptores de reconhecimento de padrões (Pattern Recognition Receptors; PRRs). Esses receptores reconhecem estruturas conservadas essenciais para o ciclo de vida dos patógenos, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (Pathogen-Associated Molecular Patterns; PAMPs), desencadeando vias de sinalização intracelular que resultam na ativação de fatores de transcrição e na produção de citocinas para conter a infecção (BRUBAKER et al., 2015). Dessa forma, a resposta imunológica inata também contribui para a geração de uma resposta adaptativa eficaz.

Atualmente, uma variedade de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) são descritos, incluindo os receptores do tipo Toll (TLRs), os receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (NLRs) e os receptores do tipo RIG-I (RLRs). Esses receptores diferem em relação ao compartimento celular em que estão localizados e à natureza do padrão molecular associado ao patógeno (PAMP) que reconhecem (KANNEGANTI, 2020). Por exemplo, os TLRs 3, 7, 8, 9 e 13 estão presentes em endolisossomos e respondem a diferentes ácidos nucleicos derivados de vírus e bactérias que entram nas células hospedeiras por endocitose (FITZGERALD; KAGAN, 2020). Por outro lado, os sensores do tipo RLRs, como RIG-I, MDA5 e LGP2, reconhecem o RNA de fita única (ssRNA) ou dupla fita (dsRNA) liberados no citoplasma das células hospedeiras durante uma infecção (REHWINKEL; GACK, 2020). Dessa forma, o reconhecimento de ácidos nucleicos tornou-se um importante mecanismo da imunidade inata para iniciar respostas antimicrobianas, considerando que microrganismos invasores, como vírus, utilizam DNA e/ou RNA para replicação e liberam esses genomas no citoplasma das células hospedeiras (TAN et al., 2018).

Sob condições fisiológicas, o material genético em células eucarióticas é primariamente confinado ao núcleo e às mitocôndrias. A presença de DNA no citoplasma, portanto, pode sugerir uma perturbação celular, seja por infecção ou lesão. Esse DNA, seja de origem endógena ou exógena, pode servir como um sinal intrínseco de alerta, conhecido como padrão molecular associado ao dano (damage-associated molecular pattern; DAMP). Em ambas as situações, a presença de DNA citoplasmático é capaz de ativar sensores específicos no

citoplasma celular, desencadeando respostas imunes robustas (WU; CHEN, 2014).

Nesse contexto, surgem duas vias importantes para o reconhecimento de DNA no citoplasma: a via mediada pela proteína AIM2 (absent in melanoma 2) e a via de ativação do Estimulador de Genes de Interferon (STING). A ativação do AIM2 pelo DNA desencadeia a formação do inflamassoma, envolvendo a proteína ASC, resultando na ativação da caspase-1 para a maturação e produção de IL-1 β e IL-18 por clivagem proteolítica, além da indução de piroptose (KUMARI et al., 2020). Por outro lado, a ativação da via de sinalização do STING ocorre predominantemente por meio de sensores de DNA, como a enzima cGAS (cyclic GMP-AMP synthase), que gera dinucleotídeos cíclicos capazes de se ligar ao STING, desencadeando a ativação da quinase TBK1 (TANK-binding kinase 1) e do fator IRF-3 (Interferon Regulatory Factor 3), resultando na produção de interferons (IFN) do tipo I (HOPFNER; HORNUNG, 2020).

1.7 Absent in melanoma 2 (AIM2)

A estrutura do AIM2 tem sido amplamente investigada desde sua descoberta como um sensor de DNA. Os membros desta família incluem proteínas que são caracterizadas por um domínio de sequência conservado de aproximadamente 200 aminoácidos (DAWSON; TRAPANI, 1996). Estruturalmente, o AIM2 é composto por um domínio HIN (Hematopoietic, Interferon-Inducible, and Nuclear Localization) localizado no terminal C e um domínio PYD (Pyrin) no terminal N (WANG; TIAN; YIN, 2019).

O domínio HIN é essencial para a ligação do DNA de dupla fita no citoplasma. Este domínio é composto por duas dobras de OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding), que se conectam às duas fitas de DNA. Isso explica por que o receptor AIM2 reconhece DNA de dupla fita em vez de DNA de fita simples (JIN et al., 2012; THEOBALD; MITTON-FRY; WUTTKE, 2003). A ligação do DNA de dupla fita no domínio HIN-200 do AIM2 ocorre por meio de interações eletrostáticas, onde os resíduos de arginina e lisina carregados positivamente nas dobras OB se associam aos fosfatos carregados negativamente na estrutura da ribose do DNA (WANG; TIAN; YIN, 2019; WANG; YIN, 2017). A ativação do AIM2 por DNA de dupla fita é independente da sequência de DNA, mas depende do seu tamanho, sendo que

70 pares de bases de DNA de dupla fita é o tamanho mínimo necessário para ativar o AIM2 (JIN et al., 2012). Curiosamente, a ativação do AIM2 ocorre mais rapidamente na presença de moléculas de DNA de dupla fita longas, como aquelas com 300 pares de bases, o que sugere que o tamanho da molécula de DNA é um fator importante na regulação da ativação do AIM2 (MATYSZEWSKI; MORRONE; SOHN, 2018).

O domínio PYD do AIM2 desempenha um papel crucial no recrutamento da proteína adaptadora ASC durante a formação do inflamassoma (HYUN et al., 2007). Este domínio PYD se liga diretamente ao domínio PYD da ASC, resultando na montagem de filamentos helicoidais que permitem a oligomerização do inflamassoma do AIM2 (WANG; TIAN; YIN, 2019). Após a ligação da dupla fita de DNA no domínio HIN-200, ocorre uma mudança conformacional que libera o domínio PYD do HIN-200, tornando-o acessível para interagir com o domínio PYD da ASC (JIN et al., 2012). A ASC é uma molécula adaptadora que recruta a caspase-1 por meio da interação entre os domínios CARD de ambas as moléculas (WANG; TIAN; YIN, 2019). A formação do inflamassoma do AIM2 facilita a proximidade das moléculas de caspase-1, levando à geração autocatalítica de moléculas de caspase-1 ativas e à subsequente clivagem proteolítica das citocinas pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas maduras (KUMARI et al., 2020).

Inicialmente foi amplamente estudado a ativação de AIM2, que desencadeia uma resposta imune, frente ao reconhecimento e a resposta aos diferentes tipos de patógenos (KUMARI et al., 2020). Por exemplo, ativação do inflamassoma de AIM2 promove um papel protetor contra bactérias intracelulares e extracelulares. Bactérias como *Listeria* e *Francisella* são bactérias intracelulares capazes de se replicar no interior de macrófagos e células dendríticas. AIM2 é ativado pelo dsDNA destas bactérias após a lise das mesmas e liberação do DNA no citoplasma (RATHINAM et al., 2010). Em relação a infecções por vírus de DNA, estudos anteriores demonstraram que o DNA do Citomegalovírus murino (MCMV) induz a ativação de AIM2 em macrófagos e células dendríticas, resultando na produção de IL-1 β e IL-18 dependente da ativação de caspase-1. Além disso, a ativação de AIM2 é associada ao controle da replicação viral (RATHINAM et al., 2010). De maneira semelhante, o Citomegalovírus humano (HCMV) induz a ativação de AIM2 e a produção de IL-1 β em células THP1 (BOTTO et al., 2019). AIM2 também

responde à infecção pelo vírus vaccínia em macrófagos e células dendríticas, assim como ao vírus da hepatite B (HBV) e ao papilomavírus humano (HPV) (REINHOLZ et al., 2013).

Há um número crescente de estudos que destacam a relevância do AIM2 na regulação de respostas inflamatórias indesejadas, dentre elas, artrite e lúpus eritematoso sistêmico (KUMARI et al., 2020). A deficiência de AIM2 foi associada a um menor desenvolvimento de artrite reumatoide, acompanhada pela redução na infiltração de macrófagos, inflamação articular e danos ósseos e cartilaginosos (JAKOBS; PERNER; HORNING, 2015). Em relação ao lúpus eritematoso sistêmico foi demonstrado que a supressão de AIM2 resulta em uma melhora notável da doença, inibindo a ativação de macrófagos e reduzindo a resposta inflamatória em camundongos (ZHANG et al., 2013). Ademais, há relato que a ausência de AIM2 em linfócitos B está associada à proteção contra o desenvolvimento do LES. Essas descobertas sugerem que a expressão de AIM2 em linfócitos B desempenha um papel crucial na diferenciação dessas células e contribui para a patogênese da doença (YANG et al., 2021).

No contexto da psoríase, o AIM2 foi identificado como um gene/locus de susceptibilidade associado à psoríase (ZUO et al., 2015). Um dos poucos estudos que explorou a relevância de AIM2 na psoríase, demonstrou que a expressão de AIM2 está aumentada em queratinócitos de lesões cutâneas de pacientes com psoríase, e sua ativação em queratinócitos *in vitro* leva à liberação de IL-1 β , sugerindo que o AIM2 está envolvido na patogênese da psoríase (DOMBROWSKI et al., 2011). No entanto, ainda não foi elucidada a contribuição do AIM2 na modulação da resposta imune durante o desenvolvimento e persistência da psoríase.

1.8 Estimulador de Genes de Interferon (STING)

STING, também conhecida como MITA, ERIS ou MPYS, é codificada pelo gene TMEM173 (Tmem173 em camundongos) e desempenha um papel crucial na resposta imune inata aos ácidos nucleicos (ISHIKAWA; BARBER, 2008; SUN et al., 2009; ZHONG et al., 2008).

A proteína adaptadora STING é composta por 379 aminoácidos em humanos ou 378 em camundongos. Em condições de homeostase, está localizada no citoplasma adjacente ao retículo endoplasmático (RE). Sua estrutura inclui uma região N-terminal, um domínio transmembrana com quatro segmentos, uma região conectora, um domínio citosólico de ligação ao ligante

(ligand-binding domain; LBD) e uma cauda C-terminal (C-terminal tail; CTT) (HUANG et al., 2012; OUYANG et al., 2012; SHANG et al., 2012, 2019).

A ativação de STING pode ocorrer através de vários sensores de DNA citoplasmáticos, incluindo IFI16 (proteína 16 induzida pelo interferon gama) (JØNSSON et al., 2017; UNTERHOLZNER et al., 2010), DDX41 (DEAD-box helicase 41) (ZHANG et al., 2011b) e cGAS (cyclic GMP-AMP synthase), este último amplamente estudado na literatura. cGAS possui um domínio catalítico e dois sítios de ligação ao DNA, permitindo sua interação com o dsDNA citoplasmático e ativando-o para sintetizar o dinucleotídeo cíclico (cyclic dinucleotide; CDN) cGAMP utilizando ATP e GTP como substratos (ABLASSER et al., 2013a; SUN et al., 2013). Além disso, estudos recentes demonstraram que os CDNs produzidos por cGAS podem ser exportados para o meio extracelular, onde atuam como imunotransmissores, ativando STING em outras células imunes presentes no ambiente (CAROZZA et al., 2020).

A interação entre STING e CDNs, como cGAMP, c-di-AMP e c-di-GMP, induz mudanças conformacionais e a oligomerização de STING (BURDETTE et al., 2011; ISHIKAWA; MA; BARBER, 2009). Isso promove sua translocação do retículo endoplasmático para compartimentos perinucleares, como o complexo de Golgi, endossomos e autofagossomos, por meio de um processo mediado por vesículas do complexo II de proteínas do envoltório (COPII) (DOBBS et al., 2015; MUKAI et al., 2016; SAITOH et al., 2009; ZHANG et al., 2019). Também já foi demonstrado que STING tem a capacidade de se ligar diretamente ao dsDNA, entretanto os detalhes precisos dessa interação ainda estão por ser totalmente esclarecidos (ABE et al., 2013). No entanto, a ativação de STING desempenha um papel fundamental na resposta ao reconhecimento de dsDNA citoplasmático.

Com a sua ativação e subsequente translocação intracelular, a proteína STING expõe o seu domínio C-terminal, que atua como um local de ancoragem para a proteína quinase TBK1. Esta, por sua vez, sofre autofosforilação em seu resíduo S172 e catalisa a fosforilação de STING em S366 (em humanos) ou S365 (em camundongos). Adicionalmente, após a translocação para o complexo de Golgi, ocorre a palmitoilação dos resíduos de cisteína C88 e C91 de STING, uma modificação pós-traducional crucial para a sinalização eficaz da proteína (MUKAI et al., 2016). Concomitantemente à ativação de STING, TBK1 promove o recrutamento e fosforilação de IRF3 em S396,

desencadeando a sua dimerização e subsequente translocação nuclear (CHEN; SUN; CHEN, 2016; TANAKA; CHEN, 2012; ZHANG et al., 2019). No núcleo, IRF3 instiga a transcrição de genes envolvidos na resposta imune inata, notadamente os interferons do tipo I (LIU et al., 2015; TANAKA; CHEN, 2012). Ademais, a ativação da cascata STING-TBK1 pode recrutar a quinase IKK, que, por sua vez, fosforila o inibidor do fator nuclear NF- κ B (I κ B α), propiciando a ativação e translocação nuclear de NF- κ B para a transcrição de genes inflamatórios (ABE; BARBER, 2014; DUNPHY et al., 2018). No entanto, a montagem do sinalossoma STING-TBK1-IRF3 representa a via canônica de ativação de STING.

Além de desencadear uma resposta antiviral nas células, a cascata de sinalização induzida pelos interferons do tipo I também engloba outras vias que resultam na expressão de efetores antibacterianos, citocinas, quimiocinas e moléculas metabólicas. Isso confere à sinalização mediada por interferons do tipo I uma diversidade funcional, com efeitos tanto pró-inflamatórios quanto anti-inflamatórios (IVASHKIV; DONLIN, 2014). Por exemplo, os interferons do tipo I têm sido associados à indução da produção de IL-10, uma citocina imunossupressora potente com amplos efeitos sobre as células do sistema imune inato e adaptativo (CHANG et al., 2007; JIANG et al., 2016; MCNAB et al., 2014).

É bem estabelecido que o reconhecimento de DNA próprio pelo sistema imunológico pode desencadear a quebra da tolerância e contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes, o que tem motivado pesquisadores a explorar o papel do reconhecimento de DNA endógeno nesse processo (ZHANG et al., 2022). De maneira geral, a produção crônica de interferons do tipo I tem sido associada ao desenvolvimento dessas condições patológicas.

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune que afeta o sistema nervoso central, resultando em neuroinflamação e desmielinização. A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é um modelo amplamente utilizado para estudar a EM. Em estudos prévios, observou-se que o a ativação de STING com nanopartículas de DNA (DNPs) ou com o CDN c-di-GMP reduziu significativamente os sinais clínicos da EAE, além de suprimir a produção de citocinas inflamatórias por células esplenocíticas após reestimulação antigênica in vitro (LEMOS et al., 2014). Notavelmente, a ativação de STING durante esse processo desencadeou a expressão de

indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1) em células hematopoiéticas. A IDO1, uma enzima envolvida no metabolismo do triptofano, também exerce funções tolerogênicas, regulando negativamente a produção de citocinas inflamatórias e suprimindo respostas mediadas por células T, contribuindo assim para a prevenção da autoimunidade (MUNN; MELLOR, 2013). Estudos mais recentes demonstraram que a terapia com injeção de micropartículas encapsuladas com o CDN cGAMP (cGAMP MP) em animais com EAE resultou em uma redução significativa nos parâmetros clínicos da doença, com um início tardio da mesma. Esse efeito terapêutico foi associado à indução da produção de IL-27, tanto por mecanismos dependentes quanto independentes de IFNs do tipo I. Importante ressaltar que esses efeitos terapêuticos foram abolidos em animais com mutações disfuncionais em STING (JOHNSON et al., 2021)

No cenário de mucosa intestinal, foi investigado o papel dos CDNs produzidos pela microbiota intestinal na ativação do eixo STING-IFN do tipo I para a manutenção da homeostase local. Eles observaram que a deficiência de STING exacerbou a colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS), resultando em níveis reduzidos de IL-10 nos linfonodos mesentéricos e aumento da concentração de IL-17 no cólon dos animais. Além disso, utilizando um modelo de colite induzida por transferência de células T, eles demonstraram que as células T CD4⁺ deficientes em STING foram capazes de induzir uma inflamação intestinal mais grave (CANESSO et al., 2018). Esses achados foram corroborados por outro estudo que mostrou que os CDNs derivados da microbiota ativam STING em fagócitos mononucleares, resultando na produção de IL-10 para prevenir a inflamação e promover a homeostase intestinal (AHN et al., 2017)

Ao que tange ao papel de STING na psoríase há uma escassez de estudos abordando qual seria o papel na modulação dessa doença. Um dos poucos estudos existente, demonstrou que existe uma regulação positiva da expressão de STING e IRF3 na área lesionada de pacientes com psoríase e diabetes. Em camundongos diabéticos com psoríase, após o tratamento com C-156, inibidor de STING, houve uma melhora na resposta inflamatória do tecido cutâneo (XIAOHONG, et al., 2022). Além desse, outro trabalho que utilizou os STING^{Gt}, (Goldenticket), que possuem uma mutação (substituição I199N) na proteína STING, tornando-a inativa (SAUER et al., 2011), foi observado uma melhora na resposta inflamatória em modelos semelhantes a

psoríase. No entanto, esses estudos não esclareceram os mecanismos pelos quais o STING e a cascata de sinalização desencadeada por sua ativação podem modular a resposta inflamatória durante o desenvolvimento da psoríase.

Diante de tudo que foi exposto, entender os mecanismos pelo qual os sensores de DNA citósolico modula a resposta inflamatória na psoríase, além de contribuir para o entendimento do mecanismo fisiopatológico da psoríase, possibilitaria apontar novos caminhos para o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas ou de diagnósticos mais eficientes para melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos pela doença.

Hipótese

2. HIPÓTESE

Diversos estudos têm demonstrado que os receptores de ácidos nucleicos desempenham um papel significativo na fisiopatologia de doenças inflamatórias. Sendo assim, a hipótese de nosso trabalho é que o DNA extracelular leva à ativação de AIM2 (parte A) e STING (parte B), induzindo a modulação de vias inflamatórias e contribuindo assim para a resposta imune na psoríase.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a participação de AIM2 (parte A) e STING (parte B) na imunopatogênese da psoríase.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar o perfil transcricional da pele de pacientes com psoríase;
- Quantificar a concentração do DNA circulante livre em plasma de pacientes com psoríase;
- Caracterizar a expressão de AIM2 e STING em modelo psoriasiforme induzido por IMQ e em pele de pacientes com psoríase
- Avaliar o papel de AIM2 e STING em modelo psoriasiforme induzido por IMQ;
- Investigar os mecanismos pelo qual AIM2 e STING modula a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme induzido por IMQ
- Verificar se os componentes das vias de sinalização de AIM2 e STING estão envolvidas na resposta inflamatória em modelo psoriasiforme induzido por IMQ

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Pacientes

A viabilização desta parte do estudo conta com a participação de equipe médica da Divisão de Dermatologia, sob a coordenação da Profa. Cacilda da Silva Souza. Foram convidados a participar do estudo pacientes em seguimento no Ambulatório de Psoríase do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP). O convite foi realizado pessoalmente no horário de funcionamento dos ambulatórios. Amostras da biópsia da pele foram coletadas de 22 pacientes com psoríase vulgar com lesões de psoríase ativas envolvendo uma área de superfície corporal (BSA) superior a 10% e/ou índice de área e gravidade da psoríase (PASI) superior a 10, critérios para psoríase moderada-grave. Esses pacientes estavam em uso de tratamento tópico (corticosteroides e/ou calcipotriol) ou não estavam em uso de nenhum tratamento sistêmico. Esses foram os critérios de inclusão/exclusão. As amostras de pele humana foram obtidas de 12 pacientes com psoríase vulgar, com a coleta da pele através de um punch de 2 mm, de regiões lesionadas ou não lesionadas dos mesmos pacientes. Essas amostras foram coletadas pelos médicos dermatologistas habilitados para este procedimento. Todas as amostras foram utilizadas para análises de DNA circulante livre por qPCR ou cortes congelados para Imunofluorescência. As aquisições das amostras, incluindo as biópsias de pele e amostras de sangue, foram previamente aprovadas pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (65644117.1.0000.5440). O consentimento informado foi obtido para todos os procedimentos.

4.2. Animais

Camundongos machos *Aim2*^{-/-}, *Pycard*^{-/-}, *Casp1*^{-/-} e *IL-1R*^{-/-} em um fundo genético C57BL/6J foram obtidos no biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, em São Paulo, Brasil. A cepa de camundongo *Il17ra*^{-/-}, *Sting*^{-/-}, *Irf3*^{-/-}, *Cgas*^{-/-} e *Ifnar*^{-/-} foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Bernhard Ryffel do “Centre National de la Recherche Scientifique”, Orleans, França. Todos os camundongos foram criados e alojados em condições específicas livres de patógenos (SPF) no Centro de criação de camundongos especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão

Preto, da Universidade de São Paulo. Todos os experimentos foram realizados com camundongos machos ou fêmeas de 8 a 10 semanas de idade de acordo com as diretrizes do comitê de ética animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Todos os experimentos foram realizados em concordância com o comitê de Ética para animais de experimentação (077/2019).

4.3. Análises *in silico*

Dados brutos de conjuntos de dados de microarrays foram baixados do Gene Expression Omnibus (GEO) (Edgar et al. 2002). Os efeitos de lote foram detectados usando dados de varredura como substitutos de lote e depois removidos usando o pacote *sva*. A normalização foi realizada usando o algoritmo Robust Multi Array do pacote *affy* bioconductor. A ambiguidade entre as sondas correspondentes ao mesmo gene foi removida selecionando sondas com a maior média de expressão entre as amostras. O controle de qualidade das amostras de microarrays foi realizado usando o pacote *arrayQualityMetrics* (Kauffmann et al. 2009). Um teste t moderado, conforme implementado no pacote *Limma*, foi usado para detectar genes diferencialmente expressos entre amostras de pele lesionada e não lesionada de pacientes com psoríase (Ritchie et al. 2015). A detecção de genes diferencialmente expressos foi realizada usando o pacote *Limma* (Ritchie et al., 2015) e estão representados no gráfico do 'heatmap' dos bancos de dados GSE13355, GSE14905, GSE53552, GSE6710 e GSE30999. A expressão de AIM2 desses diferentes bancos de dados foi quantificada e representada no GraphPad prisma 9 (GraphPad Software) após normalização.

4.4 Modelos psoriasiformes

Imiquimod 5% (IMQ) foi aplicado topicamente diariamente na pele do dorso (60 mg) ou da orelha (60 mg) de camundongos de 8-10 semanas de idade pela duração indicada nas legendas das figuras. Para a pele do dorso, os camundongos foram previamente depilados com barbeador e, posteriormente, creme depilatório 'veet' para remover o pelo residual. Após 2 dias, o creme contendo IMQ foi aplicado na orelha ou na pele do dorso. Poly (dA:dT) (20 µg/orelha) ou salina foram injetados intradermicamente diariamente pela duração indicada nas legendas das figuras. As injeções foram realizadas

usando uma seringa de insulina em um volume total de 10-15 µl/orelha. O tratamento com anti-IL17A (1mg/kg) ou IgG1 (1mg/kg) foram feitos nos dias 0,2 e 4 por via intraperitoneal.

