

BRUNO BRAZ BEZERRA

MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA  
IMUNOMODULAÇÃO DE MONÓCITOS PRIMÁRIOS  
HUMANOS POR HIDROXI-PROPIL-BETA-  
CICLODEXTRINA (HP- $\beta$ CD)



**Monografia apresentado ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
JULHO / 2019

**Trabalho realizado no Departamento de Virologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Luciana Barros de Arruda e coorientação de Flávio Lemos Matassoli.**

## CIP - Catalogação na Publicação

B574m Braz Bezerra, Bruno  
MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA  
IMUNOMODULAÇÃO DE MONÓCITOS PRIMÁRIOS HUMANOS POR  
HIDROXI-PROPILO-BETA-CICLODEXTRINA (HP-βCD) / Bruno  
Braz Bezerra. -- Rio de Janeiro, 2019.  
75 f.

Orientadora: Luciana Barros de Arruda.  
Coorientador: Flávio Lemos Matassoli.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2019.

1. Hidroxi-propil-beta-ciclodextrina. 2. PPAR? .  
3. Monócito. 4. Imunomodulação. 5. Colesterol. I.  
Barros de Arruda, Luciana, orient. II. Lemos  
Matassoli, Flávio, coorient. III. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ**  
**COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO  
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,  
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E  
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Bruno Braz Bezerra**  
 DRE: 116024576

BANCA EXAMINADORA: Prof. Marcelo Torres Bozza (Presidente)  
 Prof. Heitor A. de Paula Neto  
 Dra. Teresa Cristina Calegari Silva  
 Prof. Renata Meirelles S. Pereira (Suplente)

Título da Monografia: **“MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA  
 IMUNOMODULAÇÃO DE MONÓCITOS PRIMÁRIOS HUMANOS POR  
 HIDROXI-PROPILO-BETA-CICLODEXTRINA (HP-βCD)”**

Local: **Sala de Reunião do Departamento de Virologia / CCS / UFRJ**  
 Data e hora de início: **01 de julho de 2019 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,5 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 01 de Julho de 2019.

NOTA  
9.5  
9.5  
9.5

Banca Examinadora:

Prof. Marcelo Torres Bozza

Prof. Heitor A. de Paula Neto

Dra. Teresa Cristina Calegari Silva

Prof. Renata Meirelles S. Pereira

Aluno:

Bruno Braz Bezerra

Orientador:

Prof. Luciana Barros de Arruda

Coorientador:

Prof. Flávio Lemos Matassoli

Coordenador  
 de TCC

Prof. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Aos meus amores eternos: mãe, pai, irmã e bruno.

## **Agradecimentos**

Agradeço a minha família e amigos próximos pela ajuda desde optar por estudar numa universidade pública até concluir o curso.

Agradeço imensamente e especialmente toda a atenção e trabalho oferecido na minha orientação pela Luciana Barros de Arruda e Flávio Lemos Matassoli. Foram fundamentais na minha formação como cientista e à eles devo tudo que aprendi durante a graduação.

Agradeço a todo grupo do laboratório que também participaram da minha formação me ensinando técnicas, preparo de soluções e localização dos materiais no laboratório – e também me salvando quando necessário. Lana, Yasmin e Sharton, em especial, foram fundamentais e, a eles, sou grato.

Agradeço às instituições de fomento que permitiram o desenvolvimento do meu trabalho junto ao laboratório, CNPq e FAPERJ.

## RESUMO

BRUNO BRAZ BEZERRA

### MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA IMUNOMODULAÇÃO DE MONÓCITOS PRIMÁRIOS HUMANOS POR HIDROXI-PROPILO-BETA-CICLODEXTRINA (HP-βCD)

**Orientador: Luciana Barros de Arruda**

Em trabalho realizado anteriormente pelo grupo, mostramos que o tratamento de monócitos primários humanos com HP-βCD, droga capaz de sequestrar colesterol de membranas biológicas, levou a redução na expressão das citocinas TNF-α e IL-10 em resposta a LPS. Em análise de transcriptoma realizado pelo grupo, identificamos que o tratamento de HP-βCD regula negativamente a expressão de PPARγ e parceiros moleculares como RAR e FABP4. PPARγ é um receptor nuclear envolvido na regulação do metabolismo de colesterol e lipídio celular. Trabalhos na literatura mostram a participação de PPARγ no desenvolvimento da resposta imune adaptativa em macrófagos estimulados por LPS e PMA. A ativação de PPARγ foi associada a redução na expressão de quimiocinas, citocinas e maturação de macrófagos. Nosso trabalho procura, então, determinar de que maneira HP-βCD modula a resposta de monócitos primários humanos por LPS. Fomos capazes de mostrar que, com 48h, momento em que estimulamos com LPS, os níveis totais de colesterol celulares se encontravam normalizados, a composição de “lipid rafts”, intimamente associadas a colesterol, estavam normalizadas e a expressão de receptores TLR4 e associados MyD88 e TRIF, se encontravam funcionais – sendo a imunomodulação observada não dependente destes fatores. Ao analisarmos proteínas envolvidas na cascata de sinalização de TLR4 por LPS, encontramos redução na atividade de p38 e IκBα, sendo possíveis sugestões quanto a modulação causada por HP-βCD. Considerando a regulação de PPARγ e os possíveis efeitos antiinflamatórios explorados na literatura, mostramos que, de fato, HP-βCD é capaz de reduzir os níveis de expressão de PPARγ com 1h de tratamento, se mantendo em níveis baixos até 48h após o tratamento. Ao observarmos o papel de PPARγ na expressão de TNF-α em resposta a LPS, vimos que, diferente do relatado nos estudos, a ativação de PPARγ não leva a redução na expressão de TNF-α, mas sim a inibição de PPARγ. Este conjunto de dados nos leva a compreender um pouco mais sobre o mecanismo de atuação de HP-βCD em monócitos e os efeitos gerados por ele, auxiliando o desenvolvimento de estudos que propõem HP-βCD como tratamento de doenças, como doença de Niemann-Pick tipo C, aterosclerose, e no controle da ativação imune crônica em pacientes infectados com HIV.

**Palavras-chave:** hidroxipropil-beta-ciclodextrina, PPARγ, monócito, imunomodulação, colesterol.

**ABSTRACT****BRUNO BRAZ BEZERRA****MOLECULAR MECHANISMS INVOLVED ON THE  
IMMUNOMODULATION OF HUMAN PRIMARY MONOCYTES BY 2-  
HYDROXYPROPYL-BETA-CYCLODEXTRIN (HP- $\beta$ CD)****Orientador: Luciana Barros de Arruda**

On a study held before by our group, we showed that treating human primary monocytes with HP- $\beta$ CD, drug able to sequester cholesterol from biological membranes, reduced the expression of TNF- $\alpha$  and IL-10 in response to LPS. On a transcriptomic analysis made by our group, we identified that HP- $\beta$ CD treatment negatively regulates the expression of PPAR $\gamma$  e its molecular partners RAR and FABP4. PPAR $\gamma$  is a nuclear receptor involved on the cholesterol and cellular lipid metabolisms. On the literature, it has been shown the relation between PPAR $\gamma$  and the development of immune responses on macrophages stimulated with LPS and PMA. The activation of PPAR $\gamma$  is associated with a reduced expression of chemokines, cytokines and macrophage maturation. Our work focuses on determining by which mechanism HP- $\beta$ CD modulates the LPS response of primary human monocytes. We were able to demonstrate that, with 48h, on the moment we stimulate the cells with LPS, the cellular cholesterol total levels were normalized and the expression of TLR4 and its associates MyD88 and TRIF, were functional – being the immunomodulation observed not dependent on these elements. Analyzing the proteins involved on the TLR4 signaling pathway by LPS, we found a reduced activity of p38 and I $\kappa$ B $\alpha$ , being possible candidates to explain the modulation caused by HP- $\beta$ CD. Considering the regulation of PPAR $\gamma$  and its possible antiinflammatory effects explored on the literature, we showed that, indeed, HP- $\beta$ CD is capable of reducing PPAR $\gamma$  expression levels on 1h treatment, maintaining low levels until 48h after treatment. We investigated the participation of PPAR $\gamma$  on the expression of TNF- $\alpha$  in response to LPS and we found that, different from what was found on the literature, the activation of PPAR $\gamma$  does not result on reduced expression of TNF- $\alpha$ , but the inhibition of PPAR $\gamma$ . The data conducts us on the understanding of how HP- $\beta$ CD works on monocytes and its effects, serving on the development of studies that propose HP- $\beta$ CD as treatment of diseases, such as Niemann-Pick type C disease, atherosclerosis and on the chronic immune control on patients infected with HIV.

**Key-words:** Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, PPAR $\gamma$ , monocyte, immunomodulation, cholesterol.



**ÍNDICE**

<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Ciclodextrinas .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Colesterol.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Mecanismos de Regulação do Colesterol Intracelular .....</b>	<b>7</b>
<b>1.5 Regulação do Metabolismo de Colesterol.....</b>	<b>10</b>
<b>1.5.1 Receptores Ativadores da Proliferação de Peroxissomas (PPARs) ..</b>	<b>10</b>
<b>1.6 Metabolismo de Colesterol e Imunidade Inata .....</b>	<b>12</b>
<b>1.7 Hipótese .....</b>	<b>18</b>
<b>2. Justificativa.....</b>	<b>18</b>
<b>3. Objetivo .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Objetivos Específicos.....</b>	<b>19</b>
<b>4. Materiais e Métodos .....</b>	<b>20</b>
<b>5. Resultados.....</b>	<b>24</b>
<b>6. Discussão .....</b>	<b>35</b>
<b>7. Conclusões .....</b>	<b>40</b>
<b>8. Referências Bibliográficas:.....</b>	<b>42</b>

## 1. Introdução

Nosso grupo de pesquisa vem investigando o uso de HP- $\beta$ CD, cuja principal função biológica é o sequestro de colesterol de membrana, como potencial fármaco anti-HIV. Recentemente, nós demonstramos que o tratamento com HP- $\beta$ CD em monócitos primários derivados de pacientes HIV+ e HIV- inibe a produção de TNF $\alpha$  e IL-10 induzida por LPS (Matassoli et al., 2018). Essa regulação se dá a níveis transcricionais, com diminuição da expressão dos RNAs mensageiros de ambas citocinas. O tratamento é capaz de diminuir a fosforilação de p38 MAPK, sem alterar níveis de expressão de PI3K e fosforilação de ERK MAPK. O tratamento também diminui a expressão de CD-36 e HLA-DR nesses monócitos (Matassoli et al., 2018), indicando que o tratamento poderia impactar também no desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa. Intrigantemente, essa regulação induzida pelo tratamento com HP- $\beta$ CD parece ser parcialmente independente dos níveis de colesterol. Embora as concentrações mais altas da droga fossem suficientes para induzir depleção do colesterol, concentrações mais baixas não depletaram colesterol, mas induziram o mesmo efeito imunomodulatório. Além disso, o estímulo com LPS era feito somente quando os níveis de colesterol da célula já estavam reestabelecidos (Matassoli et al., 2018), reforçando a hipótese de que o mecanismo de regulação induzido por HP- $\beta$ CD não fosse apenas pela depleção de colesterol ou desorganização de “lipid rafts”, mas por mecanismos que envolvessem outros reguladores.

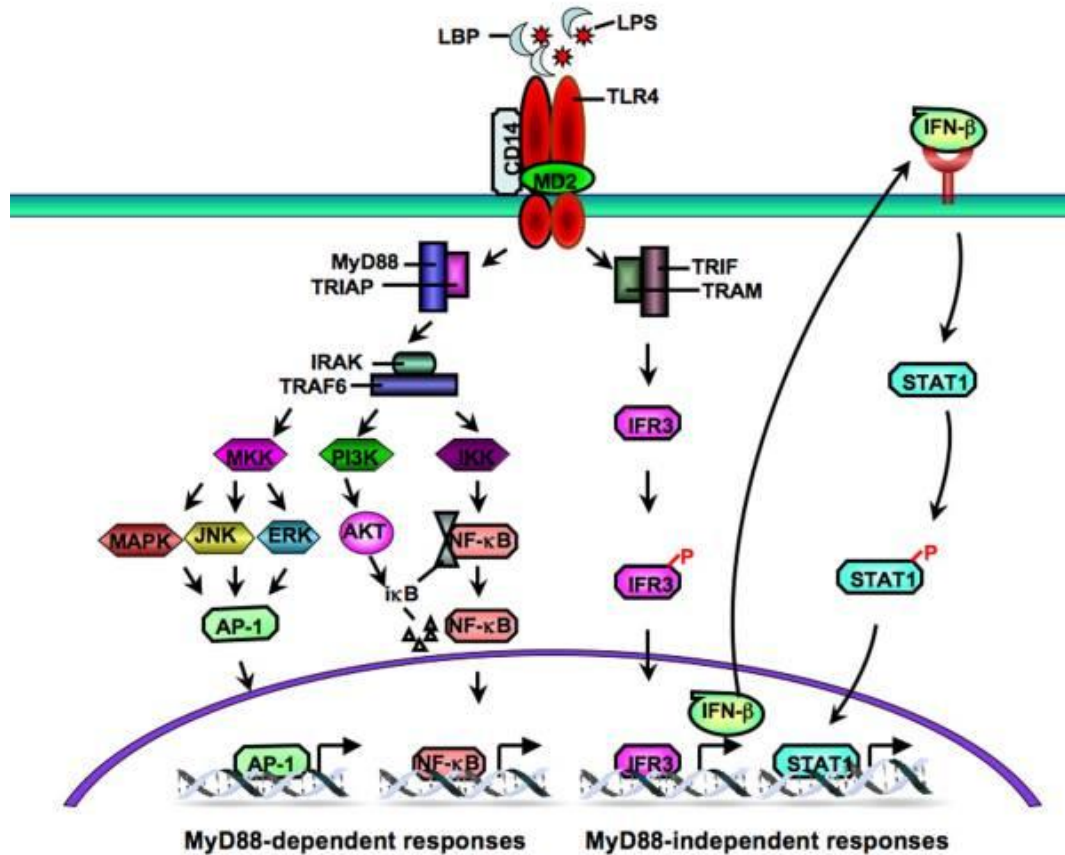
De fato, uma análise de todo perfil transcricional dessas células após o tratamento revelou que HP- $\beta$ CD é capaz de induzir uma completa mudança no perfil de expressão genica, com a indução de mais de dois mil genes diferentemente expressos. Uma análise mais profunda revelou que a via mais impactada pelo tratamento era a via de PPAR $\gamma$  e seus parceiros moleculares, que incluem os outros fatores de transcrição RARG, MITF, MEIS1 e MEF2A, além das proteínas FABP-3, FABP-4 e FABP-5. Por isso, acreditamos que haja relação entre o tratamento de monócitos com HP $\beta$ CD e a regulação de genes da via de sinalização de PPAR $\gamma$ , e que ele seja, ainda, o responsável pela modulação da resposta gerada por LPS.

### 1.1 Ativação de Monócitos por LPS

Monócitos, em conjunto com células dendríticas, são a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos. Estas células carregam a habilidade de reconhecerem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) através de receptores localizados em sua membrana plasmática e citoplasma. Muitos são os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como a família de receptores semelhantes a Toll (TLR), família de receptores semelhantes a NOD (NLR), receptores semelhantes a RIG (RLR), entre outros. Todos estes, em última análise, funcionam como recursos para que as células da primeira linha de defesa consigam detectar possíveis ameaças e reagir a elas, no intuito de eliminá-las. Os mecanismos de eliminação são possíveis através da fagocitose e destruição das ameaças e geração da inflamação através da secreção de citocinas e quimiocinas, que levarão ao recrutamento de novas células e, se necessário, desenvolvimento de resposta imune adaptativa. (Janeway, 2010).

LPS, componente da membrana externa de bactérias gram-negativas, é uma das moléculas mais estudadas na indução de resposta imune e pode ocasionar, em excesso, até inflamação sistêmica e sepse. O estímulo de LPS em células do sistema imune ocorre através da sua ligação na proteína que se liga a LPS (LBP), isso facilita a sua interação com CD14, presente na membrana plasmática de células do sistema imune. CD14 facilita a interação de LPS para o complexo de receptor TLR4/MD-2 e leva então ao reconhecimento de LPS. Após reconhecimento, TLR4 oligomeriza e, através de domínios TIR (receptor Toll-interleucina-1), recruta moléculas adaptadoras abaixo da via de sinalização. MyD88 (gene primário de resposta a diferenciação mielóide 88), TIRAP (proteína adaptadora contendo domínio TIR), TRIF (adaptador contendo domínio TIR que induz IFN $\beta$ ), TRAM (molécula adaptadora relacionada a TRIF) e SARM (proteínas contendo domínios sterile a e HEAT-Armadillo) levam, então, a transdução de sinais através de uma série de moléculas, que levam a ativação de fatores de transcrição. Estes, resultam na transcrição de genes que levam a expressão de citocinas próinflamatórias e interferons do tipo I. As vias de sinalização que culminam na transcrição de citocinas próinflamatórias são dependentes de MyD88 e resultam na ativação das MAPKs (proteína quinase ativada por mitógeno), que ativam o fator de transcrição AP-1, e IKKs (I $\kappa$ B quinase), que ativam NF- $\kappa$ B. As vias de sinalização que culminam na transcrição de interferon do tipo I são dependentes de TRIF e resultam na ativação das MAPK, IKKs e

TBK1 (quinase que se liga a TANK 1), que ativam, respectivamente, os fatores de transcrição AP-1, NF- $\kappa$ B e IRF3 (Figura 1). (Medzhitov e Janeway, 2000; Janeway e Medzhitov, 2002; Lu, Yeh e Ohashi, 2008; Guo e Friedman, 2010).



**Figura 1:** Esquema das vias de sinalização ativadas por TLR4. LPS interage com LBP e, em conjunto com CD14 e MD-2, se liga a TLR4, ativando vias dependentes e não dependentes de MyD88. A via dependente de MyD88 sinaliza através da ativação de IKK e MAPK, que leva a ativação de NF- $\kappa$ B e AP-1, respectivamente, resultando na indução de citocinas pró-inflamatórias. Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e AKT são fatores importantes abaixo de MyD88 que medeiam também a ativação de NF- $\kappa$ B. A via independente de MyD88 é mediada por TRIF, que ativa IRF3 e induz a expressão de IFN  $\beta$  e genes responsivos a IFN. (Guo e Friedman, 2010).

Moléculas envolvidas na sinalização por TLR4 também estão presentes na sinalização de outros sistemas, como na regulação do metabolismo de colesterol e lipídios e podem agir ligando estes sistemas entre si. Ao longo do texto, estes assuntos serão melhor abordados.

## 1.2 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos, formados por ligações de monômeros de  $\alpha$ -1,4-D-glucopirranose, extraídos do amido de milho e batatas através da ação da enzima glucosiltransferase (Atwood *et al.*, 1996). Sua nomenclatura varia de acordo com o número de resíduos de glicose na sua estrutura, sendo o hexâmetro nomeado como  $\alpha$ -CD, o heptâmetro como  $\beta$ -CD e o octâmetro como  $\gamma$ -CD. Por causa das ligações em cadeia das moléculas de glucopirranose, as CDs apresentam uma estrutura cônica, com o seu exterior hidrofílico e o interior relativamente hidrofóbico, fazendo com que a molécula seja solúvel em água, além de permitir que estas moléculas abriguem outras menores e apolares, solubilizando-as (Atwood *et al.*, 1996). Por esta característica, as CDs são amplamente utilizadas nas áreas farmacêutica, agroquímica, de fragrâncias e recuperação de meio ambiente.

