



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

JULIANA EDELVACY LIMA PINTO

**ESTUDO DO PAPEL DE RECEPTORES LXR NA DIFERENCIAÇÃO DE
LINFÓCITOS TCD4⁺ IN-VITRO E IN-VIVO**

**SÃO PAULO
2023**

JULIANA EDELVACY LIMA PINTO

**ESTUDO DO PAPEL DE RECEPTORES LXR NA DIFERENCIAÇÃO DE
LINFÓCITOS TCD4⁺ IN-VITRO E IN-VIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Celular.

Orientador: Profº Drº Pedro Manoel Mendes Moraes Vieira.

**SÃO PAULO
2023**

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Lima Pinto, Juliana Edelvacy
ESTUDO DO PAPEL DE RECEPTORES LXR NA
DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS TCD4+ IN-VITRO E IN-VIVO
/ Juliana Edelvacy Lima Pinto; orientador Pedro
Manoel Mendes Moraes Vieira. -- São Paulo, 2023.
92 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Linfócitos TCD4. 2. SUMOilação. 3. Polarização
de células T. 4. LXR. I. Mendes Moraes Vieira,
Pedro Manoel, orientador. II. Título.

AGRADECIMENTOS

O processo de aprendizagem que vivi no mestrado foi extremamente recompensador e desafiador. Como aluna, o aprendizado das técnicas e conexões que fiz na instituição foi muito enriquecedor, todavia, não seria possível finalizar esse trabalho sem o apoio de muitas pessoas especiais que me apoiaram em toda essa caminhada.

Quero agradecer primeiro aos meus pais Betânia e Licarion que sempre me incentivaram a fazer o que gosto e ir atrás dos meus sonhos. Aos meus irmãos Ricardo e Neto, que assim como eu, fizeram pós-graduação e sempre entenderam minhas queixas.

A meu companheiro Leomim, que apesar da distância física a todo momento esteve ao meu lado mesmo nos tempos de dificuldade, obrigada por sempre me apoiar e acreditar em mim.

À Willias que me acompanha desde a graduação e embarcou nessa viagem comigo, amiga, muito obrigada por todo o apoio, por me ajudar nos experimentos, pela companhia e por sua amizade. Se existe alguma amizade que quero levar por toda via essa é a sua!

Aos queridos amigos que fiz no laboratório e me ajudaram em diversos experimentos. Ana Ju, Lincon e Jefferson, obrigada por escutarem minhas reclamações e compartilhar tantas risadas comigo.

Por fim, agradeço a CAPES e FAPESP pela bolsa de pesquisa, sem a qual não seria possível executar esse projeto.

RESUMO

Lima Pinto, JE. **Estudo do Papel de Receptores LXR na diferenciação de Linfócitos TCD4+ In-vitro e In-vivo**. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2023.

LXRs (do inglês, *liver x receptors*) são receptores nucleares, que atuam como sensores dos níveis de colesterol no corpo, desempenhando um papel essencial na regulação do metabolismo, transporte e efluxo de lipídeos. LXRs apresentam duas isoformas, LXR α e LXR β , sendo a expressão de LXR α primariamente no intestino, fígado e tecido adiposo, enquanto o LXR β é expresso em praticamente todos os tipos celulares. Em resposta à associação com um ligante, os LXRs tornam-se ativos e translocam para o núcleo, onde associados a receptores retinóide X (RXR) atuam modulando a expressão de genes associados a regulação do metabolismo e efluxo de colesterol. Além de sua função na regulação da homeostase metabólica, LXRs também participam na regulação da resposta inflamatória, com um papel anti-inflamatório devido à sua capacidade de inibir a transcrição de NF-kB, isso ocorre por meio de um mecanismo denominado transrepressão, envolvendo a ligação com um peptídeo chamado SUMO. Embora diversos trabalhos tenham descritos os efeitos benéficos da ativação de LXR para a regulação da resposta inflamatória, pouco se sabe sobre os efeitos da SUMOilação de LXRs na polarização de células T CD4. Assim, o objetivo desse trabalho é entender como as duas isoformas do LXR atuam na polarização de linfócitos TCD4. Observamos uma redução na polarização em linfócitos Th1, Treg e Th17 quando LXR α ou LXR β estão deletados, mas com um efeito mais evidente na deleção de LXR β . A ativação do LXR por meio do uso do agonista GW3965 tem um efeito anti-inflamatório enquanto sua inibição por meio do uso do antagonista PGF2 α tem um efeito pró-inflamatório, sendo as duas isoformas do LXR importantes para esse papel. Também observamos uma menor expressão de GLUT1 e ativação da via de NF-kb quando as isoformas de LXR são deletadas. Em contraponto, observamos *in vivo* que a deleção de LXR aumentou a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células T CD4. Dessa forma, ambas isoformas de LXRs tem um papel essencial na polarização de células T CD4, com um papel ainda mais evidente para o LXR β .

Palavras-chave: Linfócitos TCD4, SUMOilação, LXR, Polarização de células T.

ABSTRACT

Lima Pinto, JE. **Study of the Role of LXR receptors in the differentiation of TCD4 cells In-vitro and In-vivo.** [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2023.

LXRs (liver x receptors) are nuclear receptors that act as sensors of the body's cholesterol levels, playing a crucial role in the regulation of the metabolism, transport, and efflux of lipids. LXRs are found in two isoforms, LXR α e LXR β , where the expression of LXR α is primarily in the intestine, liver, and adipose tissue, while LXR β is expressed in almost all cell types. In response to the association with a ligand, LXRs become active and translocate to the nucleus, where, in association with a retinoid receptor (RXR), act as gene expression modulators and as well as a regulator of the metabolism and cholesterol efflux. In addition to its function on the regulation of the metabolism homeostasis, LXRs also participate in inflammatory regulation, with an anti-inflammatory role, due to its capacity of inhibiting NF-Kb activation, which occurs through a mechanism called trans repression that involves the binding to a peptide called SUMO. Although many works have described the benefic effects of LXR activation for the regulation of the inflammatory response, little is known of the SUMOylation effects of LXRs in the polarization of T CD4+ cells. Thus, the aim of this work is to understand how the two LXR isoforms act on TCD4+ lymphocyte polarization. We observed a reduction in the polarization of Th1, Treg and Th17 lymphocytes when both receptors are deleted, but with a more evident effect upon LXR β deletion. LXR has an anti-inflammatory effect when activated with agonists GW3965, while its inhibition through the use of antagonist PFG2 α has a pro-inflammatory effect. Both isoforms are important for this effect. We also observed a reduced expression of GLUT1 and activation of NF-kb when both isoforms are deleted. Despite the effects observed, we found that *in vivo* that LXR deletion increased the production of pro-inflammatory cytokines from T CD4 cells. Thus, it is evident that the two isoforms of LXRs have an essential role in T CD4 lymphocyte polarization, with an even more evident role for LXR β .

Keywords: TCD4 Lymphocytes, SUMOylation, LXR, T cell Polarization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de ação dos LXRs.....	16
Figura 2: Rearranjo e expressão dos genes de cadeia α e β do receptor de célula T	20
Figura 3: Esquema da Ativação e diferenciação de linfócitos T CD4+ naive.....	23
Figura 4: Adaptação metabólica de linfócitos T CD4+ após sua ativação.....	26
Figura 5: Diferentes Programas metabólicos de Linfócitos T.	27
Figura 6: Estratégia de Gates para análise por Citometria de Fluxo	35
Figura 7: Expressão relativa de LXR e de seus genes alvos em linfócitos TCD4+ naive.....	42
Figura 8: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos CD8+ e CD4+ no Timo.	43
Figura 9: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos CD8+ e CD4+ no linfonodo mesentérico.	45
Figura 10: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos TH1, mostrando a frequência de células CD4+IFN- γ +.	46
Figura 11: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos Treg, mostrando a frequência de células CD4+FOXP3+.	47
Figura 12: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos Th17, mostrando a frequência de células CD4+IL-17+.	48
Figura 13: Expressão relativa dos genes alvos de LXR linfócitos Th1, Treg e Th17.	49
Figura 14: Expressão relativa dos genes de GLUT E SREBP1a.	50
Figura 15: Análise por Western Blott de linfócitos Th1.....	51
Figura 16: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos Th1, mostrando a frequência de células CD4+IFN- γ +	53
Figura 17: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos TH17, mostrando a frequência de células CD4+ IL-17+.....	53
Figura 18: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos Th1, mostrando a frequência de células CD4+IFN- γ +	54
Figura 19: Microscopia Confocal de linfócitos TH1 diferenciados a partir de camundongos LXR α e LXR β KO.....	56
Figura 20: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos Th1, mostrando a frequência de células CD4+IFN- γ +.	57

Figura 21: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos Treg, mostrando a frequência de células CD4+ FOXP3+.	58
Figura 22: Expressão relativa dos genes de alvos de LXR após tratamento com 2D08.	59
Figura 23: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos TH1 e TH17, mostrando a frequência de células CD4+ IFN- γ + e CD4+ IL-17+.	61
Figura 24 - DTH a OVA de camundongos LXR α e beta KO. A DTH ao peptídeo OVA foi quantificada pelo inchaço relativo da pata posterior, em um período de 6-72h.	62
Figura 25 - Mecanismo de ação proposto quando ao papel dos LXRs na diferenciação de linfócitos TCD4+.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração utilizada do inibidor de sumoilação (2D08) em experimento de diferenciação de células T CD4+.....	34
Tabela 2 - Anticorpos usados na Citometria de Fluxo	35
Tabela 3 - Anticorpos usados no Western Blotting.	37
Tabela 4 - Sequência de oligonucleotídeos iniciadores usados para ensaio de PCR em tempo real.	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABCA1	Do inglês, <i>ATP binding cassette transporter A1</i>
ABCG1	Do inglês, <i>ATP binding cassette transporter G1</i>
AIRE	Regulador autoimune
AKT	Proteína quinase B
AP-1	Proteína ativadora 1
APC	Células apresentadoras de antígeno
APOE	Apolipoproteína E
BSA	Do inglês, <i>Bovine Serum albumin</i>
CD	Do inglês, <i>cluster of differentiation</i>
CD28	Cluster de diferenciação 28
CD44	Cluster de diferenciação 44
COX 1	Ciclo-oxigenase 1
COX 2	Ciclo-oxigenase 2
CTLA-4	Proteína 4 associada ao linfócito T
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERLXR	Elemento responsivo ao LXR
Foxp3	Do inglês, <i>Forkhead box P3</i>
FSC	Do inglês, <i>Foward scatter</i>
GATA-3	Proteína 3 de ligação ao GATA
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
ILCS	Do inglês, <i>innate lymphoid cells</i>
LXR	Receptor x do fígado

MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
MHC-II	O complexo principal de histocompatibilidade do tipo II
mRNA	RNA mensageiro
MTEC	Células epiteliais medulares especializadas
NF-kb	Fator nuclear kappa B
NK	Do inglês, <i>natural killer</i>
NKTs	Do inglês, <i>natural killer T cells</i>
OVA	Ovalbumina de galinha
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
PBS	Do inglês, <i>Phosphate-buffered saline</i>
PFA	Paraformaldeído
PGF2 α	Prostaglandina F2- α
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
RAG-1	Do inglês, <i>Recombination activating gene 1</i>
RAG-2	Do inglês, <i>Recombination activating gene 2</i>
RLDL	Receptor de LDL
RNA	Ácido ribonucleico
Roryt	Do inglês, <i>Retinoid-related orphan receptor gamma t</i>
RXR	Receptor de ácido retinóico X
SBF	Soro feral bovino
SDS	Sódio dodecil sulfato
SSC	Do inglês, <i>Side scatter</i>
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
STAT4	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 4
STAT6	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 6
SUMO	Do inglês, <i>small ubiquitin-like modifier</i>
TBST	Do inglês, <i>Tris-buffered saline triton</i>
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Do inglês, <i>Transforming growth factor β</i>
TGS	Triglicerídeos
Th1	T auxiliar do tipo 1
Th17	T auxiliar do tipo 17
Th2	T auxiliar do tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral α