4.5. Processamento de tecidos para citometria de fluxo

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

4.6. Citometria de fluxo

Para marcação de superfície, as suspensões de células foram incubadas com anticorpos em PBS a 4°C por 30 min. Para coloração de citocinas intracelulares, as células foram estimuladas em meio de cultura com PMA (50 ng/ml; Sigma-Aldrich) e ionomicina (500 ng/ml; Sigma-Aldrich) por 4 h na presença de monensina (GolgiStop 1,5 µg/ml; BD Biosciences) a 37°C em uma câmara de CO₂ umidificada a 5%. Após a marcação da superfície, as células foram fixadas e permeabilizadas com 100 µl de solução BD Cytofix/Cytoperm a 4°C por 20 min. Em seguida, as células foram lavadas e marcadas intracelularmente a 4°C em tampão de permeabilização durante a noite. A marcação foi realizada a 4°C durante a noite em tampão de permeabilização. As amostras foram adquiridas em FACS verse (BD Biosciences) e os dados foram analisados usando o software FlowJo X (Tree Star).

4.7 Extração de RNA e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

O RNA total de toda a pele foi isolado usando o RNeasy Kit de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen). O cDNA de primeira fita foi sintetizado a partir de 500 µg de mRNA usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta

capacidade (4368814, Thermo Fisher Scientific). A PCR quantitativa em tempo real foi realizada usando O Master mix Power Syber Green (Thermo Fisher Scientific), primers conforme descrito na Tabela de Recursos Chave e o sistema Stepone Real-Time PCR. Os dados foram normalizados para valores de Gapdh ou Actb, e utilizamos o método $\Delta\Delta C_t$ para as análises. Os primers utilizados foram:

Gapdh

Sense: CATCTTCTTGTGCAGTGCCA

Antisense: CGGCCAAATCCGTTTAC

S100a9

Sense: CAGCATAACCACCATCATCG

Antisense: GTCCTGGTTTGTGTCCAGGT

Krt14

Sense: CAGCTCCTGTCACATCAGCGGT

Antisense: GTCCTGGTTTGTGTCCAGGT

Lcn2

Sense: CCCCATCTCTGCTCACTGTC

Antisense: TTTTCTGGACCGCATTG

Aim2

Sense: AAGCTGAAATGAGTCCTGCTG

Antisense: AACATCTCCTGCTTGCCTTCT

4.8 Extração de DNA circulante e quantificação por qPCR

Foi realizada a extração de DNA total circulante a partir das amostras de plasma dos pacientes utilizando o kit de isolamento de DNA (TIANGen Biotech), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, as amostras foram quantificadas e avaliadas quanto à qualidade no NanoDrop One/OneC (ThermoFisher Scientific, EUA).

4.9 Histologia

Logo após a coleta, a pele da orelha ou do dorso foram fixadas em paraformaldeído a 4% (PFA) a 4°C por 24 h e, em seguida, embebidas em parafina para coloração de hematoxilina e eosina (H&E). A espessura da pele

foi medida histologicamente de forma cega. Os dados representam a média de três medidas em áreas selecionadas aleatoriamente. A aquisição das imagens foi realizada em microscópio Leica MMC e analisada no software Image J. Para coloração de imunofluorescência, pele humana e de camundongo foram coletadas previamente em PBS, depois fixadas em PFA 4% a 4°C por 24 h, lavadas em PBS e crioprotegidas em solução de sacarose 30% por 72 h. Os tecidos foram então incorporados no composto OCT (Tissue-Tek; Sakura Finetek) e congelados em gelo seco. Os cortes de pele foram cortados por criostato (Leica) em cortes transversais de 10-15 µm de espessura montadas em lâminas de vidro. As amostras foram então incubadas com a solução de trabalho (PBS-BSA 1%, 0,05% de Tween) a 4°C por 30 min. Posteriormente, os cortes foram incubado com anticorpo primário contra AIM2 (Abcam), Tmem173 (Abcam) , S100a9 (R&D) e Krt14 (Abcam) diluídos na solução de trabalho a 4°C durante a noite. Os cortes foram lavados pelo menos cinco vezes com TBS-T por 5 min antes de incubar com anticorpos secundários e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) diluído na solução de trabalho a 4°C por 30 min. Os cortes foram lavados pelo menos cinco vezes com TBS-T e, em seguida, o meio de montagem foi adicionado. A aquisição das imagens foi realizada em microscópio LSM 780 (Carl Zeiss).

4.10 Microscopia intravital

Foi realizada injeção intradérmica de poly (dA:dT) ou salina na orelha de camundongos LysmGfp, no volume máximo de 20ul em cada orelha. Após as injeções, as orelhas desses animais foram adquiridas por 90 minutos seguidas, através do sistema Leica MMC e analisada no software Image J.

4.11 ELISA

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

4.12 Cultura de queratinócitos (células HaCaT) in vitro

A linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT) foi expandida e mantida em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM - Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de soro fetal bovino, glicose (4,5 g/l),

penicilina (100 U/ml), L- glutamina (2 mM) e gentamicina (0,2 mg/ml) a 37°C e 5% de CO₂. As células HaCaT foram estimuladas com IL-17A (100 ng/ml - sistemas R&D) em uma placa de 24 poços por 24 horas. Posteriormente, as células foram transfectadas com dsDNA (2µg/ml) da própria célula HaCaT ou com poly (dA:dT) (2µg/ml) utilizando Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) por 12-16 horas. 24 horas após remover a mistura de transfecção, o sobrenadante celular foi coletado para ensaios de ELISA.

4.13 Cultura de queratinócitos primários

A cultura de queratinócitos primários foi realizada utilizando pele de um grupo de seis camundongos neonatos (1 a 3 dias pós-nascimento). Os procedimentos para remover a pele e isolar as células foram conduzidos conforme descrito por Li. F e colaboradores, 2017. Após quatro dias de cultivo das células, com a renovação do meio suplementado diariamente, as células foram tratadas com IL-17 (100ng/ml) por 24 horas. Posteriormente, as células foram transfectadas com dsDNA (2µg/ml) dos próprios queratinócitos primários ou com poly (dA:dT) (2µg/ml) utilizando Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) por 12-16 horas. 24 horas após remover a mistura de transfecção, o sobrenadante celular foi coletado para ensaios de ELISA.

4.14 Western Blot

Os sobrenadantes foram utilizados para dosagem de proteínas, utilizando o reagente Bradford Reagent (Sigma Aldrich). Volumes contendo quantidades específicas de proteína foram incubados com tampão de amostras na proporção de 1:1, a 95°C durante 10 min. Em seguida, amostras do homogenato foram separadas por eletroforese em gel acrilamida SDS-PAGE 10-12% e transferidas para membranas de nitrocelulose. Após a transferência, as membranas foram incubadas a 4°C com tampão de bloqueio, contendo PBS e leite desnatado 5% (p/v) além de Tween 20 (0,1%). Em seguida, as membranas foram lavadas com PBS e Tween 20 (0,1%) e incubadas em solução de BSA 5% e Tween 20 (0,1%) contendo anticorpo monoclonal anti-AIM2 (1:1000, Abcam). As membranas foram novamente lavadas, incubadas com anticorpo secundário por 1 h e novamente lavadas. As membranas foram reveladas com o kit de quimioluminescência (ECL, Amershan Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.), seguindo as recomendações do fabricante.

4.15 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 8 (GraphPad Software) e R studio. As comparações para dois grupos foram calculadas usando testes t de Student bicaudais não pareados, e comparações múltiplas por ANOVA de uma via ou ANOVA de duas vias com pós teste de Bonferroni. Valores de P abaixo de 0,05 foram considerados significativos (* $P < 0,05$). Detalhes estatísticos para cada experimento podem ser encontrados nas legendas das figuras correspondentes.

Parte A

*Papel do AIM2 no desenvolvimento e
manutenção da psoríase*

5. RESULTADOS

5.1 A via de sensores citosólicos de DNA representa a assinatura gênica na pele de pacientes com psoríase

Apesar dos recentes progressos na compreensão da patogênese da psoríase (GRIFFITHS et al., 2021a) e do advento de terapias farmacológicas mais eficazes para seu tratamento (GHORESCHI et al., 2021), os mecanismos moleculares responsáveis pelo surgimento e pela manutenção dessa condição ainda permanecem pouco compreendidos. Nesse contexto, o objetivo inicial de nosso estudo foi identificar potenciais alvos envolvidos no desenvolvimento e manutenção da psoríase. Primeiramente, para termos uma visão global, realizamos uma reanálise de cinco bancos de dados públicos provenientes de diferentes estudos envolvendo pacientes com psoríase. Então, por meio de uma análise sistemática e imparcial, pudemos examinar as principais alterações transcricionais entre a pele não afetada e a afetada por psoríase. De forma interessante, identificamos que os sensores citosólicos de DNA associado a patógenos foram uma das principais vias de regulação positiva observadas nestes bancos de dados (Figura 4).

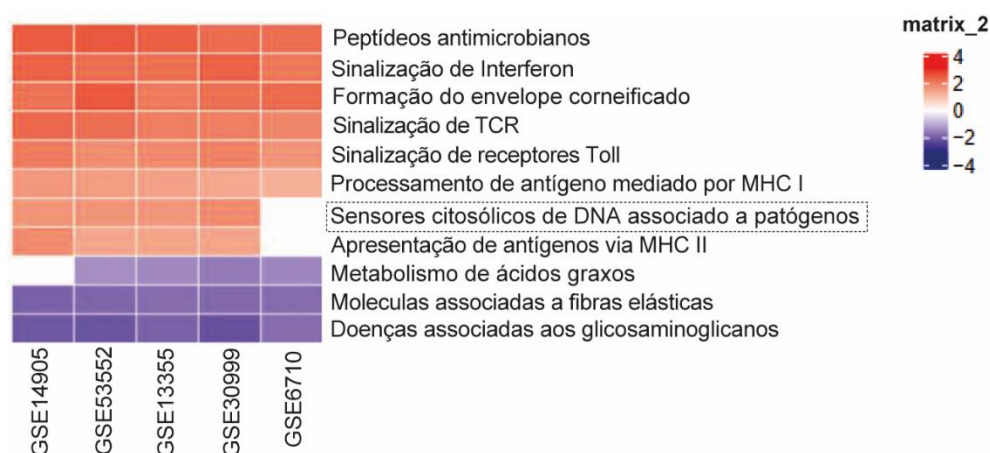


Figura 4 - A via de sensores citosólicos de DNA é dominantemente up regulada na pele de pacientes com psoríase. Heatmap mostrando o número de genes diferencialmente expressos (DEGs) de pele lesionada e não lesionada de pacientes com psoríase vulgar em cinco bancos de dados diferentes (GSE14905, GSE53552, GSE13355, GSE30999 e GSE6710), utilizando uma escala de cores contínua de roxo para vermelho. Os valores individuais de log₂ [fold change] (normalizados ao baseline) foram usados como classificações em uma análise de enriquecimento de conjuntos de genes em amostras únicas para identificar vias consistentemente enriquecidas entre os sujeitos.

5.2 As concentrações de DNA livre plasmático encontram-se elevadas em pacientes com psoríase

O papel de moléculas de DNA livre de células (cfDNA) era mal compreendido e sua presença no plasma era considerada irrelevante. No entanto, sua importância clínica tem sido reconhecida devido às diferenças nas concentrações entre indivíduos saudáveis e doentes. No momento, concentrações elevadas de cfDNA são identificadas como biomarcadores de gravidade em pacientes com várias doenças, incluindo doenças autoimunes, câncer e sepse (BRONKHORST; UNGERER; HOLDENRIEDER, 2019; DUVVURI; LOOD, 2019; RHODES; CECCONI, 2012). Sabendo disso, analisamos a concentração de cfDNA em plasma de pacientes com psoríase vulgar em relação a doadores saudáveis. Nossos dados relevaram que em pacientes com psoríase há um aumento nos níveis de cfDNA quando comparados com os indivíduos saudáveis (Figura 5).

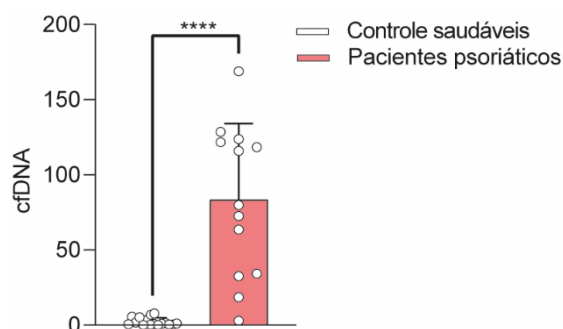


Figura 5 - Os níveis de DNA livre de células estão elevados em pacientes psoriáticos. Níveis de cfDNA (cópias de DNA mitocondrial / DNA nuclear por μL) em amostras de plasma de pacientes saudáveis ($n=16$) e pacientes com psoríase ($n=13$). A significância estatística foi avaliada pelo teste t de Student não pareado. $P<0,001$ (****) foi considerado estatisticamente significativo.

5.3 A expressão de AIM2 está elevada na pele de pacientes com psoríase e no modelo psoriasiforme

O cfDNA consiste em fragmentos curtos de DNA de fita dupla que podem promover a inflamação através da ativação de receptores citosólicos como o AIM2, responsável pela maturação e liberação de IL-1 β e IL-18. Nosso próximo passo, foi investigar a possível participação de AIM2 na psoríase através de uma caracterização utilizando quatro bancos de dados públicos que disponibilizou valores de expressão gênica de mais de 20.000 genes em biópsias de pacientes divididos em 3 grupos: biópsia de indivíduos controle

saudável (controles), biópsia não lesionada de pacientes com psoríase vulgar e biópsia lesionada de pacientes com psoríase.

Observamos que a expressão gênica de *AIM2* é regulado positivamente na biópsia da pele lesionada de pacientes com psoríase vulgar em comparação com a região não lesionada e pacientes controle saudáveis. Notavelmente, não encontramos diferença significativa nos níveis de *AIM2* entre pele não lesionada e pele de indivíduos saudáveis, indicando que a expressão de *AIM2* está relacionada com a resposta inflamatória ativa (Figura 6).

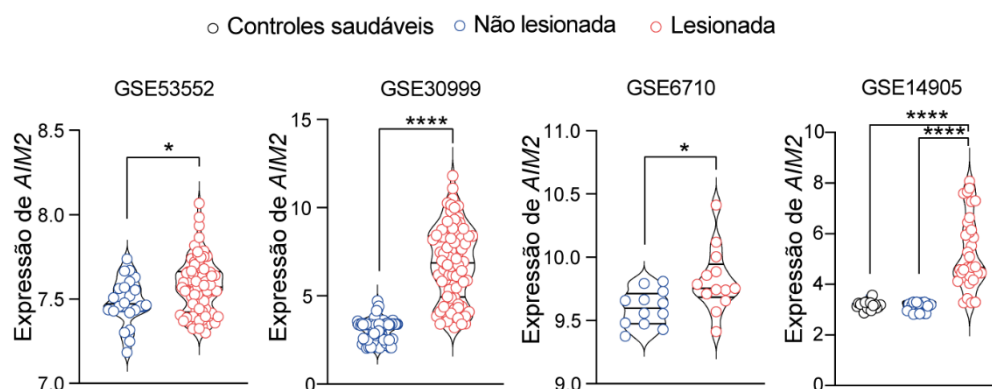


Figura 6 - A expressão de *AIM2* é induzida na lesão cutânea de pacientes com psoríase vulgar. Os gráficos em barra representam a expressão de *AIM2* entre indivíduos saudáveis, pele lesionada e não lesionada de pacientes com psoríase, de quatro bases de dados de psoríase humana (GSE53552, 30999, 1405 e 6710). A significância estatística foi avaliada pelo teste t de Student não pareado. $P < 0,05$ (*) e $P < 0,001$ (****) foi considerado estatisticamente significativo.

Com intuito de aprofundar essa caracterização, utilizamos o modelo de inflamação cutânea induzida pela aplicação tópica de imiquimode 5% (IMQ) (VAN DER FITS et al., 2009a), um imunomodulador ligante dos receptores TLR7/8. Esse modelo mimetiza o desenvolvimento das lesões cutâneas semelhante ao observado em humanos, tais como: hiperproliferação de queratinócitos, aumento de infiltrado inflamatório na derme e a resposta inflamatória dependente do eixo IL-23/IL-17 (VAN DER FITS et al., 2009b). Previamente, corroborando com os dados já descrito na literatura, observamos que houve um aumento da espessura da pele no grupo tratado com IMQ, dia após dia, comparado ao grupo sem tratamento cutâneo com IMQ (Figura 7A-C). Então, avaliamos a cinética da expressão de *AIM2*. Assim como visualizado em pacientes com psoríase vulgar, houve um aumento um significativo da expressão do *AIM2*. Entretanto, no modelo psoriasiforme, foi possível identificar que o pico de expressão de *AIM2* ocorre nos dias 2 e 3 após a aplicação de IMQ (Figura 7D).

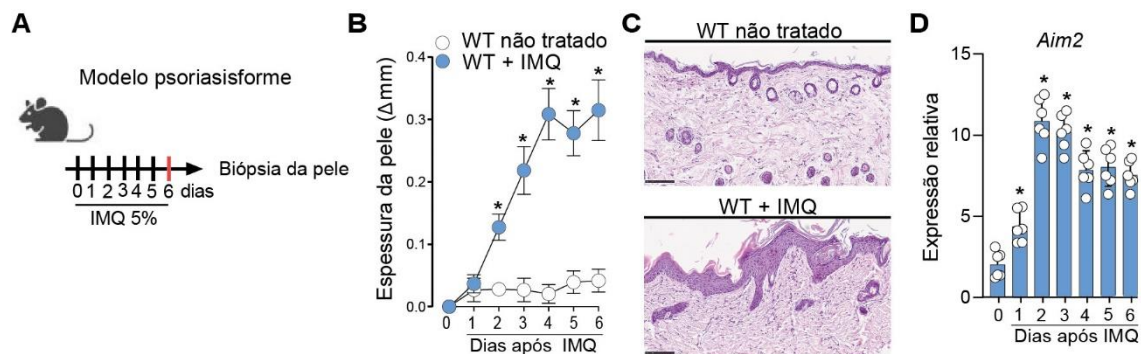


Figura 7 - A expressão de AIM2 é induzida na pele em modelo psoriasiforme. Camundongos WT (C57BL/6) previamente depilados foram tratados topicamente com IMQ 5% diariamente antes das análises. Camundongos WT não tratados foram utilizados como controle. (A) Ilustração esquemática do modelo psoriasiforme. (B) Cinética da alteração da inflamação (delta) na pele do dorso, medida com um paquímetro. (C) Imagens representativas de cortes de pele do dorso coradas por H&E adquiridas com objetiva de 20x. Barras de escala, 100 μ m. (D) Cinética do nível de expressão relativa de RNAm de AIM2 normalizados pelo Gapdh, nos lisados de pele total de camundongos WT, avaliado por qPCR. Os gráficos representam a média $\pm$ SEM de dados obtidos de 2 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com o teste de comparação múltipla de bonferroni em B e ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni em D. $P < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo.

5.4 A expressão de AIM2 exacerba a inflamação cutânea de características semelhantes às da psoríase

Com a finalidade de elucidar o papel funcional do AIM2 no desenvolvimento inflamatório do modelo psoriasiforme induzido por IMQ, foram utilizados camundongos deficientes geneticamente para AIM2 (*Aim2*^{-/-}). Notamos que os animais *Aim2*^{-/-} apresentaram um processo inflamatório atenuado em comparação com o grupo controle, que foi evidente na menor espessura da pele do dorso (Figura 8A) e na avaliação macroscópica (Figura 8B) após a aplicação tópica de IMQ. Concomitante a esses achados, observamos que a ablação genética de AIM2 diminuiu a espessura da epiderme e o infiltrado de células inflamatórias na derme, avaliada por coloração de H&E, em comparação ao grupo WT tratado com IMQ (Figura 8C).

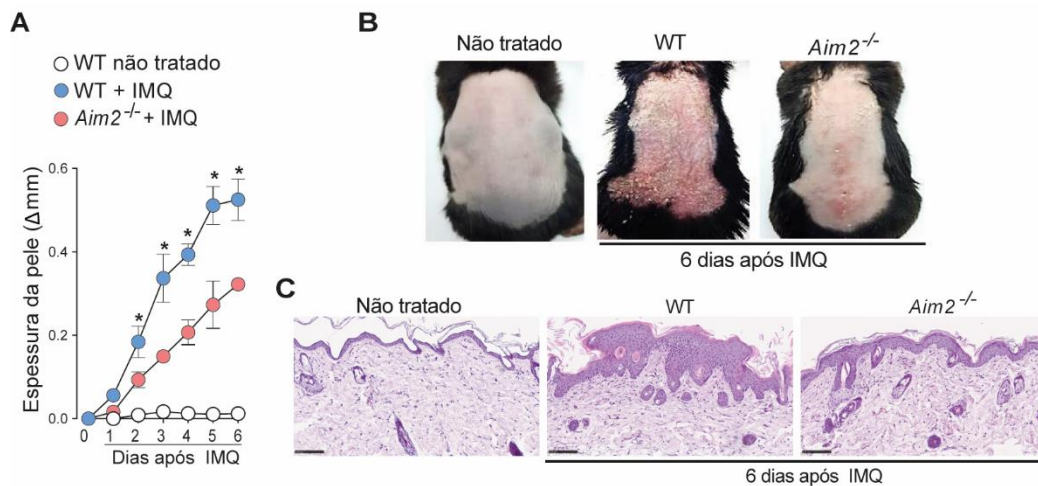


Figura 8 - AIM2 exacerba a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme. Camundongos WT (C57BL/6) e *Aim2*^{-/-} foram tratados topicamente com IMQ diariamente antes das análises. Camundongos WT não tratados foram utilizados como controles. (A) Cinética da alteração da espessura (delta) na pele do dorso, medida com um paquímetro. (B) Imagem macroscópica 6 dias após aplicação tópica de IMQ. (C) Imagens representativas de cortes de pele do dorso coradas por H&E, adquiridas com objetiva de 20x. Barras de escala, 100 μm. O gráfico representa a média ± SEM de dados obtidos de 2-3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com o teste de comparação múltipla de bonferroni em A. $P < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significante.

Como controle, foi feita a histologia da pele WT e *Aim2*^{-/-} sem nenhum tratamento. Não foi observado nenhuma diferença entre as duas linhagens (Figura 9).