De fato, as CDs tem sido amplamente exploradas na indústria farmacêutica, funcionando sobretudo como carreadoras, melhorando a solubilidade de outras moléculas ao abriga-las em seu interior e permitindo que elas sejam administradas (Davis e Brewster, 2004). CDs também são resistentes a degradação por enzimas humanas, apresentam estabilidade física e química, têm baixo custo de produção e não estimulam resposta imune contra as próprias em mamíferos (Davis e Brewster, 2004). Além disso, modificações químicas podem ser feitas para otimizar a capacidade de inclusão e interação das CDs com outras moléculas, como a inclusão de grupamentos hidrofóbicos, hidrofílicos e iônicos (Ono *et al.*, 2001; Manosroi *et al.*, 2005). Por exemplo, as variações hidroxipropil  $\beta$ -CD (HP- $\beta$ CD), metil- $\beta$ -ciclodextrina (M-BCD) e sulfobutil éter  $\beta$ -CD (SBE- $\beta$ CD) se diferenciam por serem mais solúveis, apresentarem menos efeitos tóxicos ao organismo humano e não cristalizarem facilmente. Isso permitiu a aprovação destas moléculas pelo Food and Drug Administration (FDA) e, portanto, sua liberação como segura para fins farmacêuticos (Davis e Brewster, 2004).

As primeiras aplicações de CDs, no mercado, foram como tecnologia de carreamento de prostaglandinas (Hirayama, Kurihara e Uekama, 1984; Uekama e Otagiri, 1987; Wiese *et al.*, 1991). Em seguida foram utilizadas como carreadoras de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (Serni, 1993; Lee e Balfour, 1994; McEwen, 2000). Também foram estudadas não só como moléculas simples, mas formando complexos chamados polímeros compostos por CDs, com o fim de entregar drogas no organismo. Estes polímeros são formados pela ligação em cadeia de CDs com outras moléculas orgânicas como epiclorigrina ou ácido hialurônico, que resultam no aumento da sua solubilidade

aquosa, taxa de dissolução, estabilidade química dos fármacos e permeabilidade em membranas biológicas (Vecsernyés *et al.*, 2014).

Além da utilização das CDs como moléculas carreadoras, e por já terem demonstrado que essas moléculas apresentam um perfil seguro para administração em humanos, as CDs tem sido exploradas com outros propósitos. Uma das características principais das  $\beta$ -CDs é a sua capacidade de se ligar e sequestrar colesterol de membranas biológicas (Davis e Brewster, 2004). Nesse sentido, alguns grupos hipotetizaram a utilização dessa droga como molécula antiviral contra vírus envelopados. Os resultados mostraram que a depleção de colesterol através do tratamento com HP- $\beta$ CD do vírus da imunodeficiência de símios (SIV) e do vírus da imunodeficiência humana (HIV) resultou em perda de infecciosidade por inativação e permeabilização dos vírions (Graham *et al.*, 2003). A depleção de colesterol da membrana de células infectadas por HIV reduziu drasticamente a quantidade de vírus liberados e os vírus liberados de células com colesterol depletado são minimamente infecciosos (Liao, Graham e Hildreth, 2003). Também já foi demonstrado que a utilização de HP- $\beta$ CD como microbicida vaginal preveniu parcialmente a transmissão de SIV, em modelo símio, por inativação viral irreversível (Ambrose *et al.*, 2008). Em modelo de infecção pelos flavivírus Dengue virus (DENV) e West Nile virus (WNV), também envelopados, metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) também mostrou efeitos antivirais (Osuna-Ramos, Reyes-Ruiz e Ángel, 2018).

Além da utilização como droga antiviral, outra aplicação de HP- $\beta$ CD importante é a utilização para tratamento da doença de Niemann-Pick tipo C (NPC). NPC é uma condição hereditária caracterizada pela perda da expressão das proteínas de transporte de colesterol NPC1 e NPC2, envolvidas no tráfego intracelular de colesterol. A deficiência dessas proteínas leva ao acúmulo de colesterol no endossoma tardio e lisossoma, e provoca um quadro neurodegenerativo fatal (Vanier, 2010). Por conta da característica de se ligar a colesterol, derivados de CDs foram investigadas como potencial tratamento para a doença. Em modelos *in vitro*, estudos mostraram que HP- $\beta$ CD foi capaz de sobrepor o efeito de NPC1 e 2, recuperando o transporte de colesterol do endossoma tardio para o retículo endoplasmático (Abi-Mosleh *et al.*, 2009; Rosenbaum *et al.*, 2010). Em paralelo, diversos estudos foram realizados *in vivo*, em modelo de camundongo NPC1<sup>-/-</sup>, e mostraram que a administração de HP- $\beta$ CD resultou em atraso no progresso da doença. Os camundongos tratados com HP- $\beta$ CD apresentaram diminuição de acúmulo intraneural de colesterol, redução de marcadores secundários de neurodegeneração, aumento de sobrevivência, recuperação da disfunção hepática e recuperação dos níveis de colesterol na

maioria dos órgãos (Camargo *et al.*, 2001; Davidson *et al.*, 2009; Lopez *et al.*, 2014). Por apresentar dados satisfatórios em modelos animais, ensaios clínicos foram realizados em pacientes com NPC, sendo a via intratecal com os melhores resultados. O tratamento se mostrou seguro e bem tolerado, e os pacientes apresentaram atraso no desenvolvimento das manifestações neurológicas e aumento de biomarcadores de redistribuição de colesterol no sistema nervoso central (Sakiyama *et al.*, 2015; Maarup *et al.*, 2015; Ory *et al.*, 2017; Berry-Kravis *et al.*, 2018). Sendo assim,  $\beta$ CDs tem mostrado aplicações interessantes e promissoras em outros campos por conta da sua atividade biológica.

### 1.3 Colesterol

O colesterol é um esterol fundamental na constituição e funcionamento de células eucarióticas animais. Sendo uma das classes lipídicas presentes no organismo, ele representa 25% de toda membrana plasmática celular (Ikonen, 2008). Inclusive, a maquinaria celular requerida para a sua biossíntese está presente em todas células nucleadas do organismo humano, confirmando que sua presença é indispensável para o funcionamento de todas elas (Reboldi e Dang, 2018). Inicialmente, o colesterol foi descrito simplesmente como constituinte da membrana plasmática, responsável por torná-la mais rígida, e, por consequência, reduzindo a sua permeabilidade e aumentando a resistência mecânica da bicamada lipídica (Bretscher e Munro, 1993). Posteriormente, o colesterol foi descoberto por ser fundamental na formação de estruturas especializadas de membrana denominadas de “lipid rafts”. Em conjunto com glicoesfingolípídios e enfingomielina, ele forma regiões mais rígidas e, portanto, permite uma organização da membrana (Brown e London, 1998). De fato, o colesterol parece ser fundamental na manutenção dessas plataformas, uma vez que a retirada farmacológica do colesterol através do tratamento com HP- $\beta$ CD é capaz de depletar completamente essas estruturas da membrana das células (Brown & London, 2000).

Diversas proteínas possuem domínios que as fazem ancorar nessas regiões específicas da membrana, proporcionando o seu recrutamento e agregação, como as proteínas ancoradas em glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Cherezov *et al.*, 2007) e as proteínas que sofreram processo de miristoilação ou palmitoilação (Brown e London, 2000). Como consequência, as “lipid rafts” concentram moléculas envolvidas em organização de estruturas membranares, transporte intracelular, sinalização celular e transdução de sinal, justamente por agregarem receptores, correceptores e moléculas adaptadoras (Langlet, 2000). Foi, ainda, atribuída a importância delas como geradora de polarização da

superfície celular, mecanismo importantíssimo pra formação inclusive da fisiologia de tecidos (Simons e van Meer, 1988).

Além do seu papel na estrutura da membrana e sinalização celular, colesterol também parece estar diretamente associado a modulação da resposta inflamatória. Ensaios *in vitro* mostraram que inibição da biossíntese de colesterol dispara espontaneamente a via de resposta por interferon do tipo I (IFN), por interferir na transdução de sinal via STING-TBK (York *et al.*, 2015). Outro estudo demonstrou que a enzima colesterol 25-hidroxilase (Ch25h), parte do metabolismo de colesterol, é estimulada por IFN tipo I e que isto tem efeito na diminuição da atividade de inflamossoma por IL-1 e expressão de IL-1 $\beta$  (Reboldi *et al.*, 2014). Esses achados serão melhor discutidos posteriormente.

#### **1.4 Mecanismos de Regulação do Colesterol Intracelular**

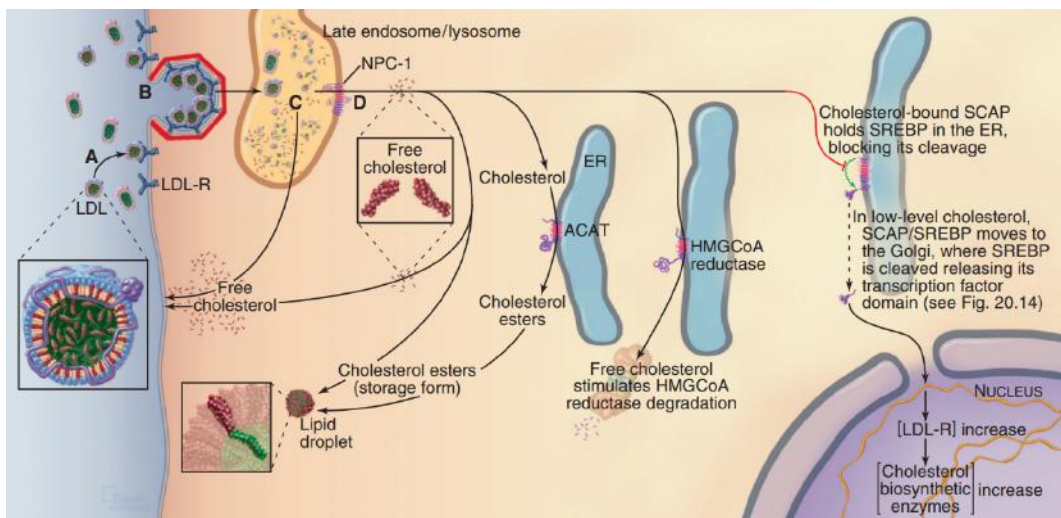
Devido a importância do colesterol no funcionamento celular, o seu metabolismo, síntese e tráfego devem ser, portanto, finamente regulados. Assim, os níveis celulares de colesterol são regulados por um complexo balanço entre síntese endógena, obtenção de colesterol extracelular e efluxo de colesterol para fluidos vasculares (Simons e Ikonen, 2000). Qualquer desbalanço, em quaisquer etapas, pode provocar uma série de consequências patológicas, como o desenvolvimento de aterosclerose, que é caracterizada pelo acúmulo de colesterol em decorrência de deficiência no efluxo de colesterol, levando ao desenvolvimento de placas de gordura nas principais artérias do organismo (Arnold e Kwiterovich, 2003).

O colesterol é transportado pelo corpo na sua forma esterificada, em conjuntos com lipoproteínas e outros lipídios. Originado da dieta e síntese de novo, sobretudo no fígado, eles são solubilizados em lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) e transportados através do sangue (Pollard, 2016). Através de endocitose mediada por receptor LDL, as células do organismo captam esse colesterol da corrente sanguínea, sendo transportados para o lisossomo através da via endocítica (Figura 1 A, B e C). Nos lisossomos, os ésteres de colesterol são hidrolisados e a massa de colesterol, não associada mais ao LDL, é transportada por proteínas citoplasmáticas carreadoras para outras membranas celulares (Figura 1 D) (Pollard, 2016). Uma pequena parte do colesterol é transportado para o retículo endoplasmático (RE), que abriga até 1% do colesterol celular total. Essa quantidade de colesterol presente no RE funciona controlando a atividade de fatores de transcrição que regulam genes envolvidos com o metabolismo de colesterol (Lange, 1991).



Um dos fatores de transcrição chave na regulação dos níveis de colesterol presentes no RE é a proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol (SREBP). Esse fator fica preso ao RE pela proteína ativadora da clivagem de SREBP (SCAP), que possui um domínio que reconhece esteroides, sendo, portanto, um sensor dos níveis de colesterol intracelulares (Hua *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2002, Sever *et al.*, 2003). Em situações de baixas quantidades de colesterol celular, SCAP fica com o domínio que reconhece colesterol livre e o complexo SREBP-SCAP escapa do RE e é endereçado para o complexo de Golgi (Brown and Goldstein, 1999; Goldstein, DeBose-Boyd e Brown, 2006). No complexo de Golgi há a liberação proteolítica de SREBP, que então segue para o núcleo e ativa genes envolvidos no metabolismo de esteróis (Brown e Goldstein, 1997; Horton *et al.*, 2002). Dentre esses, a ativação de SREBP promove a expressão do receptor de LDL (LDLR), importante para captação de colesterol; e de  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA redutase (HGM-CoA redutase), que catalisa a primeira etapa da biossíntese de colesterol (Hua *et al.*, 1993). Por outro lado, quando há acúmulo de colesterol, o complexo SCAP-SREBP fica associado à proteína INSIG, que também reside na membrana no RE, e que previne endereçamento do complexo para o complexo de Golgi (Figura 2) (Yang *et al.*, 2002; Sever *et al.*, 2003).

O aumento de colesterol presente nas membranas e livres no citoplasma também tem como consequência a ativação da enzima acilcoenzimaA colesterol aciltransferase (ACAT), que converte colesterol livre em ésteres de colesterol para armazenamento em gotículas lipídicas (Pollard, 2016). Um outro efeito do acúmulo de colesterol é a degradação da enzima HGM-CoA redutase, limitando sua atividade e, conseqüentemente, a síntese *de novo* de colesterol (Gil *et al.*, 1985; Skalnik *et al.*, 1988).



**Figura 2: Processamento intracelular e regulação da biossíntese de colesterol.** A. Colesterol proveniente da dieta é entregue às células na forma de LDL. B. As partículas de LDL são endocitadas via clatrina. C. No endossoma tardio/lisossoma, o colesterol livre é liberado e transportado para a superfície celular ou membranas internas, dependendo, em parte, de NPC-1. (D). O excesso de colesterol pode ser acetilado por ACAT e armazenado em “lipid droplets” como ésteres de colesterol. A atividade de ACAT é aumentada por altos níveis intracelulares de colesterol. Ao mesmo tempo, altos níveis de colesterol presentes na membrana diminuem a síntese de colesterol por ativação de degradação dependente de proteassoma da enzima HMG-CoA reductase. Por fim, os altos níveis de colesterol reduzem a tomada de partículas LDL e colesterol proveniente da dieta através do bloqueio do processamento proteolítico do fator de transcrição SREBP, que é necessário para expressão do receptor de LDL (LDL-R). Quando SREBP transloca ao núcleo, ele promove, então, o aumento da expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de colesterol. (Pollard, 2016).

Recentemente, estudos tem mostrado o envolvimento de SREBP com o desenvolvimento da inflamação. Camundongos deficientes em SREBP-1a são resistentes aos efeitos tóxicos gerados por desafio com LPS e por sepse induzida por puntura e ligação de ceco. Descobriu-se que seus macrófagos falham em ativar lipogênese e funções chaves de inflamossomos, como ativação de caspase1 e secreção de IL-1 $\beta$ . Foi sugerido, então, que SREBP interage diretamente e ativa NLRP1a (Im *et al.*, 2011). Nesse sentido, SREBP atua na indução do processo inflamatório.

Em contrapartida, a ativação de TLR4 resulta na produção de ácidos graxos com perfil anti-inflamatório e que contribui para a diminuição da regulação de RNAs mensageiros que expressam mediadores próinflamatórios. Esse mecanismo é dependente de SREBP1 e resulta no desacoplamento de NF $\kappa$ B nos genes alvos de ativação (Oishi *et al.*, 2017).

## 1.5 Regulação do Metabolismo de Colesterol

Outro nível de controle do metabolismo de lipídios e do colesterol são os receptores nucleares, uma classe de fatores de transcrição ativados por ligantes específicos que tem papel fundamental na manutenção da homeostase celular (Evans e Mangelsdorf, 2014). Diversos receptores nucleares respondem às mudanças nos níveis de colesterol endógeno por intermédio de ligantes lipídicos, levando a expressão de proteínas que regulam o metabolismo de lipídios de uma maneira geral, como os receptores X do fígado (LXRs), os farnesoid X receptor (FXRs) e os receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPARs) (Janowski *et al.*, 1996). LXRs podem ser ativados por oxisteróis e desmosteróis, FXRs por ácidos biliares e PPARs por ácidos graxos, ácidos graxos e ácido linoleico. LXRs e FXRs, quando ativados, levam a transcrição de genes que resultam no efluxo de colesterol e ácidos graxos através de transportadores como ABCA1 e CDCA, e portanto, o transporte reverso de colesterol (Calkin e Tontonoz, 2012). PPARs estão envolvidos com captação e lipídios e oxidação de ácidos graxos (Kersten, Desvergne e Wahli, 2000).

### 1.5.1 Receptores Ativadores da Proliferação de Peroxissomas (PPARs)

Os PPARs compõem um grupo de três diferentes proteínas, codificados por genes distintos: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ . Todos os três são receptores nucleares, com afinidade por uma variedade de LP, incluindo ácidos graxos, eicosanoides e derivados de ácido linoleico (Harmon, Lam e Glass, 2011). Ao reconhecerem seus ligantes, se tornam ativados e funcionam como fatores de transcrição, regulando diretamente a expressão dos elementos responsivos aos proliferadores de peroxissomas (PPREs) (Schoonjans *et al.*, 1996). Apesar da ativação de PPAR $\alpha$  de fato promover a proliferação de peroxissomos (Lee *et al.*, 1995), a ativação de PPAR $\delta$  e PPAR $\gamma$  não levam ao mesmo fenótipo. Assim, a classificação dos PPARs na mesma família não se baseia na sua função, mas semelhança na sequência de aminoácidos.

Na sua forma nativa celular os PPARs são encontrados na forma de heterodímeros associados com diferentes moléculas, incluindo o receptor retinóide X (RXR), e correpressores transcripcionais, como o receptor de ácido retinóico (RAR), hormônio tireoide (SMRT) e receptor correpressor nuclear (NCoR) (Xu *et al.*, 1999; Drenzo *et al.*, 1997). Uma vez que PPAR é ativado, os complexos podem sofrer mudanças conformacionais que levam a dissociação dos correpressores e/ou associação com outras

moléculas coativadoras. Assim, pode haver a formação de complexos ativos que, então, se ligam aos elementos responsivos a PPAR (PPRE) (Tavares *et al.*, 2007).

#### 1.5.1.1 PPAR $\gamma$

O gene de PPAR $\gamma$  pode dar origem a três diferentes RNAs mensageiros, sendo eles PPAR $\gamma$ 1, que é expresso em uma ampla variedade de tecidos como coração, cólon, intestino delgado e grosso, rins, pâncreas e baço, PPAR $\gamma$ 2, expresso exclusivamente em tecido adiposo e PPAR $\gamma$ 3, expresso de forma restrita a macrófagos e intestino grosso (Fajas *et al.*, 1997; Fajas *et al.*, 1998).

O papel de PPAR $\gamma$  foi inicialmente bem estabelecido em adipócitos. Foi demonstrado que a introdução de PPAR $\gamma$  em fibroblastos, na presença de ligantes fracos, induziu a diferenciação destas células em adipócitos (Tontonoz *et al.*, 1994). Além disto, camundongos destituídos de PPAR $\gamma$  apresentaram reduzida quantidade de tecido adiposo ou exibiam lipodistrofia (Barak *et al.*, 1999). A indução desses fenótipos na presença ou ausência de PPAR $\gamma$  está associado a sua função, uma vez que ele estimula a expressão de muitos genes envolvidos no metabolismo de lipídios, como FABP-4, acil-CoA sintetase e lipase lipoproteica (LPL) (Tontonoz *et al.*, 1994; Schoonjans *et al.*, 1996; Schoonjans, 1995). PPAR $\gamma$  também controla a expressão através da indução da proteína transportadora de ácidos graxos (FATP-1) e CD36, ambas participando da captação de lipídios pelos adipócitos (Sfeir *et al.*, 1997).