Tregs T reguladoras

TRIS-HCL Tris-(hidroximetil)-aminometano)-HCL

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Transportadores de Colesterol	13
1.2 Receptores X Do Fígado (LXR).....	15
1.3 Moduladores De LXR	18
1.4 Desenvolvimento de Linfócitos T.....	19
1.5 Maturação e ativação de linfócitos T CD4+	22
1.6 Metabolismo de Linfócitos T.....	24
1.7 Importância dos linfócitos T CD4+	28
2 OBJETIVO.....	30
2.1 Objetivo Geral	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 Animais	33
3.2 Diferenciação de Linfócitos TCD4 naive.....	33
3.3 Análise por Citometria de Fluxo.....	34
3.4 Dosagem de citocinas extracelulares.....	36
3.5 Western Blotting	36
3.6 PCR em tempo real	37
3.7 Imunofluorescência de Confocal.....	38
3.8 Imunização para Indução de Hipersensibilidade do Tipo Tardia (DTH)	39
3.8.1 DTH	40
3.9 Análise Estatística	40
4 RESULTADOS	41
4.1 A deleção de LXR α e LXR β afeta o desenvolvimento de linfócitos T	42
4.2 A deleção de LXR α e LXR β afeta a diferenciação de linfócitos TCD4.....	46

4.3 A ausência do LXR modula a ativação de linfócitos T CD4	48
4.4 A ativação e inibição de LXR α e LXR β afeta a diferenciação de linfócitos TCD4+.....	51
4.5 A Deleção das duas isoformas do LXR afeta a morfologia mitocondrial e o acúmulo de corpúsculos lipídicos.....	54
4.6 A Sumoilação do LXR impacta na polarização de linfócitos T reguladores.	57
4.7 A resposta dos linfócitos TCD4 de camundongos deficientes de LXR é afetadatum modelo antígeno específico	60
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO	73
7 REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transportadores de Colesterol

Os lipídeos são um dos nutrientes mais importantes do corpo, provendo energia, ácidos graxos essenciais e seus derivados para a manutenção da homeostase corporal. Existem basicamente 3 classes de lipídeos, sendo elas: triglicerídeos (TGs), esteróis e fosfolipídeos (FAHY *et al.*, 2005, 2009). Dentro do grupo dos esteróis, o colesterol ganha destaque, uma vez que é o lipídeo esteroide mais abundante do corpo e possui participação na produção de diversos hormônios (QUEHENBERGER *et al.*, 2010).

O colesterol é um componente essencial das membranas celulares de mamíferos, sendo também um precursor de ácidos biliares e hormônios esteroides, com participação nos mais diversos processos metabólicos do corpo (ZAMPELAS; MAGRIPLIS, 2019). Os seus níveis circulantes são regulados por um balanço entre a sua síntese intracelular, dieta, absorção e remoção do seu excesso de tecidos periféricos (SIMONS; IKONEN, 2000). Num contexto celular, essa molécula é necessária para a biossíntese da membrana plasmática e para a sinalização de vias regulatórias em todos os tipos celulares, incluindo células do sistema imune (AGUILAR-BALLESTER *et al.*, 2020; SHI *et al.*, 2022). Nesse contexto, estudos recentes apontaram que o colesterol também pode atuar na modulação da resposta imune inata e adaptativa (REBOLDI; DANG, 2018).

Dentre os mecanismos atuantes no controle desses níveis circulantes de colesterol corporal, transportadores de colesterol tem um papel fundamental nessa manutenção. Um dos moduladores desses transportadores são os receptores x do fígado (LXR), que tem ganhado destaque nos últimos anos. LXRs são receptores nucleares (NRs), descritos como fatores de transcrição capazes de regular diversos genes relacionados com o metabolismo de colesterol e lipídeos, tanto em condições homeostáticas, como em condições patológicas (BILOTTA *et al.*, 2020). Eles estão presentes no corpo em duas isoformas com uma diferente expressão tecidual (TAYLOR *et al.*, 2010; ZHONG, SHUMEI *et al.*, 2010; ZHU, RONGTAO *et al.*, 2012).

Quando ativados, os LXRs podem mediar atividades anti-inflamatórias e modular a resposta imune, principalmente via regulação de genes envolvidos no metabolismo de glicose e lipídeos (SCHULMAN, 2017; WANG, BO *et al.*, 2018; WILLY

et al., 1995). A principal forma de atuação dos LXRs contra o acúmulo de colesterol intracelular ocorre via indução da expressão de transportadores de colesterol da família *ATP binding cassette* (ABC), como ABCA1 e ABCG1 (TONTONNOZ, 2011). Atualmente, diversos trabalhos na literatura descrevem a importância dos LXRs no desenvolvimento de doenças autoimunes como a esclerose múltipla (MAILLEUX *et al.*, 2018), artrite reumatóide (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016), lúpus (HAN *et al.*, 2018) e doenças inflamatórias como a aterosclerose (FESSLER, 2018). Nesse contexto, atualmente, os LXRs são considerados como um dos principais reguladores capazes de detectar os níveis de colesterol dentro das células (ZHU, RONGTAO *et al.*, 2012).

Esses NRs também atuam na repressão de vias importantes para a regulação da resposta imune (BENSINGER *et al.*, 2008a; VALLEDOR, 2005). Atuando na indução da resposta anti-inflamatória em macrófagos (GEYEREGGER *et al.*, 2009; POURCET *et al.*, 2016) de células dendríticas (BECEIRO *et al.*, 2018) e na modulação da ativação de linfócitos T e B, representando dessa forma, um elo entre o metabolismo de colesterol, proliferação e migração de células do sistema imune inato e adaptativo (CUI *et al.*, 2011a; GEYEREGGER *et al.*, 2009; SOLT; KAMENECKA; BURRIS, 2012; WALCHER *et al.*, 2010), o que poderia justificar o seu papel regulatório no controle e doenças inflamatórias, autoimunes e infecciosas (A-GONZALEZ *et al.*, 2009; CALKIN; TONTONNOZ, 2010; REPA *et al.*, 2000).

Essas doenças autoimunes e inflamatórias estão intimamente relacionadas com a resposta imunológica adaptativa, a qual pode ser dividida em dois campos: resposta imune humoral e celular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2021). A resposta imune humoral envolve principalmente a resposta de linfócitos B e, conseqüentemente, a produção de anticorpos a partir destes. Por outro lado, a resposta imune celular envolve a participação de linfócitos TCD4+ auxiliares e linfócitos TCD8+ citotóxicos (ALBERTS *et al.*, 2002). Recentemente foi descrito que o colesterol tem um papel importante na resposta imune de linfócitos T, podendo participar a formação da sinapse imunológica (SWAMY *et al.*, 2016), ativação via receptor de linfócito T (TCR) (WANG, FENG *et al.*, 2016) e produção de citocinas (KIDANI *et al.*, 2013).

O colesterol também atua na proliferação celular de linfócitos T, onde o tratamento de linfócitos T naive com estatinas, apresentou um efeito inibitório na

diferenciação e na proliferação dessas células (GHITTONI *et al.*, 2005). Estatinas são inibidores competitivos da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), uma enzima com um importante papel na biossíntese de colesterol (ISTVAN, 2002). Além disso, a inibição dessa enzima, levou a uma redução nos níveis de síntese de DNA em diversos tipos de populações celulares caracterizadas pela sua alta taxa de proliferação, como linfócitos, fibroblastos e células tumorais (CHAKRABARTI; ENGLEMAN, 1991; LI, JUAN *et al.*, 2017; MACIVER; MICHALEK; RATHMELL, 2013). O que aponta que a regulação dos níveis intracelulares de colesterol tem um papel essencial na funcionalidade, proliferação e diferenciação de linfócitos T.

Portanto, tendo em vista que a regulação dos níveis intracelulares de colesterol em linfócitos T é essencial para sua função efetora e que ainda não está completamente estabelecido o papel dos LXRs, como mediadores dos níveis de colesterol intracelular, na regulação da resposta imune de linfócitos TCD4+, torna-se necessário uma maior compreensão do papel desses receptores na diferenciação e função efetora de linfócitos TCD4+. Com o intuito de entender melhor o possível impacto desse receptor na modulação da polarização desses linfócitos TCD4+ e consequentemente, na progressão de doenças autoimunes e inflamatórias.

1.2 Receptores X do Fígado (LXR)

Receptores X do fígado (LXR) são fatores de transcrição que controlam a expressão de genes envolvidos em uma variedade de funções biológicas, destacando-se o seu papel na regulação do metabolismo, através do transporte e efluxo de colesterol e nas respostas inflamatórias (IM; OSBORNE, 2011; RASHEED; CUMMINS, 2018). Atualmente duas isoformas de LXR são conhecidas: LXR α e LXR β , que apresentam um distinto padrão de expressão tecidual e celular. LXR α é altamente expresso em tecidos metabolicamente ativos como tecido adiposo, fígado e intestino, e em células imunes como macrófagos e linfócitos (REPA *et al.*, 2000; SEOL; CHOI; MOORE, 1995). Ao passo que LXR β é expresso de forma ubíqua (ZHONG, LIMEI *et al.*, 2014).

LXRs são ativados em resposta à associação com seus ligantes endógenos

como oxisteróis, descritos como derivados do colesterol, produzidos num contexto de alta concentração de colesterol intracelular e moléculas intermediárias da sua biossíntese, como o demosterol (SCHULMAN, 2017), podendo ainda ser ativados por agonistas sintéticos como GW3965 e T0901317 que mimetizam a conformação dessa molécula (PENG *et al.*, 2011; YOON *et al.*, 2013). Os LXRs estão comumente associados na forma de um heterodímero a um receptor de ácido retinóico X (RXR).

Uma vez ativado, por meio da ligação com oxisteróis e derivados de ácido retinóico, ocorre a dissociação do complexo co-repressor, que antes estava associado a LXR/RXR (HIEBL *et al.*, 2018) e no lugar deste, um complexo co-ativador é recrutado, fazendo com que haja ligação do heterodímero ao ERLXR (Elemento responsivo ao LXR) e a consequente transcrição dos genes-alvo como ABCA1 e ABCG1 (JAKOBSSON *et al.*, 2009), que promovem o efluxo de colesterol da célula como representado na figura 1A.