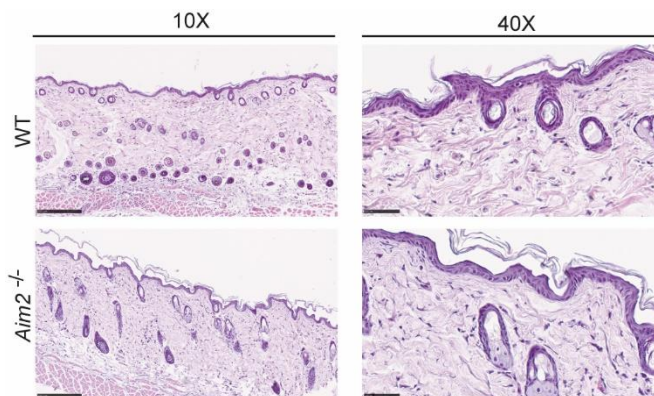


Figura 9 - Não existe diferença da morfologia da pele entre WT e *Aim2*^{-/-}. Camundongos WT (C57BL/6) e *Aim2*^{-/-} sem tratamento foram utilizados. Imagens representativas de cortes de pele do dorso coradas por H&E, adquiridas com objetiva de 20x e 40x. Barras de escala, 100 μm e 50 μm.

Então, fomos avaliar se o AIM2 é capaz de modular mediadores inflamatórios relevantes para a manutenção e desenvolvimento da psoríase. Inicialmente, investigamos a expressão de alguns genes classicamente associados à ativação de queratinócitos e inflamação nesse modelo, tais como: *Krt14*, *Lcn2* e *S100a9*. Diante da deleção do AIM2, é possível notar uma redução da expressão de *Krt14*, *Lcn2* e *S100a9*, após a aplicação de IMQ, quando comparamos com o grupo controle (Figura 10A).

Nesse mesmo sentido, avaliamos os níveis de quimiocinas e citocinas que são amplamente descritas na literatura por terem um papel crucial na patofisiologia da psoríase. Foi observado que ablação genética de AIM2 leva uma diminuição dos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-18, IL-23, e CXCL1/KC em comparação ao grupo controle, submetidos ao modelo de psoriasiforme (Figura 10B)

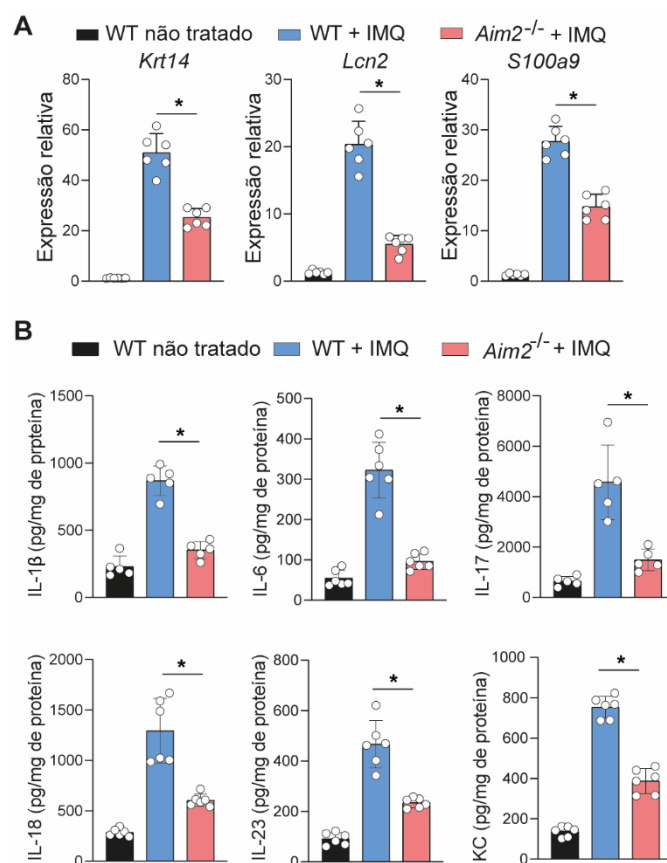


Figura 10 - AIM2 promove a liberação de mediadores inflamatórios. Camundongos WT (C57BL/6) e *Aim2*^{-/-} foram tratados topicamente com IMQ diariamente antes das análises. Camundongos WT não tratados foram utilizados como controles. (A) expressão relativa de mRNA de *Krt14*, *Lcn2* e *S100a9* em lisados de pele inteira de camundongos tratados com IMQ normalizados para *Gapdh* avaliados por qPCR (B) Níveis de IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18, IL-23 e KC em homogeneizados de pele determinados por ELISA. Os gráficos representam a média $\pm$ SEM de dados obtidos de 2 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni. $P < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo.

Sabendo da importância dos mediadores inflamatórios supra citados para ativação e recrutamento de células, consequentemente, estabelecimento da inflamação cutânea, optamos por realizar uma citometria de fluxo da pele de animais *Aim2*^{-/-} e WT após aplicação tópica de IMQ para elucidar a relação do AIM2 e a migração de células para o sítio inflamatório. Dentre as células mieloides e linfoides, foi observado que a deficiência de AIM2 leva a redução do número de neutrófilos (CD11b⁺ Ly6G⁺), macrófagos (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁻ MHCII⁺), células dendríticas (CD11c⁺ MHCII⁺) e células T produtoras de IL17A (CD3⁺ TCR γδ^{int} IL17A⁺) na pele tratada com IMQ comparada ao grupo controle (Figura 11)

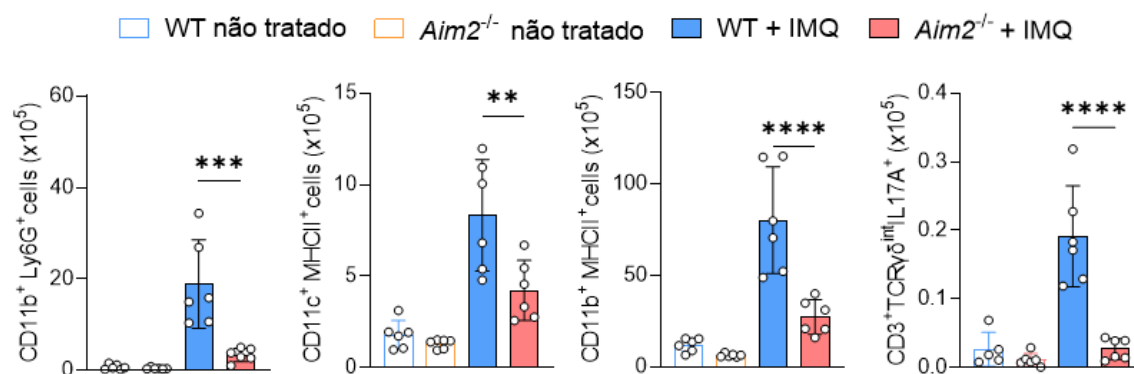


Figura 11 - AIM2 promove a migração de células inflamatórias. Camundongos WT e *Aim2*^{-/-} receberam tratamento tópico por 6 dias consecutivos com IMQ antes das análises. Camundongos WT e *Aim2*^{-/-} não tratados com IMQ foram utilizados como controles. Gates representativas e números absolutos de neutrófilos (CD11b⁺ Ly6G⁺), macrófagos (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁻ MHCII⁺), células dendríticas (CD11c⁺ MHCII⁺) e células T γδ T (CD3⁺ TCR γδ^{int} IL17A⁺) isoladas a partir de células CD45⁺ provenientes da orelha. Os gráficos representam a média ± SEM de dados obtidos de 2 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni. P<0,05 (*) foi considerado estatisticamente significativo.

Em seguida, para ampliar o estudo do efeito do AIM2 na resposta inflamatória da pele, injetamos o ligante do AIM2 (poly dA:dT) na camada dérmica da orelha de camundongos Lysm-GFP, e os efeitos agudos foram analisados. Após 90 min da administração intradérmica do ligante de AIM2, observou-se uma migração expressiva e rápida de células Lysm-GFP para o tecido cutâneo em comparação com os camundongos que receberam apenas injeção de salina. Sugerindo que quando o AIM2 reconhece o seu ligante ocorre

uma resposta imunológica rápida e robusta, indicando o seu papel na indução da inflamação cutânea (Figura 12).

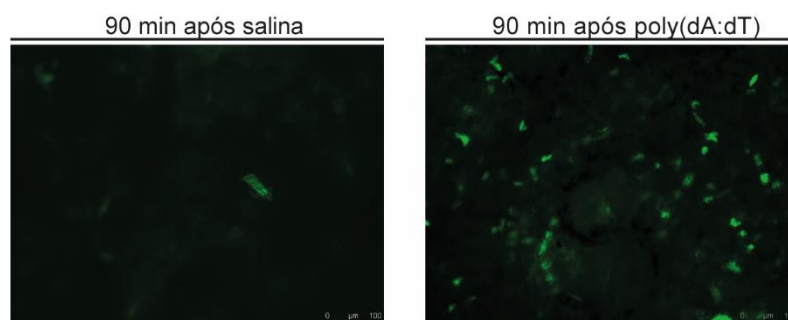


Figura 12 - AIM2 induz o acúmulo massivo de células Lysm+ na pele agudamente. Salina ou poly dA:dT (20 ug/orelha) foram injetados intradermicamente nas orelhas (15 ul) de camundongos Lysm-GFP e avaliadas durante 90 minutos por microscopia intravital. Foto representativa após 90 minutos após injeção intradérmica de salina ou poly dA:dT na orelha, avaliada por microscopia intravital.

Considerando todos esses dados em conjunto, fica evidente que AIM2 exacerba a fisiopatologia da inflamação cutânea semelhante à psoríase induzida por IMQ, destacando seu papel na progressão da doença, através da modulação de mediadores inflamatórios que afetam a infiltração de células imunes na pele inflamada.

5.5 AIM2 é majoritariamente expresso na epiderme

Sabendo do aumento da expressão de AIM2 na pele lesionada de pacientes com psoríase e na pele de camundongos, resolvemos caracterizar a localização da expressão de AIM2. Para isso, foi realizado a biópsia da pele de pacientes com psoríase seguida do ensaio de imunofluorescência. Na região lesionada observamos uma expressão massiva de AIM2 na epiderme, uma região predominada por queratinócitos, quando comparado a região não lesionada do mesmo indivíduo. Uma expressão menor foi observada em células na região da derme (Figura 13A).

Para reforçar esse achado, também avaliamos a expressão de AIM2 em camundongos que foram submetidos ao modelo que mimetiza a psoríase. Do mesmo modo que foi observado em pacientes, é possível visualizar que há uma maior expressão de AIM2 na epiderme após aplicação de IMQ (Figura 13B).

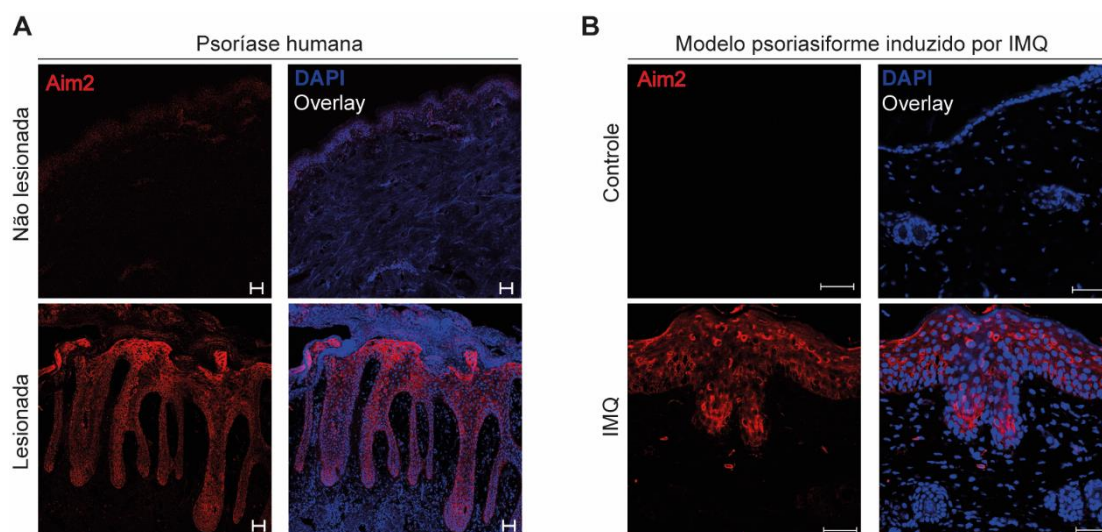


Figura 13 - Caracterização da expressão de AIM2 na pele de pacientes e em modelo experimental de psoríase. (A) Imagens de imunofluorescência com marcação para AIM2 (vermelho) e DAPI (azul) de pele lesionada e não lesionada de paciente com psoríase vulgar. Barra de escala, 50 µm. (B) Imagens de imunofluorescência com marcação para AIM2 (vermelho) e DAPI (azul) proveniente da pele de camundongos após aplicação tópica de IMQ. Barra de escala, 100 µm. Todas as imagens foram adquiridas com com microscópio confocal multifotom LSM 800 (Carl Zeiss Microscopy) e analisadas utilizando o software Fiji do imageJ.

5.6 A expressão de AIM2 é regulada por IL-17A

Nossas análises prévias demonstraram que AIM2 é expresso na epiderme, onde os queratinócitos predominam, tanto em pacientes com psoríase quanto no modelo induzido por IMQ que simula a psoríase. Devido ao papel crucial do IL-17A na patogênese da psoríase, estimulando a proliferação e secreção de mediadores inflamatórios pelos queratinócitos (MARTIN et al., 2013), decidimos investigar se o IL-17a poderia influenciar a expressão de AIM2 nestas células. Para isso, primeiramente cultivamos uma linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT) na presença ou ausência de IL-17a (Figura 14A). A estimulação das células HaCaT com IL-17a resultou em um expressivo aumento da expressão do gene *AIM2* (Figura 14B). De maneira consistente, a análise por imunoblot confirmou o aumento na expressão da proteína AIM2 após a ativação das células HaCaT com IL-17A (Figura 14C).

Em seguida, reanalisamos um banco de dados público GEO (GSE117468) para avaliar a expressão relativa do mRNA de AIM2 em biópsias de pele lesional de pacientes com psoríase vulgar tratados com brodalumabe, um anticorpo monoclonal humano que visa a subunidade do receptor IL-17RA. Biópsias de pele das lesões foram obtidas de pacientes antes do tratamento

(basal) e 12 semanas após a administração subcutânea de 210 mg de brodalumabe ou placebo (RUSSEL et al., 2014). Notavelmente, encontramos uma redução significativa do mRNA de AIM2 em biópsias de pele de pacientes após o tratamento com brodalumabe (Figura 14D).

Nosso próximo passo, foi avaliar se a perda de sinalização de IL-17A em camundongos deficientes em IL-17RA (*Il17ra*^{-/-}) afetaria a expressão de AIM2 após a indução do modelo de psoríase. Como já descrito na literatura, os camundongos *Il17ra*^{-/-} apresentaram uma espessura significativamente reduzida em comparação ao grupo controle (Figura 14E). Além disso, observamos níveis mais baixos de IL1- β , IL-18, IL-23 e CXCL1/KC após a aplicação tópica diária de IMQ em *Il17ra*^{-/-} quando comparado com os camundongos WT (Figura 14F). A histologia reforçou que existe uma menor inflamação cutânea e hiperplasia epidérmica nos animais *Il17ra*^{-/-} em comparação ao grupo controle (Figura 14G). Interessantemente, os camundongos tratados com IMQ deficientes do receptor para IL-17A mostraram menor expressão de proteína AIM2 na pele do que os camundongos WT (Figura 14H). Com base no exposto, nossos resultados evidenciam que a indução cutânea de AIM2 ocorre de maneira dependente de IL-17 em um modelo psoriasiforme, assim como na pele afetada de pacientes com psoríase.

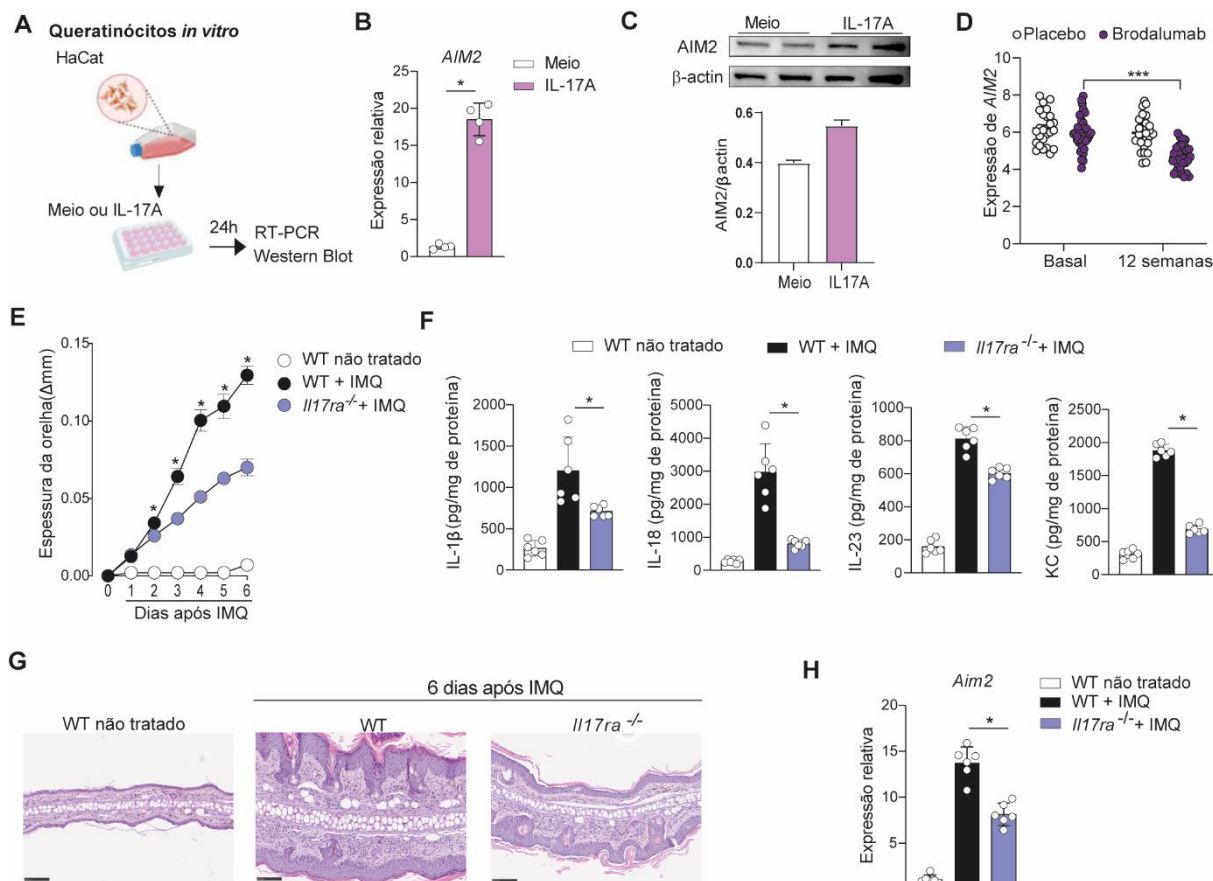


Figura 14 - O eixo IL-17A é necessário para induzir a expressão de AIM2 na pele com psoríase. (A) Ilustração esquemática da cultura de células HaCaT. (B) Níveis relativos de expressão de mRNA de *AIM2* em células HaCaT estimuladas com IL-17A por 24 horas, avaliados por qPCR. (C) Western blot da expressão de AIM2 em células HaCaT estimuladas com IL-17A por 24 horas. (D) Expressão de AIM2 na pele antes e após 12 semanas de tratamento com brodalumabe em psoríase humana. (E) Curso temporal das mudanças na espessura da orelha (Δ) foi medida diariamente após aplicação tópica de IMQ. (F) Níveis de IL-1 β , IL-6, IL-23, IL-18 e CXCL1/KC nos homogeneizados de pele da orelha determinados por ELISA. (G) Coloração H&E de seções de pele das costas em WT e *Il17ra*^{-/-} com IMQ por seis dias consecutivos. (H) Expressão relativa de mRNA de *Aim2* de WT e *Il17ra*^{-/-}. O gráfico representa a média $\pm$ SEM de dados obtidos de 2-3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com o teste de comparação múltipla de bonferroni em E e ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni em F e H. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5.7 A ativação direta do AIM2 induz diretamente a inflamação cutânea de características semelhantes às da psoríase.

Com base na evidência que sugere o efeito pró-inflamatório de AIM2, formulamos a hipótese de que ativação direta desse receptor poderia causar diretamente alterações semelhantes à psoríase na pele. Inicialmente, avaliamos a capacidade do poly(dA:dT), um ligante do AIM2, ou DNA de fita dupla (dsDNA) extraído de queratinócitos, em induzir a liberação de mediadores inflamatórios pelos queratinócitos. Foram estimulados tanto a

linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT) quanto os queratinócitos murinos primários. Nossos resultados demonstraram que tanto poly(dA:dT) quanto dsDNA podiam induzir a produção de CXCL1/CXCL8 e IL-18 por células HaCaT e queratinócitos murinos primários (Figura 15).

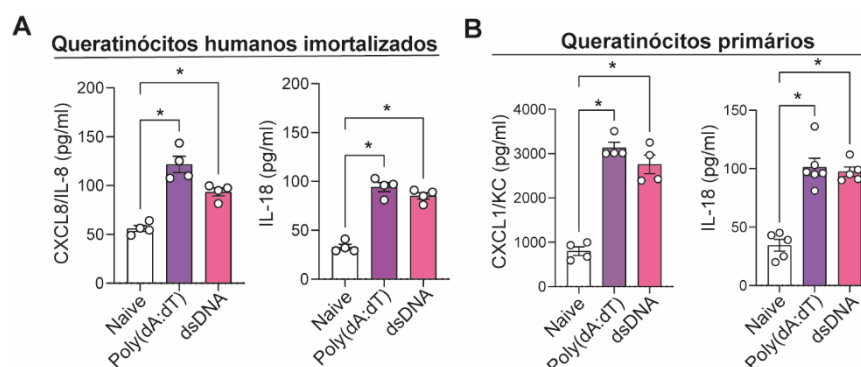


Figura 15 - Poly (dA:dT) e dsDNA são capazes de estimular queratinócitos. (A) Queratinócitos imortalizados de linhagem humana (HACAT) foram estimulados por 24 horas com poly (dA:dT) (2ug) e dsDNA (2ug) da própria HACAT e os níveis de CXCL8/IL-8 e IL-18 determinados por ELISA (B) Queratinócitos primários foram estimulados por 24 horas com poly (dA:dT) (2ug) e dsDNA (2ug) do próprio queratinócito e os níveis de CXCL1/KC e IL-18 determinados por ELISA. Os gráficos representam a média $\pm$ SEM de dados obtidos de 2 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni. $P < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo.