PPAR $\gamma$  pode ser ativado por uma variedade de ligantes sintéticos ou naturais de origem lipídica, como ácidos graxos e eicosanoides (Kliwer *et al.*, 1997; Salam *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2004). Diversos estudos mostram que a ativação de PPAR $\gamma$  por seus ligantes lipídicos, resultam em regulação da expressão de genes envolvidos em metabolismo de lipídios e glicose, além de interferir no desenvolvimento da inflamação. Derivados de ácido linoleico são capazes de diminuir a resposta inflamatória da linhagem de macrófagos murinos estimulados com LPS, reduzindo seus níveis de óxido nítrico, PGE2 e TNF $\alpha$  (Huang *et al.*, 2011). Estudos *in vitro* utilizando linhagem de macrófago estimulada por LPS demonstraram ainda, que derivados de ácidos graxos levaram a ativação de PPAR $\gamma$ , com consequente inibição de NF $\kappa$ B e redução da expressão de IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$ , (Zhao *et al.*, 2005). Em outro estudo, foi mostrado que o tratamento de células de linhagem com pioglitazona, um agonista farmacológico, promove ativação de PPAR $\gamma$ , que atua como uma E3 ubiquitina ligase e que leva a degradação de NF $\kappa$ B (Hou, Moreau e Chadee, 2012).

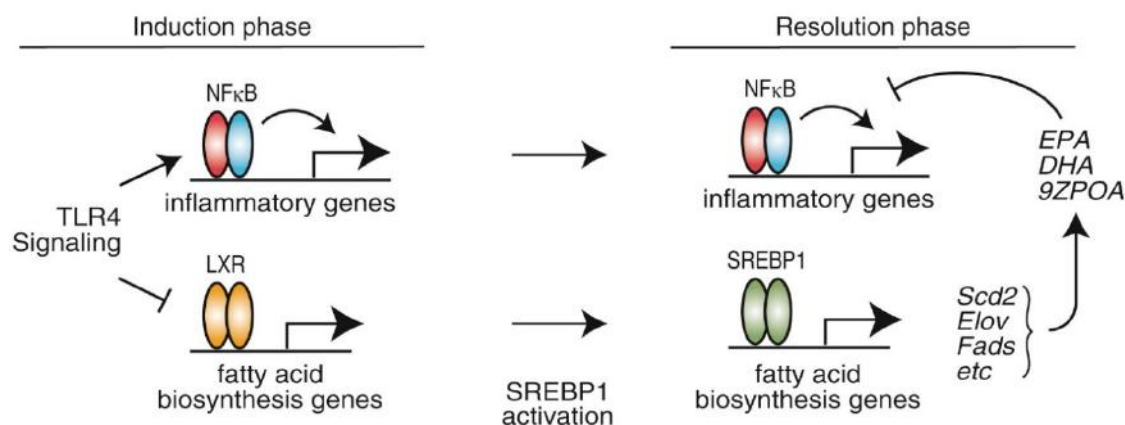
### 1.6 Metabolismo de Colesterol e Imunidade Inata

Como explorado anteriormente, o colesterol é uma molécula fundamental em funções básicas celulares, como composição da membrana e formador de plataformas essenciais para transdução de sinais (Reboldi e Dang, 2018). Além disso, o tráfego, a síntese e o metabolismo de colesterol é finamente regulado em diferentes níveis, uma vez que o acúmulo de colesterol é tóxico e é capaz de provocar uma série de doenças metabólicas (Arnold e Kwiterovich, 2003). Nos últimos anos diversos grupos têm mostrado que as vias de regulação de síntese, captação e efluxo de colesterol podem modular também vias de sinalização intracelular envolvidas no controle da resposta inflamatória. Assim, os níveis celulares de colesterol e produtos derivados de seu metabolismo exercem papel na regulação de metabolismo e ativação imune (Reboldi e Dang, 2018).

Uma das primeiras evidências da relação entre colesterol e controle da resposta imune surgiu de um estudo avaliando o efeito da adição de 25-Hidroxicolesterol (25-HC) em culturas de células linfóides. 25-HC é um oxisterol e um dos metabólitos bioativos derivado do metabolismo de colesterol (Russel, 2003), cuja formação se dá através da enzima colesterol 25-hidrolase (Ch25h), residente no RE. Foi demonstrado que 25-HC inibe a proliferação de linfócitos induzida por mitógenos (Heiniger e Marshall, 1982). Posteriormente foi demonstrado que esse fenômeno estava associado a ligação do 25-HC à SREBP e bloqueio de sua ativação, possivelmente inibindo a captação ou síntese de colesterol (Adams *et al.*, 2004). De fato, a adição subsequente de colesterol às culturas recuperou a capacidade proliferativa dessas células. Esses achados sugerem que 25-HC funciona como um repressor da biossíntese de colesterol controlada por SREBP (Heiniger e Marshall, 1982; Adams *et al.*, 2004). Estes dados mostraram, ainda, que a regulação da biossíntese de colesterol por SREBP é influenciada não apenas pelos níveis de colesterol, mas também pela interação direta com produtos do metabolismo de colesterol. É possível, portanto, que ambos os mecanismos tenham um impacto direto no desenvolvimento da resposta imune (Reboldi e Dang, 2018).

Nesse sentido, foi reportado que a enzima CH25h é induzida por interferon do tipo I (IFN-I) em células mielóides e que a produção desse IFN-I leva a uma repressão da biossíntese de colesterol dependente de SREBP (Russel, 2003; Payne e Hales, 2004; Goldstein, DeBose-Boyd e Brown, 2006). Posteriormente, foi demonstrado que a ativação de CH25h e conseqüente acúmulo de 25-HC pode ser um dos mecanismos de ação antiviral mediado por IFN do tipo I, uma vez que 25-HC inibe a entrada de alguns vírus em células, possivelmente por remodelamento da membrana, além de impedir a

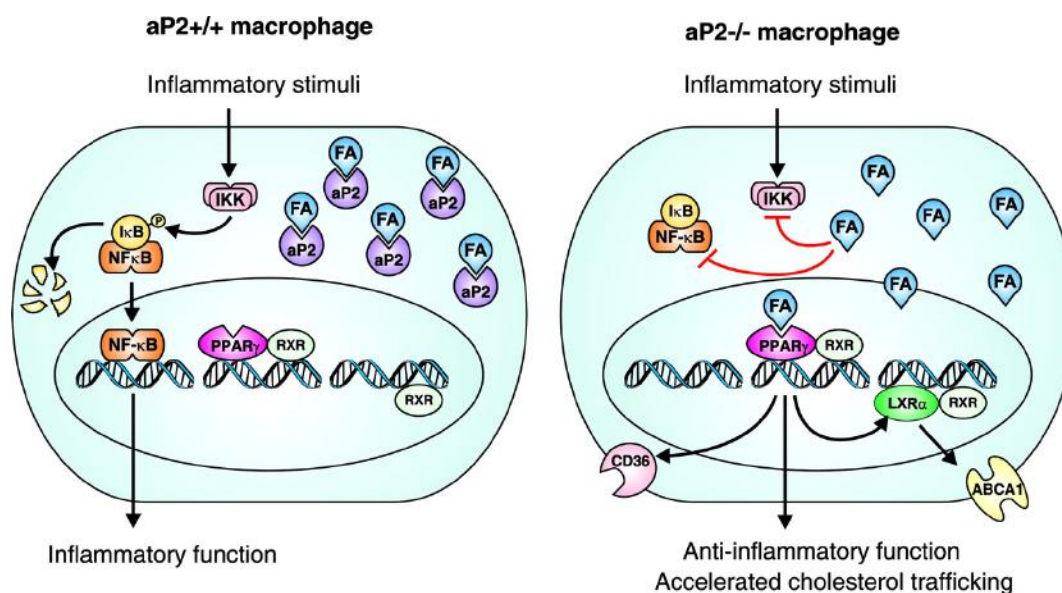
replicação viral (Liu *et al.*, 2012; Blanc *et al.*, 2012). Além disso, também foi demonstrado que diminuição da síntese de colesterol induzida por 25-HC está diretamente associada com uma diminuição da ativação da plataforma de inflamossoma e, conseqüentemente, diminuição da produção de IL-1 $\beta$  (Reboldi *et al.*, 2014). Macrófagos estimulados via TLR4 apresentam aumento da expressão de SREBP após 12-24h de estímulo. Esse aumento da expressão de SREBP está associado a uma maior aquisição de ácidos graxos insaturados e ao início da fase de resolução da inflamação (Figura 3) (Oishi *et al.*, 2017). A depleção de SREBP nesse modelo faz com que esses macrófagos tenham menor capacidade de produção de ácidos graxos insaturados, levando a uma maior atividade de NF- $\kappa$ B e conseqüente indução do estado hiperinflamatório (Oishi *et al.*, 2017).



**Figura 3: Modelo de ações integradas de NF $\kappa$ B, LXRs e SREBP1 durante as fases de indução e resolução da resposta por TLR4.** A sinalização por TLR4, na fase de indução, promove a expressão de genes inflamatórios via NF $\kappa$ B e reprime a expressão de genes da biossíntese de ácidos graxos. O decréscimo dos níveis de ácidos graxos resulta em ativação de SREBP1. A ativação de SREBP1 leva a expressão de genes relacionados com a biossíntese de ácidos graxos (Scd2, EloV e Fads). A via de biossíntese de ácidos graxos produz, então, ácidos graxos insaturados (EPA, DHA e 9ZPOA), que, por sua vez, atuam inibindo a expressão de genes inflamatórios por NF $\kappa$ B. (Oishi *et al.*, 2017).

Outro ponto de regulação cruzada entre metabolismo lipídico e inflamação se dá pela interação entre ácidos graxos e FABP ou PPAR $\gamma$ . O aumento da disponibilidade de ácidos graxos livres de FABP permite sua ligação a PPAR $\gamma$ , induzindo sua ativação. A ativação de PPAR $\gamma$ , por sua vez, promove diminuição da atividade de I $\kappa$ B kinase e conseqüente redução da atividade de NF $\kappa$ B. De fato, foi demonstrado que a depleção de FABP4 em

macrófagos leva a ativação de PPAR $\gamma$  e inibição da atividade de NF $\kappa$ B (Makowski *et al.*, 2005). Em contrapartida, na presença de FABP4, os ligantes lipídicos ficam retidos e acabam por não ativar a via de PPAR $\gamma$ , permitindo a ativação da via de NF $\kappa$ B (Figura 4) (Makowski *et al.*, 2005). Em acordo com estes resultados, em modelo de linhagem de macrófagos, o tratamento com inibidor farmacológico de FABP inibe a expressão da quimiocina MCP-1 e citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$  (Furuhashi *et al.*, 2007).



**Figura 4: FABP4/aP2 regulando tráfego de colesterol e vias inflamatórias em macrófagos.** Modelo hipotético em que aP2 retém ácidos graxos celulares por associação e os previne de inibir IKK e, portanto, ativação de NF $\kappa$ B e subsequente função inflamatória. Quando ausente no sistema, ácidos graxos livres inibem a resposta via NF $\kappa$ B e ainda ativam os receptores nucleares PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$  atua, então, tanto no tráfego de colesterol, através da expressão de CD36 e ABCA1, quanto na resposta imune, inibindo-a. (Makowski *et al.*, 2005).

PPARs, como já discutido, são normalmente ativados em conjunto a RXR e, assim, regulam os PPREs. Foram descritos primeiramente pela sua atividade na regulação do metabolismo de ácidos graxos, porém eles têm recebido atenção quanto ao seu efeito anti-inflamatório em diferentes modelos celulares. O primeiro indicativo foi evidenciado em camundongos destituídos de PPAR $\alpha$ , com resposta inflamatória prolongada quando estimulados com leucotrienos e ácido araquidônico (Devchand *et al.*, 1996). Outros estudos confirmaram o efeito anti-inflamatório da ativação de PPAR $\alpha$  em diferentes modelos celulares. Quando sob efeito de agonistas farmacológicos, foi visto que PPAR $\alpha$  inibe a produção de marcadores inflamatórios como molécula celular de adesão vascular-

1 (VCAM-1), IL-6 e endotelina-1 (ET-1) em células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos (Marx *et al.*, 1999; Delerive *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2001; Marx *et al.*, 2001; Neve *et al.*, 2001). Em seguida, também foi mostrado que a aorta de camundongo destituído de PPAR $\alpha$  respondia de maneira exacerbada ao estímulo com LPS, corroborando a atividade anti-inflamatória de PPAR $\alpha$  *in vivo* (Delerive *et al.*, 2000).

A ativação de PPAR $\beta/\delta$  também contribui para um perfil anti-inflamatório. Monócitos derivados de camundongos PPAR $\delta$  *-/-* estimulados com tioglicolato produziram menos MCP-1, IL-1 $\beta$  e metaloproteinase matriz MMP-9 (Lee *et al.*, 2003). Além disso, quando macrófagos obtidos de camundongos selvagens foram tratados com agonista de PPAR $\delta$ , houve supressão da expressão de MCP-1 e IL-1 $\beta$ , significando então que a ativação de PPAR $\delta$  também é anti-inflamatória. Em relação ao PPAR $\gamma$ , diferentes modelos também sugerem que a sua ativação resulta em efeitos anti-inflamatórios. Macrófagos ativados com IFN- $\gamma$  ou LPS e tratados com ligante natural ou sintético de PPAR $\gamma$  tem inibição da expressão de óxido nítrico sintase (iNOS), gelatinase B e receptor “scavenger” A (SR-A) (Ricote *et al.*, 1998). Em modelo de monócitos estimulados com forbol-miristil-acetato (PMA) e tratados com ligante natural ou sintético de PPAR $\gamma$ , a expressão das citocinas próinflamatórias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 é inibida (Jiang, Ting e Seed, 1998).

Estudos mostram que PPARs podem resultar na inibição de genes próinflamatórios de diferentes maneiras, seja por interação direta, regulação de atividade kinase, interação com correpressores ou transrepressão dependente de correpressor.

No modelo de interação direta, PPARs se liga via interação proteína-proteína aos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B, AP-1, STAT e NF-AT, e prevenindo a sua ligação com genes alvo (Figura 5 A) (Delerive *et al.*, 1999; Delerive *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2000 Vanden *et al.*, 2003). PPARs podem, ainda, serem ativados e induzirem a expressão de I $\kappa$ B $\alpha$ , inibidor de NF- $\kappa$ B, impedindo, por maior quantidade, que os sinais desliguem o inibidor do fator de transcrição (Figura 5 B).

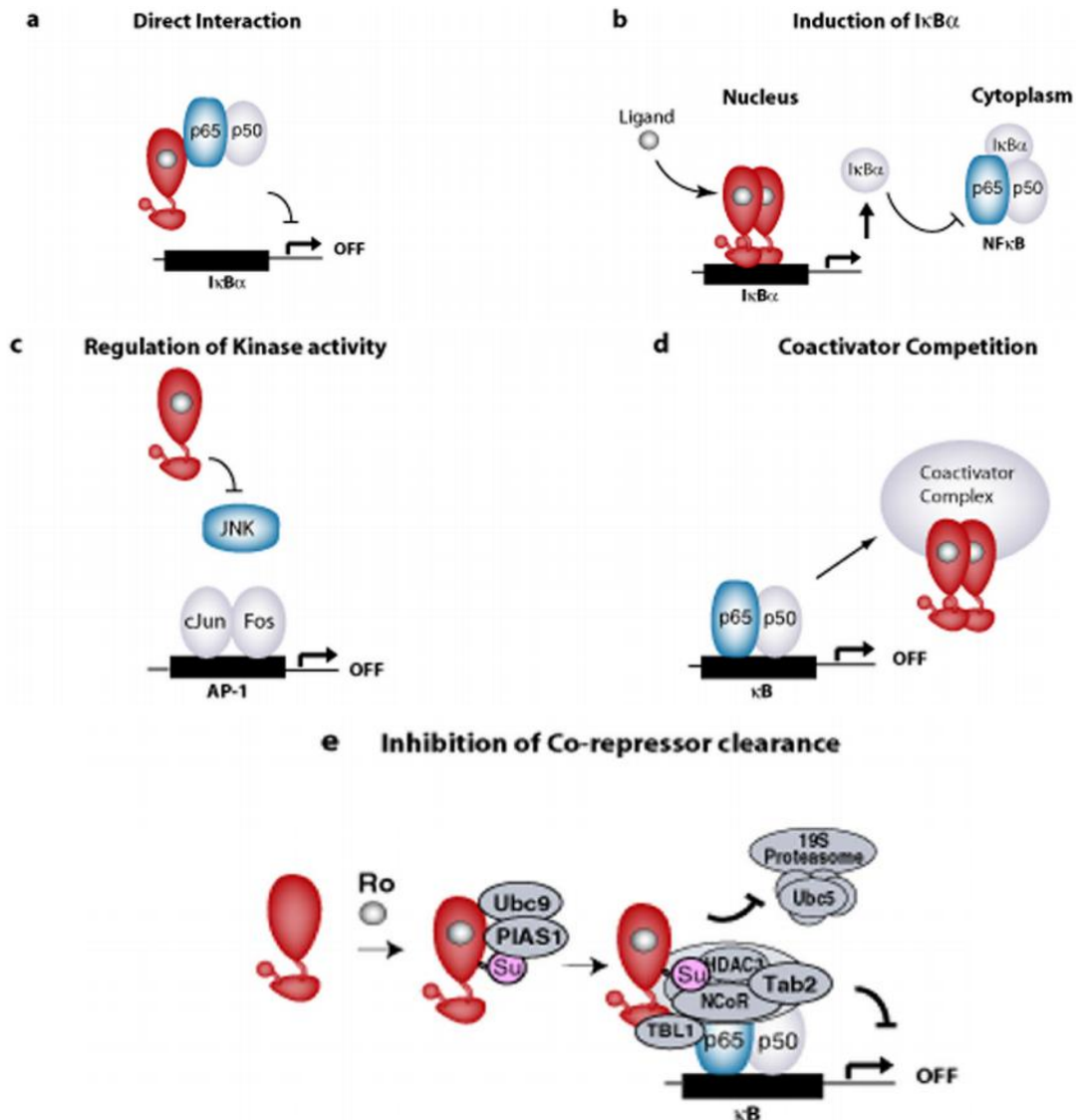
A via das proteínas kinase ativada por mitógeno (MAPK) também é regulada por PPARs em diferentes níveis. A ativação de PPAR $\gamma$  reduz a ativação de c-Jun N-terminal kinase (JNK) MAPK e p38 no cólon, levando a regulação reduzida da expressão de genes próinflamatórios (Figura 5 C) (Desreumaux *et al.*, 2001). Ligantes farmacológicos de PPAR $\gamma$ , em células de músculo liso, inibe vias de migração “downstream” da via de ERK/MAPK (Goetze *et al.*, 1999; Goetze *et al.*, 2001). Também foi mostrado que os



efeitos anti-inflamatórios de PPAR $\alpha$  em macrófagos envolve a inibição da via de sinalização da proteína kinase C (Paumelle *et al.*, 2006; Blanquart *et al.*, 2004).

Quanto a interação com coreguladores, os fatores de transcrição requerem um arsenal de proteínas coativadoras que se sobrepõe. Nesse modelo, PPARs competem com NF- $\kappa$ B e AP-1 por ligação com coativadores gerais, como proteína de ligação ao CREB (CBP), e p300, ou outros coreguladores, que estão presentes de forma limitada na célula (Figura 5 D) (Kamei *et al.*, 1996).

Já para o modelo de transrepressão dependente de correpressor, dois modelos foram estudados. Para PPAR $\delta$ , as evidências apontam para o controle do estado de inflamação do macrófago baseado na sua associação com BCL-6 (Lee *et al.*, 2003). Em outro modelo, estudos sugerem que PPAR $\gamma$  promove a transrepressão de um grupo de genes de resposta inflamatória em macrófagos por impedir a diminuição de complexos de correpressores em promotores inflamatórios induzidos pela cascata de sinalização por LPS (Figura 5 E) (Pascual *et al.*, 2005; Ghisletti *et al.*, 2007).



**Figura 5: Mecanismos de transrepressão mediados por PPAR.** A. PPAR interage diretamente com p65 e impede sua ligação aos genes alvos e, portanto, sua ativação. B. PPAR leva a expressão de IκB e impede disponibilidade do complexo NFκB para se ligar ao DNA e ativar a transcrição de genes alvo. C. PPAR reduz ativação de JNK e, por fim, a indução da expressão e genes inflamatórios. D. PPAR se liga a complexos de coativadores e impede sua ligação com NFκB e AP-1. E. PPAR, via sumoilação, impede o desacoplamento do complexo inibitório NCoR dos genes alvos de NFκB. (Ricote e Glass, 2007).