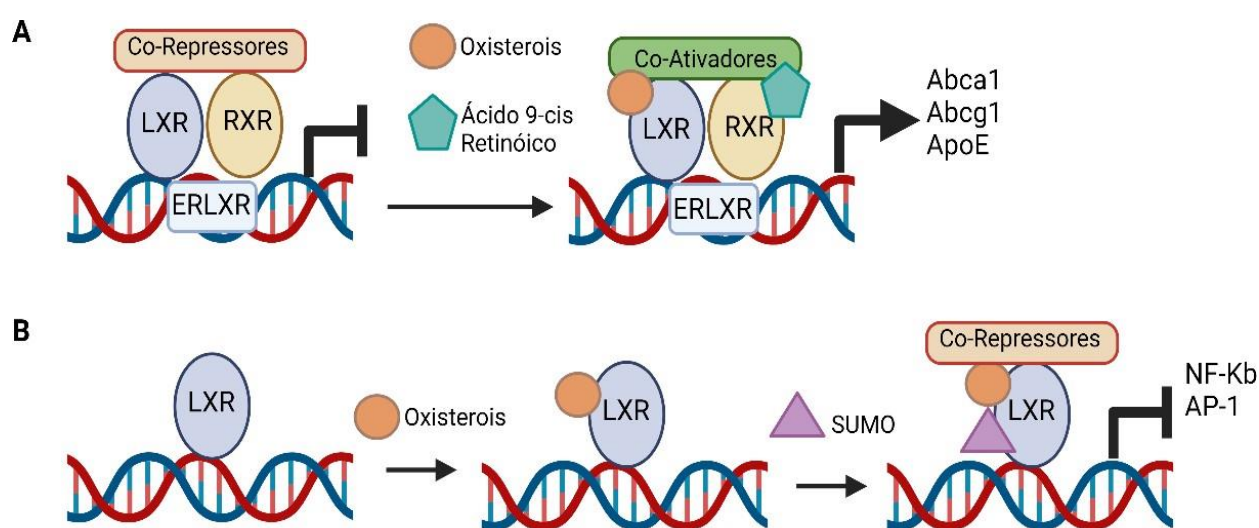


Figura 1: Mecanismo de ação dos LXRs. (A) Os LXRs são ativados por meio da ligação com oxisteróis, o que provoca uma mudança conformacional no receptor fazendo com que ele se dissocie de co-repressores e se associe com co-ativadores, promovendo então a transcrição de genes alvos do LXR. (B) A sumoilação do LXR ocorre após sua ativação por meio de oxisteróis o que estabiliza os correpressores no promotor de NF-kb e AP-1, inibindo a transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Fonte: Autoria própria.

Além dessa atividade, foi descrito que os LXRs também atuam na repressão de genes pró-inflamatórios, como o NF-kB e AP-1 (POURCET *et al.*, 2016; TALAMILLO *et al.*, 2020). Essa repressão ocorre através de um processo chamado de

transrepressão (NOMURA *et al.*, 2015), envolvendo modificações pós-traducionais no LXR como a SUMOilação, onde um peptídeo denominado SUMO (do inglês, *small ubiquitin-like modifier*) se liga ao receptor (TREUTER; VENTECLEF, 2011). Essa ligação do peptídeo SUMO no LXR induz a uma estabilização dos co-repressores no NF-Kb, inibindo a transcrição de genes pró-inflamatórios (Fig. 1B), sendo esse processo bem descrito em macrófagos (STEFFENSEN; JAKOBSSON; GUSTAFSSON, 2013; TALAMILLO *et al.*, 2020; XIAO *et al.*, 2017).

Além da ação da transrepressão em genes pró-inflamatórios, os LXRs atuam de diversas formas na redução da inflamação, como através da indução da síntese de ácidos graxos de cadeia longa poli-insaturados, como é o caso do ômega-3 (JALIL *et al.*, 2019). A presença desse ácido graxo é capaz de reduzir a transativação mediada pelo NF-kB em genes inflamatórios, promovendo a acetilação de histonas em regiões regulatórias e conseqüentemente reduzindo a inflamação (LI, PINGPING *et al.*, 2013). Também foi demonstrado que a ativação dos LXRs é capaz de reduzir a inflamação mediada por macrófagos alterando seu perfil para um subtipo de resolução da inflamação (M2) (ENDO-UMEDA *et al.*, 2022; MATALONGA *et al.*, 2017) e reduzir a diferenciação de linfócitos TCD4⁺ em subtipos pró-inflamatórios (CUI *et al.*, 2011d; XU *et al.*, 2009). Esse receptor também é capaz de atuar aumentando a expressão do proto-oncogene MER tirosina quinase (MERTK), caracterizado como um receptor que promove a síntese de mediadores relacionados com a resolução da inflamação (CHOI *et al.*, 2015; ENDO-UMEDA *et al.*, 2022).

Por fim, a ativação da eferocitose, também está associada com a atividade de LXRs, resultando no efluxo do colesterol livre derivado de células apoptóticas, via expressão dos transportadores ABCA1 e ABCG1. Esse mecanismo, em conjunto com a modulação que os LXRs têm na diferenciação de macrófagos pode atuar na prevenção de uma ativação excessiva do sistema imune (A-GONZALEZ *et al.*, 2009; FOND *et al.*, 2015). Além disso, a remoção de células apoptóticas atua na prevenção da autoimunidade, como demonstrado em modelos murinos de lúpus, onde o tratamento com agonistas dos LXRs melhorou a progressão da doença (A-GONZALEZ *et al.*, 2009).

1.3 Moduladores de LXR

Trabalhos presentes na literatura, indicam que os LXRs podem exercer um papel fundamental na diferenciação de células T CD4. Agonistas sintéticos de LXR, que simulam a conformação de moléculas de oxisterol, têm sido usados para o tratamento de doenças autoimunes e em modelos animais como na encefalomielite autoimune experimental (EAE) (XU *et al.*, 2009). No trabalho de Hindinger *et al.*, (2006), o tratamento com o agonista sintético T0901317 diminuiu a expressão de marcadores pró- inflamatórios, o que resultou na diminuição da inflamação no sistema nervoso central e na desmielinização em camundongos (CUI *et al.*, 2011b; HINDINGER *et al.*, 2006).

Também foi demonstrado que o uso do agonista sintético GW3965 inibiu a diferenciação de células T CD4 *naive* em células Th17, onde, por outro lado, ao se isolar as células T CD4 *naive* de camundongos deficientes em LXR α/β , a diferenciação em células Th17 ocorreu normalmente, mesmo na presença de agonistas (CERMENATI *et al.*, 2013; CUI *et al.*, 2011b). Todavia, o papel que cada isoforma exerce nesse processo ainda não é conhecido.

Além dos agonistas, o uso de antagonistas de LXR também são muito importantes para analisar efetivamente o papel desse receptor. Um desses antagonistas, que foi demonstrado na literatura é justamente a prostaglandina F2- α (PGF2 α), que é um mediador inflamatório derivado da via do ácido araquidônico, sendo formada por meio da ação das enzimas ciclo-oxigenases (COX) 1 e 2 (SALES; JABBOUR, 2003; ZHUANG *et al.*, 2013a).

O tratamento com PGF2 α em células transfectadas com um vetor contendo genes das subunidades α e β de LXR, tiveram a expressão gênica desses receptores inibida. Ademais, quando se realizou a administração do agonista GW3965, o perfil observado anteriormente foi revertido, com o aumento da expressão transiente dos genes de LXR (HEROLD *et al.*, 2017a; ZHUANG *et al.*, 2013a). Mostrando então uma ação específica da PGF2 α na inibição das duas isoformas de LXR. Todavia, pouco ainda se sabe sobre o impacto da modulação de cada isoforma do LXR na diferenciação de linfócitos TCD4+.

1.4 Desenvolvimento de Linfócitos T

Linfócitos TCD4+ possuem um papel essencial na manutenção da homeostase corporal, com o intuito de entender melhor a importância que essas células têm no nosso organismo, faz-se necessário um entendimento básico dos processos envolvidos no seu desenvolvimento. Na medula óssea, células-tronco pluripotentes dão origem a diferentes tipos de leucócitos a partir de um precursor linfóide como células NK (do inglês *natural killer*), ILCs (do inglês, *innate lymphoid cells*), NKTs (do inglês, *natural killer T cells*), linfócitos T CD4+ ou T CD8+ e linfócitos B. De forma mais específica, precursores de célula T migram da medula óssea para o timo que é considerado um órgão linfóide primário, onde essas células irão passar por um processo chamado de maturação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2021).

Ao migrar para o timo, a célula precursora não expressa nenhum dos coreceptores CD4 ou CD8 (CD do inglês *cluster of differentiation*), tampouco um receptor de célula T (TCR), CD3 ou cadeias ζ , encontrando-se, então, no estado duplo-negativo. Tendo em vista que nesse momento os precursores não possuem TCR, a primeira etapa de maturação é a montagem de um TCR funcional, com as suas cadeias $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, por um processo de recombinação somática (HAYES; LI; LOVE, 2005; LIVÁK *et al.*, 1997).

Nesse processo, o primeiro passo é a expressão das proteínas Rag-1 e Rag-2, responsáveis por promover a junção dos segmentos D β -a-J β no locus da cadeia pesada β do TCR e depois a junção dos segmentos DJ com V, formando o éxon VDJ rearranjado da cadeia β do receptor, sendo chamado então de pré-TCR (CHITGOPEKER; SAHNI, 2014). Em seguida, a cadeia α é rearranjada de forma semelhante, unindo apenas os segmentos VJ da cadeia α , uma vez que não existem segmentos D no locus dessa cadeia, completando a formação do TCR. Caso o rearranjo das cadeias $\alpha\beta$ do TCR não tenha ocorrido com êxito a célula pode prosseguir com o rearranjo das cadeias $\gamma\delta$, que são formadas logo após a chegada da célula T ao timo, ou morrerem por apoptose (JOACHIMS *et al.*, 2006), como representado na figura 2.

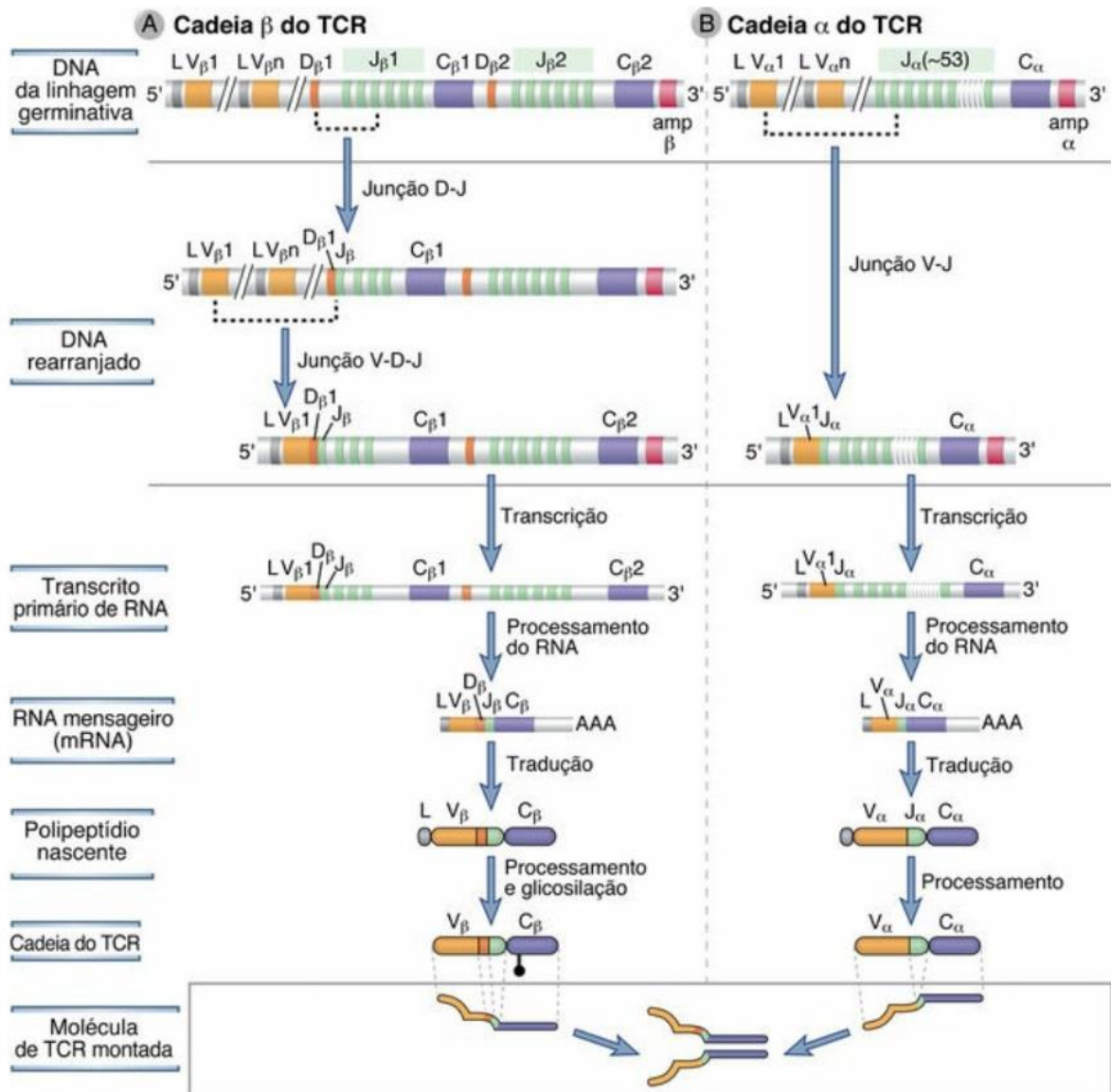


Figura 2: Rearranjo e expressão dos genes de cadeia α e β do receptor de célula T. (A) O primeiro rearranjo a ocorrer é o da cadeia β do TCR, ocorrendo inicialmente a recombinação de um segmento DJ e depois a junção do segmento DJ com um V. (B) O próximo rearranjo a ocorrer é o da cadeia alfa do TCR, que sofre apenas um rearranjo dos segmentos VJ. Após a recombinação somática o gene rearranjado pode ser transcrito e traduzido numa molécula de TCR montada funcional, ocorrendo a montagem das cadeias alfa e beta. Fonte: ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2021.