Neste cenário, com o objetivo de examinar os efeitos da ativação de AIM2 na resposta inflamatória da pele em estágios posteriores, implementamos um modelo de injeção intradérmica diária de poly dA:dT por quatro dias consecutivos em animais WT e *Aim2*^{-/-} (Figura 16A). Esse protocolo nos permitirá observar se a ativação prolongada de AIM2 afeta a inflamação cutânea ao longo do tempo e como isso pode influenciar a progressão ou a resolução da resposta inflamatória. A injeção de poly(dA:dT) provocou um aumento significativo na espessura da orelha do grupo WT em comparação com aqueles tratados com salina, sendo o dia 3 o pico do aumento da espessura da orelha. Em contrapartida, o grupo *Aim2*^{-/-} exibiram uma redução notável na espessura da orelha após a administração de poly(dA:dT) (Figura 16B), juntamente com uma diminuição na expressão dos genes *Krt14* e *S100a9* (Figura 16C). Esses resultados sugerem que a ausência de AIM2 reduz a resposta inflamatória induzida por poly(dA:dT), resultando em uma redução na expressão de genes associados à inflamação e à proliferação de queratinócitos.

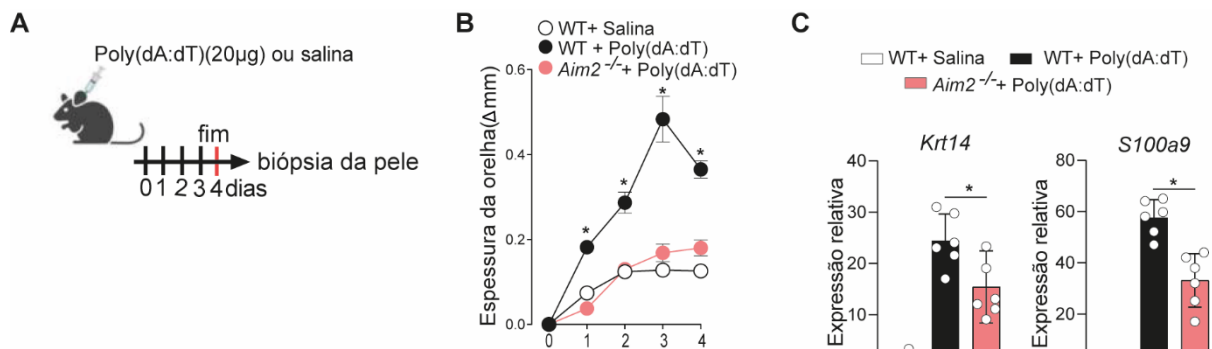


Figura 16 - A injeção intradermal do ligante de AIM2 induz inflamação na pele semelhante à psoríase. Salina ou poly(dA:dT) (20 ug/orelha) foram injetados intradermal nas orelhas (15ul) de camundongos WT e *Aim2*^{-/-} durante 4 dias. (A) Ilustração esquemática da estratégia do experimento. (B) Cinética da alteração da espessura (delta) da orelha, medida com um paquímetro. (C) Expressão relativa de mRNA de *Krt14* e *S100a9* em lisados de pele inteira de camundongos tratados com poly(dA:dT) normalizados para Gapdh avaliados por qPCR. O gráfico representa a média ± SEM de dados obtidos de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com o teste de comparação múltipla de bonferroni em B. P<0,05 (*) foi considerado estatisticamente significativo.

Para investigar se o efeito pró-inflamatório observado após ativação direta do AIM2 depende da proteína ASC, umas das proteínas pertencente ao inflamassoma, administramos poly(dA:dT) em camundongos deficientes em ASC (codificada pelo gene *Pycard*^{-/-}). Observamos uma redução significativa na espessura da orelha em camundongos *Pycard*^{-/-} tratados com poly(dA:dT), semelhante à observada em camundongos *Aim2*^{-/-} (Figura 17A). Além disso, houve uma diminuição na produção de mediadores inflamatórios, como IL-1β, IL-6, IL-17A, IL-18, IL-23 e CXCL1/KC, em camundongos *Aim2*^{-/-} e *Pycard*^{-/-} tratados com poly(dA:dT) (Figura 17B). De forma consistente, cortes histológicos da orelha mostraram uma diminuição na hiperplasia epidérmica com um menor acúmulo de células inflamatórias na derme de camundongos *Aim2*^{-/-} e *Pycard*^{-/-} tratados com poly(dA:dT) em comparação com camundongos WT tratados com poly(dA:dT) (Figura 17C). Esses achados reforçam o papel do AIM2 em desencadear respostas inflamatórias cutâneas observadas durante a psoríase.

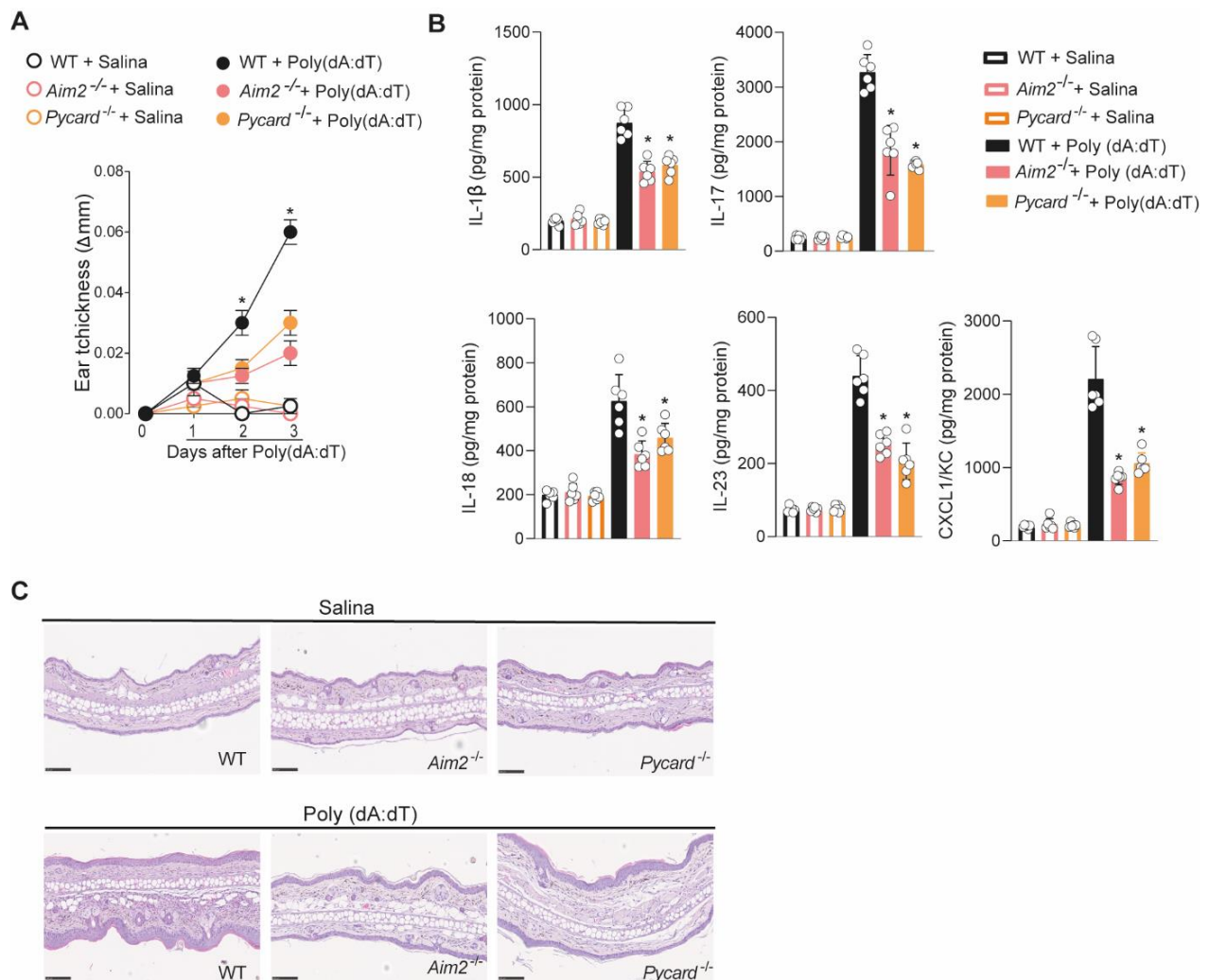


Figura 17 - A injeção intradérmica do ligante de AIM2 desencadeia uma inflamação cutânea dependente de ASC. Salina ou poly(dA:dT) (20 ug/orelha) foram injetados intradermal nas orelhas (15ul) de camundongos WT, *Aim2*^{-/-} e *Pycard*^{-/-} durante 4 dias. (A) Cinética da alteração da espessura (delta) da orelha, medida com um paquímetro. (B) Níveis de IL-1β, IL-6, IL-17, IL-18, IL-23 e KC em homogeneizados de pele determinados por ELISA. (C) Imagens representativas de cortes da orelha coradas por H&E, adquiridas com objetiva de 20x. Barras de escala, 100 μm. O gráfico representa a média ± SEM de dados obtidos de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com o teste de comparação múltipla de bonferroni em A e ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni em B. P<0,05 (*) foi considerado estatisticamente significante.

5.8 O inflamassoma AIM2 é necessário para a indução da inflamação cutânea semelhante à psoríase.

Por fim, examinamos se a função do AIM2 depende dos componentes do inflamassoma durante a psoríase. Inicialmente, notamos um aumento significativo na expressão de PYCARD (que codifica para ASC) e CASP1 (que codifica para caspase-1) na pele lesionada de pacientes com psoríase em comparação com grupos de pele não lesionada ou pele de indivíduos saudáveis (Figura 18A). Além disso, observamos uma expressão

consideravelmente aumentada de *Casp1* e *Il1 β* no modelo de psoríase induzida por IMQ em camundongos (Figura 18B). Para avaliar o papel de ASC e caspase-1, utilizamos linhagens de camundongos deficientes para ASC (*Pycard*^{-/-}) ou caspase-1 (*Casp1*^{-/-}). A falta de ASC ou caspase-1 resultou em redução da hiperplasia cutânea, medida pela espessura da pele dorsal, de maneira semelhante à observada na ausência de AIM2 (Figura 18C). Estes resultados foram corroborados pela coloração de H&E das seções de pele dorsal, que mostraram uma diminuição do espessamento epidérmico e da acantose em camundongos *Pycard*^{-/-} e *Casp1*^{-/-} tratados com IMQ, em comparação com camundongos WT tratados com IMQ (Figura 18D). É importante destacar que a deficiência de ASC ou caspase-1 preveniu a produção de mediadores pró-inflamatórios, como: IL1- β , IL-17 e IL-23 (Figura 18E).

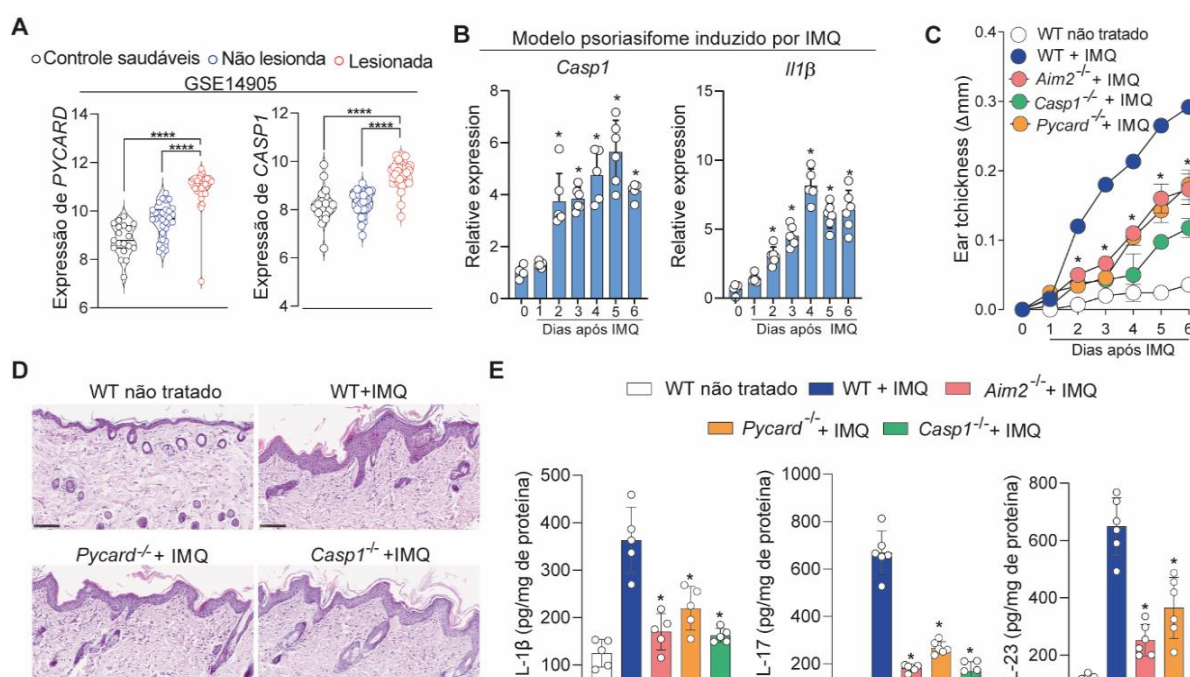


Figura 18 - ASC e Caspase-1 são necessários para o desenvolvimento da psoríase induzida por IMQ em camundongos. (A) Expressões gênicas de CASP1 e PYCARD em amostras de biópsia de pele de controles saudáveis e sítios não lesados ou lesados de pacientes com psoríase, avaliadas por análise de um conjunto de dados transcriptômicos publicado (GSE14905). (B-E) Camundongos WT(C57BL/6), *Aim2*^{-/-}, *Pycard*^{-/-} e *Casp1*^{-/-} foram tratados topicamente com IMQ diariamente antes das análises. Camundongos WT não tratados foram usados como controles. (B) Cinética da expressão relativa de mRNA de *Casp1* e *Il1B* em lisados de pele inteira de camundongos tratados com IMQ normalizados para Gapdh avaliados por qPCR (C) Evolução das mudanças na espessura da pele das costas (delta) medida diariamente após aplicação tópica de IMQ por paquímetro. (D) Representação da coloração de hematoxilina e eosina (H&E) de seções de pele das costas dos animais. Adquirido com ampliação de 20x. A barra de escala indica 100 μ m. (E) Níveis de IL-1 β , IL-23 e IL-17 em homogeneizados de pele determinados por ELISA. O gráfico representa a média $\pm$ SEM de dados obtidos de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com o teste de comparação múltipla de bonferroni em C e ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni em A, B e E. P<0,05 (*) foi considerado estatisticamente significativo.

De forma consistente, a ausência de IL-1R, o receptor de IL-1 β , reduziu o espessamento da pele e a produção de IL-1 β , IL-17 e IL-23 no modelo de psoríase induzida por IMQ em camundongos (Figura 19 A-C). No geral, esses dados evidenciam que o AIM2 promove a fisiopatologia da inflamação cutânea induzida por IMQ de maneira dependente do inflamassoma.

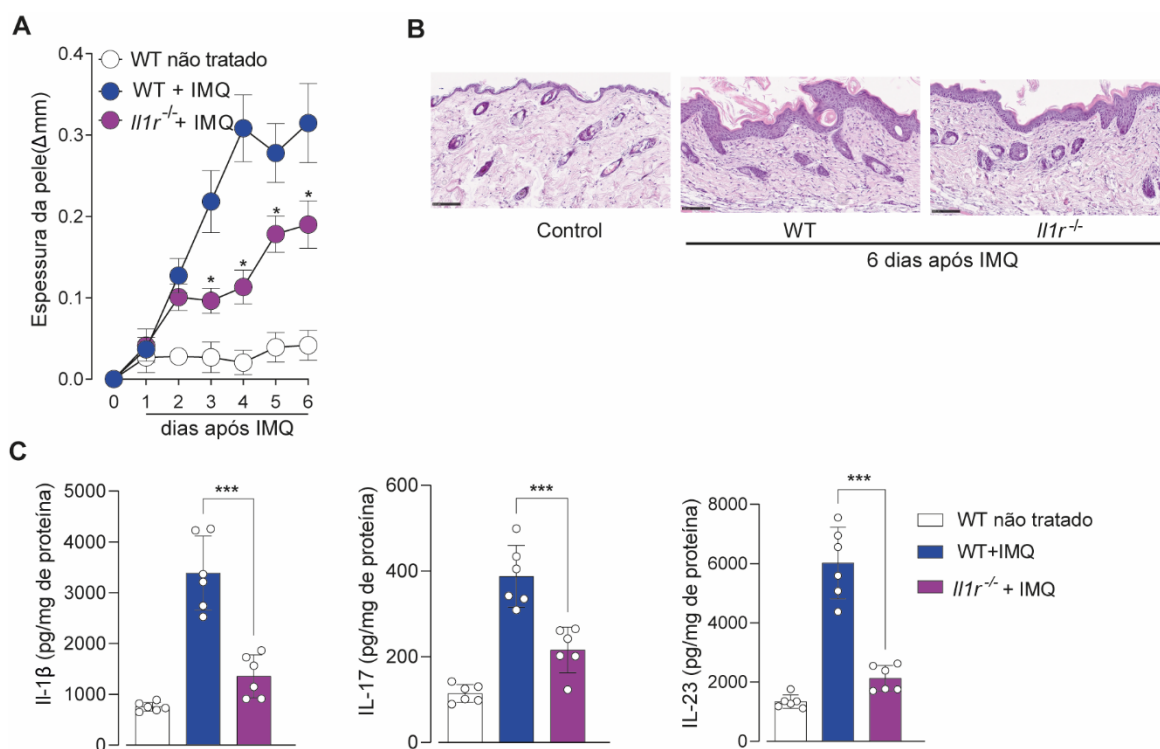


Figura 19 - IL-1R é necessário para o desenvolvimento da psoríase induzida por IMQ em camundongos. Camundongos WT (C57BL/6) e *Il1r*^{-/-} foram tratados topicamente com IMQ diariamente antes das análises. Camundongos WT não tratados foram usados como controles. (A) Cinética da alteração da espessura (delta) na pele do dorso, medida com um paquímetro. (B) Imagens representativas de cortes de pele do dorso coradas por H&E, adquiridas com objetiva de 20x. Barras de escala, 100 μ m. (C) Os níveis de IL-1 β , IL-17 e IL-23 foram determinados por ELISA. O gráfico representa a média $\pm$ SEM de dados obtidos de 2-3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com o teste de comparação múltipla de Bonferroni em A e por ANOVA de uma via com teste pós-hoc de Bonferroni em C. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Parte B

*Papel do STING no desenvolvimento e
manutenção da psoríase*

6. RESULTADOS

6.1 A via de sinalização de interferon representa a assinatura gênica na pele de pacientes com psoríase

Conforme evidenciado na seção A deste estudo, procedemos à reanálise de cinco conjuntos de dados públicos provenientes de estudos diversos que envolveram pacientes diagnosticados com psoríase. Observou-se que os sensores citosólicos de DNA associados a patógenos emergiram como uma das principais vias com regulação positiva nesses conjuntos de dados. No entanto, é importante ressaltar que a via de sinalização do interferon destacou-se como uma das principais vias reguladas positivamente na pele de pacientes com psoríase (Figura 20).

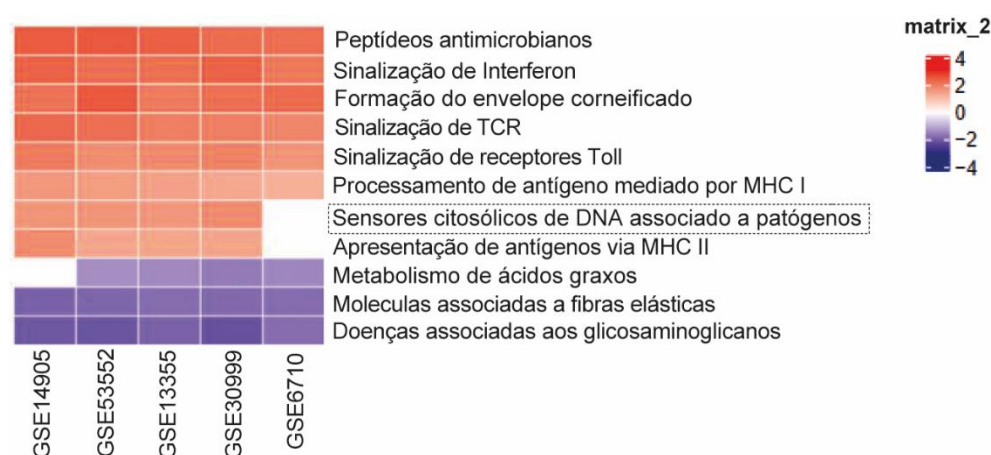


Figura 20 - A via de sensores citosólicos de DNA e sinalização de interferon são dominantemente up regulada na pele de pacientes com psoríase. Heatmap mostrando o número de genes diferencialmente expressos (DEGs) de pele lesionada e não lesionada de pacientes com psoríase vulgar em cinco bancos de dados diferentes (GSE14905, GSE53552, GSE13355, GSE30999 e GSE6710), utilizando uma escala de cores contínua de roxo para vermelho. Os valores individuais de $\log_2$ [fold change] (normalizados ao baseline) foram usados como classificações em uma análise de enriquecimento de conjuntos de genes em amostras únicas para identificar vias consistentemente enriquecidas entre os sujeitos.

6.2 STING está expresso na pele de pacientes com psoríase vulgar

Considerando a regulação positiva das vias de sinalização dos sensores de DNA e da sinalização de interferon, juntamente com o aumento dos níveis de cfDNA no plasma de pacientes com psoríase (como demonstrado na seção A - Figura 4), optamos por investigar outro importante via de sensores de DNA,

a via de sinalização de STING, cuja ativação induz a produção de interferons tipo I. Inicialmente, para realizar a caracterização da expressão de STING em pacientes com psoríase, foram coletadas amostras da área não lesionada e lesionada de pacientes com psoríase vulgar para a realização de ensaio de imunofluorescência. Nossas análises revelaram uma expressão aumentada de STING na pele lesionada de pacientes com psoríase em comparação com a pele não lesionada desses pacientes. Além disso, foram utilizados KR14 e S100A9, que sabidamente são expressas em queratinócitos que estão localizados na epiderme. Curiosamente, é possível visualizar que não há co-expressão de STING com KRT14 e S100A9, porém há a expressão massiva de STING na derme da área lesionada (Figura 21).