## 1.7 Hipótese

Portanto, a nossa hipótese é que HP- $\beta$ CD afete a expressão e função de receptores envolvidos com metabolismo de colesterol e ácido graxo que também participem de controle da resposta inflamatória, como PPAR $\gamma$ . Com isso, de acordo com a literatura, a ativação de PPAR $\gamma$  levaria a inibição de NF- $\kappa$ B e, em última análise, inibição da expressão das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10.

## 2. Justificativa

Nosso grupo demonstrou que o tratamento de monócitos com HP- $\beta$ CD alterou o perfil de ativação dessas células, diminuindo a secreção de TNF $\alpha$  e IL-10, induzida por LPS. Esse efeito não resultou exclusivamente da depleção de colesterol de membrana ou da desorganização de “lipid raft”. Além disso, observamos que o tratamento com HP- $\beta$ CD impactou a expressão de genes associados a diferentes vias metabólicas, particularmente, associados a via de PPAR $\gamma$ . Entretanto, os mecanismos associados a essa regulação, bem como o papel dessas vias na modulação da ativação de monócitos ainda não foram investigados.

A busca no entendimento dos mecanismos que promovem a comunicação entre regulação do metabolismo de colesterol e a resposta imune trazem esclarecimentos não só de interesse no campo da biologia celular, mas também como ferramenta de atuação com fins farmacêuticos. Muitas são as doenças causadas por distúrbios no metabolismo de colesterol, funcionamento do sistema imune ou uma combinação de ambas, e que normalmente geram quadros crônicos e de difícil resolução. Novos caminhos terapêuticos são essências e, para isto, a investigação básica se torna fundamental.

Entender a maneira como a regulação de colesterol de monócitos pode influenciar na sua resposta à inflamação pode elucidar caminhos para o entendimento e resolução de várias condições. Por exemplo, na formação de placas de ateroma em pacientes com aterosclerose, uma vez que os macrófagos envolvidos com o próprio processo de formação da placa têm acúmulo de colesterol intracelular, se tornando uma “foam cell”, e adquire um perfil inflamatório que mantém a formação da placa. Outra área de interesse é no tratamento da ativação imune crônica em pacientes HIV+, já que nestes pacientes o principal responsável pela manutenção da ativação são os monócitos e as citocinas mais envolvidas nesse processo são TNF $\alpha$  e IL-10.

### 3. Objetivo

Investigar o mecanismo envolvido na diminuição da expressão das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 em monócitos primários humanos tratados com HP $\beta$ CD e estimulados com LPS.

#### 3.1 Objetivos Específicos

- Determinar a cinética de depleção de colesterol por HP- $\beta$ CD em monócitos primários humanos;
- Avaliar o efeito de HP- $\beta$ CD sobre a organização de “lipid rafts” e composição de ácidos graxos;
- Investigar o efeito de HP- $\beta$ CD na transdução de sinais da cascata de sinalização de TLR4 por LPS;
- Confirmação dos dados do transcriptoma analisando a expressão de PPAR $\gamma$  após tratamento dos monócitos diferentes concentrações de HP $\beta$ CD;
- Caracterizar a cinética da expressão de PPAR $\gamma$  após tratamento com diferentes doses de HP $\beta$ CD, com e sem estímulo de LPS;
- Investigar o papel de PPAR $\gamma$  na inibição de TNF- $\alpha$  por HP $\beta$ CD, através do uso de agonistas e antagonistas específicos desse receptor;

#### **4. Materiais e Métodos**

##### 4.1. Purificação de monócitos humanos por ensaio de adesão:

A partir do sangue de doadores saudáveis, cedido pelo Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), foi realizada a purificação de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) por meio do gradiente de Ficoll (Histopaque-1077). Para isto, é colocada a proporção de 1:2 de Ficoll e sangue em um tubo Falcon de 50mL e centrifugado à 500g por 30 minutos. A nuvem de PBMC é transferida para outro tubo Falcon, adicionado PBS 1x para completar 50mL e centrifugado novamente à 500g por 10 minutos. As células são então ressuspensas em meio completo (RPMI com 10% de soro fetal bovino) e contadas. Para purificação de monócitos por ensaio de adesão,  $10^8$  células viáveis de PBMC são plaqueadas em placas de Petri e incubadas em meio completo, à 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 2 horas. Em seguida, o sobrenadante é descartado, as células aderidas são centrifugadas, ressuspensas em meio completo e contadas. O protocolo foi aprovado pelo comitê de ética da UFRJ (Protocolo: 105/07).

##### 4.2. Tratamento de monócitos com 1 e 10mM de HPβCD:

Monócitos são plaqueados em placas TPP de 24 poços, com  $10^6$  células por poço, ou placas TPP de 6 poços, com  $5 \times 10^6$  células por poço, com meio sem soro, contendo 1mM ou 10mM de HPβCD (Cyclodextrin Technologies Development, Inc; CTD, High Springs). As células são incubadas à 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 1 hora. Em seguida, o meio antigo com HP-βCD é retirado, as células lavadas com PBS 1x e mantidas com meio completo à 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 48 horas.

##### 4.3. Estímulo de LPS:

Monócitos tratados ou não com HPβCD e cultivados por 48 horas são, então, estimulados com 20ng/mL de LPS (Sigma Aldrich) por diferentes períodos (30 minutos, 4 horas ou 24 horas) de acordo com a análise realizada.

##### 4.4. Tratamento com agonista de PPARγ, TZD, e antagonista, GW9662:

Monócitos primários humanos purificados de doadores saudáveis, plaqueados, tratados ou não com 1mM e 10mM de HP-βCD, são acrescidos, no meio de cultura, de 100uM de TZD e/ou GW9662 pelos determinados tempos de cada análise.

#### 4.5. Dosagem de colesterol:

Monócitos tratados ou não com HP- $\beta$ CD são cultivados por 1h, 6h, 24h e 48h. Após os determinados tempos, o pellet de células é submetido ao kit de dosagem de colesterol Amplex Red Cholesterol (Thermo Fisher Scientific Inc., Pittsburg, USA).

#### 4.6. Análises por Citometria de Fluxo:

Monócitos primários humanos são isolados de doadores saudáveis, tratados ou não com 1mM e 10mM de HP- $\beta$ CD e mantidos por 1h ou 48h. Cada  $10^6$  monócitos foram mantidos em 100 $\mu$ L de tampão de bloqueio (PBS com 10% de soro fetal bovino e Fc Block) e incubados por 30 minutos no gelo. Em seguida, as células foram marcadas com anti-CD14, anti-TRL4, anti-CD45 e anti-CD59 conjugados com FITC, APC, APC-Cy7 e PE e incubadas por 1 hora no gelo. Após incubação, as células foram lavadas com PBS, fixadas com 4% de formaldeído e lidas no citômetro de fluxo FACSCalibur (BDBiosciencesfonte). Foram adquiridas 10000 eventos e análise foi realizada utilizando-se o programa FlowJo.

#### 4.7. Microscopia de fluorescência:

Sobre lamínula tratada com polilisina, em placas TPP de 24 poços,  $10^6$  monócitos foram plaqueados, tratados com 1mM e 10mM de HP- $\beta$ CD e mantidos por 1h e 48h. Em seguida, as células são lavadas com PBS 1x e fixadas com solução de formaldeído 4% por 15 minutos. Células são lavadas novamente em PBS 1x e bloqueadas com tampão de bloqueio (BS com 10% de soro fetal bovino e Fc Block). Em seguida, as células são marcadas com Bodipy 1:300 em tampão de bloqueio por 1h. As lamínulas são seladas em contato com laminas e levadas para observação em microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager D2.

#### 4.8. PCR em tempo real:

As células são submetidas ao protocolo de extração de RNA por TRIzol reagente, de acordo com as recomendações do fabricante (Thermo Fisher Scientific). O RNA purificado sofreu ação da transcriptase reversa para obtenção do cDNA, através do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Multiscribe Reverse Transcriptase), de acordo com as recomendações do fabricante (Thermo Fisher Scientific). Com o cDNA, é realizado PCR quantitativo em tempo real (qPCR-RT) utilizando o kit Power SYBR Green master mix (Thermo Fisher Scientific), utilizando uma combinação dos

iniciadores, de acordo com o que se quer analisar: TNF- $\alpha$ senso (5'-CAG AGG GAA GAG TTC CCC AGG GAC-3' ), TNF- $\alpha$ anti-senso (5'- CCT TGG TCT GGT AGG AGA CGG C-3' ), H10 senso (5'- AAT AAG GTT TCT CAA GGG GCT-3' ), H10 anti-senso (5'- AGA ACC AAG ACC CAG ACA TCA A-3' ), PPAR $\gamma$ senso (5'-GCA GTG GGG ATG TCT CAT AAT AG-3' ), PPAR $\gamma$  anti-senso (5'- CAG GGG GGT GAT GTG TTT GAA-3' ), GAPDH senso (5'-GTG GAC CTG ACC TGC CGT CT-3' ) e GAPDH anti-senso (5'- GGA GGA GTG GGT GTC GCT GT-3' ). As reações foram feitas no sistema de PCR em tempo real StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, Inc) com a ciclagem de 50° C por 2min, 95° C por 10min e adicionais 40 ciclos de desnaturação (95° C por 15seg), anelamento de iniciadores (55° C por 30seg)extensão (60° C por 60seg). As amostras ainda foram submetidas a uma curva de melting para eliminar os dímeros de iniciadores (95° C por 15seg, 60° C por 60seg e 25 por 15seg). Os dados foram analisados através do método comparativo C-T( $\Delta\Delta C_t$ ), com normalização de GAPDH.

#### 4.9. Western Blotting:

As células são lisadas com tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7.5 cotendo 150 mM de NaCl, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 1% Triton X-100) acrescido de inibidores de protease (Sigma Aldrich) por 15 minutos no gelo. Os debris celulares são removidos por centrifugação a 7000g, por 2 minutos a temperatura ambiente. As amostras são normalizadas através da quantidade total de proteína. O extrato é submetido a eletroforese em SDS-PAGE 10% para separação das proteínas e transferido para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Milipore). Indicadores de peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech) são utilizados como padrão de corrida. As membranas são bloqueadas com solução TBS 1X contendo 2,5% de BSA por 30 minutos. Essas membranas são lavadas três vezes com TBS contendo 0,05% Tween 20 (TBS-Tween) e, então, marcadas com anticorpo anti-p38, anti-Pp38, anti-pI $\kappa$ B $\alpha$  e anti-GAPDH (1:1000, Cell Signaling Technologies, Boston, USA) overnight a 4°C. Após sucessivas lavagens com TBS, as membranas serão incubadas com anticorpos anti-IgG de coelho ou anti-IgG de camundongo conjugados a peroxidase (1:10000, Santa Cruz Biotechnology) por 1h, sob agitação, a temperatura ambiente. As membranas serão incubadas com o substrato luminescente comercial Super Signal West Pico (Thermo Fisher Scientific) para detecção da expressão das proteínas. A relação entre as proteínas fosforiladas e não fosforiladas ou

proteínas fosforiladas sobre proteínas constitutivas serão determinadas utilizando o programa ImageJ.

#### 4.10. Avaliação da viabilidade celular por XTT:

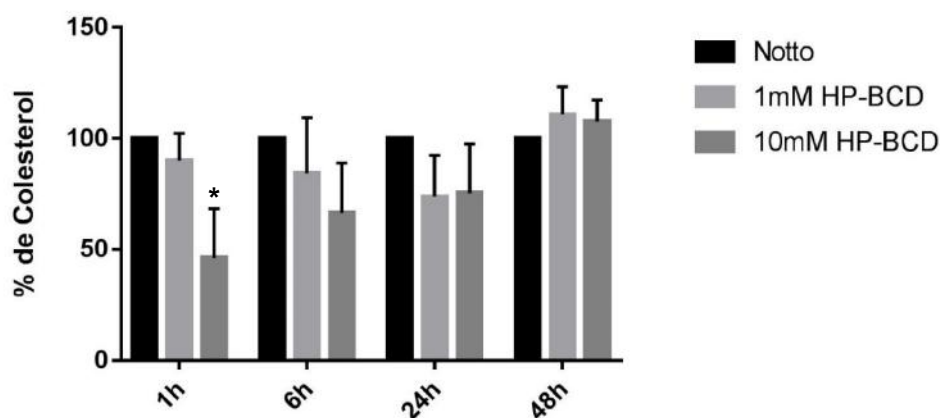
Monócitos primários humanos foram purificados de doadores saudáveis, plaqueados em placa de 96 poços na concentração de  $10^6$  células por poço e tratados com as concentrações de TZD (10uM, 50uM e 100uM) ou GW9662 (3uM, 10uM e 30uM). Após 48h de tratamento, foi acrescentado XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfohenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Após a pesagem do XTT (0,0012g), foi acrescentado 950uL de PBS e a solução aquecida à 56oC. A solução foi resfriada e foi adicionado PMS (N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate) (Sigma-Aldrich). As células foram incubadas com XTT por 3h e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Bio-RAD) no comprimento de onda de 450nm. Como controle positivo, células foram incubadas com Triton X100 (10%) durante o mesmo período de incubação com XTT.



## 5. Resultados

### 5.1 HP- $\beta$ CD reduz os níveis totais de colesterol, os quais se reestabelecem em 48h após o tratamento

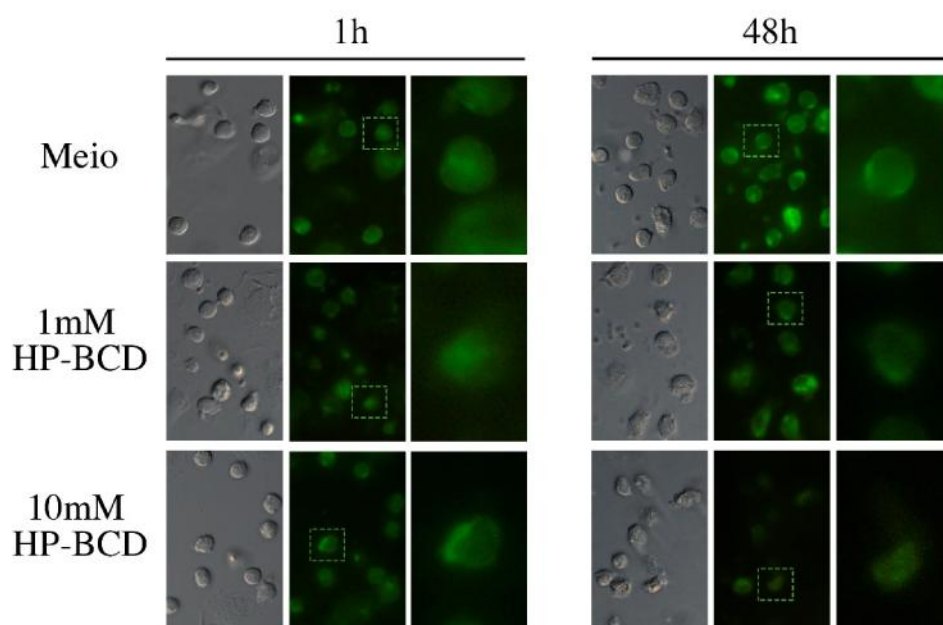
Dados anteriores do grupo demonstraram que o tratamento de monócitos obtidos de pacientes HIV+ com HP- $\beta$ CD levavam a uma diminuição da ativação dessas células induzida por LPS. Para avaliar os mecanismos relacionados a esse evento, inicialmente, investigamos alguns parâmetros associados expressão de colesterol e organização de lipid rafts, cujas alterações são os principais fenômenos biológicos descritos mediados por ciclodextrinas. Nosso primeiro passo foi avaliar a cinética de depleção e recuperação dos níveis de colesterol após tratamento de monócitos humanos primários, obtidos de doadores saudáveis, com HP- $\beta$ CD. As células foram tratadas por 1h com HP- $\beta$ CD a 1mM ou 10mM, lavadas, e o meio substituído por meio completo, livre de HP- $\beta$ CD. Após diferentes períodos de tempo, os níveis totais de colesterol foram dosados. Como esperado, monócitos tratados com 10mM de HP- $\beta$ CD por 1h, apresentaram, em média, 50% de redução dos níveis totais de colesterol (Figura 6). Após 1h, houve recuperação gradativa dos níveis de colesterol até 48h, atingindo os níveis iniciais. Em relação à concentração de 1mM de HP- $\beta$ CD, não houve depleção significativa dos níveis totais de colesterol, se mantendo estáveis ao longo de 48h após tratamento. Esses dados indicam que o tratamento com HP- $\beta$ CD de fato reduziu colesterol celular, mas após 48h, as células apresentaram níveis semelhantes aqueles observados em células não tratadas.



**Figura 6: Tratamento de 10mM de HP- $\beta$ CD diminui níveis totais de colesterol em 1h e há recuperação gradativa até 48h.** Monócitos primários humanos foram purificados de doadores saudáveis, pré-tratados com 1mM e 10mM de HP- $\beta$ CD, mantidos em meio completo novo por 1h, 6h, 24h e 48h e, no pellet de células, foram dosados os níveis totais de colesterol por kit Amplex Red reagente (n = 3) (A).

## 5.2 HP- $\beta$ CD afeta a organização de ácidos graxos celulares

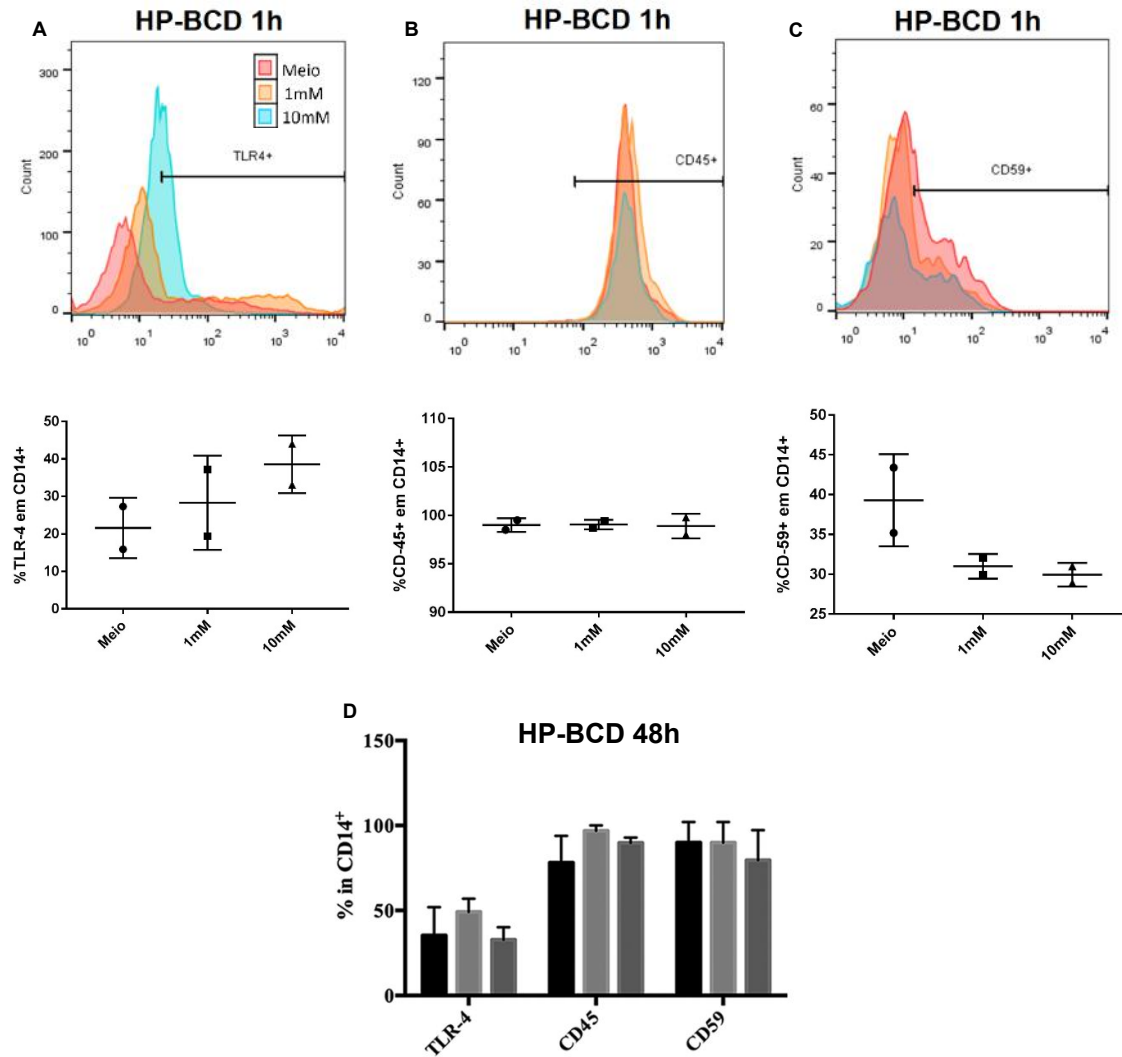
Em transcriptoma realizado pelo grupo, vimos que o tratamento de HP- $\beta$ CD também leva a modulação negativa na expressão de moléculas associadas ao metabolismo de ácidos graxos, como FABP4 e FABP5. Nos perguntamos se o tratamento estaria modificando a organização dos ácidos graxos nas células tratadas. Para isto, monócitos primários humanos foram isolados de doadores saudáveis, tratados com 1mM e 10mM de HP- $\beta$ CD por 1h e mantidos em meio novo completo por 48h. Após 1h e 48h, as células foram submetidas ao protocolo de microscopia de fluorescência e marcadas para ácidos graxos com bodipy. Aparentemente, há uma reorganização que forma focos de concentração de ácidos graxos nas células tratadas com 1mM e 10mM de HP- $\beta$ CD por 1h e que não são mais observados após 48h (Figura 7).