O pré-TCR transduz sinais que inibem o rearranjo do outro alelo da cadeia beta (exclusão alélica) e promove a diferenciação para o estágio de dupla expressão de CD4 e CD8. No estágio CD4⁺ CD8⁺ (duplo-positivo) do desenvolvimento de linfócitos T, essas células interagem com células epiteliais corticais com o intuito de testar a afinidade de interação do TCR com o complexo maior de histocompatibilidade (MHC)

de células epiteliais tímicas. Essa seleção dos timócitos CD4+CD8+ TCR alfa-beta requer o reconhecimento de complexos MHC-peptídeo próprio nas células epiteliais do timo, levando a um resgate das células da morte programada (GERMAIN, 2002).

Conforme os timócitos TCR alfa-beta amadurecem, eles migram do córtex para a medula do timo e tornam-se CD4+CD8- ou CD8+CD4- (GERMAIN, 2002). A seleção positiva é acompanhada pelo comprometimento com a linhagem. Isso resulta na combinação dos TCRs que reconhecem o MHC I com a expressão de CD8 e silenciamento de CD4; enquanto os TCRs que reconhecem moléculas de MHC II estão combinados com a expressão de CD4 e perda da expressão de CD8. Portanto, linfócitos que reconhecerem o MHC-I e II expressarão uma das moléculas correceptoras (CD8 ou CD4 respectivamente) e vão migrar do córtex para a medula do timo, enquanto as células que não tiverem afinidade com o MHC sofrerão apoptose, esse processo é denominado seleção positiva (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2021; HE; PARK; KAPPES, 2010).

Por fim, na medula, esta célula simples-positiva irá interagir com células epiteliais medulares especializadas (mTEC) que carregam antígenos próprios de variados tecidos do organismo, apresentando-os pela molécula de MHC. O fator de transcrição AIRE exerce um papel crucial nesta etapa, controlando a exposição de células T a diversas proteínas próprias e dirigindo a eliminação de linfócitos altamente reativos ao próprio organismo (ANDERSON; SU, 2011).

Neste processo de seleção negativa, linfócitos que reagirem ao antígeno próprio com alta afinidade sofrerão apoptose. Por outro lado, linfócitos que reconhecerem o antígeno próprio com baixa afinidade serão considerados maduros, e estarão prontos para migrar para periferia e povoar órgãos linfoides secundários, como o baço e linfonodos (PALMER, ED, 2003). Ainda, linfócitos que reconhecerem o antígeno próprio com afinidade moderada podem se diferenciar em células T reguladoras (BETTINI, MATTHEW L.; VIGNALI, 2010). Por fim, esses linfócitos que foram acometidos para se tornar células CD4⁺, são chamados de linfócitos T CD4 *naive* pois ainda não foram ativadas pelo reconhecimento de um antígeno em específico.

1.5 Maturação e ativação de linfócitos T CD4+

Como explicado anteriormente, os linfócitos T CD4 são maturados no timo e migram como células T CD4 *naive*, para os órgãos linfóides secundários, como baço e linfonodos (RICHARDS *et al.*, 2015). Neles as células T CD4 entrarão em contato com as células apresentadoras de antígeno (APC), como uma célula dendrítica, que, por meio do contato com o complexo principal de histocompatibilidade do tipo II (MHC-II) associado a um peptídeo, a depender do contexto irá ativar a célula (BUCK, MICHAEL D.; O'SULLIVAN; PEARCE, 2015).

Nesse momento, ocorre uma comunicação entre moléculas coestimuladoras e a consequente secreção de citocinas pela célula dendrítica para que o linfócito T CD4 *naive* diferencie em um perfil específico, existem diversos subtipos de linfócitos TCD4+, como T auxiliar do tipo 1 (Th1), T auxiliar do tipo2 (Th2), T auxiliar do tipo 17 (Th17) ou células T regulatórias (Tregs) (MARTINEZ-SANCHEZ *et al.*, 2018). Essa apresentação de antígenos envolve usualmente a presença de um patógeno ou de moléculas associadas ao dano celular, fazendo com que as APCs fagocitem e apresentem os antígenos via MHC II para o TCR de células T CD4, sendo este o primeiro sinal para a ativação de células T CD4 (Figura 3) (HEIDEN, MATTHEW G.VANDER; CANTLEY; THOMPSON, 2009).

Ademais, são necessários outros sinais coestimulatórios, que irão garantir a ativação desse linfócito, como a ligação de moléculas coestimuladoras pelas células dendríticas, envolvendo a ligação do B7 (CD80/86) das células dendríticas com o CD28 dos linfócitos T, sendo esse o segundo sinal. E por fim, o terceiro sinal de ativação, que consiste na secreção de citocinas pelas células dendríticas, que irão determinar a mudança de perfil dos linfócitos T CD4 para outros subtipos celulares mostrado na figura 2 (BUCK, MICHAEL D.; O'SULLIVAN; PEARCE, 2015; PEARCE, 2010).

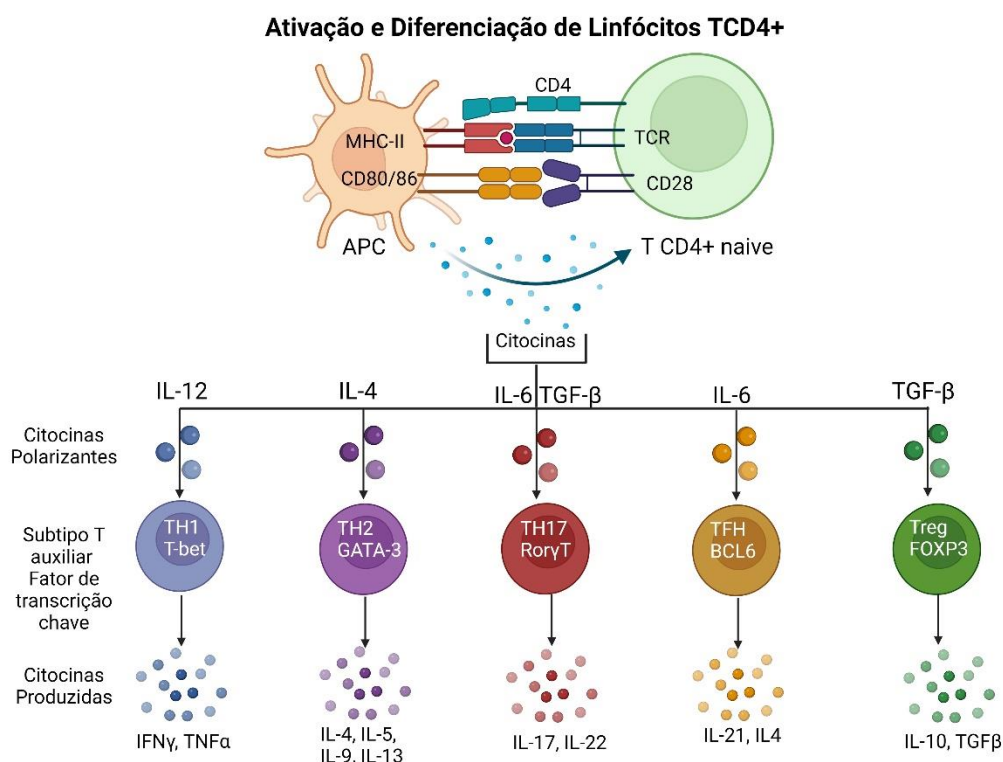


Figura 3: Esquema da Ativação e diferenciação de linfócitos T CD4+ naive. Linfócitos T *naive* são ativados via apresentação antigênica por uma célula apresentadora de antígenos (APC), como uma célula dendrítica. Essa célula fornece três sinais de ativação que irão ativar e polarizar os linfócitos. O primeiro sinal é a apresentação de um antígeno específico via MHC-II que o linfócito TCD4 *naive* irá reconhecer via TCR, em seguida ocorrem sinais coativadores que envolvem principalmente o reconhecimento do CD80 de uma APC pelo CD28 do linfócito TCD4 e por fim, o último sinal é a secreção de citocinas específicas que irão polarizar os linfócitos em subtipos específicos. Fonte: Autoria Própria.

Esses subtipos celulares ou perfis, variam de acordo com as citocinas secretadas: (i) IL-12 via STAT4 e a subsequente expressão de T-bet leva a polarização em células Th1; IL-4 via STAT6 e GATA-3 promove diferenciação em Th2; IL-6 e TGF-beta via STAT3 polariza em Th17, a qual expressa o fator de transcrição RoryT e apenas o TGF-beta via Foxp3 para o perfil Treg (Fig. 3) (MARTINEZ-SANCHEZ et al., 2018; SCHMITT; UENO, 2015). Existe outro subtipo de linfócito TCD4+ que possui um papel fundamental na maturação e ativação de linfócitos B, que são os linfócitos T foliculares (CROTTY, 2019). A diferenciação dessas células também depende da interação com uma célula apresentadora de antígeno, que realiza a secreção de IL-6 e ativação da molécula coestimulatória ICOSL, o que por sua vez ativa o fator de transcrição BCL6 e STAT5 (JOHNSTON *et al.*, 2009, 2012).. Linfócitos T foliculares secretam principalmente a citocina IL-21 e IL-4 (AVERY *et al.*,

2008; YU, DI *et al.*, 2009).

Dentre os diversos tipos de linfócitos TCD4 existentes, os subtipos investigados neste trabalho serão: Th1, Th17 e Treg. Uma vez que, um dos intuitos deste trabalho é o de verificar o efeito da deleção dos LXRs em doenças autoimunes e esses perfis de linfócitos em especial, possuem um importante papel na regulação da severidade e prevenção de doenças autoimunes e inflamatórias. Nesse processo inflamatório, linfócitos Th1 e Th17 atuam principalmente através da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e IL-17 e os Treg atuam através da produção de TGF- β e ação inibitória do CTLA-4 na ativação das células, inibindo então o processo inflamatório (DARDALHON *et al.*, 2008, 2018). Além disso, como explicado anteriormente, o papel dos receptores LXR na polarização de células T CD4, em especial dessas células mencionadas, ainda carece de estudos quanto ao impacto de cada isoforma desse receptor na sua funcionalidade.