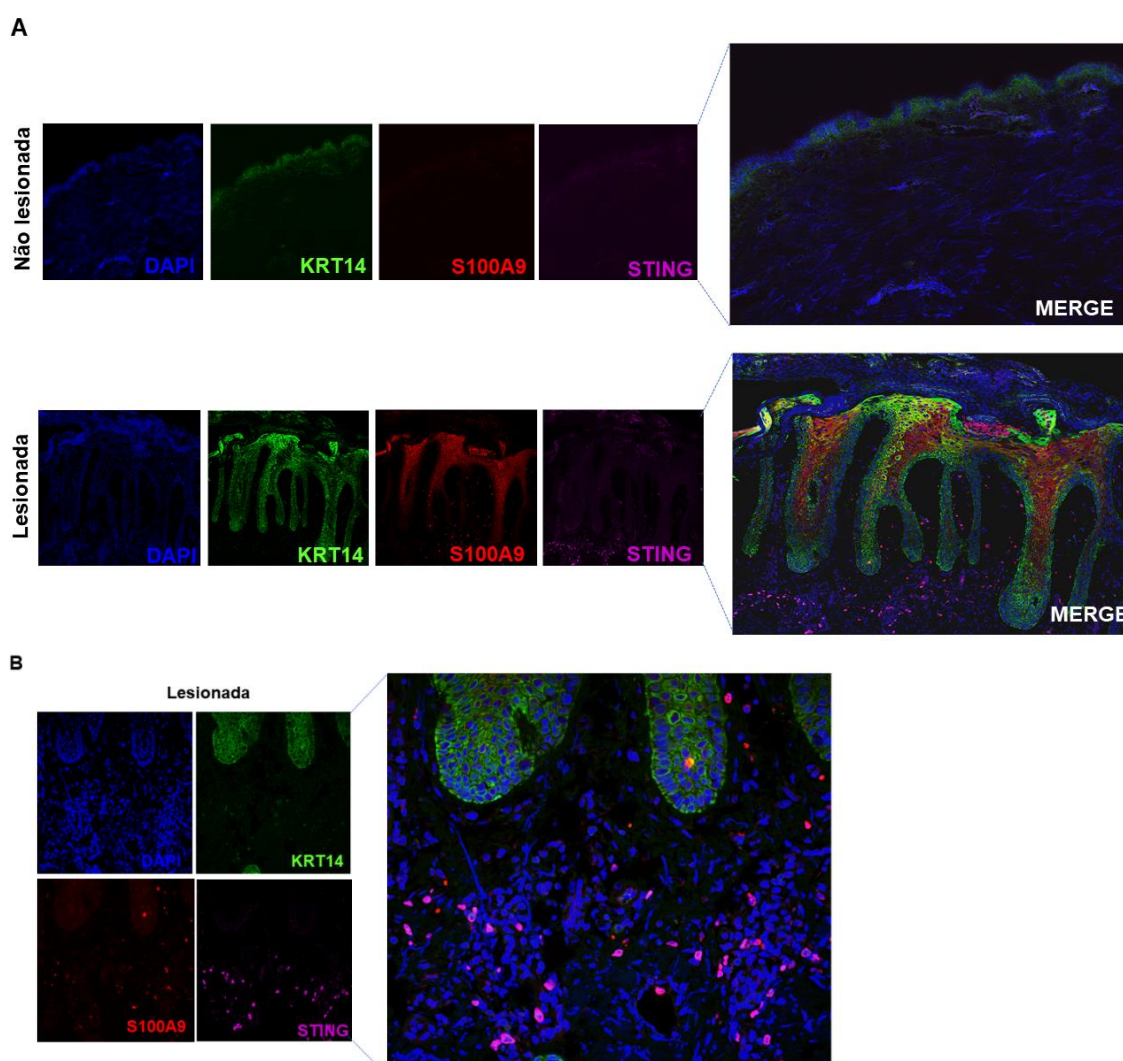


Figura 21 - A expressão de STING é aumentada na derme da área lesionada de pacientes com psoríase. Imagens representativas de imunofluorescência com marcação para STING (roxo), S100A9 (Vermelho), KRT14 (verde) e DAPI (azul) de pele lesionada e não lesionada de paciente com psoríase vulgar. Barra de escala, 100 μ m em A e Barra de escala, 50 μ m em B. Todas as imagens foram adquiridas com com microscópio confocal multifoton LSM 800 (Carl Zeiss Microscopy) e analisadas utilizando o software Fiji do imageJ.

6.3 A deficiência de STING exacerba a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme

Para avaliar a importância biológica de STING, utilizamos camundongos deficientes geneticamente para STING (*Sting*^{-/-}) submetidos ao modelo de inflamação cutânea induzida por IMQ. Nossos resultados indicaram que a ausência de STING, após a aplicação tópica de IMQ, levou a um aumento expressivo no espessamento da pele entre o terceiro e sexto dia (Figura 22A), além disso, macroscopicamente foi possível visualizar maior grau de eritema e descamação quando comparado ao grupo controle (Figura 22B). Corroborando com esses dados, observamos nos cortes histológicos que a deficiência de STING induz um maior espessamento da epiderme e na acantose, além de, maior infiltrado de células inflamatórias na derme quando comparado ao grupo controle (Figura 22C).

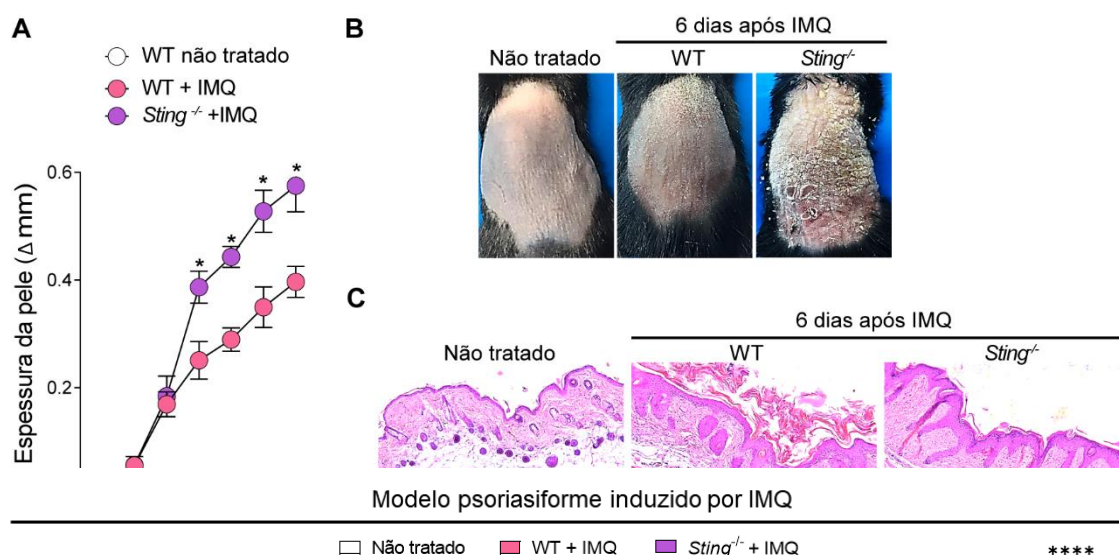


Figura 22 - STING reduz a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme. Camundongos WT (C57BL/6) e *Sting*^{-/-} foram tratados topicamente com IMQ diariamente antes das análises. Camundongos WT não tratados foram usados como controles. (A) Cinética da alteração da espessura (delta) na pele do dorso, medida com um paquímetro. (B) Imagem microscópica 6 dias após aplicação tópica de IMQ. (C) Imagens representativas de cortes de pele do dorso coradas por H&E, adquiridas com objetiva de 20x. Barras de escala, 100 μ m. O gráfico representa a média $\pm$ SEM de dados obtidos de 2-3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com o teste de comparação múltipla de bonferroni em C. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Figura 23 - STING modula os níveis de mediadores inflamatórios. Camundongos WT (C57BL/6) e *Sting*^{-/-} foram tratados topicamente com IMQ diariamente antes das análises. Camundongos WT não tratados foram utilizados como controles. Amostras de pele foram coletadas e processadas para mensuração dos níveis de IL-17, IL-6, IL-23, IFN- β e IL-10 por ELISA. O gráfico representa a média $\pm$ SEM de dados obtidos de 2-3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni. $P < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo.

Em seguida, avaliamos se a ausência de STING impacta os níveis de mediadores inflamatórios que estão envolvidos no processo de cronificação do

processo inflamatório da pele. Após seis dias consecutivos da aplicação de IMQ, notamos que a ausência de STING acarretou no aumento dos níveis de IL-17, IL-23 e IL-6 quando comparado ao grupo WT. Entretanto, curiosamente, os animais *Sting*^{-/-} apresentaram menores níveis de IFN- β e de IL-10 ao contrapor com o respectivo controle (Figura 23).

As citocinas IL-17, IL-23 e IL-6 desempenham um papel importante no recrutamento e ativação de células inflamatórias. Diante disso, decidimos avaliar através de citometria de fluxo a relação entre STING e a migração de células para a pele após os animais serem submetidos ao modelo psoriasiforme. Nossos dados revelaram que na ausência de STING há um maior número de neutrófilos (CD11b⁺ Ly6G⁺), de células dendríticas (CD11c⁺ MHCII⁺) e de monócitos (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁻ MHCII⁺), e em relação as células linfoides, também observou-se um aumento nas células T CD4⁺ em comparação com o grupo controle (Figura 24).

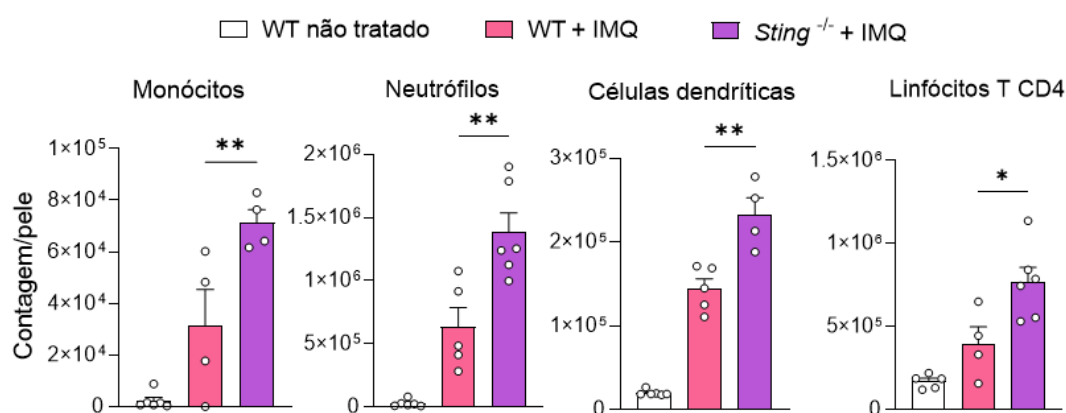


Figura 24 - STING reduz a migração de células inflamatórias. Camundongos WT (C57BL/6) e *Sting*^{-/-} foram tratados topicamente com IMQ diariamente antes das análises. Números absolutos de neutrófilos (CD11b⁺ Ly6G⁺), monócitos (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁻ MHCII⁺), células dendríticas (CD11c⁺ MHCII⁺) e células T CD4⁺ isoladas a partir de células CD45⁺ provenientes da orelha. Os gráficos representam a média $\pm$ SEM de dados obtidos de 2 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni. P<0,05 (*) foi considerado estatisticamente significante.

Ao analisar todos esses dados em conjunto, torna-se evidente que a presença de STING é necessária para que ocorra o controle da inflamação cutânea, através da sua influência em modular os níveis de mediadores inflamatórios, consequentemente, a migração de células imunes.

6.4 A presença de linfócitos é necessária para que STING module a inflamação cutânea

Já é bem descrito na literatura que os linfócitos desempenham um papel central na regulação da psoríase, tanto na sua patogênese quanto na modulação da resposta imune durante a doença (RENDON & SCHÄKE, 2019), e que na ausência de STING houve uma exacerbação da inflamação, além do aumento das células T CD4+, então resolvemos investigar se o fenótipo observado era dependente de linfócitos. Para elucidar esse questionamento, foram utilizados animais *Sting*^{-/-} *Rag2*^{-/-}, ou seja, esses animais não possuem a expressão de STING e nem linfócitos maduros. Interessantemente, notamos que os *Sting*^{-/-} *Rag2*^{-/-} apresentaram uma melhora na espessura da pele (Figura 25A), assim como, na descamação da pele quando comparado com o grupo *Sting*^{-/-} (Figura 25B). Corroborando com esses dados, observamos em cortes histológicos que a há uma redução na espessura da epiderme e na acantose no grupo *Sting*^{-/-} *Rag2*^{-/-} quando comparado com o grupo *Sting*^{-/-} (Figura 25C).

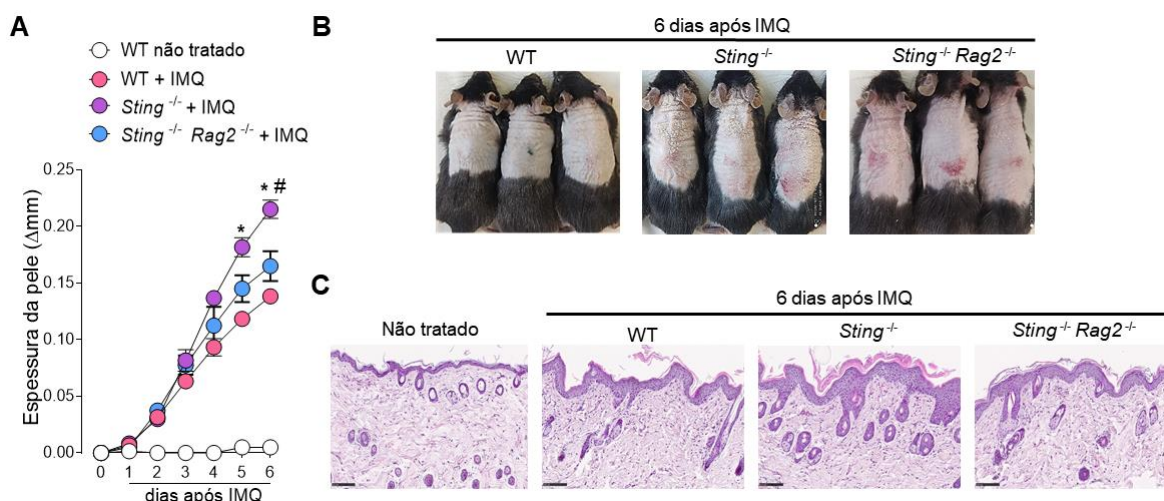


Figura 25 - Linfócitos são importantes para a modulação da inflamação cutânea por STING em modelo psoriasiforme. Camundongos WT (C57BL/6), *Sting*^{-/-} e *Sting*^{-/-} *Rag2*^{-/-} foram tratados topicamente com IMQ diariamente antes das análises. Camundongos WT não tratados foram utilizados como controles. (A) Cinética da alteração da espessura (delta) na pele do dorso, medida com um paquímetro. (B) Imagem microscópica 6 dias após aplicação tópica de IMQ. (C) Imagens representativas de cortes de pele do dorso corados por H&E, adquiridas com objetiva de 20x. Barras de escala, 100 μ m. O gráfico representa a média $\pm$ SEM de dados obtidos de 2-3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com o teste de comparação múltipla de bonferroni em A. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Para obter uma visão abrangente da resposta inflamatória da pele na ausência de linfócitos e STING no modelo psoriasiforme induzido por IMQ, investigamos as principais alterações nos níveis de mediadores inflamatórios. Houve uma redução dos níveis de IL-17, IL-23 e IL-6, mas não de IL-10, no grupo *Sting*^{-/-} *Rag2*^{-/-} quando comparado ao *Sting*^{-/-} (Figura 26).

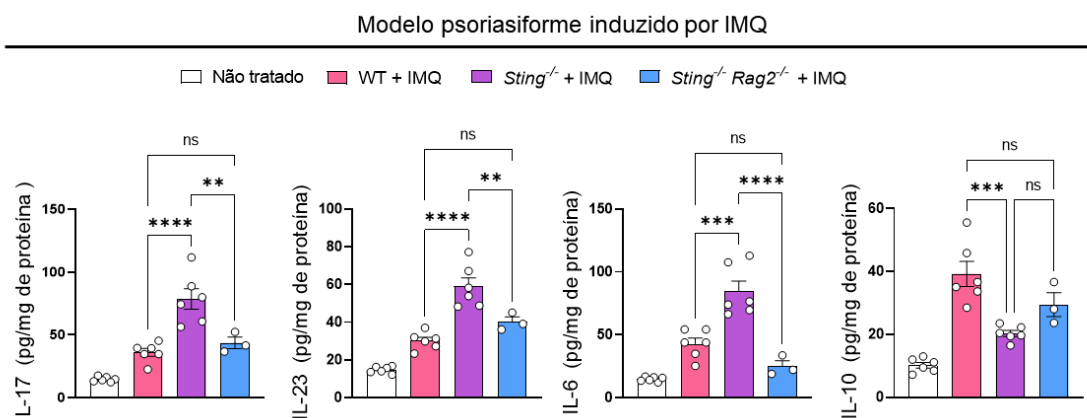


Figura 26 - Ausência de linfócitos e STING afeta os níveis de mediadores inflamatórios em modelo psoriasiforme. Camundongos WT (C57BL/6), *Sting*^{-/-} e *Sting*^{-/-} *Rag2*^{-/-} foram tratados topicamente com IMQ diariamente antes das análises. Camundongos WT não tratados foram utilizados como controles. Amostras de pele foram coletadas e processadas para mensuração dos níveis de IL-17, IL-6, IL-23 e IL-10 por ELISA. O gráfico representa a média ± SEM de dados obtidos de 2-3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni. P<0,05 (*) foi considerado estatisticamente significante.

6.5 IL-17 é envolvida no controle da inflamação mediada por STING em modelo psoriasiforme

Um estudo recente do nosso grupo demonstrou que STING é capaz de induzir a reprogramação de células TH17 para um perfil com menor potencial patogênico. A ativação de STING promove diminuição na produção de IL-17A e o aumento da produção de IL-10 (DAMASCENO et al., 2022). Baseado nesse estudo, e nos dados descritos anteriormente, decidimos investigar se a resposta inflamatória exacerbada observada na ausência de STING é dependente de IL-17. Assim, tratamos os animais *Sting*^{-/-} com anti-IL-17 (1 mg/kg i.p.) nos dias zero, dois e quatro, assim como seu respectivo controle IgG1(1 mg/kg i.p.), durante o desenvolvimento do modelo de psoriasiforme. Interessantemente, foi possível visualizar que o grupo *Sting*^{-/-} + anti-IL-17 + IMQ apresentou uma redução significativa na espessura da pele quando comparado com o grupo *Sting*^{-/-} + IgG1 + IMQ (Figura 27A). Esse dado é suportado, por uma menor espessura da epiderme e infiltrado de células

inflamatórias observadas nos segmentos histológicos da pele do grupo *Sting*^{-/-} + anti-IL-17 + IMQ em relação ao seu grupo controle (Figura 27B). Também foram avaliados os níveis de IL-10 e IL-23 na pele do *Sting*^{-/-} + anti-IL-17 + IMQ, onde ambas citocinas apresentaram uma diminuição em seus níveis quando comparado ao grupo *Sting*^{-/-} + IgG1 + IMQ. Entretanto, não houve diferença nos níveis de IL-10 e IL-23 entre os grupos WT e *Sting*^{-/-} que receberam anti-il-17 (Figura 27C).

Diante do exposto, podemos inferir que a sinalização de STING induz o controle da resposta inflamatória de maneira dependente de IL-17, ou seja, de alguma forma STING estar controlando a produção de IL-17.

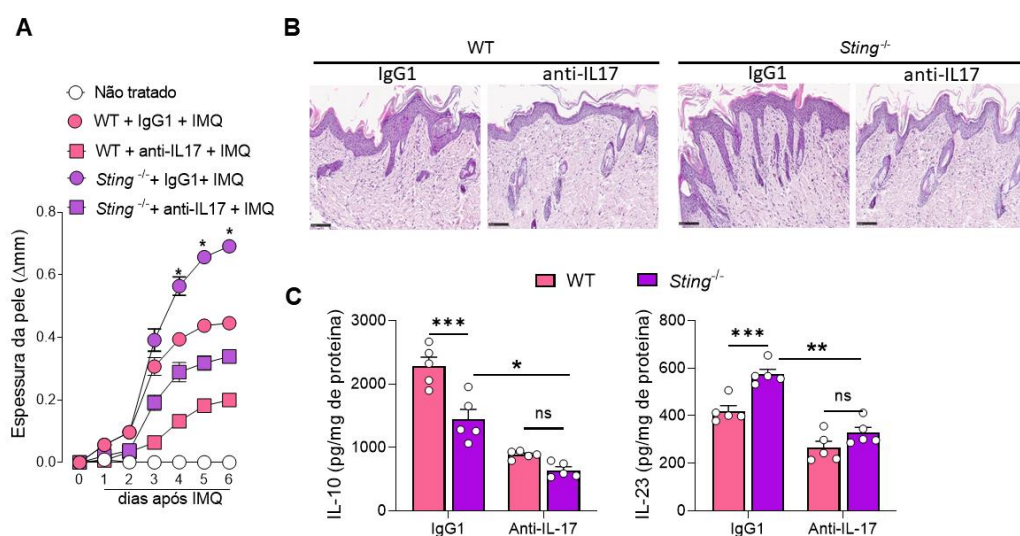


Figura 27 - IL-17 controla a inflamação gerada pela ausência de STING em modelo psoriasiforme. Camundongos WT (C57BL/6) e *Sting*^{-/-} foram tratados topicamente com IMQ por 6 dias diariamente antes das análises. Camundongos WT não tratados foram utilizados como controles. Foram injetados anti-IL-17 (1mg/kg) ou IgG1 (1mg/kg) nos dias 0,2 e 4 por via intraperitoneal. (A) Cinética da alteração da espessura (delta) na pele do dorso, medida com um paquímetro. (B) Imagens representativas de cortes de pele do dorso coradas por H&E, adquiridas com objetiva de 20x. Barras de escala, 100 μm. (C) Amostras de pele foram coletadas e processadas para mensuração dos níveis de IL-23 e IL-10 por ELISA. O gráfico representa a média ± SEM de dados obtidos de 2-3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com o teste de comparação múltipla de bonferroni em A e ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de bonferroni em C. P<0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

6.6 A sinalização de STING é dependente da expressão de IRF3 na inflamação cutânea da pele

A ativação clássica da via de sinalização de STING ocorre por intermédio de sensores de DNA como a GMP-AMP cíclico sintase (cyclic GMP-AMP synthase; cGAS), que medeia a produção de dinucleotídeos cíclicos que se ligam ao STING, desencadeando a ativação da quinase 1 de ligação à TANK

(TANK- binding kinase 1; TBK1) e Fator Regulador de Interferon 3 (Interferon Regulatory Factor 3; IRF-3) para a produção de interferons (IFN) do tipo I (HOPFNER; HORNING, 2020). Seguindo essa linha, primeiro, optamos por investigar se a sinalização de STING é dependente de cGAS no modelo de inflamação da pele induzida por IMQ. Surpreendentemente, os animais deficientes para cGAS exibiram uma menor espessura da pele, acompanhado, por uma menor espessura de epiderme e de acantose em relação aos animais que não possuem a expressão de STING (Figura 28).