**Figura 8: HP- $\beta$ CD aparenta reorganizar a localização de ácidos graxos.** Monócitos primários humano foram purificados de doadores saudáveis, tratados com 1mM e 10mM de HP- $\beta$ CD por 1h e mantidos em meio novo completo por 48h. As células foram submetidas ao protocolo de microscopia de fluorescência e marcadas com Bodipy. (n=1).

### **5.3 Análise cinética da expressão de receptores associados a lipid rafts após tratamento com HP- $\beta$ CD**

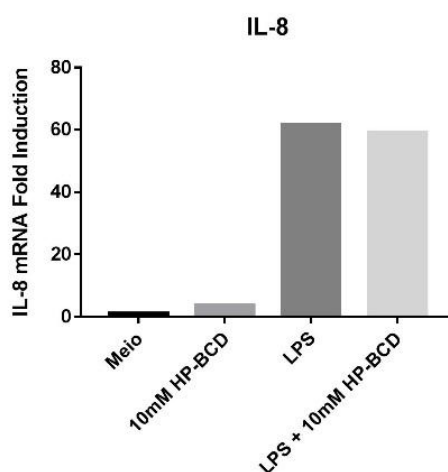
Como o tratamento de HP- $\beta$ CD retira colesterol das membranas celulares, colesterol está majoritariamente distribuído em “lipid rafts” e o receptor de LPS, TLR4, está presente nas “lipid rafts”, investigamos se o tratamento com HP- $\beta$ CD afeta os níveis de expressão de TLR4 na superfície. Como controle, foi analisada também a expressão de receptores associados ou não associados aos raft – CD59 e CD45, respectivamente. Monócitos primários humanos foram purificados de doadores saudáveis, tratados com 1mM e 10mM de HP- $\beta$ CD por 1h e mantidos por 48h em meio novo completo. Foram analisadas a expressão de TLR4 e dos marcadores de raft, CD59, e não raft, CD45, após 1h e 48h de tratamento. Nós observamos que após 1h de tratamento com HP- $\beta$ CD, as células apresentaram uma redução da expressão de CD59, mas não de CD45, indicando que houve desestruturação de “lipid rafts” (Figura 7B e 7C). Após 48h de tratamento, a expressão de ambas as proteínas foi restabelecida, corroborando os dados anteriores de que os rafts são restabelecidos nesse período de tempo. Importante, a expressão de TLR4 não foi alterada pelo tratamento com HP- $\beta$ CD (Figura 7A), indicando que os efeitos de diminuição da ativação induzida por LPS anteriormente observados não se deviam a diminuição da expressão do receptor.



**Figura 7: Tratamento de HP-βCD por 1h diminui a expressão de CD59, que se reestabelece com com 48h.** Monócitos primários humanos purificados de doadores saudáveis foram tratados com 1mM e 10mM de HP-βCD por 1h (A, B e C) e mantidos ou não por 48h em meio novo completo (D). Histograma representativo e gráfico da análise de células TLR4+ (A), CD45+ (B) e CD59+ (C) com 1h de tratamento (n=2). Gráfico da análise das células TLR4+, CD45+ e CD59+ após 48h de tratamento (D) (n=4). Células foram submetidas ao protocolo de citometria de fluxo, marcadas com anti-TLR4, anti-CD45 e anti-59 e analisadas por FlowJo V10.

#### 5.4 HP- $\beta$ CD não afeta a transdução de sinal por MyD88 e TRIF

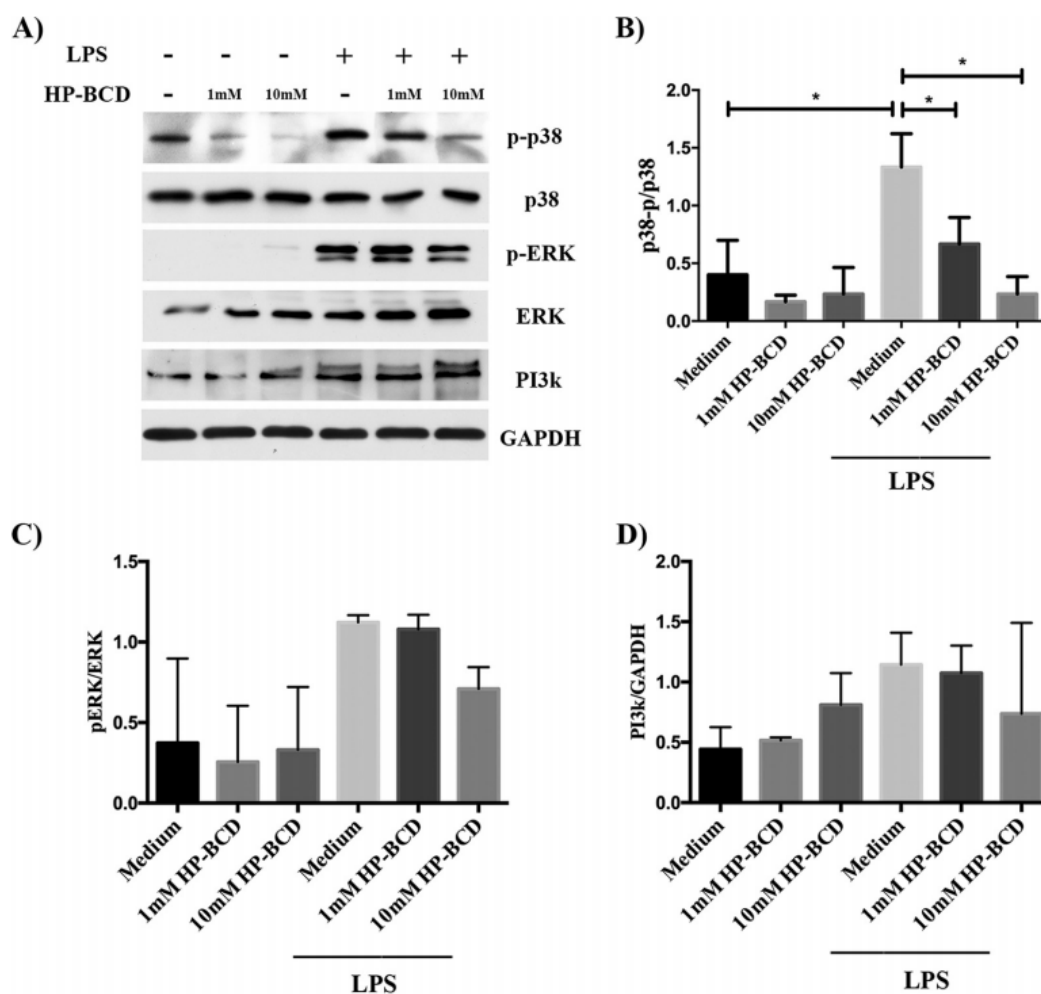
Apesar de TLR4 estar expresso, as moléculas adaptadoras, MyD88 e TRIF, também precisam estar associadas para a geração de sinal por LPS. Para avaliar se a sinalização mediada por MyD88 ou TRIF estava mantida nas células tratadas com HP- $\beta$ CD, analisamos os níveis de expressão de mRNA de IL-8, cuja via é Myd88 dependente e TRIF independente, e os níveis de secreção de IFN $\alpha$ , cuja via é TRIF dependente e Myd88 independente. Em experimentos anteriores realizados pelo grupo a secreção de múltiplas citocinas havia sido investigada em células tratadas com HP- $\beta$ CD e estimuladas por LPS. Nesses experimentos, foi observado que o tratamento com HP- $\beta$ CD não alterava a secreção de IFN induzida por LPS, sugerindo que a via de TRIF não havia sido alterada. Como nesse modelo não observamos secreção de IL-8 induzida por LPS, para investigar essa via realizamos novo experimento com uma cinética mais apropriada para investigação específica da mesma. Monócitos foram tratados com HP- $\beta$ CD, como descrito anteriormente. Após 48h de cultura, as células foram estimuladas com LPS por 4h e os níveis de expressão de mRNA correspondente a IL-8 foram avaliados. Observamos que o tratamento com HP- $\beta$ CD não afetou a expressão de IL-8, indicando a funcionalidade das moléculas MyD88 (Figura 9). Esses dados sugerem que os efeitos induzidos por HP- $\beta$ CD não se devem a um comprometimento do funcionamento das moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF ligadas ao receptor TLR4.



**Figura 9: HP- $\beta$ CD não afeta a expressão de IL-8.** Monócitos primários humanos purificados de doadores saudáveis foram tratados com 10mM de HP- $\beta$ CD por 1h, mantidos por 48h em meio novo completo, e estimulados com LPS por 4h. mRNA total foi extraído, transformado em cDNA e analisado por PCR em tempo real (n=1).

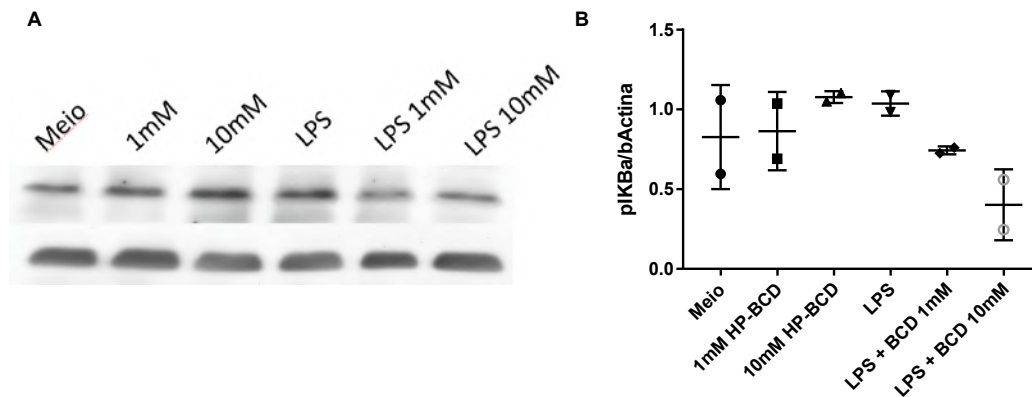
### 5.5 HP- $\beta$ CD reduz a fosforilação de p38 e I $\kappa$ B $\alpha$

Seguindo a sinalização por TLR4, analisamos moléculas de diferentes vias de sinalização estimuladas por LPS no intuito de determinar o mecanismo de inibição por HP- $\beta$ CD visto em nosso modelo. Dados preliminares feitos anteriormente sugeriram uma inibição da fosforilação de p38. Nós confirmamos e investigamos também a atividade de ERK e expressão de PI3K. Vimos que o tratamento com HP- $\beta$ CD reduz os níveis de fosforilação de p38, mas não de ERK e PI3K, em comparação com o controle de ativação com LPS (Figura 11).



**Figura 11: HP- $\beta$ CD diminui a fosforilação p38 induzida por LPS (Matassoli et al., 2018).** Monócitos primários humanos purificados de doadores saudáveis foram tratados com 1mM e 10mM de HP- $\beta$ CD por 1h, mantidos por 48h em meio novo completo e estimulados com LPS por 30 min. Proteínas totais foram extraídas e submetidas a protocolo de Western Blotting utilizando anticorpos anti-p38, anti-pp38, anti-ERK, anti-pERK, anti-PI3K e anti-GAPDH. Análises foram feitas por ImageJ.

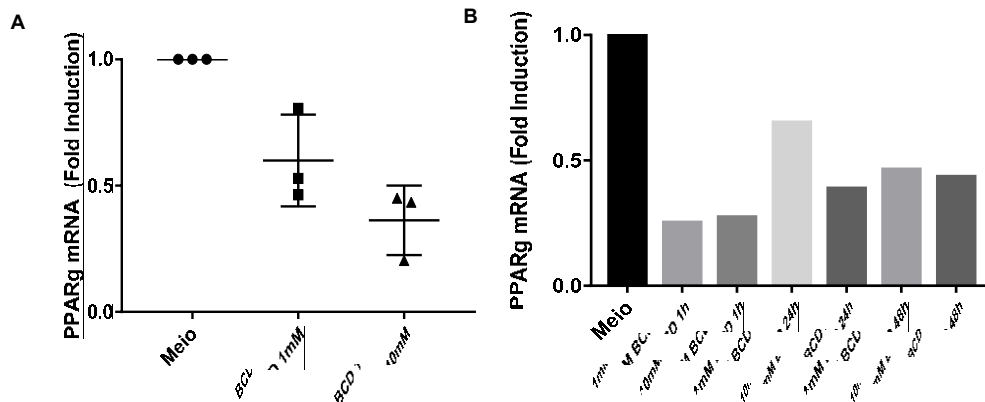
Posteriormente, investigamos a via de ativação de NF- $\kappa$ B de maneira indireta através dos níveis de I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilado. I $\kappa$ B $\alpha$  é uma molécula que age de maneira inibitória sobre NF- $\kappa$ B, se mantendo ligada a ele e impedindo a sua translocação para o núcleo e transcrição de genes alvos. Quando fosforilado, I $\kappa$ B $\alpha$  se desacopla de NF- $\kappa$ B e segue para degradação via proteassoma. Para avaliar os níveis de fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$ , monócitos primários humanos foram purificados de doadores saudáveis, tratados com 1mM e 10mM de HP- $\beta$ CD por 1h, mantidos por 48h em meio novo e estimulados com LPS por 30min. Proteínas totais foram extraídas, submetidas ao protocolo de Western Blotting e marcadas com anti-pI $\kappa$ B $\alpha$  e anti-bActina. O tratamento com as diferentes concentrações de HP- $\beta$ CD reduziu a fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$  comparado com a situação somente estimulada com LPS (Figura 12). Esses dados sugerem que HP- $\beta$ CD iniba a dissociação entre I $\kappa$ B $\alpha$  e NF- $\kappa$ B, inibindo a translocação do fator de transcrição para o núcleo. Experimentos adicionais para investigar essa hipótese, incluindo análise da expressão de NF- $\kappa$ B no núcleo e citoplasma por imunofluorescência e western blot estão em andamento.



**Figura 12: Tratamento com HP- $\beta$ CD reduz os níveis de fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$  quando estimulado com LPS.** Monócitos primários humanos foram purificados de doadores saudáveis, tratados com 1mM e 10mM de HP- $\beta$ CD por 1h, mantidos por 48h em meio novo completo e estimulados com LPS por 30min. Proteínas totais foram submetidas ao protocolo de Western Blotting, marcadas com anticorpos anti-pI $\kappa$ B $\alpha$  e anti-bActina e analisadas por ImageJ (n=2).

### 5.6 HP- $\beta$ CD reduz a expressão de mRNA de PPAR $\gamma$ até 48h após o tratamento

Em análise de transcriptoma realizado pelo grupo, foi demonstrado que uma das principais moléculas alteradas por HP- $\beta$ CD após 48h (momento de estímulo com LPS) era o receptor PPAR $\gamma$ . Uma vez que já foi reportado que a ativação de PPAR $\gamma$  pode interferir na sinalização por TLR4 em outros modelos (REF), resolvemos investigar melhor essa via. Inicialmente, avaliamos a expressão de PPAR $\gamma$  nas células tratadas com HP- $\beta$ CD para confirmar os dados de transcriptoma previamente obtidos. Para tal, monócitos foram tratados com 1mM e 10mM de HP- $\beta$ CD por 1h e mantidos com meio novo completo por 48h e a expressão de mRNA de PPAR $\gamma$  foi avaliada por RT-PCR quantitativo. Em acordo com os dados já obtidos, houve redução dose dependente da expressão de mRNA de PPAR $\gamma$  após 48h (Figura 13A). Quando submetido a uma cinética, em 1h de tratamento já há inibição da expressão de mRNA de PPAR $\gamma$ , se mantendo até 48h (Figura 13B). Sendo assim, de acordo com o nosso modelo experimental, quando o estímulo de LPS é dado, após 48h de tratamento com as diferentes concentrações de HP- $\beta$ CD, os níveis de mRNA de PPAR $\gamma$  estão abaixo de 50%. Apesar de sabermos que o tratamento com HP- $\beta$ CD reduz a expressão de PPAR $\gamma$ , não sabemos qual a implicação disto na função da proteína em si, como receptor nuclear. Para isto, estamos realizando uma colaboração com Francisco Neves, professor da Universidade de Brasília, que consiste em medir os níveis de transcrição dos genes alvos de PPAR $\gamma$  por célula repórter, quando tratados com HP- $\beta$ CD e associado a agonista e antagonista.



**Figura 13: Tratamento de HP- $\beta$ CD reduz a expressão de mRNA de PPAR $\gamma$  até 48h.**

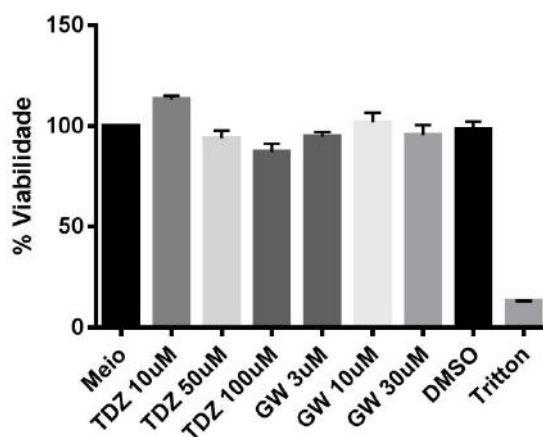
Monócitos primários humanos foram purificados de doadores saudáveis, tratados com 1mM e 10mM de HP- $\beta$ CD, mantidos em meio completo novo por 1h, 24h e 48h e analisados níveis de expressão de mRNA de PPAR $\gamma$  por PCR em tempo real. Mantidos por 48h (n = 3) (A). Cinética de 1h, 24h e 48h (n = 1) (B).



### 5.7 Análise do efeito do tratamento com agonista (TZD) e antagonista (GW9662) de PPAR $\gamma$ sobre a expressão de PPAR $\gamma$ e TNF- $\alpha$

Tendo confirmado, por PCR em tempo real, que o tratamento de HP- $\beta$ CD de fato reduz a expressão de PPAR $\gamma$ , em ambas as concentrações testadas, apostamos em PPAR $\gamma$  como parte do mecanismo responsável pela modulação causada por HP- $\beta$ CD. Para verificar se alteração funcional desse receptor estava relacionada aos efeitos da droga, utilizamos o tratamento com agonista (TZD), e antagonista (GW9662) de PPAR $\gamma$  para avaliar se haveria reversão do efeito observado por HP- $\beta$ CD. Antes dos ensaios funcionais com HP- $\beta$ CD, analisamos o efeito das drogas na sobrevivência celular, expressão de PPAR $\gamma$  e expressão de TNF- $\alpha$ .