No estudo feito por Herold *et al.* 2017, por exemplo, foi-se verificado que a ativação *in vitro* de LXRs de linfócitos T CD4 *naive*, por agonistas naturais ou sintéticos reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN-gama e IL-17, aumentando assim a diferenciação de Treg de 2 para 5% (HEROLD *et al.*, 2017b). Como essa taxa de diferenciação de células Tregs foi extremamente baixa (5%), ainda não é possível afirmar qual seria o real papel dos LXRs na diferenciação de linfócitos T CD4+ *naive*.

1.6 Metabolismo de Linfócitos T

Linfócitos T usam diferentes vias metabólicas baseadas no seu estado de diferenciação e memória. Num estado não ativado linfócitos T dependem principalmente da fosforilação oxidativa (OXPHOS) para sobreviver (Fig. 4-1) (CHO *et al.*, 1999; CIERI *et al.*, 2013). Porém, num contexto de ativação, frente a exposição a um antígeno, linfócitos T *naive* diferenciam em células efetoras e passam a usar a glicose e aminoácidos como uma fonte rápida de energia no intuito de secretar de forma efetiva citocinas, como IFN- γ e TNF- α (Fig. 4-2) (AHN *et al.*, 2018; GUDMUNDSDOTTIR; WELLS; TURKA, 1999; WHERRY; BLATTMAN; AHMED, 2005).

Estima-se que após a ativação de linfócitos T *naive* ocorra uma mudança de um perfil dependente de oxidação da glutamina e da produção de lactato através da OXPHOS para usar a glicólise anaeróbica e oxidação parcial da glutamina (67% de todo o lactato é produzido a partir do metabolismo da glicose e 33% do metabolismo da glutamina), sem alterar de forma significativa sua produção de ATP (BENTAL; DEUTSCH, 1993). Essa mudança da OXPHOS para o uso da glicólise, também conhecida como efeito Warburg (KORNBERG, 2020), é intimamente dependente da ativação da via do NF-kB nesses linfócitos (PALMER, CLOVIS S. *et al.*, 2015).

Após eliminar o antígeno causador da inflamação, muitas células T morrem, todavia, uma pequena fração dessas células sobreviventes podem formar linfócitos T de memória (Fig. 4-3), os quais possuem uma maior biogênese mitocondrial e OXPHOS mais eficiente (GETT; HODGKIN, 1998; VAN DER WINDT *et al.*, 2013; W VAN DER WINDT *et al.*, 2013). Esses linfócitos T de memória podem sobreviver por vários meses, ou até anos, até encontrarem o antígeno para o qual eles são específicos (Fig.4-4). Caso essas células encontrem novamente o antígeno, elas rapidamente se tornam em células efetoras de memória e mudam o seu metabolismo para a glicólise e o uso de aminoácidos de forma mais rápida e eficiente do que os linfócitos TCD4+ *naive* (Fig.4-5). Por fim, os linfócitos T que sobrevivem mantêm o uso da OXPHOS para persistir no corpo do hospedeiro por muitos anos (Fig.4-6) (GETT; HODGKIN, 1998; VAN DER WINDT *et al.*, 2013; W VAN DER WINDT *et al.*, 2013).

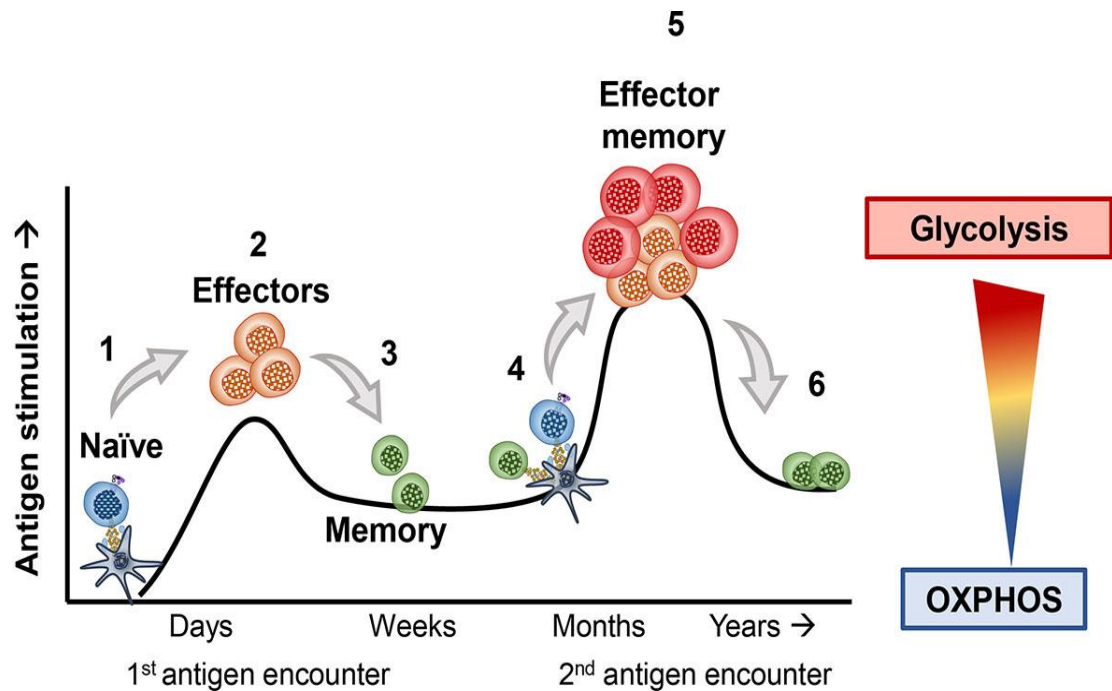


Figura 4: Adaptação metabólica de linfócitos T CD4+ após sua ativação. Linfócitos T *naive* apresentam um metabolismo dependente da fosforilação oxidativa (OXPHOS), num contexto de ativação essas células tornam-se em células efetoras e apresentam uma alta taxa de glicólise. Após a resposta imune, algumas células sobrevivem e viram células de memória, com um metabolismo dependente da OXPHOS. Numa re-exposição ao antígeno células de memória são rapidamente ativadas e mudam seu metabolismo para o uso da glicólise de forma mais eficiente do que células efetoras comuns. As células de memória sobreviventes a essa ativação voltam a depender da OXPHOS e podem sobreviver por anos no organismo. Fonte: RANGEL RIVERA et al., 2021.

Linfócitos T *naive* podem permanecer viáveis durante todo o período de vida do ser humano (NASI *et al.*, 2006). Esses linfócitos só se tornam ativos após o encontro com os respectivos antígenos para os quais eles são específicos, todavia, surge o questionamento sobre como essas células são capazes de permanecer viáveis por tanto tempo. Como representado na figura 5-A, linfócitos T *naive* só podem sobreviver quando citocinas homeostáticas, como interleucina 7 (IL-7), provê os sinais necessários para ativar vias de sobrevivência no linfócito, principalmente via sinalização da Akt (RATHMELL *et al.*, 2000b; WOFFORD *et al.*, 2008).

A ativação via Akt é capaz de promover diversas alterações metabólicas em linfócitos T, dentre elas a translocação do transportador 1 de glicose (GLUT1) para a superfície da célula, com o intuito de aumentar assim a entrada de glicose (EDINGER; THOMPSON, 2002). A glicose é metabolizada em piruvato, um substrato que pode entrar então na mitocôndria e ser usada, por exemplo, para a síntese de triacil-glicerol, que serve como uma fonte para a síntese de lipídios. Além da glicose,

diversos outros nutrientes são necessários para diferenciar linfócitos T *naive* em linfócitos efetores após o encontro com o antígeno, como glutamina e L-arginina, representado na figura 5-B. Por fim, em comparação com os perfis efetores e *naive*, linfócitos T de memória apresentam um perfil metabólico dependente da biogênese e fusão mitocondrial, assim como na oxidação de ácidos graxos (Fig.5-C) (BENTAL; DEUTSCH, 1993; DEBERARDINIS; LUM; THOMPSON, 2006).

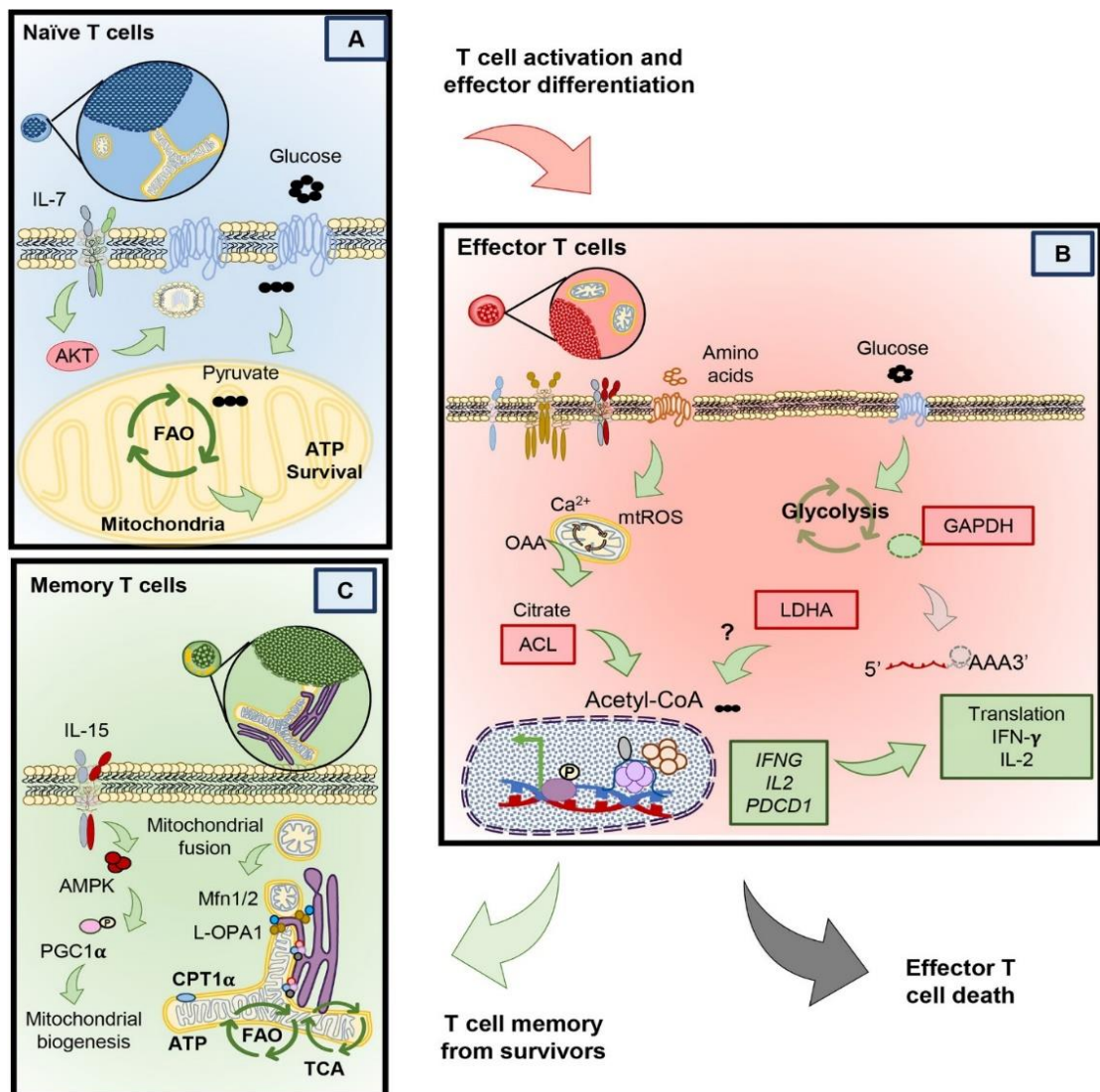


Figura 5: Diferentes Programas metabólicos de Linfócitos T. (A) Linfócitos T *naive* dependem da fosforilação oxidativa e da oxidação de ácidos graxos como fonte energética, a IL-7 promove sinais de sobrevivência para essa célula. (B) Num contexto de ativação, linfócitos T dependem principalmente do metabolismo glicolítico, com o favorecimento da translocação do transportador de glicose GLUT1 para a superfície da célula para que ocorra a entrada de mais glicose. (C) Células T de memória por

outro lado, apresentam um perfil metabólico dependente da biogênese mitocondrial e da oxidação de ácidos graxos. Fonte: RANGEL RIVERA *et al.*, 2021.