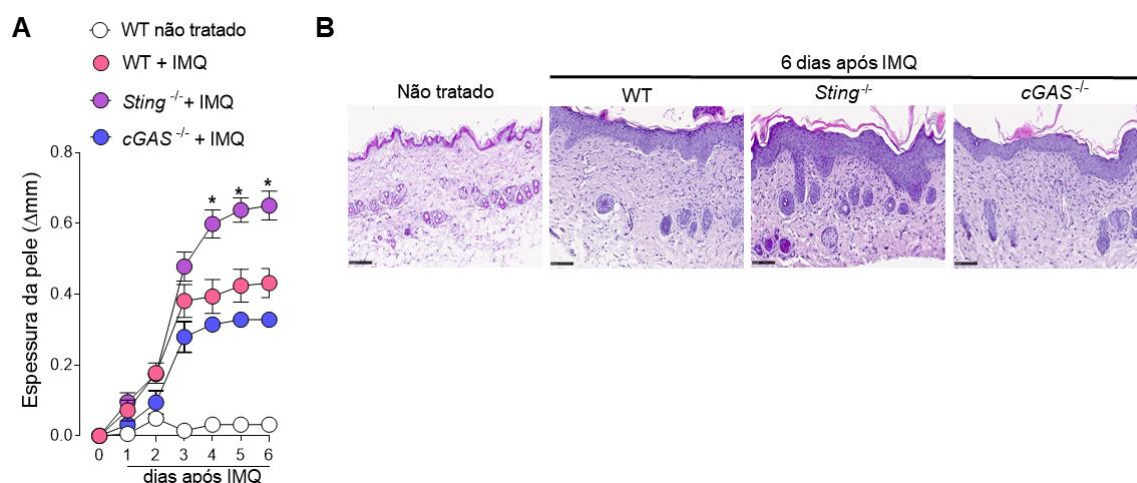


Figura 28 - cGAS reduz a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme. Camundongos WT (C57BL/6) e *cGAS*^{-/-} foram tratados topicamente com IMQ por 6 dias diariamente antes das análises. Camundongos WT não tratados foram utilizados como controles. (A) Cinética da alteração da espessura (delta) na pele do dorso, medida com um paquímetro. (B) Imagens representativas de cortes de pele do dorso coradas por H&E, adquiridas com objetiva de 20x. Barras de escala, 100 μm. O gráfico representa a média ± SEM de dados obtidos de 2 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com o teste de comparação múltipla de bonferroni em A. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Em seguida nos perguntamos se a sinalização de IRF3 é necessária para o controle da inflamação cutânea por STING. Curiosamente, a ausência de IRF3 intensificou a resposta inflamatória, o que pode ser visualizado através do aumento expressivo da espessura da pele, assim como, da descamação presente no dorso dos animais em relação aos animais *Sting*^{-/-} e WT que receberam IMQ (Figura 29 A-B). Além disso, a histologia evidenciou um aumento robusto na epiderme, na acantose e no infiltrado de células na derme no grupo *Irf3*^{-/-} em relação ao grupo controle (Figura 29C).

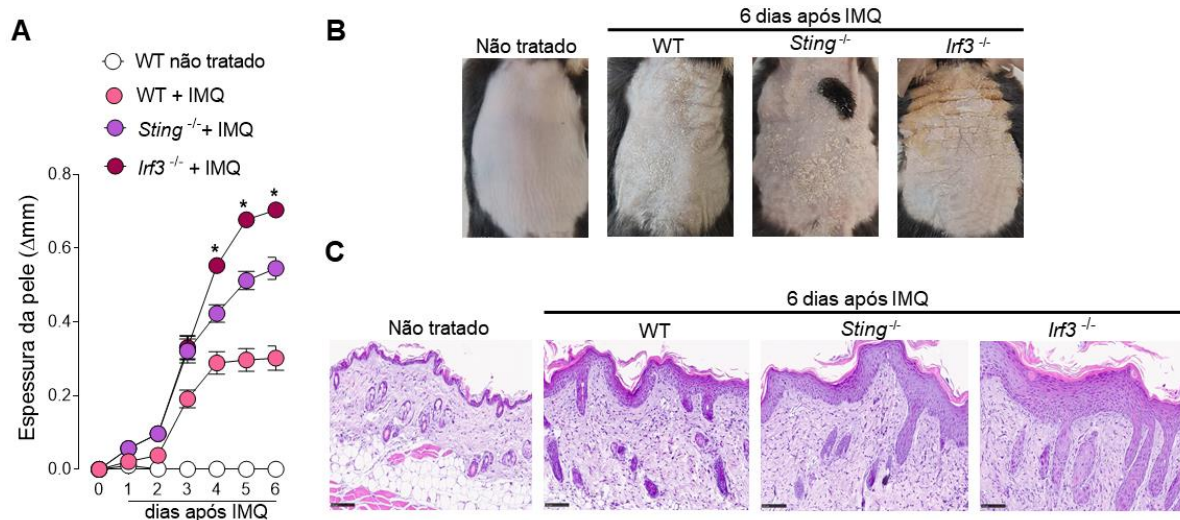


Figura 29 - IRF3 induz a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme. Camundongos WT (C57BL/6) e *Irf3*^{-/-} foram tratados topicamente com IMQ por 6 dias diariamente antes das análises. Camundongos WT não tratados foram utilizados como controles. (A) Cinética da alteração da espessura (delta) na pele do dorso, medida com um paquímetro. (B) Imagens representativas de cortes de pele do dorso coradas por H&E, adquiridas com objetiva de 20x. Barras de escala, 100 μm. O gráfico representa a média ± SEM de dados obtidos de 2 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com o teste de comparação múltipla de bonferroni em A. P<0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Por fim, sabendo que classicamente a transcrição de IRF3 leva a produção de interferons (IFN) do tipo I, no qual sua sinalização ocorre através dos receptores IFNAR. Então, avaliamos se a expressão desse receptor é importante para o controle da resposta inflamatória exercida por STING. Surpreendentemente, a ausência de IFNAR levou uma menor espessura da pele tanto em relação ao *Sting*^{-/-} quanto ao WT após a aplicação tópica de IMQ (Figura 30A). Esses achados também ficam evidentes na histologia (Figura 30B).

Com base nesses resultados, podemos inferir que a regulação da resposta inflamatória cutânea por STING ocorre independentemente da ativação de STING via sinalização de cGAS e do reconhecimento de interferon tipo I por IFNAR. No entanto, essa regulação é dependente da sinalização de IRF3.

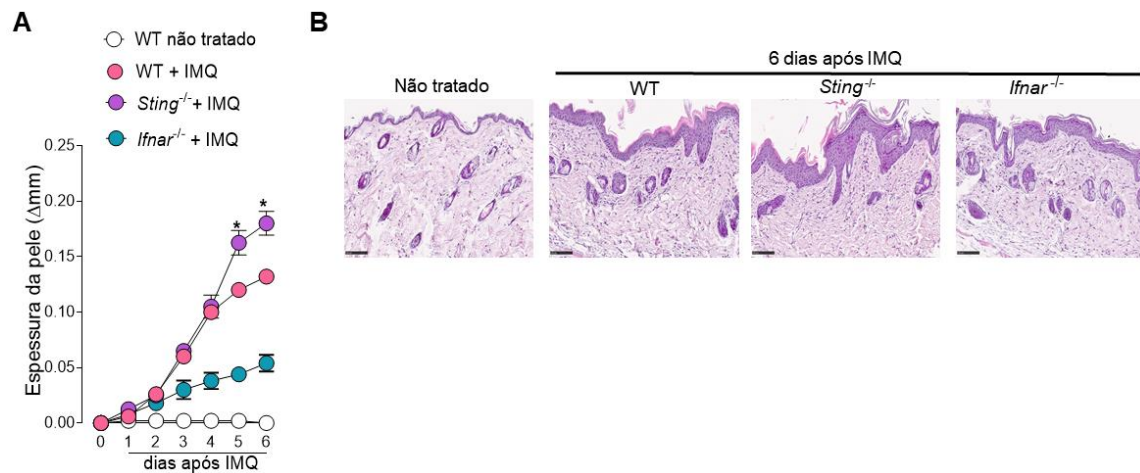


Figura 30 - IFNAR reduz a inflamação cutânea em modelo psoriasiforme. Camundongos WT (C57BL/6) e *Ifnar*^{-/-} foram tratados topicamente com IMQ por 6 dias diariamente antes das análises. Camundongos WT não tratados foram utilizados como controles (A) Cinética da alteração da espessura (delta) na pele do dorso, medida com um paquímetro. (B) Imagens representativas de cortes de pele do dorso coradas por H&E, adquiridas com objetiva de 20x. Barras de escala, 100 μ m. O gráfico representa a média $\pm$ SEM de dados obtidos de 2 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com o teste de comparação múltipla de bonferroni em A. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

A psoríase é uma doença de grande importância epidemiológica, afetando aproximadamente 2-3% da população mundial. Contudo, os fármacos atualmente empregados no tratamento da psoríase frequentemente exibem eficácia limitada, uma vez que se concentram primariamente nas manifestações inflamatórias crônicas da doença, sem abordar sua causa subjacente de forma direta. Esta limitação decorre em grande parte do entendimento ainda incompleto dos mecanismos precisos responsáveis pelo desenvolvimento da patologia. Ademais, é de suma importância a identificação de potenciais biomarcadores, os quais podem desempenhar um papel crucial no diagnóstico, prognóstico e abordagem terapêutica da psoríase. Neste contexto, a proposta inicial deste estudo consistiu em identificar alvos potencialmente relevantes na patogênese da psoríase. Para tanto, uma abordagem integrada foi empregada, envolvendo a reanálise de múltiplos repositórios de dados públicos de pacientes com psoríase, com o intuito de caracterizar o perfil transcricional mediante a comparação entre áreas de pele lesionada e não lesionada desses indivíduos. A via de sensores de citósolicos de DNA foi encontrada predominantemente aumentada. Neste estudo, evidenciamos que vias cruciais para o reconhecimento de DNA citoplasmático, AIM2 e STING, desempenham um papel significativo na regulação do desenvolvimento da psoríase, contudo, operam de maneira antagônica. Demonstramos que a expressão do AIM2 na pele, principalmente na epiderme, aumenta durante a resposta inflamatória da psoríase, e a ablação genética desse gene resultou em uma redução significativa dos aspectos inflamatórios. Por outro lado, observou-se que o STING é predominantemente expresso na derme de indivíduos com psoríase, e sua ausência resultou na intensificação da resposta inflamatória.

O DNA recentemente surgiu como um ativador potente do sistema imunológico inato. Células são expostas a DNA de fita dupla, liberado por células hospedeiras danificadas durante lesões teciduais ou introduzido por vírus de DNA e bactérias intracelulares durante infecções (HORNUNG, 2010; IMAEDA, 2009; ISHII, 2006, STETSON, 2006; TAKAOKA, 2007). No nosso estudo foi observado aumento de DNA circulante livre em plasma de pacientes

com psoríase. O cfDNA anormal tem sido reconhecido como um fator patogênico em diversas enfermidades, tais como doenças autoimunes, traumas graves e neoplasias (LIU et al., 2021; CAICEDO et al., 2021; JIA et al., 2020). Diante do exposto, o objetivo do nosso estudo foi investigar simultaneamente a lacuna de conhecimento relacionada ao papel dos sensores de DNA, AIM2 e STING, na resposta inflamatória cutânea durante o desenvolvimento da psoríase.

Pesquisadores relataram que o gene *AIM2* é um dos 15 novos genes/loci de risco para psoríase por meio do array de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) de exoma completo (ZUO et al., 2015), reforçando a importância de elucidar o AIM2 no contexto da psoríase. Outro estudo, evidenciou que há um aumento da expressão de AIM2 na pele humana e o acúmulo de DNA no citoplasma dos queratinócitos ativa o inflamassoma AIM2, resultando na liberação de IL-1 β , sendo os queratinócitos identificados como a principal fonte deste mediador inflamatório (DOMBROWSKI et al., 2011). Essas observações são consistentes com nossas análises, nas quais identificamos um aumento na expressão de AIM2 na pele de pacientes com psoríase e em camundongos tratados com IMQ, um modelo animal que mimetiza a psoríase. Além disso, constatamos que a expressão de AIM2 está predominantemente localizada na epiderme.

A ativação do AIM2 inicia a montagem do inflamassoma, um complexo imunológico inato que leva à ativação de cascata inflamatória, resultando na maturação e secreção de IL-1 β e IL-18. Achados experimentais e clínicos apontam para um papel importante da IL-1 β na patogênese e evolução da inflamação cutânea na psoríase. Na pele inflamada, fatores derivados de queratinócitos, incluindo IL-1 β , ativam células dendríticas residentes na pele, que liberam IL-23, ativando células T produtoras de IL-17, como Th17. Isso resulta na produção de várias citocinas e quimiocinas, como IL-6 e CXCL-1, levando ao recrutamento e ativação de outras células imunes, incluindo neutrófilos e macrófagos. Quanto a IL-18, sua expressão está correlacionada de forma significativa com a gravidade da psoríase (RASMY et al., 2011). De fato, resultados experimentais preliminares evidenciaram que a IL-18, em combinação com a IL-23, induz a produção de IL-17, desencadeando uma inflamação proeminente e exacerbando a hiperplasia epidérmica característica da psoríase (SHIMOURA et al., 2017). Considerando o envolvimento da IL-1 β

e IL-18 na patogênese da psoríase e sua liberação subsequente à ativação do inflamassoma AIM2, nossa hipótese foi que o aumento da expressão do gene AIM2 na pele de pacientes com psoríase potencialize o processo inflamatório subjacente à doença. Seguindo esta linha, fornecemos evidências de que a deficiência genética de AIM2 previne a inflamação cutânea induzida por IMQ, através da redução na produção de IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18, IL-23 e CXCL1/KC, o que diminui a migração de neutrófilos, células dendríticas, macrófagos e células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17, e consequentemente, o estabelecimento da inflamação cutânea.

Os queratinócitos representam a população predominante de células no estrato epidérmico da pele. Durante o curso da psoríase, essas células manifestam uma proliferação e diferenciação anômalas, levando a hiperplasia epidérmica (NI et al., 2020). Observamos que o AIM2 está predominantemente expresso na epiderme, e sua falta resulta em uma redução na expressão de *Lcn2*, *Krt14* e *S100a9*, os quais estão relacionados com a ativação e proliferação dos queratinócitos. Entretanto, é necessário a condução de mais experimentos para entender a influência de AIM2 na ativação e proliferação dos queratinócitos. Dentre as citocinas documentadas por seu efeito direto sobre os queratinócitos, IL-17 se destaca, levando a um ciclo de retroalimentação positiva que induz a produção de citocinas e quimiocinas adicionais (MARTIN et al., 2013). Identificamos que ao estimular queratinócitos com IL-17A houve um aumento na expressão tanto do gene quanto da proteína de AIM2. Posteriormente, foi observado que após o tratamento farmacológico com o anticorpo monoclonal anti-IL17RA (brodalumabe), a expressão de AIM2 foi significativamente suprimida. Seguindo nessa linha de entender a importância de IL-17A para a expressão de AIM2, evidenciamos que a perda de sinalização de IL-17A em camundongos deficientes em IL-17RA leva a uma menor expressão de *Aim2*. Esses resultados, em conjunto, sugerem que o ambiente pró-inflamatório, caracterizado pela presença de IL-17A na pele afetada pela psoríase, desempenha um papel importante na regulação da expressão do AIM2, estabelecendo um feedback positivo que influencia a inflamação cutânea psoriasiforme. Assim, uma investigação mais aprofundada é necessária para compreender o mecanismo pelo qual ocorre a regulação de AIM2 por IL-17A em queratinócitos.

Cada vez mais, estudos ressaltam que a ativação do receptor AIM2 está associada a diversas doenças autoimunes e inflamatórias, como artrite reumatoide, colite, diabetes tipo 1 e lúpus eritematoso sistêmico (KUMARI et al., 2021). No entanto, é importante destacar que a ativação do receptor AIM2 pode desencadear tanto uma resposta pró-inflamatória quanto anti-inflamatória. Por exemplo, a ativação de AIM2 na mucosa intestinal parece estar relacionada à proteção contra a disbiose e o desenvolvimento da colite. Nesse contexto, Hu et al. (2015) observaram que camundongos deficientes em AIM2 são mais suscetíveis ao desenvolvimento de colite induzida por DSS ou pela inflamação intestinal decorrente de infecção por *Escherichia coli*. Esses eventos foram associados a uma redução significativa na produção de IL-1 β e IL-18, demonstrando assim a importância da ativação do inflamassoma AIM2 no controle do crescimento de *E. coli* e na proteção contra a inflamação intestinal. Por outro lado, na artrite, a ativação do receptor AIM2 está associada ao seu desenvolvimento. Isso é evidenciado pelo aumento da expressão de caspase-1 clivada e IL-1 β observado nas articulações de camundongos deficientes em IFNAR e Dnase II. Essa melhoria foi acompanhada por uma redução na infiltração de macrófagos, inflamação articular e danos ósseos e cartilagosos (JAKOBS; PERNER; HORNUNG, 2015). Neste estudo, foi observado que a ativação do receptor AIM2 na pele, por meio de seu ligante, poly (dA:dT), induz a uma resposta inflamatória cutânea semelhante à psoríase. Esta resposta foi caracterizada pela hiperplasia epidérmica e pelo aumento de IL-6, IL-17A, IL-18, IL-23 e CXCL1/KC, assim como da expressão de genes associados à diferenciação e proliferação de queratinócitos (*Krt14* e *S100a9*). Além disso, constatou-se que o efeito pró-inflamatório de AIM2 na pele é dependente de ASC. Portanto, reforça-se a importância de AIM2 para o estabelecimento do processo inflamatório cutâneo.

Uma das limitações do presente estudo é a falta de experimentação para identificar qual seria a origem desse DNA. Contudo, como mencionado anteriormente, demonstramos que há um aumento de DNA circulante livre no plasma, nos dando indícios que pode estar envolvido com a ativação do receptor de AIM2. Cao e colaboradores (2022) propuseram que as armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) de pacientes com psoríase poderiam ativar o inflamassoma AIM2 em queratinócitos por meio da via de sinalização p-38 MAPK, induzindo a produção de IL-1 β . É relevante destacar que as NETs têm

sido relatadas contendo DNA mitocondrial (mtDNA) (POLI et al, 2023; LOOD et al., 2016), e que a estimulação de queratinócitos cultivados com dsDNA desencadeia a liberação de IL-1 β mediada pelo inflamassoma AIM2 (DOMBROWSKI et al., 2011). Neste trabalho, demonstramos que a linhagem de queratinócitos humano e queratinócitos murinos estimulados com dsDNA ou poly(dA:dT) produzem a quimiocina, CXCL1, assim como a citocina IL-18, dependente do inflamassoma. Juntos, esses achados e nossas descobertas sugerem que o dsDNA pode ativar o AIM2 nos queratinócitos, promovendo o desenvolvimento da psoríase. No entanto, estudos futuros são necessários para elucidar o mecanismo exato envolvido e o potencial papel de AIM2 em outras células, incluindo células imunes por meio de camundongos deficientes condicionais. Além disso, vale salientar que outros receptores inatos, incluindo sensores de DNA, também desencadeiam e mantêm a inflamação na pele psoriática. Por exemplo, o peptídeo LL37 forma um complexo com ácidos nucleicos que pode ativar o receptor toll-like 9 (TLR9) em queratinócitos ou células dendríticas plasmocitoides para promover ainda mais a produção de mediadores pro-inflamatórios durante a psoríase (MORIZANE et al., 2012; LANDE et al., 2007). Isso poderia explicar por que a deficiência de AIM2 não consegue mitigar completamente a inflamação da pele psoriática.

Quando o AIM2 reconhece e se liga ao DNA ocorre uma mudança conformacional no AIM2, levando à sua oligomerização. Este oligômero de AIM2 então recruta a proteína adaptadora ASC, através da interação entre seus domínios de homologia de caspase-recrutamento (CARD). A ASC recrutada se polimeriza em um filamento longo, formando a plataforma de ativação para a enzima caspase-1. A caspase-1 é então recrutada e ativada dentro do inflamassoma AIM2, promovendo a clivagem da pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas ativas, IL-1 β e IL-18 (HORNUNG et. al., 2009). Nossos resultados demonstram um aumento na expressão de ASC e caspase-1 na pele lesada de pacientes com psoríase vulgar. Além disso, ao submetermos animais deficientes em ASC ou caspase-1 a um modelo murino semelhante à psoríase, observamos uma melhora no desenvolvimento da psoríase. Esta melhora foi evidenciada pela redução da espessura epidérmica, acantose e dos níveis de IL1- β , IL-17 e IL-23 em camundongos *Pycard*^{-/-} e *Casp1*^{-/-} tratados com IMQ. Assim, nosso estudo demonstra que o AIM2 é essencial para induzir a inflamação psoriasiforme por meio de um mecanismo dependente do

inflamassoma. Em consonância com nossos dados, outro estudo revelou que o EFLA 945, um constituinte de extratos de folhas de videira vermelha conhecido por impedir a entrada de DNA, atenua as respostas pró-inflamatórias relacionadas à psoríase induzida por IMQ na pele psoriática tópica, incluindo a ativação da caspase-1, maturação de IL-1 β e produção de IL-17, além de reduzir a gravidade da psoríase (CHUNG et al., 2020).

Dado o exposto, nossos resultados combinados de amostras clínicas e murinas demonstram pela primeira vez que o AIM2 promove a inflamação cutânea induzindo a liberação de mediadores inflamatórios e amplificando a migração de células imunes, e tem sua expressão regulada por IL-17.

Com base no dado já mencionado, foi observado que além da regulação positiva da via de sensores de DNA, também, encontramos a modulação positiva da sinalização de IFNs na pele de pacientes com psoríase. Então, sabendo que STING é um membro chave da maquinaria de reconhecimento de DNA citoplasmático e que sua sinalização culmina na fosforilação e subsequente migração de IRF3, para o núcleo das células, onde promove a expressão de IFNs do tipo I (TANAKA; CHEN, 2012), buscamos aprofundar o conhecimento de como ele está envolvido na fisiopatologia da psoríase.

Sempre empenhados em adotar uma abordagem translacional, observamos que houve um aumento da expressão de STING na região da derme de pacientes com psoríase. Diante disso, nosso próximo objetivo foi elucidar a relevância biológica de STING para o desenvolvimento da psoríase. Ao induzir o modelo semelhante a psoríase em animais deficientes para STING, ficou evidente que houve uma exacerbação da inflamação. Vale ressaltar que esse experimento foi conduzido tanto no Brasil quanto na França, e os resultados alcançados foram consistentes nos dois locais, demonstrando a reprodutibilidade dos achados. Entretanto, Yu e colaboradores (2022), usando a pontuação PASI modificada, demonstraram que em camundongos (*Tmem173^{gt}*) ocorre a melhora da resposta inflamatória. A diferença observada entre os dois estudos pode ser atribuída a diferentes abordagens para a interrupção genética (*Sting^{-/-}* versus *Tmem173^{gt}*). O *Tmem173^{gt}* possui uma mutação (substituição I199N) na proteína STING, tornando-a inativa (SAUER et al., 2011), e isto pode interferir na ativação das vias de sinalizações downstream a STING, e desta forma influenciar nos resultados obtidos pelos pesquisadores.