Na literatura, as concentrações comumente usadas, em diferentes modelos de cultura de células, de TZD são de 10 $\mu$ M a 100 $\mu$ M e de GW9662 são de 100nM a 50 $\mu$ M. Dessa forma, no ensaio de citotoxicidade, monócitos primários humanos foram submetidos ao tratamento com agonista TZD nas concentrações de 10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M e 100 $\mu$ M, tratamento com antagonista GW9662 nas concentrações de 3 $\mu$ M, 10 $\mu$ M e 30 $\mu$ M, e mantidos por 48h. Nenhuma das concentrações usadas foi tóxica para a sobrevivência celular (Figura 14).

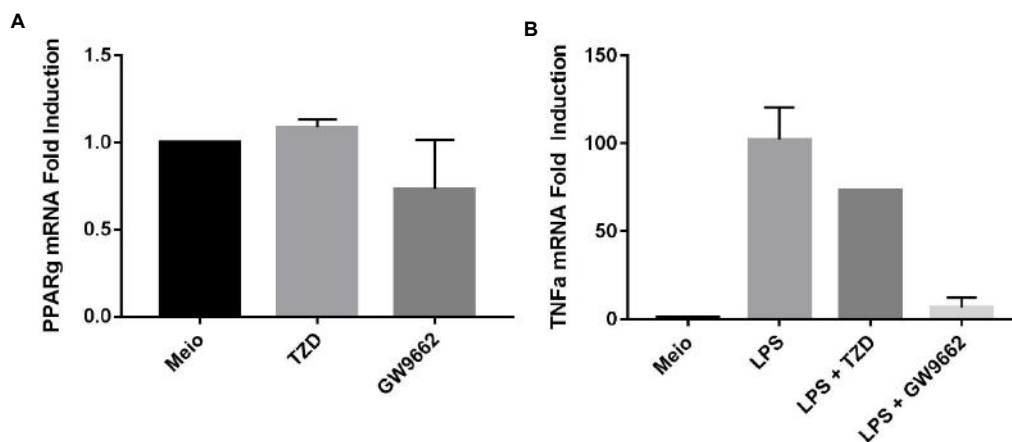


**Figura 14: Ensaio de citotoxicidade de TZD e GW9662.** Monócitos primário humanos foram tratados com as concentrações discriminadas de TZD e GW9662 e mantidos em cultura por 48h. Em seguida, foram submetidas ao protocolo de viabilidade celular por XTT (n=2).

Tendo as doses de TZD e GW9662 determinadas, realizamos, então, um experimento para avaliar o efeito de TZD e GW9662 na expressão de PPAR $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Para isto, monócitos primários humanos foram purificados de doadores saudáveis, e tratados com

100uM de TZD, 100uM de GW, por 48h. Para avaliação da expressão de TNF- $\alpha$ , adicionalmente, as células foram estimuladas com LPS por 30min. Em seguida, os níveis de expressão de mRNA de PPAR $\gamma$  e TNF- $\alpha$  dosados por PCR em tempo real.

A ativação e inibição de PPAR $\gamma$  não influenciaram na sua própria expressão, pois os níveis de mRNA de PPAR $\gamma$  se mantiveram semelhantes ao controle (Figura 15A). Com relação a expressão de TNF- $\alpha$ , a inibição de PPAR $\gamma$  por GW9662 aboliu quase totalmente a sua expressão, enquanto que a ativação por TZD não parece influenciar (Figura 15B).



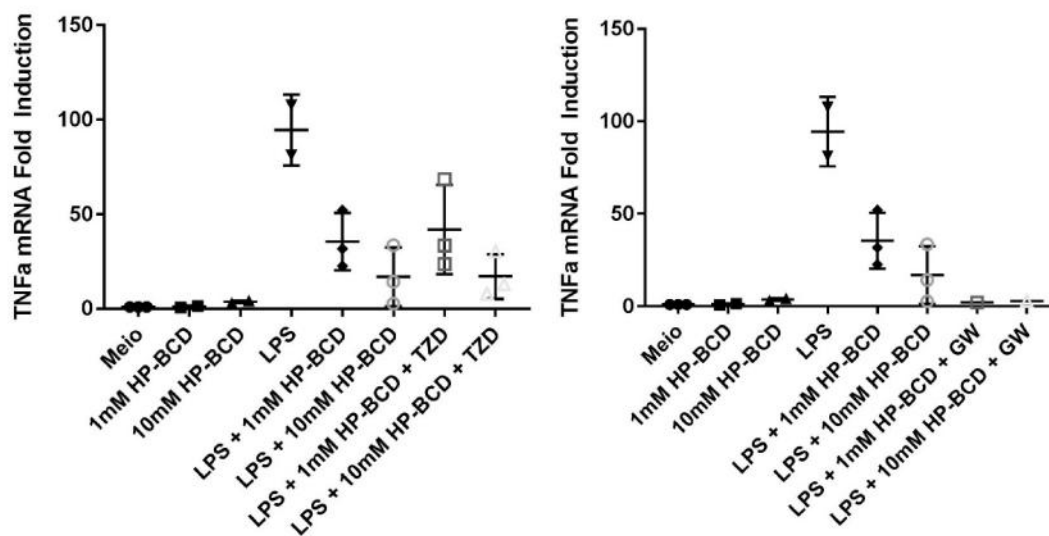
**Figura 15: Efeito de TZD e GW9662 sobre a expressão de PPAR $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .**

Monócitos primários humanos purificados de doadores saudáveis foram tratados com 100uM de TZD ou 100uM de GW9662 e mantidos por 48h em cultura. Para dosar TNF- $\alpha$ , após 48h, monócitos foram estimulados com LPS por 4h. Níveis de mRNA de PPAR $\gamma$  (A) e TNF- $\alpha$  (B) foram medidos por PCR em tempo real.

Sendo assim, as concentrações definidas não influenciam na sobrevivência das células, o tratamento com TZD e GW9662 não alteram a expressão de PPAR $\gamma$  e GW9662 gera efeito inibitório na expressão de TNF- $\alpha$ , semelhante ao observado com HP- $\beta$ CD.

### 5.8 Papel de PPAR $\gamma$ sobre o efeito modulatório de HP- $\beta$ CD

Por fim, buscamos saber se o tratamento com TZD ou GW9662 reverteriam o efeito observado no tratamento com HP- $\beta$ CD, investigando então o papel de PPAR $\gamma$  na modulação por HP- $\beta$ CD. Monócitos primários humanos foram purificados de doadores saudáveis, tratados com 1mM e 10mM de HP- $\beta$ CD, tratados também com TZD ou GW9662 e estimulados com LPS por 4h. Os níveis de mRNA de TNF- $\alpha$  foram analisados por PCR em tempo real. Imaginamos que, se HP- $\beta$ CD diminui a expressão de PPAR $\gamma$ , também há diminuição da sua atividade e, portanto, o tratamento com um agonista estimularia sua ativação, revertendo o efeito de HP- $\beta$ CD. Entretanto, vimos que o tratamento com 100uM de TZD não impediu a inibição de expressão de TNF- $\alpha$ , comparado com o controle somente com HP- $\beta$ CD e estimulado com LPS (Figura 16 A). Além disto, o tratamento com antagonista GW9662 intensificou a inibição da expressão de TNF- $\alpha$  (Figura 16 B). Sendo assim, entendemos que o papel de PPAR $\gamma$  na modulação vista por HP- $\beta$ CD pode não ser a causa da imunomodulação, mas um evento que ocorre em paralelo.



**Figura 16: Papel da ativação ou inibição de PPAR $\gamma$  sobre o efeito inibitório na produção de TNF- $\alpha$  visto pelo tratamento com HP- $\beta$ CD.** Monócitos primários humanos purificados de doadores saudáveis foram tratados com 1mM e 10mM de HP- $\beta$ CD por 1h e tiveram seu meio substituído por meio novo completo. Algumas situações foram tratadas com 100uM de TZD (A) ou GW9662 (B) e a cultura de célula mantida por 48h. Os níveis de mRNA de TNF- $\alpha$  foram medidos por PCR em tempo real (n=3).

## 6. Discussão

No presente trabalho investigamos os mecanismos moleculares envolvidos na inibição da expressão de TNF- $\alpha$  induzida por LPS em células previamente tratadas com HP- $\beta$ CD. A motivação vem de dados prévios realizados pelo grupo com pacientes HIV+, que demonstraram que HP- $\beta$ CD reduziu drasticamente a expressão e secreção, exclusivamente, das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 – principais citocinas secretadas relacionadas à inflamação crônica desenvolvida em paciente HIV+ e sob tratamento antiviral. A investigação dos mecanismos inibitórios causados por HP- $\beta$ CD, quanto a resposta por LPS, elucida tanto a relação entre os metabolismos de colesterol e ácidos graxos com o metabolismo de resposta imune inata, como também contribui para o desenvolvimento de novos fármacos no tratamento de doenças com origem inflamatória.

Inicialmente, já sabíamos que o tratamento com 10mM de HP- $\beta$ CD por 1h reduz, em média, 50% do conteúdo total de colesterol em monócitos e há recuperação aos níveis basais em 48h. Buscando entender o mecanismo por trás da modulação por HP- $\beta$ CD, investigamos a cinética de recuperação de colesterol total celular até atingir os níveis basais. Vimos que, após depleção de colesterol total por 10mM de HP- $\beta$ CD, houve recuperação gradativa, ao longo dos tempos de 6h e 24h até 48h, indicando que a célula respondeu aos níveis baixos de colesterol de maneira a recuperá-los ao longo do tempo. Estudos anteriores realizados com células HepG2 tratadas com HP- $\beta$ CD por 3h e analisadas até 48 horas pós tratamento, foi detectado um aumento da síntese intracelular e influxo de colesterol (Peluso e Dixon, 1997). Em modelo de célula endotelial aórtica ABAE, após 24h de depleção de colesterol por HP- $\beta$ CD, houve diminuição da expressão de transportadores ABCA1 e ABCG1, envolvidos no efluxo de colesterol (Coisne et al., 2016). Portanto, nossos dados colaboram com os encontrados na literatura indicando que após depleção de colesterol por HP- $\beta$ CD, a célula dispõe de mecanismos que resultam na recuperação dos níveis basais de colesterol. Nesse sentido, a retirada de colesterol por HP- $\beta$ CD resulta na modulação do metabolismo de colesterol, no intuito de recupera-lo, aumentando síntese intracelular de colesterol, estimulando influxo e reduzindo efluxo de colesterol.

As vias bioquímicas de controle de metabolismo de colesterol e ácidos graxos estão intimamente ligadas, sejam por compartilharem estímulos lipídicos, como também vias metabólicas e precursores básicos de origem lipídicas, como ácidos graxos. Em

transcriptoma realizado, vimos que há diminuição na expressão de moléculas envolvidas no transporte intracelular de ácidos graxos por FABP4 e FABP5. Nos perguntamos, então, se HP- $\beta$ CD influenciava na composição de ácidos graxos em nosso modelo, uma vez que a modulação no metabolismo de ácidos graxos também poderia estar envolvida na modulação da resposta a LPS. Para isto, utilizamos marcador de ácidos graxos e realizamos uma análise por microscopia de fluorescência, comparando células tratadas com não tratadas. Vimos que o tratamento de HP- $\beta$ CD aumenta a frequência de células com focos de concentração de ácidos graxos, podendo indicar uma reorganização celular e talvez modificação no metabolismo de ácidos graxos. Estudos anteriores demonstraram que o fornecimento de colesterol às células levou a diminuição da síntese de ácidos graxos (Huster et al, 1998; Cardoso et al., 2019). Além disso, houve shift no padrão de produção de ácidos graxos, prevalecendo síntese de ácidos graxos insaturados sobre os saturados. Isso mostra que, de fato, influências no metabolismo de colesterol, seja fornecendo ou retirando-o, reflete também no metabolismo de ácidos graxos. HP- $\beta$ CD pode agir, então, tanto modulando o braço metabólico de colesterol, como também o de ácidos graxos. Futuramente, dosaremos o conteúdo total de ácidos graxos para entender melhor o envolvimento de HP- $\beta$ CD na composição e metabolismo de ácidos graxos. Além disso, pretendemos avaliar os níveis de expressão de FABP4 e SREBP, cuja ativação dependente dos níveis de ácidos graxos livres, pode estar relacionada a indução de um estado anti-inflamatório.

Após investigarmos a ação de HP- $\beta$ CD diretamente na composição de colesterol e ácidos graxos celulares, decidimos olhar para o efeito da depleção de colesterol na composição de lipid rafts. Sabemos que colesterol é o principal componente de lipid rafts e que elas são importantes na formação de plataformas capazes de gerar sinal para a célula. Em conjunto, TLR4 está presente nas lipid rafts na superfície celular. Assim, imaginamos que o tratamento com HP- $\beta$ CD poderia também resultar numa diminuição dos níveis de TLR4 presentes na membrana e assim reduzir o sinal do estímulo com LPS. Nossos dados mostraram que 1h de tratamento de HP- $\beta$ CD desestruturou lipid rafts, reduzindo a presença de marcador de raft CD59 na membrana da célula em comparação com a não tratada. Porém, após 48h de tratamento, os seus níveis já estavam normalizados. Além disto, após 48h, o tratamento não influenciou na composição de TLR4 das células tratadas, indicando que no momento do estímulo com LPS em nosso modelo, as células já haviam recomposto a composição de lipid rafts e haviam níveis normais do receptor de

LPS. Em outros modelos foi demonstrado que a depleção de colesterol leva a diminuição da resposta por LPS por comprometimento de expressão de TLR na membrana (Koseki et al., 2006). No entanto, nesses estudos as análises foram realizadas logo após o tratamento com HP- $\beta$ CD, enquanto que no nosso modelo o estímulo com LPS foi feito apenas 48h após o tratamento, quando os níveis de colesterol e expressão de receptores associados a raft já estavam restabelecidos.

Estudos mostraram que o tratamento por ciclodextrinas também é capaz de resultar na ineficiência da resposta por TLR via desorganização das moléculas adaptadoras intracelulares (Koseki et al., 2006). Além disto, um mecanismo de ativação de LXR que resulta no aumento da expressão de ABCA1 levou a mudança na organização da composição de lipídios de membrana e desorganização de moléculas adaptadoras, resultando em inibição da sinalização por diferentes TLRs (Ito et al., 2015). Em outro modelo de receptor situado em lipid rafts na membrana, receptor de IgE em mastócitos, a depleção de colesterol por BCD resultou na perda de ligação do receptor de IgE com a Lyn quinase, na porção intracelular, impedindo geração de sinal via sequências ITAM, quando estimulados (Sheets et al., 1999; Holowka et al., 2005).

Portanto, embora tenhamos demonstrado uma expressão normal de TLR4 após o tratamento com HP- $\beta$ CD, seria possível que o mesmo resultasse devido a deficiência na sinalização subsequente.

A resposta de TLR4, quando ativado por LPS, depende do recrutamento de moléculas intracelulares adaptadoras MyD88 e TRIF. A primeira está diretamente relacionada com a expressão de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , e a segunda, relacionada a expressão de interferon do tipo I. Os efeitos modulatórios observados por HP- $\beta$ CD poderiam existir devido a uma modulação na expressão ou localização destas moléculas. Nossos dados sugeriram, de maneira indireta que após 48h de tratamento com HP- $\beta$ CD, não houve comprometimento do funcionamento de MyD88 e TRIF, uma vez o tratamento não influenciou na expressão de IL-8, dependente de MyD88, e IFN- $\alpha$ , dependente de TRIF. Sendo assim, efeito modulatório por HP- $\beta$ CD observado quanto a expressão de TNF- $\alpha$  em resposta a LPS, não parece ser devido a uma deficiência no recrutamento das moléculas adaptadoras, nos levando a investigar, então, moléculas envolvidas na cascata de sinalização intracelular em resposta a LPS.

Como visto anteriormente, a cascata de sinalização intracelular em resposta a LPS envolve uma série de moléculas que levam, por fim, a expressão de genes inflamatórios alvo. Após recrutamento de MyD88, há fosforilação de MAPKs, que levam a translocação de AP-1 para o núcleo, e fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$ , que se desliga de NF- $\kappa$ B, liberando-o para translocação ao núcleo. Vimos que o tratamento de HP- $\beta$ CD resulta numa menor atividade de p38, e menor fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$ . A redução na fosforilação destas moléculas pode resultar numa menor translocação de AP-1 e NF- $\kappa$ B para o núcleo e, portanto redução na expressão de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ . Em macrófagos de camundongo, o estímulo com LPS associado a utilização de inibidor de p38 resultou no bloqueio da expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6 (Meng et al., 2015). Em macrófagos primários humanos, a expressão de TNF- $\alpha$ . em resposta a LPS também se mostrou dependente da ativação de p38 (Campbell et al., 2004). Sendo assim, a diminuição da fosforilação de p38 e I $\kappa$ B $\alpha$  podem de fato ser responsáveis pela redução na expressão de TNF- $\alpha$  e, inclusive, há relatos de envolvimento da ativação de receptores nucleares na menor atividade destas moléculas e consequente efeito anti-inflamatório. Ainda precisamos avaliar o efeito de HP- $\beta$ CD na translocação direta de NF- $\kappa$ B para o núcleo, através microscopia de fluorescência e por fracionamento celular, para complementar o dado de reduzida fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$  e provarmos que há de fato uma menor ativação de NF- $\kappa$ B.

Em paralelo, as análises do transcriptoma das células tratadas com HP- $\beta$ CD revelaram, de maneira significativa, uma série de vias reguladas positivamente e negativamente. Entre elas, a regulação negativa mais expressiva era a via de PPAR $\gamma$ . Dados da literatura demonstraram que a modulação da ativação de PPAR $\gamma$  pode influenciar diferentes sinais inflamatórios. Foi reportado que a ativação de PPAR $\gamma$  e RXR por agonistas levou a redução na fosforilação de p38 e translocação de NF- $\kappa$ B, efeitos semelhantes ao observado no nosso modelo (Desreumaux et al., 2001). De maneira inicial, confirmamos, através de PCR em tempo real, que HP- $\beta$ CD reduz a expressão de PPAR $\gamma$  nas concentrações de 1mM e 10mM após 1h de tratamento e isto se mantém até 48h. Apesar de a redução na expressão de PPAR $\gamma$  não estar diretamente relacionado com a sua função, hipotetizamos que o estímulo de PPAR $\gamma$  com um agonista fosse capaz de recuperar a regulação negativa desta via e reverter o efeito de HP- $\beta$ CD na expressão de TNF- $\alpha$ . Feito isto, vimos que o tratamento com agonista não recuperou a expressão de TNF- $\alpha$  e que o tratamento com o antagonista reforçou ainda mais a inibição de TNF- $\alpha$ . Os dados na literatura relativos a conversa entre PPAR $\gamma$  e resposta imune são contraditórios. A maioria

revela que a ativação de PPAR $\gamma$  por agonistas naturais ou sintéticos leva a um efeito inibitório na expressão de citocinas e quimiocinas em diferentes células (Ricote et al., 1998; Jiang et al., 1998; Grip et al., 2002). Porém, alguns artigos criticam estes achados e os atribuem a agonistas inespecíficos ou utilizados em altas doses. Moore et al. demonstrou os efeitos inibitórios do agonista natural de PPAR $\gamma$ , 15d-PGJ2, mesmo em células PPAR $\gamma$ -/- (Moore et al., 2001). Em outro trabalho, a ativação de PPAR $\gamma$  em conjunto com RXR resulta num aumento do uptake de oxLDL e expressão de CD36, resultando em desenvolvimento de aterosclerose (Tontonoz et al., 1998). Sendo assim, nossos dados mostram que a ativação de PPAR $\gamma$  não recupera a expressão de TNF- $\alpha$  e que, curiosamente, sua inibição leva a inibição de TNF- $\alpha$ , podendo ser o mecanismo de ação inibitória de HP- $\beta$ CD. Ainda precisamos relacionar estes achados com a diminuição de fosforilação de p38 e I $\kappa$ B $\alpha$ , para buscarmos descrever o mecanismo de atuação de HP- $\beta$ CD.