1.7 Importância dos linfócitos T CD4+

As diversas populações de linfócitos T CD4 atuam tanto em processos pró-inflamatórios como anti-inflamatórios, onde o aumento da população de células Tregs, está relacionado com a melhora do prognóstico em diversas doenças (EGGENHUIZEN; NG; OOI, 2020; ROMANO *et al.*, 2019), principalmente naquelas mediadas por linfócitos T, como as hipersensibilidades do tipo tardia (DTH) (KOUTROLOS *et al.*, 2014).

Também conhecida como hipersensibilidade do tipo IV, esse tipo de hipersensibilidade envolve principalmente a resposta à antígenos próprios ou estranhos por células Th1 e Th17. Inicialmente o indivíduo será sensibilizado ao antígeno, fazendo com que uma célula apresentadora de antígeno migre para o linfonodo e ative uma célula T específica, ocorrendo o processo de expansão clonal que leva alguns dias. Num segundo contato com o mesmo antígeno, essas células serão ativadas e irão secretar citocinas que vão recrutar e ativar leucócitos gerando um processo inflamatório (ACTOR, 2019b, a).

A importância da ação das células Treg envolve principalmente a supressão desse perfil pró-inflamatório, por meio da ligação do seu CTLA-4 com a molécula coestimuladora B7 nas APCs e por meio da secreção de IL-10, que inibe a produção de citocinas inflamatórias e TGF- β (BETTINI, MARIA; VIGNALI, 2009). Dessa forma, a ativação ou supressão dos receptores LXR em células T CD4, por meio do uso de agonistas ou antagonistas sintéticos, poderia alterar o perfil inflamatório, uma vez que a SUMOilação de LXR inibe a transcrição de genes pró-inflamatórios (LEE *et al.*, 2016). Essa SUMOilação poderia então, alterar o perfil de polarização das células T CD4.

Esse quadro seria possível, pois já se foi demonstrado na literatura, que a inibição da transcrição de genes pró-inflamatórios, que por sua vez reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, podem influenciar na diferenciação de células T CD4 (DUPAGE; BLUESTONE, 2016; MURPHY; STOCKINGER, 2010). Embora muitos estudos tenham sido desenvolvidos com intuito de entender os mecanismos pelos quais LXRs desempenham funções anti-inflamatórias, pouco se sabe sobre como cada isoforma dos LXRs modula a polarização de células T CD4. Além disso,

apesar de a SUMOilação afetar diretamente a função de LXRs, os efeitos que essa mudança pós-traducional pode exercer sobre a diferenciação de células T CD4 permanece desconhecido. Dessa forma, uma vez que a SUMOilação de LXR inibe a transcrição de genes pró-inflamatórios, com este trabalho visamos investigar como a ativação ou supressão de receptores LXR pode alterar o perfil inflamatório em células TCD4+ (FESSLER, 2018) e o papel de cada isoforma desse receptor nesse processo.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo desse estudo é o de analisar o papel dos LXRs na polarização de células T CD4.

2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar como LXR α e LXR β regula a polarização de células T CD4 naive em células Th1, Treg ou Th17;
- b) Investigar o padrão de expressão de LXR α e LXR β em células T CD4+ naive e em células T CD4 polarizadas em TH1, TH17 e Treg;
- c) Estudar o como a deleção de LXRs afeta a proliferação de células T CD4;
- d) Avaliar se a SUMOilação de LXR influencia a polarização de células T CD4 *naive* em células Th1, Th17 ou Treg;
- e) Determinar como os LXRs modulam a polarização de células T CD4 *naive* em células Th1, Th17 ou Treg *in vivo*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

As análises aqui descritas foram realizadas no Laboratório de Imunometabolismo (LIM), localizado no Instituto de Biologia da Faculdade Estadual de Campinas (IB/Unicamp). Camundongos com idade entre 6-20 semanas do fundo C57BL/6J foram usados em todos os experimentos. Animais selvagens foram obtidos do centro multidisciplinar para investigação biológica na área da ciência em animais de laboratório (CEMIB) da UNICAMP. Animais LXR α -/- e LXR β -/- foram comprados da *Jackson Laboratories* e mantidos no biotério de camundongos do DGEMI DBBT/IB/UNICAMP. O uso de animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Unicamp), cadastrada pelo protocolo 5913-1/2021. Os animais foram mantidos em condições controladas livre de patógenos no biotério de camundongos do DGEMI DBBT/IB/UNICAMP, acondicionados em micro-isoladores coletivos, contendo no máximo cinco animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 22°C e com suprimento de água (filtrada) e alimento (ração padrão) autoclavados *ad libitum*, com sistema de exaustão.

3.2 Diferenciação de Linfócitos TCD4 naive

Leucócitos de animais WT e deficientes em LXR α e LXR β (LXR α KO e LXR β KO) foram obtidos de amostras de baço e linfonodos (axilar, inguinal e mesentérico). As amostras foram removidas cirurgicamente e acondicionadas em PBS (do inglês *Phosphate-buffered saline*; Gibco), em seguida despejadas em um filtro celular (Corning) de 100 μ m e maceradas sobre um tubo Falcon 50mL com o auxílio de um êmbolo de seringa. A suspensão de células obtida foi centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm a 4°C e o sedimento ressuspendido em 1 mL do tampão de separação para isolamento de T CD4 *naive* (PBS; 0,5% BSA; 2 mM EDTA).

Células CD4 *naive* foram isoladas por seleção negativa em coluna de separação magnética EasySep™ (StemCell) com uso do Kit MojoSort™ CD4 *naive* (Biolegend), as células foram ressuspendidas em meio RPMI completo (10% de SBF, 1% de penicilina/streptomicina, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de vitamina, 1% de piruvato e 55uM de β -mercapto). O número de células foi ajustado para 2×10^5 células/mL e foram plaqueadas em placa de 96 poços de fundo chato contendo anti-CD3 (2 μ g/ml) aderido a placa e anti-CD28 (4 μ g/ml) solúvel.

Em seguida, as células foram tratadas com o inibidor de Sumoilação 2D08 e agonistas de LXR (Tabela 1) por 30 minutos e estimuladas com citocina recombinante TGF- β 1 (20 ng/mL; R&D Systems) para polarização em um perfil Treg, IL-12 (10 ng/ml; Peprotech) para polarização em um perfil Th1 ou IL-6 (50 ng/ml. Peprotech) e TGF- β 1 (1 ng/mL; R&D Systems) para TH17. As concentrações do agonista de LXR e 2D08 foram escolhidas após experimentos prévios e ajustadas para a concentração mínima necessária. Células foram cultivadas em meio RPMI completo por 3 dias a 37°C, 5% de CO₂ e analisadas por meio da técnica de citometria de fluxo. Os compostos foram diluídos em DMSO (dimetilsulfóxido).

Tabela 1: Concentração utilizada do inibidor de sumoilação (2D08) em experimento de diferenciação de células T CD4+.

Moduladores	Concentração Utilizada (μM)
GW3965	3
PFG2- α	5
2D08	1

3.3 Análise por Citometria de Fluxo

As diferentes amostras de suspensão celular foram processadas para identificação dos subtipos celulares, através da marcação com anticorpos. A leitura das amostras foi realizada no equipamento BD FACSymphony A5 SE (BD Biosciences), usando o software FACSuite (BD Biosciences). Os resultados obtidos foram analisados no software FlowJo (Tree Star, San Carlo, CA). Para a marcação de citocinas intracelulares, as células foram tratadas com PMA (50 ng/ml; Sigma-Aldrich) e Ionomicina (500 ng/ml; Sigma-Aldrich) por 1 hora seguido da adição de Brefeldina A (10 μ g/mL; Sigma-Aldrich) por mais 3 horas. Posteriormente, foi utilizado o kit BD Cytofix/Cytoperm™ conforme descrito pelo fabricante (BD Bioscience) para permeabilização e fixação das células e marcação intracelular de citocinas. Para a marcação do fator de transcrição Foxp3 foi utilizado o kit Foxp3/Transcription Factor

Staining Buffer Set (e-Bioscience), conforme descrito pelo fabricante. Os conjugados de anticorpo-fluorocromo (Biolegend) estão especificados na Tabela 2.

Tabela 2: Anticorpos usados na Citometria de Fluxo

Marcador	Fluorocromo	Clone
CD4	Apc-Cy7/BV785	GK1.5
CD8	PerCP-Cy5.5/Apc-Cy7	YTS156.7.7
IFN- γ	PE/APC	XMG1.2
Foxp3	PE	FJK-16s
IL-17	BUV421	TC11-18H10.1
Live/Dead	BB515/BUV495	-
TCR β	PECF594	H57-597
CD44	FITC	IM7
CD62L	PECY7	MEL-14

Para a estratégia de gates, inicialmente foi selecionado com base nos dados de SSC e FSC (tamanho e granulosidade) a população de linfócitos. Em seguida, dentro dessa seleção foram selecionados apenas as células únicas (do inglês *singlets*) e, por fim, dentro dessa segunda seleção, foram selecionados os linfócitos T CD4+ vivos (CD4 positivos e *Live/Dead* negativos).

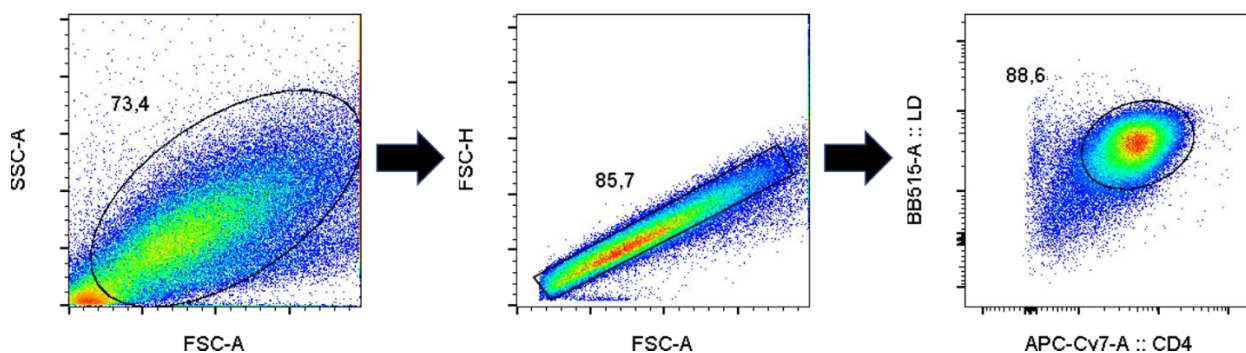


Figura 6: Estratégia de Gates para análise por Citometria de Fluxo. Inicialmente com, base nos dados de tamanho e granulosidade, a população de linfócitos foi escolhida e dentro dessa população foram escolhidas as células únicas (do inglês *singlets*). Por fim, dentro da seleção dos *singlets* foram selecionados os linfócitos positivos para a marcação de TCD4 e negativos para a marcação de *live and dead* configurando então os linfócitos TCD4 vivos.