Nós últimos anos vem sendo demonstrado que STING é capaz de modular respostas inflamatórias. Conesso e seus colaboradores (2019) demonstraram que a deficiência de STING é suficiente para agravamento da colite induzida por DSS, e isto foi associado a menores níveis de IL-10 e maiores níveis de IL-17. Em consonância com essas descobertas, foi relatado que CDNs derivados da microbiota é capaz de ativar STING em fagócitos mononucleares e induzem a produção de IL-10 para prevenir a inflamação e promover a homeostase intestinal (AHN et. al., 2017). No contexto de EAE, a ativação de STING foi capaz de reduzir sinais clínicos da doença, e também foi observado uma menor produção de IL-17 e IL-6 (LE MOS et. al., 2014). Corroborando com esses achados, nossos resultados demonstram que a deficiência de STING levou a uma maior produção de IL-23, IL-17 e IL-6, e menor uma produção de IL-10 e IFN β . Sabe-se que esse *milieu* de citocinas tem implicações importantes na migração, manutenção e diferenciação de células que estão envolvidas com a progressão da psoríase (DI MEGLIO & NESTLE, 2017). Dentro desse contexto, observamos que a ausência de STING levou a um maior número de neutrófilos, de células dendríticas, de monócitos e de células T CD4+ no sítio inflamatório. De fato, fica evidente a contribuição de STING durante o processo inflamatório no contexto da psoríase, entretanto são necessários mais estudos para entender como essa proteína regula a produção de citocinas.

Nas últimas décadas, vem sendo demonstrado que tanto as células imunes quanto as adaptativas desempenhas um papel no processo inflamatório crônico da psoríase. Especialmente, as células T auxiliares são elementos essenciais no desenvolvimento da doença, as quais produzem diversas citocinas, como IL-17. Essa citocina atua sobre queratinócitos, intensificando a inflamação característica da psoríase (MARTIN, et. al. 2013). Interessantemente, observamos que os animais que não possuem linfócitos maduros e não possuem STING apresentam uma melhora considerável no fenótipo, além de, menores níveis de IL-17, IL-23 e IL-6. O que nos leva a acreditar que a sinalização de STING em linfócitos é crucial para limitar o processo inflamatório durante a psoríase. Interessantemente, um estudo do nosso grupo demonstrou que ativação de STING regula a patogenicidade de células Th17. Nestas células, STING induz a produção de IL-10 de modo parcialmente dependente da atividade de AhR em células TH17. Em paralelo,

STING é capaz de reduzir a atividade transcricional de $Ror\gamma\tau$ sobre a região CNS2 do gene *Il17a*, culminando em menor produção desta citocina (DAMASCENO et al., 2022). Esses dados suportam os nossos achados, onde observamos que a neutralização de IL-17A foi capaz de reverter a resposta inflamatória exacerbada observada em animais deficientes de STING. Em concordância com os resultados obtidos em nosso estudo, foi mostrado que a deficiência de STING per se induziu aumento no infiltrado de células TH17 no pâncreas, a exacerbação da inflamação e indução de fibrose em modelo de pancreatite crônica em camundongos (ZHAO et al., 2019). Entretanto, o tratamento com anti-IL17A em animais STING KO foi suficiente para reverter os parâmetros clínicos da doença. Diante do exposto, nossos dados e os estudos recentes, fica evidente que a ativação da sinalização de STING tem potencial para ser usado como uma estratégia terapêutica para controlar doenças que são mediadas por células Th17.

STING pode ser estimulado por diferentes sensores de DNA citoplasmáticos, como a proteína IFI16 (JØNSSON et al., 2017; UNTERHOLZNER et al., 2010), a helicase DDX41 (ZHANG et al., 2011b), e cGAS, sendo esta última amplamente estudada como alvo terapêutico em doenças inflamatórias (DECOUT et al., 2021). Porém, em nosso trabalho observamos que o efeito anti-inflamatório de STING é independente da sinalização de cGAS no modelo psoriasiforme. Sugerindo que outro sensor de DNA pode estar envolvido na ativação de STING na psoríase. Além disso, é importante destacar que foi relatado que STING pode se ligar diretamente ao DNA dupla-fita (ABE et al., 2013), assim como, estresse celular induz a liberação de DNA mitocondrial, o qual foi previamente demonstrado ativar a via de sinalização de STING (WEST et al., 2015). Deste modo, esses tópicos são de nosso interesse e necessitam de futuras investigações para desvendar qual é o mecanismo de ativação de STING no desenvolvimento da psoríase.

A via de sinalização tradicional do STING resulta na fosforilação e posterior translocação de IRF3 para o núcleo das células, onde estimula a expressão de interferons do tipo I (TANAKA; CHEN, 2012). No presente estudo, vimos que IRF3 é fundamental para controle da resposta inflamatória no contexto da psoríase. De fato, no trabalho citado anteriormente, em células Th17 após ativação de STING, o fator de transcrição IRF3 é ativado, sendo capaz de interagir fisicamente com $Ror\gamma\tau$, o que resulta em uma menor

produção de IL-17. Sendo assim, investigações futuras torna-se interessante para desvendar os mecanismos e o impacto da sinalização de STING-IRF3 em células Th17 no contexto da psoríase.

Pesquisas recentes descreveram a existência de uma via não canônica do STING, que rapidamente induz a produção de IL-6 com produção mínima de IFN- β após danos ao DNA em queratinócitos HaCaT (DUNPHY et al., 2018). Além disso, no que diz a respeito de resposta inflamatória na pele, foi visto que em camundongos tratados com anticorpos neutralizantes de IFN α ou IFN β , ou camundongos deficientes em IFNAR (receptor para IFN α/β), não desenvolveram inflamação cutânea mediada por células Th17 (NESTLE et al., 2005; GREGORIO et. al, 2010). Esses resultados suportam o que encontramos nesse estudo, onde observamos que a regulação da resposta inflamatória cutânea por STING ocorre independentemente de IFNAR. Como observamos um aumento da produção de IL-6 na ausência de STING e uma menor produção de IFN beta, especulamos que está ocorrendo a ativação de uma via não canônica durante o desenvolvimento da psoríase, no entanto, é necessário mais estudo para elucidar essa possível sinalização.

Por fim, é relevante salientar que, embora não tenha sido o foco de nosso estudo, há evidências de uma relação entre AIM2 e STING, o que abre perspectivas para investigar a interação desses dois receptores de DNA na fisiopatologia de doenças inflamatórias na pele. O presente estudo mostrou que esses receptores podem desencadear respostas distintas, indicando a complexidade de suas interações e seu potencial impacto nos processos inflamatórios cutâneos. Podemos citar como exemplo, uma pesquisa que relatou que ativação in vitro do inflamassoma AIM2 em macrófagos e células dendríticas murinas resulta em uma redução da ativação da via STING, em parte através da promoção da morte celular dependente de caspase-1 (CORRALES et. al., 2016).

Portanto, este estudo acrescenta novas perspectivas quanto a versatilidade de receptores de DNA em regular as repostas imunes, o qual contribuirá para investigação do circuito imunorregulador induzido por STING e AIM2 na psoríase. Logo, STING e AIM2 pode representar potencial alvo terapêutico para doenças inflamatórias crônicas na pele.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Tendo em vista os achados descritos neste trabalho podemos concluir que os sensores de DNA, AIM2 e STING, desempenham um papel relevante no processo inflamatório associado à psoríase. Porém, ativação desses sensores levam a uma resposta antagônica.

Em humanos, demonstramos o perfil da assinatura gênica na pele de pacientes com psoríase, com destaque para a via de sensores de citosólicos de DNA. Além disso, observamos o aumento de DNA circulante livre no plasma. Ao combinar amostras clínicas de pacientes com psoríase e um modelo pré-clínico da doença, observamos que a expressão de AIM2 é predominante na epiderme, enquanto a expressão de STING ocorre na derme.

Relatamos que o AIM2 desempenha um papel crucial como sensor imunológico na promoção da inflamação cutânea psoriasiforme, aumentando os níveis de citocinas e quimiocinas, bem como o recrutamento de células imunes e a ativação/proliferação de queratinócitos. Observamos também que a expressão de AIM2 nos queratinócitos é induzida pela IL-17A. Além disso, nossos resultados demonstram o envolvimento do AIM2 na inflamação psoriasiforme através de sua ativação canônica.

Em relação ao STING, nossa pesquisa evidencia seu papel protetor no modelo de inflamação cutânea semelhante a psoríase. Isto ocorre, através da redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, do aumento dos níveis de citocinas anti-inflamatórias e diminuindo a migração de células imunes. Demonstramos que os linfócitos e a IL-17A desempenham um papel crucial na regulação da resposta inflamatória mediada por STING. Além disso, observamos que IRF3, componente downstream da sinalização de STING, intensificou a inflamação na pele, sendo essa regulação independente de cGAS e IFNAR.

Em suma, nossos resultados indicam que os receptores de DNA, STING e AIM2 desempenham um papel na modulação da resposta inflamatória da pele, sugerindo que esses receptores podem ser alvos farmacológicos importantes para doenças inflamatórias que envolvem respostas mediadas por IL-17 em sua patogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, Takayuki; BARBER, Glen N. Cytosolic-DNA-Mediated, STING-Dependent Proinflammatory Gene Induction Necessitates Canonical NF- κ B Activation through TBK1. *Journal of Virology*, [S. l.], v. 88, n. 10, p. 5328–5341, 2014. DOI: 10.1128/JVI.00037-14. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00037-14>.
- ABE, Takayuki; HARASHIMA, Ai; XIA, Tianli; KONNO, Hiroyasu; KONNO, Keiko; MORALES, Alejo; AHN, Jeonghyun; GUTMAN, Delia; BARBER, Glen N. STING Recognition of Cytoplasmic DNA Instigates Cellular Defense. *Molecular Cell*, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 5–15, 2013. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.01.039. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.039>.
- ABLASSER, Andrea; GOLDECK, Marion; CAVLAR, Taner; DEIMLING, Tobias; WITTE, Gregor; RÖHL, Ingo; HOPFNER, Karl Peter; LUDWIG, Janos; HORNUNG, Veit. CGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature*, [S. l.], v. 498, n. 7454, p. 380–384, 2013. a. DOI:10.1038/nature12306.
- ABLASSER, Andrea; SCHMID-BURCK, Jonathan L.; HEMMERLING, Inga; HORVATH, Gabor L.; SCHMIDT, Tobias; LATZ, Eicke; HORNUNG, Veit. Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. *Nature*, [S. l.], v. 503, n. 7477, p. 530–534, 2013. b. DOI: 10.1038/nature12640. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12640>
- AHN, Jeonghyun; SON, Sehee; OLIVEIRA, Sergio C.; BARBER, Glen N. STING-Dependent Signaling Underlies IL-10 Controlled Inflammatory Colitis. *Cell Reports*, [S. l.], v. 21, n. 13, p. 3873–3884, 2017. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.11.101. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.101>
- ALTO, Neal M.; YAN, Nan. STING activation by translocation from the ER is associated with infection and autoinflammatory disease. *Cell Host and Microbe*, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 157–168, 2015. DOI: 10.1016/j.chom.2015.07.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2015.07.001>.
- BREZINSKI, E. A, DHILLON, J. S., & ARMSTRONG, A. W. (2015). Economic Burden of Psoriasis in the United States: A Systematic Review. *JAMA Dermatology*, 1–8. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2014.3593>
- BOEHNCKE, Wolf Henning; SCHÖN, Michael P. Psoriasis. *The Lancet* Lancet Publishing Group, , 2015. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61909-7. Acesso em: 2 set. 2020.
- BOTTO, Sara; ABRAHAM, Jinu; MIZUNO, Nobuyo; PRYKE, Kara; GALL, Bryan; LANDAIS, Igor; STREBLOW, Daniel N.; FRUH, Klaus J.; DEFILIPPIS, Victor R. Human Cytomegalovirus Immediate Early 86-kDa Protein Blocks Transcription and Induces Degradation of the Immature Interleukin-1 β Protein during Virion-Mediated Activation of the AIM2 Inflammasome. *mBio*, [S. l.], v. 10, n. 1, 2019. DOI: 10.1128/MBIO.02510-18. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30755509/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

BRONKHORST, Abel Jacobus; UNGERER, Vida; HOLDENRIEDER, Stefan. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomolecular Detection and Quantification*, v. 17, p. 100087, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221475351830024X>>.

BRUBAKER, Sky W.; BONHAM, Kevin S.; ZANONI, Ivan; KAGAN, Jonathan C. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. [s.l.: s.n.]. v. 33 DOI: 10.1146/annurev-immunol-032414-112240. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-032414-112240>.

BURDETTE, Dara L.; MONROE, Kathryn M.; SOTELO-TROHA, Katia; IWIG, Jeff S.; ECKERT, Barbara; HYODO, Mamoru; HAYAKAWA, Yoshihiro; VANCE, Russell E. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature*, [S. l.], v. 478, n. 7370, p. 515–518, 2011. DOI: 10.1038/nature10429. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10429>.

CAPON, F.; SEMPRINI, S.; DALLAPICCOLA, B.; NOVELLI, G. Evidence for interaction between psoriasis-susceptibility loci on chromosomes 6p21 and 1q21. *American journal of human genetics*, [S. l.], v. 65, n. 6, p. 1798–1800, 1999. DOI: 10.1086/302653. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10577939/>. Acesso em: 20 nov. 2022

CANESSO, M. C. C. et al. The cytosolic sensor STING is required for intestinal homeostasis and control of inflammation. *Mucosal Immunology*, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 820–834, 2018. DOI: 10.1038/mi.2017.88. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/mi.2017.88>.

CAROZZA, Jacqueline A. et al. Extracellular cGAMP is a cancer-cell-produced immunotransmitter involved in radiation-induced anticancer immunity. *Nature Cancer*, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 184–196, 2020. DOI: 10.1038/s43018-020-0028-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s43018-020-0028-4>.

Cao T, Yuan X, Fang H, et al. Neutrophil extracellular traps promote keratinocyte inflammation via AIM2 inflammasome and AIM2-XIAP in psoriasis. *Exp Dermatol*. Published online 2022. doi:10.1111/exd.14711

CHANG, Elmer Y.; GUO, Beichu; DOYLE, Sean E.; CHENG, Genhong. Cutting Edge: Involvement of the Type I IFN Production and Signaling Pathway in Lipopolysaccharide-Induced IL-10 Production. *The Journal of Immunology*, [S. l.], v. 178, n. 11, p. 6705–6709, 2007. DOI: 10.4049/jimmunol.178.11.6705.

CHEN, Qi; SUN, Lijun; CHEN, Zhijian J. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nature Immunology*, [S. l.], v. 17, n. 10, p. 1142–1149, 2016. DOI: 10.1038/ni.3558.
Chung IC, Yuan SN, OuYang CN, et al. EFLA 945 restricts AIM2 inflammasome activation by preventing DNA entry for psoriasis treatment. *Cytokine*. 2020;127. doi:10.1016/j.cyto.2019.154951

CICEDO, A. ZAMBRANO, K., SANON, S. GAVILANES, A.W.D., Extracellular mitochondria in the cerebrospinal fluid (CSF): potential types and key roles in

central nervous system (CNS) physiology and pathogenesis, Mitochondrion 58 (2021) 255–269.

Corrales, L., Woo, S.-R., Williams, J. B., McWhirter, S. M., Dubensky, T. W., & Gajewski, T. F. (2016). Antagonism of the STING Pathway via Activation of the AIM2 Inflammasome by Intracellular DNA. *The Journal of Immunology*, 196(7), 3191–3198. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502538>

Damasceno, L. E. A., Cebinelli, G. C. M., Fernandes, M. F., Nascimento, D. C., Públio, G. A., Vinolo, M. A. R., Oliveira, S. C., Sparwasser, T., Cunha, T. M., Cunha, F. Q., & Alves-Filho, J. C. (2022). STING is an intrinsic checkpoint inhibitor that restrains the TH17 cell pathogenic program. *Cell Reports*, 39(8). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110838>

DAWSON, Michelle J.; TRAPANI, Joseph A. HIN-200, a novel family of IFN-inducible nuclear proteins expressed in leukocytes *Journal of Leukocyte Biology* Federation of American Societies for Experimental Biology, , 1996. DOI: 10.1002/jlb.60.3.310. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8830786/>. Acesso em: 17 mar. 2021.

Decout, A., Katz, J. D., Venkatraman, S., & Ablasser, A. (2021). The cGAS–STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 21, Issue 9, pp. 548–569). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00524-z>

DOMBROWSKI, Y., PERIC, M., KOGLIN, S., KAMMERBAUER, C., GÖß, C., ANZ, D., SIMANSKI, M., GLÄSER, R., HARDER, J., HORNING, V., GALLO, R. L., RUZICKA, T., BESCH, R., & SCHAUBER, J. (2011). Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. *Science Translational Medicine*, 3(82). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002001>

DUVVURI, Bhargavi; LOOD, Christian. Cell-free DNA as a biomarker in autoimmune rheumatic diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. MAR, p. 502, 2019.

DUNPHY, Gillian et al. Non-canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF-κB Signaling after Nuclear DNA Damage. *Molecular Cell*, [S. l.], v. 71, n. 5, p. 745- 760.e5, 2018. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.07.034. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276518306038>.

DI MEGLIO, Paola; NESTLE, Frank O. Immunopathogenesis of psoriasis. *Clinical and Basic Immunodermatology: Second Edition*, [S. l.], p. 373–395, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-29785-9_21. Acesso em: 20 nov. 2022.

EHRCHEN, Jan M.; SUNDERKÖTTER, Cord; FOELL, Dirk; VOGL, Thomas; ROTH, Johannes. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, [S. l.], v. 86, n. 3, p. 557–566, 2009. a. DOI: 10.1189/JLB.1008647. Acesso em: 13 dez.2021.

FITZGERALD, KATHERINE A.; KAGAN, JONATHAN C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*, [S. l.], v. 180, n. 6, p. 1044–1066, 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.041. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>

FRANK NESTLE, Psoriasis O.; KAPLAN, Daniel H.; BARKER, Jonathan. Psoriasis. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra0804595>, [S. l.], v. 361, n. 5, p. 496-509, 2009. DOI: 10.1056/NEJMra0804595. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmra0804595>. Acesso em: 13 dez. 2021

GHORESCHI, Kamran; BALATO, Anna; ENERBÄCK, Charlotta; SABAT, Robert. Therapeutics targeting the IL-23 and IL-17 pathway in psoriasis. *The Lancet*, [S. l.], v. 397, n. 10275, p. 754–766, 2021. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00184-7. Disponível em: <http://www.thelancet.com/article/S0140673621001847/fulltext>. Acesso em: 13 dez. 2021.

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

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

Gregorio J, Meller S, Conrad C, Di Nardo A, Homey B, Lauerma A, et al.. Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons. *J Exp Med.* (2010) 207:2921–30. 10.1084/jem.20101102

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

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

GRIFFITHS, C. E. M. C., & BARKER, J. J. N. W. N. (2007). Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *The Lancet*, 370(9583), 263–271. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61128-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61128-3)

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

HOPFNER, Karl Peter; HORNING, Veit. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS–STING signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*,

- [S. I.], v. 21, n. 9, p. 501–521, 2020. DOI: 10.1038/s41580-020-0244-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-020-0244-x>
- Imaeda AB, Watanabe A, Sohail MA, Mahmood S, Mohamadnejad M, et al. (2009) Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J Clin Invest* 119: 305–314
- Ishii KJ, Coban C, Kato H, Takahashi K, Torii Y, et al. (2006) A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* 7: 40–48.
- ISHIKAWA, Hiroki; BARBER, Glen N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*, [S. I.], v. 455, n. 7213, p. 674–678, 2008. DOI: 10.1038/nature07317.
- IVASHKIV, Lionel B.; DONLIN, Laura T. Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, [S. I.], v. 14, n. 1, p. 36–49, 2014. DOI: 10.1038/nri3581. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3581>.
- JAKOBS, Christopher; PERNER, Sven; HORNUNG, Veit. AIM2 Drives Joint Inflammation in a Self-DNA Triggered Model of Chronic Polyarthritis. *PLOS ONE*, [S. I.], v. 10, n. 6, p. e0131702, 2015. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0131702. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0131702>. Acesso em: 2 dez. 2021
- Jia, J. Wang, M. Ma, Y. Teng, J. Shi, H. Liu, Sun, H. Y. Y. Su, J. Meng, H. Chi, et al., Circulating neutrophil extracellular traps signature for identifying organ involvement and response to glucocorticoid in adult-onset still's disease: a machine learning study, *Front. Immunol.* 11 (2020) 563335.
- JIN, Tengchuan et al. Structures of the HIN domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity*, [S. I.], v. 36, n. 4, p. 561–571, 2012. DOI: 10.1016/J.IMMUNI.2012.02.014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22483801/>. Acesso em: 28 nov. 2021
- JIANG, Li; YAO, Shuyu; HUANG, Su; WRIGHT, Jeffrey; BRACIALE, Thomas J.; SUN, Jie. Type I IFN signaling facilitates the development of IL-10-producing effector CD8 + T cells during murine influenza virus infection. *European Journal of Immunology*, [S. I.], v. 46, n. 12, p. 2778–2788, 2016. DOI: 10.1002/eji.201646548. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201646548>.
- JOHNSON, Brandon M. et al. STING Agonist Mitigates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Stimulating Type I IFN-Dependent and – Independent Immune-Regulatory Pathways. *The Journal of Immunology*, [S. I.], v. 206, n. 9, p. 2015–2028, 2021. DOI: 10.4049/jimmunol.2001317.
- KABASHIMA, Kenji; HONDA, Tetsuya; GINHOUX, Florent; EGAWA, Gyohei. The immunological anatomy of the skin. *Nature Reviews Immunology* 2018 19:1, [S. I.], v. 19, n. 1, p. 19–30, 2018. DOI: 10.1038/s41577-018-0084-5.

Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41577-018-0084-5>. Acesso em: 20 nov. 2022.

KANNEGANTI, Thirumala-Devi. Intracellular innate immune receptors: Life inside the cell. *Immunological Reviews*, [S. l.], v. 297, n. 1, p. 5–12, 2020. DOI: 10.1111/imr.12912. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imr.12912>.

KARASON, Ari; GUDJONSSON, Johann E.; JÓNSSON, Hjörtur H.; HAUKSSON, Valdimar B.; RUNARSDOTTIR, E. Hjaltey; STEFANSSON, Kari; VALDIMARSSON, Helgi; GULCHER, Jeffrey R. Genetics of psoriasis in Iceland: evidence for linkage of subphenotypes to distinct Loci. *The Journal of investigative dermatology*, [S. l.], v. 124, n. 6, p. 1177–1185, 2005. DOI: 10.1111/J.0022-202X.2005.23703.X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15955092/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

KUMAR, S.; HAN, J.; LI, T.; QURESHI, A. A. Obesity, waist circumference, weight change and the risk of psoriasis in US women. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, [S. l.], v. 27, n. 10, p. 1293–1298, 2013. DOI: 10.1111/JDV.12001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23057623/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*. 2009;458(7237):514-518. doi:10.1038/nature07725

Hornung V, Latz E (2010) Intracellular DNA recognition. *Nat Rev Immunol* 10: 123–130.