Ainda há muitas perguntas à serem respondidas para conseguirmos explicar o mecanismo de inibição de HP- $\beta$ CD sobre a resposta a LPS. Nos parece promissor investir em avaliar o efeito de HP- $\beta$ CD no metabolismo de colesterol e ácidos graxos e como isto pode resultar numa imunomodulação, clareando processos celulares que inter-relacionam as vias de sinalização que controlam o funcionamento celular como um todo. A grande quantidade de dados obtidos no transcriptoma realizado servirão para explorarmos, ainda, outras vias relacionadas com a regulação por HP- $\beta$ CD e resposta imune inata.



## 7. Conclusões

- Tratamento com 10mM de HP- $\beta$ CD em monócitos primários humanos reduz por volta de 50% os níveis totais de colesterol, sendo estes recuperados com 48h.
- O tratamento de 1mM não afeta os níveis totais de colesterol.
- O tratamento leva a desestruturação de lipid rafts, sem afetar TLR4, que alcançam níveis basais após 48h. HP- $\beta$ CD também não influencia no funcionamento de MyD88 e TRIF.
- O tratamento com HP- $\beta$ CD leva a inibição da atividade de p38 e I $\kappa$ B $\alpha$ .
- HP- $\beta$ CD inibe a expressão de PPAR $\gamma$  com 1h de tratamento até 48h.
- TZD não é capaz de reverter efeito de HP- $\beta$ CD e GW9662 induz ainda mais a inibição de TNF- $\alpha$  vista por HP- $\beta$ CD.

## ANEXO I

## 8. Referências Bibliográficas:

- Abi-Mosleh, L., Infante, R., Radhakrishnan, A., Goldstein, J. e Brown, M. (2009). Cyclodextrin overcomes deficient lysosome-to-endoplasmic reticulum transport of cholesterol in Niemann-Pick type C cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 17;106(46):19316-21.
- Adams, C., Reitz, J., De Brabander, J., Feramisco, J., Li, L., Brown, M. e Goldstein, J. (2004). Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. *J Biol Chem*. 279(50):52772-80.
- Adhikary, T., Wortmann, A., Schumann, T., Finkernagel, F., Lieber, S., Roth, K., Toth, P.M., Diederich, W., Nist, A., Stiewe, T., Kleinesudeik, L., Reinartz, S., Müller-Brüsselbach, S. e Müller, R. (2015). The transcriptional PPARbeta/delta network in human macrophages defines a unique agonist-induced activation state. *Nucleic Acids Res*. 43, 5033–5051.
- Ambrose, Z., Compton, L., Piatak, M., Lu, D., Alvord, W., Lubomirski, M., Hildreth, J., Lifson, J., Miller, C. e KewalRamani, V. Incomplete protection against simian immunodeficiency virus vaginal transmission in rhesus macaques by a topical antiviral agent revealed by repeat challenges. *J Virol*. 82(13):6591-9.
- Amiri, M., Yousefnia, S., Seyed Forootan, F., Peymani, M., Ghaedi, K. e Nasr Esfahani, M. (2018). Diverse roles of fatty acid binding proteins (FABPs) in development and pathogenesis of cancers. *Gene*. 676, 171–183.
- Armstrong, E., Goswami, D., Griffin, P., Noy, N. e Ortlund, E. (2014). Structural basis for ligand regulation of the fatty acid-binding protein 5, peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (FABP5-PPARbeta/delta) signaling pathway. *J. Biol. Chem*. 289, 14941–14954.
- Barak, Y., Nelson, M. e Ong, E., Jones, Y., Ruiz-Lozano, P., Chien, K., Koder, A. e Evans, R. (1999). PPAR is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*. 4:585-95.
- Beck, F., Plummer, S., Senior, P., Byrne, S., Green, S. e Brammar, W. (1992). The ontogeny of peroxisome-proliferator-activated receptor gene expression in the mouse and rat. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*.
- Berry-Kravis, E., Chin, J., Hoffmann, A., Winston, A., Stoner, R., LaGorio, L., Friedmann, K., Hernandez, M., Ory, D., Porter, F. e O' Keefe, J. (2018). Long-term Treatment of Niemann-Pick Type C1 Disease With Intrathecal 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin. *Pediatr Neurol*. 80:24-34.
- Blanc, M., Hsieh, W., Robertson, K., Kropp, K., Forster, T., Shui, G., Lacaze, P., Watterson, S., Griffiths, S., Spann, N., Meljon, A., Talbot, S., Krishnan, K., Covey, D., Wenk, M., Craigon, M., Ruzsics, Z., Haas, J., Angulo, A., Griffiths, W., Glass, C., Wang, Y. e Ghazal, P. The transcription factor STAT-1 couples macrophage synthesis of 25-hydroxycholesterol to the interferon antiviral response. *Immunity*. 38(1):106-18.
- Blanquart, C., Mansouri, R., Paumelle, R., Fruchart, J., Staels, B. e Glineur, C. (2004). The protein kinase C signaling pathway regulates a molecular switch between transactivation and transrepression activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Mol Endocrinol* 18:1906–1918.
- Braissant, O., Foufelle, F, Scotto, C., Dauca, M. e Wahli, W. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors: tissue distribution of PPAR $\alpha$ , P and  $\gamma$  in the adult rat. *Endocrinology*. 137(1):354-66.
- Bretscher, M. e Munro, S. (1993). Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science*. Sep 3;261(5126):1280-1.
- Brown, D. e London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 14:111-36.
- BROWN, D.A.; E LONDON. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*. 275(23):17221-4. 2000.
- Brown, M. e Goldstein, J. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 89(3):331-40.
- Camargo, F., Erickson, R., Garver, W., Hossain, G., Carbone, P., Heidenreich, R. e Blanchard, J. (2001). Cyclodextrins in the treatment of a mouse model of Niemann-Pick C disease. *Life Sci*. 30;70(2):131-42.

- Cardoso R., Creemers E., Absalah S., Gooris G., Hoekstra M., Eck M., Bouwstra J. (2019). Hypercholesterolemia in young adult APOE<sup>-/-</sup> mice alters epidermal lipid composition and impairs barrier function. *Mol and Cell Bio of Lipids* 976-984.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D., Hanson, M., Rasmussen, S., Thian, F., Kobilka, T., Choi, H., Kuhn, P., Weis, W., Kobilka, B. e Stevens, R. (2007). High Resolution Crystal Structure of an Engineered Human  $\beta$ 2-Adrenergic G protein-Coupled Receptor. *Science*. 318(5854): 1258–1265.
- Chiang, J. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res.* 50(10):1955-66.
- Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A., Neve, B., Torra, I., Teissier, E., Minnich, A., Jaye, M., Duverger, N., Brewer, H., Fruchart, J., Clavey, V. e Staels, B. (2001). PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med.* 7(1):53-8.
- Chinetti-Gbaguidi, G. e Staels, B. (2017). PPARbeta in macrophages and atherosclerosis. *Biochimie* 136, 59–64.
- Chung, S., Kang, B., Kim, S., Pak, Y., Cho, D., Trinchieri, G., Kim, T. (2000). Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 275:32681–32687.
- Coe, N. e Bernlohr, D. (1998). Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1391:287–306.
- Cunard, R., Eto, Y., Muljadi, J., Glass, C., Kelly, C. e Ricote, M. (2004). Repression of IFN-gamma expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Immunol* 172:7530–7536.
- Davidson, C., Ali, N., Micsenyi, M., Stephney, G., Renault, S., Dobreins, K., Ory, D., Vanier, M. e Walkley, S. (2009). Chronic Cyclodextrin Treatment of Murine Niemann-Pick C Disease Ameliorates Neuronal Cholesterol and Glycosphingolipid Storage and Disease Progression. *PLoS One.* 11;4(9):e6951.
- Delerive, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., Peters, J., Gonzalez, F., Fruchart, J., Tedgui, A., Haegeman, G. e Staels, B. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J. Biol. Chem* 274:32048–32054.
- Delerive, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., Peters, J., Gonzalez, F., Fruchart, J., Tedgui, A., Haegeman, G. e Staels, B. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J. Biol. Chem* 274:32048–32054.
- Delerive, P., Gervois, P., Fruchart, J. e Staels, B. (2000). Induction of IkappaBalpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators. *J Biol Chem* 2000;275:36703–36707.
- Demeure, O., Lecerf, F., Duby, C., Desert, C., Ducheix, S., Guillou, H. e Lagarrigue, S. (2011). Regulation of LPCAT3 by LXR. *Gene.* 1;470(1-2):7-11.
- Deng, X., Zhang, P., Liang, T., Deng, S., Chen, X. e Zhu, L. (2015). Ovarian cancer stem cells induce the M2 polarization of macrophages through the PPAR and NF-B pathways. *Int. J. Mol. Med.* 36, 449–454.
- Desreumaux, P., Dubuquoy, L., Nutten, S., Peuchmaur, M., Englaro, W., Schoonjans, K., Derijard, B., Desvergne, B., Wahli, W., Chambon, P., Leibowitz, M., Colombel J. e Auwerx, J. (2001). Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 193:827–838.
- Devchand, P., Keller, H., Peters, J., Vazquez, M., Gonzalez, F. e Wahli, W. (1996). The PPAR $\alpha$ -leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384:39–43.
- Devchand, P., Keller, H., Peters, J., Vazquez, M., Gonzalez, F. e Wahli, W. (1996). The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature.* 384(6604):39-43.
- Direnzo, J., Soderstrom, M., Kurokawa, R., Ogliaastro, M., Ricote, M., Ingrey, Hörlein, A., Rosenfeld, M. e Glass, C. (1997). Peroxisome proliferators-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid x receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Mol Cell Biol* 17:2166-76.

- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G. e Wahli, W. (1992). Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*. 68(5):879-87.
- Engel, T., Lueken, A., Bode, G., Hobohm, U., Lorkowski, S., Schlueter, B., Rust, S., Cullen, P., Pech, M., Assmann, G. e Seedorf, U. (2004). ADP-ribosylation factor (ARF)-like 7 (ARL7) is induced by cholesterol loading and participates in apolipoprotein AI-dependent cholesterol export. *FEBS Lett*. 566(1-3):241-6.
- Evans, R. e Mangelsdorf, D. (2014). Nuclear receptors, RXR, and the big bang. *Cell* 157, 255–266.
- Fajas, L., Auboeuf, D., Raspe, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A., Saladin, R., Najib, J., Laville, M., Fruchart, J., Deeb, S., Vidal-Puig, A., Flier, J., Briggs, M. e Staels, B. (1997). The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR $\gamma$  gene. *J BiolChem*. 272:18779-89.
- Fajas, L., Fruchart, J. e Auwerx, J. (1998). PPAR $\gamma$ 3 mRNA: a distinct PPAR $\gamma$  mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *Febs Letts*. 438:55-60.
- Feige, J., Gelman, L., Tudor, C., Engelborghs, Y., Wahli, W. e Desvergne, B. (2005). Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J. Biol. Chem*. 280, 17880–17890.
- Feng, X., Weng, D., Zhou, F., Owen, Y., Qin, H., Zhao, J., Wen, Yu., Huang, Y., Chen, J., Fu, H., Yang, N., Chen, D., Li, J., Tan, R. e Shen, P. (2016). Activation of PPAR by a natural flavonoid modulator, apigenin ameliorates obesity-related inflammation via regulation of macrophage polarization. *EBioMedicine* 9, 61–76.
- Fiorucci S e Distrutti E. (2015). Bile acid-activated receptors, intestinal microbiota, and the treatment of metabolic disorders. *Trends Mol Med* 21(11):702–14.
- Fruchart, J., Duriez, P. e Staels, B. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 10(3):245-57.
- Fu, X., Menke, J., Chen, Y., Zhou, G., MacNaul, K., Wright, S., Sparrow, C. e Lund, E. (2001). 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J Biol Chem*. 276(42):38378-87.
- Furuhashi, M., Tuncman, G., Gorgun, C., Makowski, L., Atsumi, G., Vaillancourt, E., Kono, K., Babaev, V., Fazio, S., Linton, M., Sulsky, R., Robl, J., Parker, R. e Hotamisligil, G. (2007). Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature*. 21;447(7147):959-65.
- Gadaleta, R., van Erpecum, K., Oldenburg, B., Willemsen, E., Renooij, W., Murzilli, S., Klomp, L., Siersema, P., Schipper, M., Danese, S., Penna, G., Laverny, G., Adorini, L., Moschetta, A. e van Mil, S. (2011). Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Gut*. 60(4):463-72.
- Ghisletti, S., Huang, W., Ogawa, S., Pascual, G., Lin, M., Willson, T., Rosenfeld, M. e Glass, C. (2007). Parallel SUMOylation-Dependent Pathways Mediate Gene- and Signal-Specific Transrepression by LXRs and PPAR $\gamma$ . *Mol Cell* 25:57–70.
- Gil, G., Faust, J.R., Chin, D.J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1985). Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell* 41, 249–258.
- Glatz, J., Luiken, J. e Bonen, A. (2010). Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: Implications for metabolic disease. *Physiol. Rev*. 90, 367–417.
- Goetze, S., Kintscher, U., Kim, S., Meehan, W., Kaneshiro, K., Collins, A., Fleck, E., Hsueh, W. e Law, R. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit nuclear but not cytosolic extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase-regulated steps in vascular smooth muscle cell migration. *J Cardiovasc Pharmacol* 38:909–921.
- Goetze, S., Xi, X., Kawano, H., Gotlibowski, T., Fleck, E., Hsueh, W. e Law, R. (1999). PPAR gamma-ligands inhibit migration mediated by multiple chemoattractants in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 33:798–806.
- Goldstein, J., DeBose-Boyd, R. e Brown, M. (2016). Protein sensors for membrane sterols. *Cell*. 124(1): 35–46.

- Gottlicher, M., Widmark, E., Li, Q. e Gustafsson, J. (1992). Fatty acids activate chimera of the clofibrate acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 4653-4657. 10.
- Graham D., Chertova E., Hilburn J., Arthur L. e Hildreth J. (2003). Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus with beta-cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions: evidence for virion-associated lipid rafts. *J. Virol.* 77(15):8237-48.
- Guo J. e Friedman S. (2010). Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2010; 3: 21.
- Guo J. e Friedman S. (2010). Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 3:21.
- Gupta, R., Tan, J., Krause, W., Geraci, M., Willson, T., Dey, S. e DuBois, R. Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 13275–13280.
- Heiniger, H. e Marshall, J. (1982). Cholesterol synthesis in polyclonally activated cytotoxic lymphocytes and its requirement for differentiation and proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79(12): 3823–3827.
- Hertz, R., Bishara-Shieban, J. e Bar-Tana, J. (1995). Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs, suppression of apolipoprotein C-111. *J. Biol. Chem.* 270: 13470-13475.
- Hirayama, F., Kurihara, M. e Uekama, K. (1984). Improving the aqueous stability of prostaglandin E2 and prostaglandin A2 by inclusion complexation with methylated-beta-cyclodextrins. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 32(10):4237-40.
- Holowka D., Gosse J., Hammond A., Han X., Sengupta P., Smith N., Wagenknecht-Wiesner A., Wu M., Young R., Baird B. (2005). Lipid segregation and IgE receptor signaling: a decade of progress. *Biochim Biophys Acta.* 1746(3):252-9.
- Hong, C., Walczak, R., Dhamko, H., Bradley, M., Marathe, C., Boyadjian, R., Salazar, J. e Tontonoz, P. (2011). Constitutive activation of LXR in macrophages regulates metabolic and inflammatory gene expression: identification of ARL7 as a direct target. *J Lipid Res.* 52(3):531-9.
- Horton, J., Goldstein, J. e Brown, M. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 109(9): 1125–1131.
- Hou, Y., Moreau, F. e Chadee, K. (2012). PPARgamma is an E3 ligase that induces the degradation of NFkappaB/p65. *Nat. Commun.* 3, 1300.
- Hua, X., Sakai, J., Brown, M. e Goldstein, J. (1996). Regulated cleavage of sterol regulatory element binding proteins requires sequences on both sides of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem.* 271(17):10379-84.
- Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M., Brown, M., Goldstein, J. e Wang, X. (1993). SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90(24): 11603–11607.
- Huang, W., Ghisletti, S., Saijo, K., Gandhi, M., Aouadi, M., Tesz, G., Zhang, D., Yao, J., Czech, M., Goode, B., Rosenfeld, M. e Glass, C. (2011). Coronin 2A mediates actin-dependent de-repression of inflammatory response genes. *Nature.* 470 (7334):414-8.
- Huang, Y., Huang, W., Li, C. e Chuang, L. (2011). Eicosadienoic acid differentially modulates production of pro-inflammatory modulators in murine macrophages. *Mol. Cell. Biochem.* 358 (1–2), 85–94.
- Hummasti, S., Laffitte, B., Watson, M., Galardi, C., Chao, L., Ramamurthy, L., Moore, J. e Tontonoz, P. (2004). Liver X receptors are regulators of adipocyte gene expression but not differentiation: identification of apoD as a direct target. *J Lipid Res.* 45(4):616-25.
- Huster, D., Arnold K. e Gawrisch K. (1998). Influence of Docosahexaenoic Acid and Cholesterol on Lateral Lipid Organization in Phospholipid Mixtures. *Biochemistry.* 37(49):17299-308.
- Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(2):125-38.

- Imo, S., Yousef, L., Blaschitz, C., Liu, J., Edwards, R., Young, S., Raffatellu, M. e Osborne, T. (2011). Linking Lipid Metabolism to the Innate Immune Response in Macrophages through Sterol Regulatory Element Binding Protein -1a. *Cell Metab.* 13(5): 540–549.
- Ito A., Hong C., Rong X., Zhu X., Tarling E., Hedde P., Gratton E., Parks J., Tontonoz P. (2015). LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. *Elife.* 4:e08009.
- Ito, A., Hong, C., Rong, X., Zhu, X., Tarling, E., Hedde, P., Gratton, E., Parks, J. e Tontonoz, P. (2015). LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. *Elife.* 4:e08009.
- Jackson, P. (2001). A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev* 2001;15:3053–3058.
- Janeway C. e Medzhitov R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 20:197-216.
- Janowski, B., Willy, P., Devi, T., Falck, J. e Mangelsdorf, D. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383, 728–731.
- Joseph, S., Castrillo, A., Laffitte, B., Mangelsdorf, D. e Tontonoz, P. (2003). Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med.* 9(2):213-9.
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S., Heyman, R., Rose, D., Glass, C., Rosenfeld, M. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85:403–414.
- Kennedy, M., Barrera, G., Nakamura, K., Baldán, A., Tarr, P., Fishbein, M., Frank, J., Francone, O. e Edwards, P. (2005). ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 1(2):121-31.
- Khanna, K., Whaley, K., Zeitlin, L., Moench, T., Mehrazar, K., Cone, K., Liao, Z., Hildreth, Z., Hoen, T., Shultz, L. e Markham, R. (2002). Vaginal transmission of cell-associated HIV-1 in the mouse is blocked by a topical, membrane-modifying agent. *J. Clin. Investig.* 109:205–211.
- Kliwer, S., Forman, B., Blumberg, B., Ong, E., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D., Umehono, K. e Evans, R. (1994). Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(15):7355-9.
- Kliwer, S., Sundseth, S., Jones, S., Brown, P., Wisely, G., Koble, C., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T., Lenhard, J. e Lehmann, J. (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4318–4323.
- Koseki M., Hirano K., Masuda D., Ikegami C., Tanaka M., Ota A., Sandoval J., Nakagawa-Toyama Y., Sato S., Kobayashi T., Shimada Y., Ohno-Iwashita Y., Matsuura F., Shimomura I., Yamashita S. (2007). Increased lipid rafts and accelerated lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha secretion in Abca1-deficient macrophages. *J Lipid Res.* 48(2):299-306.
- Laffitte, B., Repa, J., Joseph, S., Wilpitz, D., Kast, H., Mangelsdorf, D. e Tontonoz, P. (2001). LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(2):507-12.
- Lambert, G., Amar, M., Guo, G., Brewer, Jr., Gonzalez, F. e Sinal, C. (2003). The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis. *J Biol Chem.* 278(4):2563-2570.
- Lange, Y. (1991). Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts. *Journal of Lipid Research* 32(2):329-39.
- Langlet, C., Bernard, A., Drevot, P., He H. (2000). Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr Opin Immunol.* 12(3):250-5.
- Lee, C. e Balfour, J. (1994). Piroxicam- $\beta$ -cyclodextrin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in rheumatic diseases and pain states. *Drugs* 48, 907–929.
- Lee, C., Chawla, A., Urbiztondo, N., Liao, D., Boisvert, W. e Evans, R. (2003). Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science* 302:453–457.