3.4 Dosagem de citocinas extracelulares

Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados e as citocinas foram dosadas por ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utilizando-se os kits ELISA MAX™ (BioLegend) para as citocinas IL-17 e IFN- γ conforme as instruções do fabricante.

3.5 Western Blotting

Culturas celulares contendo T CD4 diferenciadas ou não, foram lisadas e as proteínas foram extraídas para realizar o protocolo de Western Blotting. Tal protocolo foi feito seguindo o método de eletroforese descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970), para separação de proteínas. Uma alíquota de 15 μ g de proteína foi dissolvida em 30 μ L de tampão de amostra (água destilada, Tris-HCl 500 mM, pH 6,8, glicerol, SDS-sódio dodecil sulfato 10%, - mercaptoetanol e bromofenol azul 0,05%). Em seguida, a amostra foi aquecida em banho seco a 95°C por 5 minutos. A amostra foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5%, sob uma tensão de 150 V e corrente de 30 mA.

As massas moleculares das proteínas foram determinadas por comparação com a migração das proteínas padrão Rainbow ou DualColor (BioRad). Após a eletroforese em gel de poliacrilamida, foi realizado o imunoblotting, transferindo-se eletroforéticamente as proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Essa membrana foi incubada com solução bloqueadora 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé) em TBST (Tris-HCl 200 mM, contendo NaCl 500 mM, Tween20, pH 7,5), durante 1 hora, antes da incubação overnight, a 4°C, com anticorpos primários específicos representados na tabela 3. Após a incubação com o anticorpo, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário específico por 1 hora. As etapas subsequentes foram realizadas com o sistema biotina-streptavidina (Amersham Pharmacia Biotech) conforme a recomendação do fabricante.

Tabela 3 - Anticorpos usados no Western Blotting.

Anticorpo	Catálogo
β -Actina	4970
pP-65	ma5-15160
p-65	701079
LXR α	ab176323
LXR β	ab56237
Vinculina	139010S

3.6 PCR em tempo real

Células T CD4+ *naive* de animais WT foram obtidas como descrito anteriormente em 3.2. Posteriormente, as células foram coletadas para extração do RNA mensageiro (mRNA). O RNA total foi extraído com o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) contendo DNAase conforme recomendado pelo fabricante. O cDNA foi obtido com kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega), conforme as instruções do fabricante. O PCR em tempo real foi feito usando a enzima Real-Time iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) com oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 4). O resultado foi calculado com a fórmula $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ da amostra teste – ΔCt da amostra controle, onde $\Delta Ct = Ct$ gene estudado – Ct 18s (gene constitutivamente expresso, utilizado como controle interno da reação).

Tabela 4 - Sequência de oligonucleotídeos iniciadores usados para ensaio de PCR em tempo real.

Gene	Sequência
Abca1	Forward: 5'-AACAGTTTGTGGCCCTTTTG-3' Reverse: 5'-AGTTCCAGGCTGGGGTACTT-3'
Abcg1	Forward: 5'-GGTCCTGACACATCTGCGAA-3' Reverse: 5'-CAGGACCTTCTTGGCTTCGT-3'

LXR α	Forward: 5'-CGACAGTTTTGGTAGAGGGACA-3' Reverse: 5'-GAGAAACATCAGGCATTGAGGC-3'
LXR β	Forward: 5'-CGCCACGTCACCCACTATT -3' Reverse: 5'- TCCTCTGGCTCCACGATGTA-3'
ApoE	Forward: 5'-ACAGATCAGCTCGAGTGGCAA-3' Reverse: 5'-ATCTTGCGCAGGTGTGTGGAGA-3'
Glut1	Forward: 5'-GCTGTGCTTATGGGCTTCTC-3' Reverse: 5'-CACATACATGGGCACAAAGC-3'
Tbx21	Forward: 5'-AGCAAGGACGGCGAATGTT-3' Reverse: 5'-CCACCTGGGAATTCAACATC-3'
FOXP3	Forward: 5'-CCCATCCCCAGGAGTCTT-3' Reverse: 5'-CCATGACTAGGGGCACTGTA-3'
RORC	Forward: 5'-GACCCACACCTCACAAATTGA-3' Reverse: 5'-AGTAGGCCACATTACACTGCT-3'
SREPB1a	Forward: 5'-GCGCCATGGATTGCACATT-3' Reverse: 5'-TTGGCACCTGGGCTGCT-3'
18s (Endógeno)	Forward: 5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3' Reverse: 5'-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3'

3.7 Imunofluorescência de Confocal

Células T CD4⁺ naive de animais WT foram obtidas e diferenciadas como descrito anteriormente em 3.2 e plaqueadas numa concentração de 1×10^6 células em 500 μ L (2×10^6 células/mL) em lamínulas numa placa de 48 poços. As lamínulas foram tratadas previamente com Poly D-Lisina, numa concentração de 15 μ Mol (100 μ L/poço) por 1 hora a 37°C. Em seguida, elas foram lavadas duas vezes com PBS 1X antes do plaquear as células. Após 3 dias de ensaio, para assegurar a diferenciação dos linfócitos TCD4⁺, o sobrenadante foi removido e o meio com o marcador de

interesse foi adicionado.

Para a marcação de corpúsculos lipídicos e mitocôndrias, preparou-se uma solução com o marcador BODIPY 493/503 (10 μ M) e Mitotracker Red CMXRos (200nM), respectivamente, em um volume de 0.5 mL/poço de meio RPMI completo aquecido sem soro, misturado vigorosamente. A solução foi então, adicionada às células por 40 min à 37°C.

Posteriormente, as células foram fixadas com PFA 4% por 15 min à temperatura ambiente, lavadas com PBS duas vezes e marcadas com o marcador para núcleo DAPI (1:1000) diluído em PBS por 5 min, em temperatura ambiente. Após a incubação, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS e, montadas com o meio de montagem, Prolong (ThermoFisher), sobre as lâminas.

A aquisição das imagens foi realizada por meio do microscópio confocal de super resolução LSM880 Airyscan com uma objetiva de 63x/1.4 a óleo. Para quantificação, foram utilizadas imagens 3D com z-step de 0,5 μ M de incremento, 1024x1024 de tamanho e 16 bits. Os lasers 405 nm, 488 nm e 597 nm (potência de 2%) foram usados para a aquisição de DAPI, Bodipy e Mitotracker, respectivamente.

O processamento das imagens foi realizado com o software FIJI/ImageJ, utilizando os seguintes comandos: "Gaussian blur filter"; "Subtract background" para remover ruídos de fundo e "Threshold" para binarização. As imagens foram então analisadas por meio do plugin "Mitochondrial Analyzer" (Version 2.0.2, 2019, Ahsen Chaudhry).

A análise para a quantificação dos corpúsculos lipídicos foi realizada de forma semelhante, onde na última etapa foram usados os comandos "Convert to Mask" para a binarização e, "Analyze Particles" para quantificação dos corpusuculos lipidicos maiores que 0.10.

3.8 Imunização de animais com Ovalbumina

Os animais WT, LXR α KO, LXR β KO foram imunizados por meio da via intramuscular com solução contendo 5 mg/mL de ovalbumina de galinha (OVA) emulsificada em adjuvante completo de Freund (CFA; do inglês, *complete freund's adjuvante*), aplicando-se 100uL da emulsão por animal. Após 7 dias, os animais foram

eutanaziados, os linfonodos axilares foram coletados, macerados e colocados em cultura. As células foram ressuspensas em meio RPMI completo (10% de SBF, 1% de penicilina/streptomicina, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de vitamina, 1% de piruvato e 55uM de β -mercapto). Foram plaqueadas 200 mil células por poço numa placa de 96 poços, e as células foram reestimuladas com ovalbumina (OVA) numa concentração de 100 ug/mL diluída em PBS e incubadas por 3 dias na estufa a 37°C para a análise por citometria de fluxo e marcação para IFN- γ e CD4 (TH1) e IL-17 e CD4 (TH17). Durante os 3 dias de ensaio o sobrenadante foi coletado para a realização de ELISA de IL-17 e IFN- γ .

3.8.1 DTH

A DTH ao peptídeo OVA foi quantificada pelo inchaço relativo da pata posterior, em um período de 6-72h. Os animais imunizados foram desafiados, 7 dias após a imunização, com 100 μ g do peptídeo OVA em 50 μ L de PBS, na pata posterior esquerda de forma intradérmica. Apenas PBS foi injetado na pata posterior direita como controle. O inchaço da pata posterior esquerda relativa à pata direita foi mensurado em intervalos de 0, 8, 24, 32, 48, 56 e 72h, após o desafio, com o auxílio de um paquímetro (Insize, São Paulo, Brasil). Os resultados foram apresentados como um inchaço da pata desafiada com o antígeno OVA relativamente a pata contralateral controle.

3.9 Análise Estatística

Os dados foram apresentados pelo valor da média e erro padrão (SEM). Para a realização da análise estatística utilizou-se o programa GraphPad PRISM 5.0. Inicialmente, foi aplicado um teste de análise de variância (ANOVA) seguida de teste Tukey para comparar os dados entre os diferentes grupos experimentais ou Teste 'T' não pareado para análises entre apenas 2 grupos. Foram considerados significativos os valores com *p <0.05.

4 RESULTADOS

4.1 A deleção de LXR α e LXR β afeta o desenvolvimento de linfócitos T

Nosso primeiro passo foi o de confirmar a deleção das duas isoformas do LXR do nosso modelo. Assim, isolamos linfócitos CD4+ *naive* de camundongos LXR α ^{-/-} e LXR β ^{-/-} *knockout* (KO) a partir de baço e linfonodos e realizamos um *Western Blott* para as duas isoformas de LXR. Verificamos assim, na figura 7A que a nossa deleção para as duas isoformas do LXR estava ocorrendo de forma específica. Uma vez que é possível observar no *Western Blott* no camundongo LXR α KO a deleção somente da isoforma alfa e no LXR β KO apenas a deleção da isoforma beta. Em seguida, isolamos linfócitos CD4 *naive* do baço, onde foram analisados a expressão dos genes alvo de LXR. Observamos que a expressão dos genes ABCG1 e APOE é nula em células de animais LXR α e LXR β KO, enquanto a de ABCA1 é menor principalmente quando o LXR β é deletado (Fig. 7B).