HU, Shuiqing; PENG, Lan; KWAK, Youn Tae; TEKIPPE, Erin Mc Elvania; PASARE, Chandrashekhar; MALTER, James S.; HOOPER, Lora V.; ZAKI, Md Hasan. The DNA Sensor AIM2 Maintains Intestinal Homeostasis via Regulation of Epithelial Antimicrobial Host Defense. *Cell Reports*, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 1922–1936, 2015. DOI: 10.1016/J.CELREP.2015.10.040. Acesso em: 2 dez. 2021.

HUANG, Yi He; LIU, Xiang Yu; DU, Xiao Xia; JIANG, Zheng Fan; SU, Xiao Dong. The structural basis for the sensing and binding of cyclic di-GMP by STING. *Nature Structural and Molecular Biology*, [S. l.], v. 19, n. 7, p. 728–730, 2012. DOI:10.1038/nsmb.2333.

KUMARI, Puja; RUSSO, Ashley J.; SHIVCHARAN, Sonia; RATHINAM, Vijay A. AIM2 in health and disease: Inflammasome and beyond. *Immunological Reviews*, [S. l.], v.297, n. 1, p. 83–95, 2020. DOI: 10.1111/imr.12903. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imr.12903>.

HYUN, Ho Park; LO, Yu Chih; LIN, Su Chang; WANG, Liwei; JIN, Kuk Yang; WU, Hao. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annual review of immunology*, [S. l.], v. 25, p. 561–586, 2007. DOI: 10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.25.022106.141656. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17201679/>. Acesso em: 28 nov. 2021.

JAKOBS, Christopher; PERNER, Sven; HORNUNG, Veit. AIM2 Drives Joint Inflammation in a Self-DNA Triggered Model of Chronic Polyarthritis. *PLOS*

ONE, [S. I.], v. 10, n. 6, p. e0131702, 2015. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0131702. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0131702>. Acesso em: 2 dez. 2021.

JØNSSON, K. L. et al. IFI16 is required for DNA sensing in human macrophages by promoting production and function of cGAMP. *Nature Communications*, [S. I.], v. 8, n. 1, p. 14391, 2017. DOI: 10.1038/ncomms14391. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms14391>.

JIN, Shan et al. DAMP molecules S100A9 and S100A8 activated by IL-17A and house-dust mites are increased in atopic dermatitis. *Experimental Dermatology* Blackwell Publishing Ltd, , 2014. DOI: 10.1111/exd.12563. Acesso em: 8 dez. 2019.

Maranduca, M., Hurjui, L., Branisteanu, D., Serban, D., Branisteanu, D., Dima, N., & Serban, I. (2020). Skin - a vast organ with immunological function (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8619>

MCNAB, Finlay W.; EWBANK, John; HOWES, Ashleigh; MOREIRA-TEIXEIRA, Lucia; MARTIROSYAN, Anna; GHILARDI, Nico; SARAIVA, Margarida; O’GARRA, Anne. Type I IFN Induces IL-10 Production in an IL-27–Independent Manner and Blocks Responsiveness to IFN- γ for Production of IL-12 and Bacterial Killing in Mycobacterium tuberculosis –Infected Macrophages. *The Journal of Immunology*, [S. I.], v. 193, n. 7, p. 3600–3612, 2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1401088. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1401088>.

Morizane S, Yamasaki K, Mühleisen B, et al. Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012;132(1):135-143. doi:10.1038/jid.2011.259

MUKAI, Kojiro; KONNO, Hiroyasu; AKIBA, Tatsuya; UEMURA, Takefumi; WAGURI, Satoshi; KOBAYASHI, Toshihide; BARBER, Glen N.; ARAI, Hiroyuki; TAGUCHI, Tomohiko. Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi. *Nature Communications*, [S. I.], v. 7, n. May, 2016. DOI: 10.1038/ncomms11932.

Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*. 2007;449(7162):564-569. doi:10.1038/nature06116

LEE, YOUNG A E et al. Genomewide scan in german families reveals evidence for a novel psoriasis-susceptibility locus on chromosome 19p13. *American journal of human genetics*, [S. I.], v. 67, n. 4, p. 1020–1024, 2000. DOI: 10.1086/303075. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10986047/>. Acesso em: 20 nov. 2022

LEMOS, Henrique et al. Activation of the STING Adaptor Attenuates Experimental Autoimmune Encephalitis. *The Journal of Immunology*, [S. I.], v. 192, n. 12, p. 5571– 5578, 2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1303258. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1303258>.

LOWES, Michelle A., et al. "The IL-23/T17 pathogenic axis in psoriasis is amplified by keratinocyte responses." *Trends in immunology* 34.4 (2013): 174-181

Lood C, Blanco LP, Purmalek MM, et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat Med*. 2016;22(2):146-153. doi:10.1038/nm.4027

NESTLE, FRANK O., et al. "Skin immune sentinels in health and disease." *Nature reviews. Immunology* 9.10 (2009): 679.

Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, et al.. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med*. (2005) 202:135–43. 10.1084/jem.20050500

NAIR, Rajan P. et al. Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *American journal of human genetics*, [S. l.], v. 78, n. 5, p. 827–851, 2006. DOI: 10.1086/503821. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16642438/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

Ni X, Lai Y. Keratinocyte: A trigger or an executor of psoriasis? *J Leukoc Biol*. 2020;108(2):485-491. doi:10.1002/JLB.5MR0120-439R

MARTIN, David A.; TOWNE, Jennifer E.; KRICORIAN, Gregory; KLEKOTKA, Paul; GUDJONSSON, Johann E.; KRUEGER, James G.; RUSSELL, Chris B. The emerging role of IL-17 in the pathogenesis of psoriasis: Preclinical and clinical findings. *Journal of Investigative Dermatology* Nature Publishing Group, , 2013. DOI: 10.1038/jid.2012.194. Acesso em: 2 set. 2020.

MATYSZEWSKI, Mariusz; MORRONE, Seamus R.; SOHN, Jungsan. Digital signaling network drives the assembly of the AIM2-ASC inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [S. l.], v. 115, n. 9, p. E1963–E1972, 2018. DOI: 10.1073/PNAS.1712860115. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29440442/>. Acesso em: 28 nov. 2021.

MUKAI, Kojiro; KONNO, Hiroyasu; AKIBA, Tatsuya; UEMURA, Takefumi; WAGURI, Satoshi; KOBAYASHI, Toshihide; BARBER, Glen N.; ARAI, Hiroyuki; TAGUCHI, Tomohiko. Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi. *Nature Communications*, [S. l.], v. 7, n. May, 2016. DOI: 10.1038/ncomms11932.

MUNN, David H.; MELLOR, Andrew L. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends in Immunology*, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 137–143, 2013. DOI: 10.1016/j.it.2012.10.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2012.10.001>.

OKADA, YUKINORI et al. Fine mapping major histocompatibility complex associations in psoriasis and its clinical subtypes. *American journal of human genetics*, [S. l.], v. 95, n. 2, p. 162–172, 2014. DOI: 10.1016/J.AJHG.2014.07.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25087609/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

OUYANG, Songying et al. Structural Analysis of the STING Adaptor Protein Reveals a Hydrophobic Dimer Interface and Mode of Cyclic di-GMP Binding. *Immunity*, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 1073–1086, 2012. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.03.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.019>.

PANTELYUSHIN, Stanislav, et al. "Roryt+ innate lymphocytes and $\gamma\delta$ T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice." *The Journal of clinical investigation* 122.6 (2012): 2252

PARISI, R., SYMMONS, D. P. M., GRIFFITHS, C. E. M., & ASHCROFT, D. M. (2013). Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(2), 377–385. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.339>

Poli V, Zanoni I. Neutrophil intrinsic and extrinsic regulation of NETosis in health and disease. *Trends Microbiol.* 2023;31(3):280-293. doi:10.1016/j.tim.2022.10.002

Rasmy H, Mikhael N, Ismail S. Interleukin-18 expression and the response to treatment in patients with psoriasis. *Arch Med Sci* (2011) 7:713–9. doi: 10.5114/aoms.2011.24144

RATHINAM, Vijay A. K. et al. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nature immunology*, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 395–402, 2010. DOI: 10.1038/NI.1864. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20351692/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

REINHOLZ, M.; KAWAKAMI, Y.; SALZER, S.; KREUTER, A.; DOMBROWSKI, Y.; KOGLIN, S.; KRESSE, S.; RUZICKA, T.; SCHAUER, J. HPV16 activates the AIM2 inflammasome in keratinocytes. *Archives of dermatological research*, [S. l.], v. 305, n. 8, p. 723–732, 2013. DOI: 10.1007/S00403-013-1375-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23764897/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

REHWINKEL, Jan; GACK, Michaela U. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nature Reviews Immunology*, [S. l.], v. 20, n. 9, p. 537–551, 2020. DOI: 10.1038/s41577-020-0288-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-0288-3>.

Rendon, A., & Schäkel, K. (2019). Psoriasis pathogenesis and treatment. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20061475>

RHODES, Andrew; CECCONI, Maurizio. Cell-free DNA and outcome in sepsis. *Critical Care*, v. 16, n. 6, p. 170, 2012.

Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(7):e47. doi:10.1093/nar/gkv007

ROMITI, RICARDO; AMONE, MARCELO; MENTER, ALAN; MIOT, HELIO A. Prevalence of psoriasis in Brazil - a geographical survey. *International journal of dermatology*, [S. l.], v. 56, n. 8, p. e167–e168, 2017. DOI: 10.1111/IJD.13604. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28345141/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

Russell CB, Rand H, Bigler J, et al. Gene Expression Profiles Normalized in Psoriatic Skin by Treatment with Brodalumab, a Human Anti-IL-17 Receptor

Monoclonal Antibody. *The Journal of Immunology*. 2014;192(8):3828-3836. doi:10.4049/jimmunol.1301737

SUN, Q., CHEN, X., MA, J., PENG, H., WANG, F., ZHA, X., ... ZHANG, H. (2011). Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(10), 4129–4134. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014769108>

SAGOO, Gurdeep S. et al. Meta-analysis of genome-wide studies of psoriasis susceptibility reveals linkage to chromosomes 6p21 and 4q28-q31 in Caucasian and Chinese Hans population. *The Journal of investigative dermatology*, [S. l.], v. 122, n.6, p. 1401–1405, 2004. DOI: 10.1111/J.0022-202X.2004.22607.X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15175030/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

SHANG, Guijun et al. Crystal structures of STING protein reveal basis for recognition of cyclic di-GMP. *Nature Structural and Molecular Biology*, [S. l.], v. 19, n. 7, p. 725– 727, 2012. DOI: 10.1038/nsmb.2332

SHANG, Guijun; ZHANG, Conggang; CHEN, Zhijian J.; BAI, Xiao-chen; ZHANG, Xuewu. Cryo-EM structures of STING reveal its mechanism of activation by cyclic GMP–AMP. *Nature*, [S. l.], v. 567, n. 7748, p. 389–393, 2019. DOI: 10.1038/s41586- 019-0998-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-0998-5>.

Shimoura N, Nagai H, Fujiwara S, Jimbo H, Yoshimoto T, Nishigori C. Interleukin (IL)-18, cooperatively with IL-23, induces prominent inflammation and enhances psoriasis-like epidermal hyperplasia. *Arch Dermatol Res* (2017) 309:315–21. doi: 10.1007/s00403-017-1735-2

Stetson DB, Medzhitov R (2006) Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24: 93–103.

TAN, Xiaojun; SUN, Lijun; CHEN, Jueqi; CHEN, Zhijian J. Detection of Microbial Infections Through Innate Immune Sensing of Nucleic Acids. *Annual Review of Microbiology*, [S. l.], v. 72, n. 1, p. 447–478, 2018. DOI: 10.1146/annurev-micro-102215-095605. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-102215-095605>.

TANAKA, Yasuo; CHEN, Zhijian J. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Science Signaling*, [S. l.], v. 5, n. 214, p. ra20–ra20, 2012. DOI: 10.1126/scisignal.2002521. Disponível em: <http://stke.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scisignal.2002521>.

Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, et al. (2007) DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448: 501–505.

THEOBALD, Douglas L.; MITTON-FRY, Rachel M.; WUTTKE, Deborah S. Nucleic acid recognition by OB-fold proteins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, [S. l.], v. 32, p. 115–133, 2003. DOI: 10.1146/ANNUREV.BIOPHYS.32.110601.142506. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12598368/>. Acesso em: 28 nov. 2021.

SAITOH, T. et al. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [S. l.], v. 106, n. 49, p. 20842–20846, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0911267106. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0911267106>.

SAUER, John-Demian et al. The N -Ethyl- N -Nitrosourea-Induced Goldenticket Mouse Mutant Reveals an Essential Function of Sting in the In Vivo Interferon Response to *Listeria monocytogenes* and Cyclic Dinucleotides. *Infection and Immunity*, [S. l.], v. 79, n. 2, p. 688–694, 2011. DOI: 10.1128/IAI.00999-10. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.00999-10>

SUN, Lijun; WU, Jiaxi; DU, Fenghe; CHEN, Xiang; CHEN, Zhijian J. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*, [S. l.], v. 339, n. 6121, p. 786–791, 2013. DOI: 10.1126/science.1232458. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1232458>.

TOLLEFSON, Megha M.; CROWSON, Cynthia S.; MCEVOY, Marian T.; MARADIT KREMERS, Hilal. Incidence of psoriasis in children: A population-based study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, [S. l.], v. 62, n. 6, p. 979–987, 2010. DOI: 10.1016/j.jaad.2009.07.029.

TSOI, Lam C. et al. Large scale meta-analysis characterizes genetic architecture for common psoriasis associated variants. *Nature communications*, [S. l.], v. 8, 2017. DOI: 10.1038/NCOMMS15382. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28537254/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

UNTERHOLZNER, Leonie et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature Immunology*, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 997–1004, 2010. DOI:10.1038/ni.1932.

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

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

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

WANG, Bing; TIAN, Yuan; YIN, Qian. AIM2 Inflammasome Assembly and Signaling. *Advances in experimental medicine and biology*, [S. l.], v. 1172, p.

- 143–155, 2019. DOI: 10.1007/978-981-13-9367-9_7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31628655/>. Acesso em: 28 nov. 2021.
- WANG, Bing; YIN, Qian. AIM2 inflammasome activation and regulation: A structural perspective. *Journal of structural biology*, [S. l.], v. 200, n. 3, p. 279–282, 2017. DOI: 10.1016/J.JSB.2017.08.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28813641/>. Acesso em: 28 nov. 2021.
- WU, Jiayi; CHEN, Zhijian J. Innate Immune Sensing and Signaling of Cytosolic Nucleic Acids. *Annual Review of Immunology*, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 461–488, 2014. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120156. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-032713-120156>.
- YANG, Ming et al. AIM2 deficiency in B cells ameliorates systemic lúpus erythematosus by regulating Blimp-1–Bcl-6 axis-mediated B-cell differentiation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2021 6:1, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–11, 2021. DOI: 10.1038/s41392-021-00725-x. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00725-x>. Acesso em: 2 dez. 2021.
- Y. Liu, K. Zhou, S. Guo, Y. Wang, X. Ji, Q. Yuan, L. Su, X. Guo, X. Gu, J. Xing, NGS-Based accurate and efficient detection of circulating cell-free mitochondrial DNA in cancer patients, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 23 (2021) 657–666.
- XIAOHONG, L., ZHENTING, Z., YUNJIE, Y., WEI, C., XIANGJIN, X., KUN, X., XIN, L., LU, L., JUN, L., & PIN, C. (2022). Activation of the STING-IRF3 pathway involved in psoriasis with diabetes mellitus. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(8), 2139–2151. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17236>
- ZHANG, Min; ZOU, Yan; ZHOU, Xujun; ZHOU, Jinming. Inhibitory targeting cGAS-STING-TBK1 axis: Emerging strategies for autoimmune diseases therapy. *Frontiers in Immunology*, [S. l.], v. 13, n. September, p. 1–26, 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2022.954129.
- ZHANG, Yan; LUO, Xiao-yu; WU, Dong-hai; XU, Yong. ROR nuclear receptors: structures, related diseases, and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 71–87, 2015. DOI: 10.1038/aps.2014.120. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/aps.2014.120>.
- ZHAO, Qinglan; MANOHAR, Murli; WEI, Yi; PANDOL, Stephen J.; HABTEZION, Aida. STING signalling protects against chronic pancreatitis by modulating Th17 response. *Gut*, [S. l.], v. 68, n. 10, p. 1827–1837, 2019. DOI: 10.1136/gutjnl-2018-317098.
- ZHANG, Weijuan; CAI, Yanxing; XU, Wei; YIN, Zhinan; GAO, Xiaoming; XIONG, Sidong. AIM2 facilitates the apoptotic DNA-induced systemic lúpus erythematosus via arbitrating macrophage functional maturation. *Journal of Clinical Immunology*, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 925–937, 2013. DOI: 10.1007/S10875-013-9881-6. Acesso em: 2 dez. 2021.

ZHANG, Xuejun et al. A large-scale screen for coding variants predisposing to psoriasis. *Nature genetics*, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 45–50, 2014. DOI: 10.1038/NG.2827. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24212883/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

ZHANG, Zhiqiang; YUAN, Bin; BAO, Musheng; LU, Ning; KIM, Taeil; LIU, Yong Jun. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nature Immunology*, [S. l.], v. 12, n. 10, p. 959–965, 2011. b. DOI:10.1038/ni.2091.

ZHONG, Bo et al. The Adaptor Protein MITA Links Virus-Sensing Receptors to IRF3 Transcription Factor Activation. *Immunity*, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 538–550, 2008. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.09.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.09.003>

Zuo, X., Sun, L., Yin, X., Gao, J., Sheng, Y., Xu, J., Zhang, J., He, C., Qiu, Y., Wen, G., Tian, H., Zheng, X., Liu, S., Wang, W., Li, W., Cheng, Y., Liu, L., Chang, Y., Wang, Z., ... Zhang, X. (2015). Whole-exome SNP array identifies 15 new susceptibility loci for psoriasis. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7793>

ANEXOS

10. ANEXOS

10.1 Anexo 1 – Prêmios recebidos durante o Doutorado

2023- Concessão de uma bolsa pela France Excellence Eiffel – Centre national de la recherche Scientifique (CNRS), University of Orleans, França. Supervisor: Nicolas Riteau. Período: SET/2022 – SET/2023

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

10.2 Anexo 2 – Artigos publicados e em revisão durante o doutorado

1. **Martins, Timna Varela**; Silva de Melo, Bruno Marcel; Toller-Kawahisa, Juliana Escher; Silva, Gabriel Victor Lucena da; Silva, Conceição Elidianne Aníbal; Paiva, Isadora Marques; Publio, Gabriel Azevedo; Rosa, Marcos Henrique; Souza, Cacilda da Silva; Zamboni, Dario Simões; Cunha, Fernando Q; Cunha, Thiago Mattar; Ryffel, Bernhard; Riteau, Nicolas & Alves-Filho, J. C. **The DNA Sensor AIM2 mediates psoriasiform inflammation by inducing type 3 immunity**. In review on Journal Clinical Investigation insight. 2024

2. Toller-Kawahisa, J. E., Hiroki, C. H., Silva, C. M. de S., Nascimento, D. C., Públio, G. A., **Martins, T. V.**, Damasceno, L. E. A., Veras, F. P., Viacava, P. R., Sukesada, F. Y., Day, E. A., Zotta, A., Ryan, T. A. J., Moreira da Silva, R., Cunha, T. M., Lopes, N. P., Cunha, F. de Q., O'Neill, L. A. J., & Alves-Filho, J. C. (2023). The metabolic function of pyruvate kinase M2 regulates reactive oxygen species production and microbial killing by neutrophils. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40021-6>

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

4. Veras, F. P., Publio, G. A., Melo, B. M., Prado, D. S., Norbiato, T., Cecilio, N. T., Hiroki, C., Damasceno, L. E. A., Jung, R., Toller-Kawahisa, J. E., **Martins, T. V.**, Assunção, S. F., Lima, D., Alves, M. G., Vieira, G. v., Tavares, L. A., Alves-Rezende, A. L. R., Karbach, S. H., Nakaya, H. I., ... Alves-Filho, J. C. (2022). Pyruvate kinase M2 mediates IL-17 signaling in keratinocytes driving psoriatic skin inflammation. *Cell Reports*, 41(13). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111897>

5. Silva, C. M. S., Wanderley, C. W. S., Veras, F. P., Gonçalves, A. V., Lima, M. H. F., Toller-Kawahisa, J. E., Gomes, G. F., Nascimento, D. C., Monteiro, V. V. S., Paiva, I. M., Almeida, C. J. L. R., Caetité, D. B., Silva, J. C., Lopes, M. I. F., Bonjorno, L. P., Giannini, M. C., Amaral, N. B., Benatti, M. N., Santana, R. C., **Martins, T. V.**... Cunha, F. Q. (2022). Gasdermin-D activation by SARS-CoV-2 triggers NET and mediate COVID-19 immunopathology. *Critical Care*, 26(1). <https://doi.org/10.1186/s13054-022-04062-5>

6. Silva, C. M.; Wanderley, C. W. S.; Veras, F. P.; Sonego, F.; Nascimento, D. C.; Gonçalves, A. V.; **Martins, T. V.**; Colón D. F.; Borges, V. F.; Brauer, V. S.; Damasceno, L. E. A.; Silva, K. P.; Toller-Kawahisa, J. E.; Batah S.S.; Souza, A. L.; Monteiro, V. V. S.; Oliveira, A. E. R.; Donate, P. B.; Zoppi, D.; Borges, M. C.; Almeida, F.; Nakaya, H. I.; Fabro, A. T.; Cunha, T. M.; Alves-Filho, J. C.; Zamboni, D. S.; Cunha, F. Q. Gasdermin D inhibition prevents multiple organ dysfunction during sepsis by blocking NET formation. *Blood Journal*, 2021 doi: 10.1182/blood.2021011525.

7. Prado, D. S.; Damasceno, L. E. A.; Sonego, A. B.; Rosa, M. H.; **Martins, T. V.**; Fonseca, M. D. M.; Cunha, T. M.; Cunha, F. Q.; Alves-Filho, J. C. *International Immunopharmacology*, v. 91, 2021. doi:

8. Damasceno, L. E. A.; Prado, D. S.; Veras, F. P.; Fonseca, M. M.; Toller-Kawahisa, J. E.; Rosa, M. H. Públio, G. A.; **Martins, T. V.**; Ramalho, F. S.; Waisman, A.; Cunha, F. Q.; Cunha, T. M.; Alves-Filho, J. C. PKM2 promotes Th17 cell differentiation and autoimmune inflammation by fine-tuning STAT3 activation. *Journal Experimental Medicine*, Vol. 217, No. 10, 2020. doi: 10.1084/jem.20190613