- Lee, C., Chawla, A., Urbiztondo, N., Liao, D., Boisvert, W., Evans, R. e Curtiss, L. (2003). Transcriptional repression of atherogenic inflammation: Modulation by PPAR delta. *Science* 302, 453–457.
- Lee, S., Pineau, T., Drago, J., Lee, E., Owens, J., Kroetz, D., Fernandez-Salguero, P., Westphal, H. e Gonzalez, F. (1995). Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol.* 15(6):3012-22.
- Lehmann, J., Kliewer, S., Moore, L., Smith-Oliver, T., Oliver, B., Su, J., Sundseth, S., Winegar, D., Blanchard, D., Spencer, T. e Willson, T. (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem.* 272(6):3137-40.
- Li, M., Pascual, G. e Glass C. (2000). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ -Dependent Repression of the Inducible Nitric Oxide Synthase Gene. *Mol. Cell. Biol* 20:4699–4707.
- Liu, B., Mink, S., Wong, K., Stein, N., Getman, C., Dempsey, P., Wu, H. e Shuai, K. (2004). PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity. *Nat Immunol* 2004;5:891–898.
- Liu, S., Aliyari, R., Chikere, K., Li, G., Marsden, M., Smith, J., Pernet, O., Guo, H., Nusbaum, R., Zack, J., Freiberg, A., Su, L., Lee, B. e Cheng, G. (2013). Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase broadly inhibits viral entry by production of 25-hydroxycholesterol. *Immunity.* 38(1):92-105.
- Loftsson, T., Brewster, M e Masson, M. (2004) Role of cyclodextrins in improving oral drug delivery. *Am. J. Drug. Deliv.* 2, 261-275.
- Lopez, A., Terpack, S., Posey, K., Liu, B., Ramirez, C. e Turley, S. (2014). Systemic administration of 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin to symptomatic Npc1-deficient mice slows cholesterol sequestration in the major organs and improves liver function. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 41(10):780-7.
- Lu Y., Yeh W. e Ohashi P. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 42(2):145-151.
- Luo, W., Xu, Q., Wang, Q., Wu, H. e Hua, J. (2017). Effect of modulation of PPAR- activity on Kupffer cells M1/M2 polarization in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Sci. Rep.* 7, 44612.
- Maarup, T., Chen, A., Porter, F., Farhat, N., Ory, D., Sidhu, R., Jiang, X. e Dickson, P. (2015). Intrathecal 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin in a single patient with Niemann-Pick C1. *Mol Genet Metab.* 116(1-2):75-9.
- Mak, P., Kast-Woelbern, H., Anisfeld, A. e Edwards, P. (2002). Identification of PLTP as an LXR target gene and apoE as an FXR target gene reveals overlapping targets for the two nuclear receptors. *J Lipid Res.* 43(12):2037-2041.
- Mak, P., Laffitte, B., Desrumaux, C., Joseph, S., Curtiss, L., Mangelsdorf, D., Tontonoz, P. e Edwards, P. (2002). Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem.* 277(35):31900-8.
- Makowski, L., Brittingham, K., Reynolds, J., Suttles, J. e Hotamisligil, G. (2005). The Fatty Acid-binding Protein, aP2, Coordinates Macrophage Cholesterol Trafficking and Inflammatory Activity. *J Biol Chem.* 2005 Apr 1;280(13):12888-95.
- Makowski, L. e Hotamisligil, G. (2004). Fatty acid binding proteins - The evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses. *J. Nutr.* 134, 2464S–2468S.
- Makowski, L., Boord, J., Maeda, K., Babaev, V., Uysal, K., Morgan, M., Parker, R., Suttles, J., Fazio, S., Hotamisligil, G. e Linton, M. (2001). Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med.* 7:699–705.
- Manosroi, J., Apriyani, M., Foe, K. e Manosroi, A. (2005). Enhancement of the release of azelaic acid through the synthetic membranes by inclusion complex formation with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 293, no. 1-2, pp. 235–240.
- Marx, N., Mackman, N., Schonbeck, U., Yilmaz, N., Hombach, V., Libby, P. e Plutzky, J. (2001). PPARalpha activators inhibit tissue factor expression and activity in human monocytes. *Circulation* 103:213–219.



- Marx, N., Sukhova, G., Collins, T., Libby, P. e Plutzky, J. (1999). PPAR $\alpha$  activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation*; 99:3125–3131.
- Matsusue, K., Miyoshi, A., Yamano, S. e Gonzalez, F. (2006). Ligand-activated PPAR beta efficiently represses the induction of LXR-dependent promoter activity through competition with RXR. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2006,256, 23–33.
- Maxfield F. e Tabas I. (2005). Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*. 1;438(7068):612-21.
- McEwen, J. (2000). Clinical pharmacology of piroxicam- $\beta$ -cyclodextrin. Implications for innovative patient care. *Clin. Drug Invest.* 19(Suppl. 2), 27–31.
- Medzhitov R. e Janeway C. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* 173:89-97.
- Mencarelli, A., Renga, B., Migliorati, M., Cipriani, S., Distrutti, E., Santucci, L. e Fiorucci, S. (2009). The bile acid sensor farnesoid X receptor is a modulator of liver immunity in a rodent model of acute hepatitis. *J Immunol.* 2009 Nov 15;183(10):6657-66.
- Nakamura, M., Yudell, B. e Loor, J. (2014). Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog.Lipid Res.* 53, 124–144.
- Nakaya, K., Tohyama, J., Naik, S., Tanigawa, H., MacPhee, C., Billheimer, J. e Rader, D. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  activation promotes macrophage reverse cholesterol transport through a liver X receptor-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(6):1276-82.
- Neve, B., Corseaux, D., Chinetti, G., Zawadzki, C., Fruchart, J., Duriez, P., Staels, B. e Jude, B. PPAR $\alpha$  agonists inhibit tissue factor expression in human monocytes and macrophages. *Circulation* 103:207–212.
- Ohshima, T., Koga, H. e Shimotohno, K. (2004). Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  is modulated by SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem* 279:29551–29557.
- Oishi, Y., Spann, N., Link, V., Muse, E., Strid, T., Edillor, C., Kolar, M.J., Matsuzaka, T., Hayakawa, S., Tao, J., Kaikkonen, M., Carlin, A., Lam, M., Manabe, I., Shimano, H., Saghatelian, A. e Glass, C. (2017). SREBP1 Contributes to Resolution of Pro-inflammatory TLR4 Signaling by Reprogramming Fatty Acid Metabolism. *Cell Metab.* 7;25(2):412-427.
- ONO, N.; ARIMA, H.; HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. A moderate interaction of maltosyl- $\alpha$ -cyclodextrin with Caco-2 cells in comparison with the parent cyclodextrin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 24, no. 4, pp. 395–402, 2001.
- Ory, D., Ottinger, E., Farhat, N., King, K., Jiang, X., Weissfeld, L., Berry-Kravis, E., Davidson, C., Bianconi, S., Keener, L., Rao, R., Soldatos, A., Sidhu, R., Walters, K., Xu, X., Thurm, A., Solomon, B., Pavan, W., Machielse, B., Kao, M., Silber, S., McKew, J., Brewer, C., Vite, C., Walkley, S., Austin, C. e Porter, F. (2017). Intrathecal 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin decreases neurological disease progression in Niemann-Pick disease, type C1: a non-randomised, open-label, phase 1-2 trial.
- Pascual, G., Fong, A., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A., Perissi, V, Rose, D., Willson, T., Rosenfeld, M. e Glass, C. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- $\gamma$ . *Nature* 437:759–763.
- Paumelle, R., Blanquart, C., Briand, O., Barbier, O., Duhem, C., Woerly, G., Percevault, F., Fruchart, J., Dombrowicz, D., Glineur, C. e Staels, B. (2006). Acute antiinflammatory properties of statins involve peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  via inhibition of the protein kinase C signaling pathway. *Circ Res* 98:361–369.
- Payne, A. e Hales, D. (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev.* 25(6): 947–970.
- Peet, D, Turley, S., Ma, W., Janowski, B., Lobaccaro, J., Hammer, R. e Mangelsdorf, D. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR  $\alpha$ . *Cell.* 93(5):693-704.
- Penas, F., Mirkin, G., Vera, M., Cevey, A., Gonzalez, C., Gomez, M., Sales, M. e Goren, N. Treatment in vitro with PPAR and PPAR ligands drives M1-to-M2 polarization of macrophages from T. cruzi-infected mice. *Biochim. Biophys. Acta.* 1852, 893–904.

- Pollard, T. (2016). Cell Biology. In: Processing and Degradation of Cellular Components. (Elsevier), pp 393-405.
- Qi, Z. e Sikorski, C. (1999). Controlled delivery using cyclodextrin technology. (Indiana, ACS Symposium Series), pp 113–130.
- Reboldi, A. e Dang, E. (2018). Cholesterol metabolism in innate and adaptive response. *F1000Res.* 16;7. pii: F1000 Faculty Rev-1647.
- Ricote, M. e Glass, C. (2007). PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 926–935.
- Ridlon, J., Kang, D. e Hylemon, (2006). P. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res.* 47(2):241–59.
- Rong, X., Albert, C., Hong, C., Duerr, M., Chamberlain, B., Tarling, E., Ito, A., Gao, J., Wang, B., Edwards, P., Jung, M., Ford, D. e Tontonoz, P. (2013). LXRs regulate ER stress and inflammation through dynamic modulation of membrane phospholipid composition. *Cell Metab.* 18(5):685-97.
- Rosenbaum, A., Zhang, G., Warre, J. e Maxfield, F. (2010). Endocytosis of beta-cyclodextrins is responsible for cholesterol reduction in Niemann-Pick type C mutant cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 23;107(12):5477-82.
- Russell, D. (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem.* 72: 137–174.
- Sakiyama, Y., Shibata, S., Sanayama, H., Ono, S., Maekawa, M., Matsuo, M., Irie, T. e Eto, Y. (2015). Intrathecal 2-Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin (HPBCD) therapy in adult-onset Niemann-Pick Disease Type C (NPC). *Journal of the Neurological Sciences* 357 e193–e214.
- Salam, N., Huang, T., Kota, B., Kim, M., Li, Y. e Hibbs, D. (2008). Novel PPARgamma agonists identified from a natural product library: a virtual screening, induced-fit docking and biological assay study. *Chem. Biol. Drug Des.* 71, 57–70.
- Schmidt, A., Endo, N., Rutledge, S., Vogel, R., Shinar, D. e Rodan, G. (1992). Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol. Endocrinol.* 6: 1634-1641. 11.
- Scholtyssek, C., Katzenbeisser, J., Fu, H., Uderhardt, S., Ipseiz, N., Stoll, C., Zaiss, M., Stock, M., Donhauser, L., Bohm, C., Kleyer, A., Hess, A., Engelke, K., David, J., Djouad, F., Tuckermann, J., Desvergne, B., Schett, G. e Krönke, G. (2013). PPARbeta/delta governs Wnt signaling and bone turnover. *Nat. Med.* 19, 608–613.
- Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A., Heyman, R., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B. e Auwerx, J. (1996). PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 15(19):5336-48.
- Schoonjans, K., Staels, B. e Auwerx, J. (1996). Role of the peroxisome proliferators activated receptor (PPAR) in mediating effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res.* 37:907-25.
- Schoonjans, K., Watanabe, M., Suzuki, H., Mahfoudi, A., Krey, G., Wahli, W., Grimaldi, P., Staels, B., Yamamoto, T. e Auwerx, J. (1995). Induction of the acylcoenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferators response element in the C promoter. *J Biol Chem* 270:19269-76.
- Serni, U. (1993). Rheumatic disease — clinical experience with piroxicam-β-cyclodextrin. *Eur. J. Rheumatol. Inflamm.* 12,47–54.
- Sever, N., Lee, P., Song, B., Rawson, R., and DeBose-Boyd, R. (2004). Isolation of mutant cells lacking Insig-1 through selection with SR-12813, an agent that stimulates degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* 279, 43136–43147.
- Sfeir, Z., Ibrahim, A., Amri, E., Grimaldi, P. e Abumrad, N. (1997). Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 57:17-21.
- Sheets, E., Holowka D. e Baird B. (1999). Critical Role for Cholesterol in Lyn-mediated Tyrosine Phosphorylation of FcεRI and Their Association with Detergent-resistant Membranes. *J Cell Biol.* 145(4):877-87.

- Sher, T., Yi, H., McBride, W. e Gonzalez, F. (1993). cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*. 32: 5598-5604.
- Shureiqi, I., Jiang, W., Zuo, X., Wu, Y., Stimmel, J., Leesnitzer, L., Morris, J., Fan, H., Fischer, S. e Lippman, S. (2003). The 15-lipoxygenase-1 product 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid down-regulates PPAR- $\delta$  to induce apoptosis in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100, 9968–9973.
- Simons, K. e Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 27 (17), pp 6197–6202.
- Singhal, A., Szente, L., Hildreth, J. e Song, B. (2018). Hydroxypropyl-beta and -gamma cyclodextrins rescue cholesterol accumulation in Niemann-Pick C1 mutant cell via lysosome-associated membrane protein 1. *Cell Death Dis.* Oct 3;9(10):1019.
- Skalnik, D., Narita, H., Kent, C., e Simoni, R.D. (1988). The membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase confers endoplasmic reticulum localization and sterol-regulated degradation onto  $\beta$ -galactosidase. *J. Biol. Chem.* 263, 6836–6841.
- Staels, B., Vu-Dac, N., Kosykh, V., Saladin, R., Fruchart, J., Dallongeville, J. e Auwerx, J. (1995). Fibrates down-regulate apolipoprotein C-111 expression independent of induction of peroxisomal acyl-Coenzyme A oxidase. *J. Clin. Invest.* 95: 705-712.
- Stefan, N., Fritsche, A., Häring, H. e Stumvoll, M. (2001). Effect of experimental elevation of free fatty acids on insulin secretion and insulin sensitivity in healthy carriers of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferators-activated receptor- $\gamma$  2 gene. *Diabetes*. 50:1143-8.
- Szejtli, J., Osa, T. (1996). Cyclodextrins. In: *Comprehensive Supramolecular Chemistry Vol. 3*. Atwood, J., eds. (New York, Pergamon).
- Szeman, J, Ueda, H., Szejtli, J., Fenyvesi, E., Machida, Y. e Nagai, T. (1987). *Chem. Pharm. Bull.* 35, 282–288.
- Tall, A. (1998). An overview of reverse cholesterol transport. *Eur Heart J.* 19 Suppl A:A31-5.
- Tontonoz, P. e Mangelsdorf, D. (2003). Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol. Endocrinol.* 17, 985–993.
- Tontonoz, P., Hu, E. e Spiegelman, B. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR $\gamma$ 2, a lipid activated transcription factor. *Cell*. 79:1147-56.
- Uekama, K e Otagiri, M. (1987). Cyclodextrins in drug carrier systems. *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems* 3, 1-40.
- Urizar, N., Dowhan, D. e Moore, D. (2000). The farnesoid X-activated receptor mediates bile acid activation of phospholipid transfer protein gene expression. *J Biol Chem*. 275(50):39313-39317.
- Vanden, W., Vermeulen, L., Delerive, P., De Bosscher, K., Staels, B. e Haegeman, G. (2003). A paradigm for gene regulation: inflammation, NF-kappaB and PPAR. *Adv Exp Med Biol* 544:181–196.
- Vanier, M, (2010). Niemann-Pick disease type C. *Vanier Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010, 5:16:1-18.
- Vavassori, P., Mencarelli A., Renga, B., Distrutti, E. e Fiorucci, S. (2009). The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity. *J Immunol.* 15;183(10):6251-61.
- Vecsernyés, M., Fenyvesi, F., Bácskay, I., Deli, M., Szente, L. e Fenyvesi, E. (2014). Cyclodextrins, Blood–Brain Barrier, and Treatment of Neurological Diseases. *Arch Med Res.* 45(8):711-29.
- Venkateswaran, A., Laffitte, B., Joseph, S., Mak, P., Wilpitz, D., Edwards, P. e Tontonoz, P. (2000). Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(22):12097-102.
- Viswakarma, N., Jia, Y., Bai, L., Vluggens, A., Borensztajn, J., Xu, J. e Reddy, J. (2010). Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR Res.* 2010: 250126.
- Wang, B. e Tontonoz, P. (2018). Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. *Nat Rev Endocrinol.* 14, 452–463.

- Wiese, M., Corde H., Chi, H., Seydel, J., Backensfeld, T. e Muller, B. (1991). Interaction of prostaglandin E1 with alpha-cyclodextrin in aqueous systems: stability of the inclusion complex. *J Pharm Sci.* 1991 Feb;80(2):153-6.
- Xu, H., Lambert, M., Montana, V., Parks, D., Blanchard, S., Brown, P., Sternbach, D., Lehmann, J., Wisely, G., Willson, T., Kliewer, S. e Milburn, M. (1999). Molecular Recognition of Fatty Acids by PeroxisomeProliferator–Activated Receptors. *Mol. Cell*, 397–403.
- Xu, L., Glass, C. e Rosenfeld, M. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev.* 9:140-7.
- Xu, X., Otsuki, M., Saito, H., Sumitani, S., Yamamoto, H., Asanuma, N., Kouhara, H. e Kasayama, S. (2001). PPARalpha and GR differentially down-regulate the expression of nuclear factor-kappaBresponsive genes in vascular endothelial cells. *Endocrinology* 142:3332–3339.
- Yang, C., McDonald, J., Patel, A., Zhang, Y., Umetani, M., Xu, F., Westover, E., Covey, D., Mangelsdorf, D., Cohen, J. e Hobbs, H. (2006). *J Biol Chem.* 281(38):27816-26.
- Yang, F., Huang, X., Yi, T., Yen, Y., Moore, D. e Huang, W. (2007). Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res.* 1;67(3):863-7.
- Yang, T., Espenshade, P., Wright, M., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J., e Brown, M. (2002). Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110, 489–500.
- Yang, T., Goldstein, J., and Brown, M. (2000). Overexpression of membrane domain of SCAP prevents sterols from inhibiting SCAP/SREBP exit from endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 275, 29881–29886.
- Ye G., Chen G., Gao H., Lin Y., Liao X., Zhang H., Liu X., Chi Y., Huang Q., Zhu H., Fan Y., Dong S. (2019). Resveratrol inhibits lipid accumulation in the intestine of atherosclerotic mice and macrophages. *J Cell Mol Med.* (6):4313-4325.
- York, A., Williams, K., Argus, J., Zhou, Q., Brar, G., Vergnes, L., Gray, E., Zhen, A., Wu, N., Yamada, D., Cunningham, C., Tarling, E., Wilks, M., Casero, D., Gray, D., Yu, A., Wang, E., Brooks, D., Sun, R., Kitchen, S., Wu, T., Reue, K., Stetson, D. e Bensinger, S. (2015). Limiting Cholesterol Biosynthetic Flux Spontaneously Engages Type I IFN Signaling. *Cell.* 163(7):1716-29.
- Yu, C., Chen, L., Luo, H., Chen, J., Cheng, F., Gui, C., Zhang, R., Shen, J., Chen, K., Jiang, H. e Shen, X. (2004). Binding analyses between Human PPARgamma-LBD and ligands. *Eur. J. Biochem.* 271, 386–397.
- Yu, L., York, J., von Bergmann, K., Lutjohann, D., Cohen, J. e Hobbs, H. (2003). Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem.* 278(18):15565-70.
- Zhao, G., Etherton, T., Martin, K., Vanden Heuvel, J., Gillies, P., West, S., KrisEtherton, P. (2005). Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 909–917.
- Zimmerman, A. e Veerkamp, J. (2002). New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci.* 59:1096–1116.