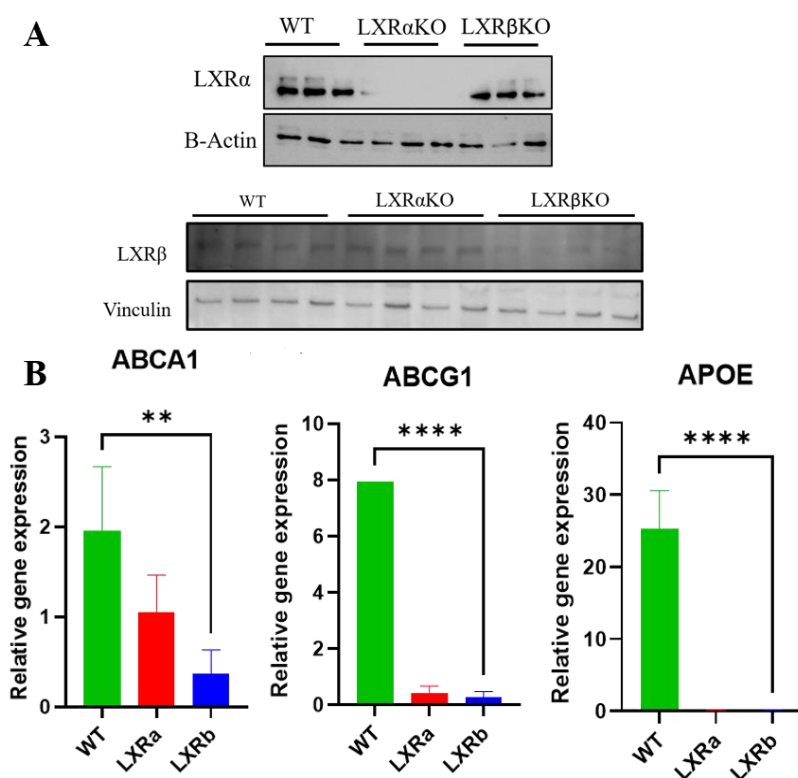


Figura 7: Expressão relativa de LXR e de seus genes alvos em linfócitos TCD4+ *naive*. (A) Baço e linfonodos foram isolados e os linfócitos TCD4+ *naive* foram isolados por meio do uso de *beads* magnéticas para a realização de *Western blot* para as duas isoformas de LXR. Foi observado que a deleção de LXR alfa e beta impede a sua expressão em linfócitos TCD4+ *naive*. (B) O baço foi coletado de camundongos WT, LXR α e LXR β , os linfócitos TCD4+ *naive* foram isolados via separação magnética, em seguida o mRNA foi extraído e foi feito PCR em tempo real para genes alvos de LXR e LXR α e LXR β . O gene 18s foi usado como gene endógeno. Gráficos em barras representativo de 3 experimentos independentes (n=3). * p < 0,05. Dados apresentam o valor da média e erro padrão (SEM).

Posteriormente, realizamos uma caracterização do perfil das populações CD4 e CD8 no timo e na periferia, analisamos linfonodos inguinais e mesentéricos de animais deficientes em LXR α ou LXR β , com o intuito de observar a importância das duas isoformas na maturação e frequência dessas células. Nos linfonodos inguinais não foi possível observar diferenças entre os grupos. Por outro lado, observamos que a deleção de das duas isoformas do LXR afetam o desenvolvimento de linfócitos CD8+ no timo e diminuindo a porcentagem de linfócitos duplo positivos (Fig.8B), principalmente quando a isoforma beta é deletada. Também observamos uma redução na porcentagem de linfócitos CD8 simples positivos (Fig. 8B), com essa redução ocorrendo tanto quando a isoforma alfa quanto a beta do LXR são deletadas, sem diferenças, no entanto, quanto a porcentagem de linfócitos CD4+ entre as condições analisadas.

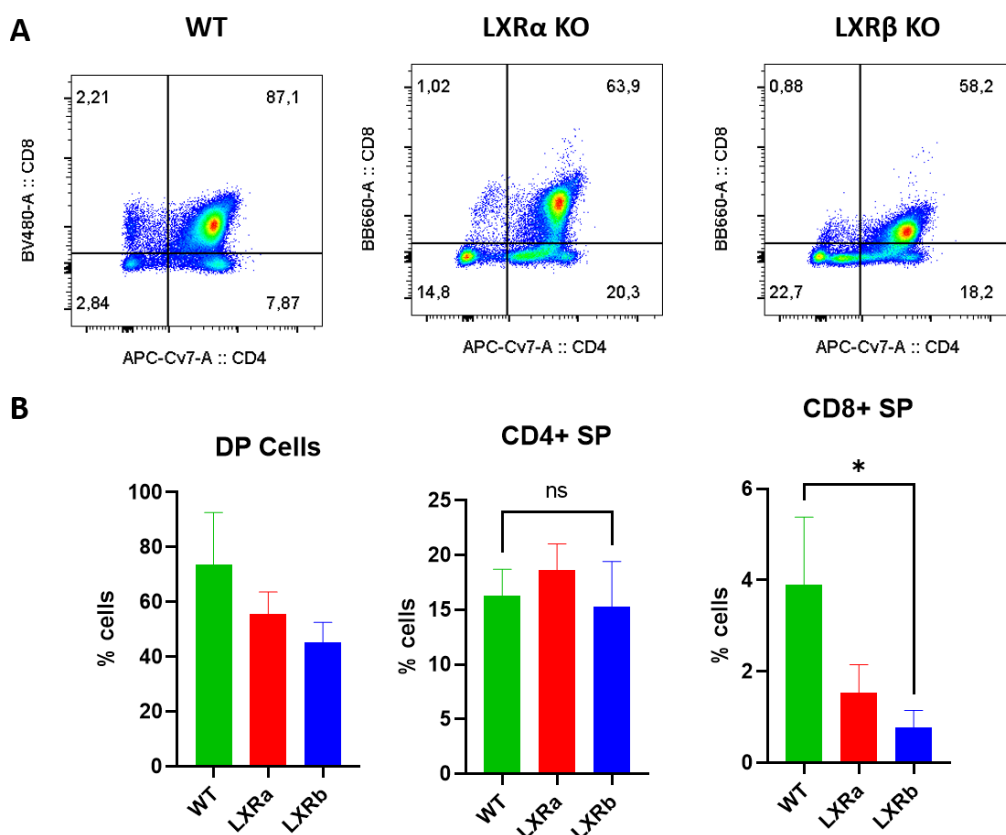


Figura 8: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos CD8+ e CD4+ no Timo. O timo foi coletado de camundongos WT, LXR α e LXR β macerado e marcados para citometria. (A) Dot plots representativos para a marcação de linfócitos TCD4 e TCD8, foi possível observar uma redução na porcentagem de linfócitos duplo positivos nos animais deletados para as duas isoformas de LXR. Foram utilizados os anticorpos para citometria Zombie aqua (BUV495); CD4 (APCCY7); CD8 (BV480). (B)

Gráficos em barras representativos de 3 experimentos independentes (n=3). * p <0,05. Dados apresentam o valor da média e erro padrão (SEM).

Em seguida, realizamos a análise do perfil dessas células na periferia (linfonodos inguinais e mesentéricos), não conseguimos observar diferenças quanto aos níveis de linfócitos TCD4+ e CD8+ nos linfonodos inguinais, todavia observamos que nos linfonodos mesentéricos ocorreu uma redução na porcentagem de linfócitos *naive* CD4+ CD62+ CD44- quando a isoforma beta do LXR é deletada e não observamos diferenças quanto as porcentagens dos linfócitos de memória CD4+ CD62- CD44+ (Fig.9A). Quanto aos linfócitos CD8+, foi possível observar, assim como nos linfócitos CD4+, uma redução linfócitos *naive* CD8+ CD62+ CD44- e um aumento nos linfócitos de memória CD8+ CD62- CD44+, principalmente quando a isoforma beta é deletada. Por fim, também foi observado um aumento na porcentagem de linfócitos CD8+ duplo positivos (Fig.9B). Esse quadro observado pode ser consequência de problemas na maturação dos linfócitos observados anteriormente no timo (Fig.8).

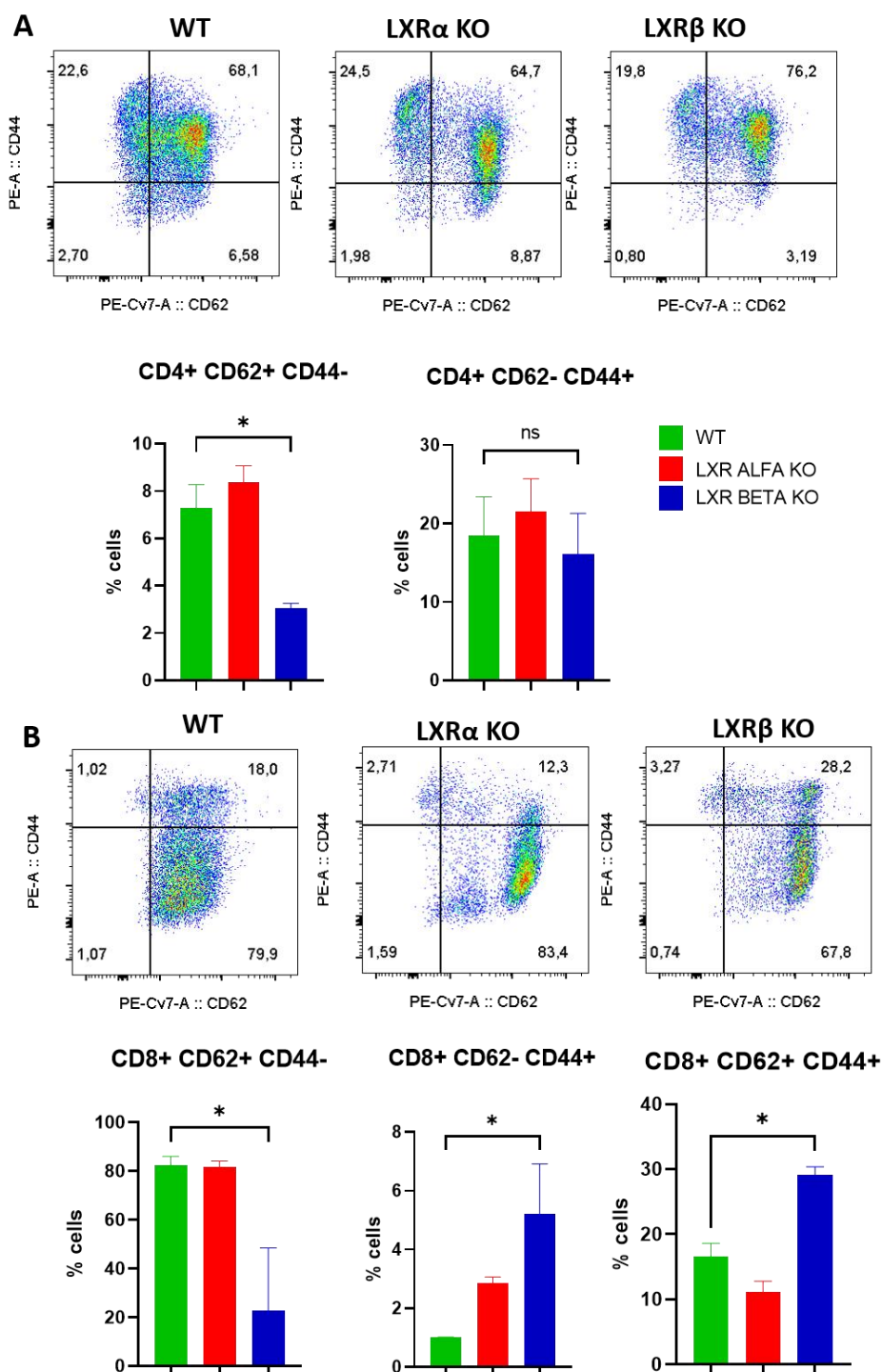


Figura 9: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos CD8⁺ e CD4⁺ no linfonodo mesentérico. Os linfonodos mesentéricos foram coletados de camundongos WT, LXR α KO e LXR β KO, macerados e em seguida marcados para citometria. (A) Dot plots representativos para a marcação de linfócitos TCD4. (B) Dot plots representativos para a marcação de linfócitos TCD8. Foram utilizados os anticorpos para citometria: Zombie aqua (BUV495); CD4 (BV785); CD8 (APCCY7); CD44 (PE); CD62L (PECY7). Gráficos em barras representativos de 3 experimentos independentes (n=3). * p < 0,05. Dados apresentam o valor da média e erro padrão (SEM).

4.2 A deleção de LXR α e LXR β afeta a diferenciação de linfócitos TCD4

Após entender a importância dos LXRs em células CD4+ não diferenciadas, partimos para entender como a deleção das duas isoformas do LXR afetaria a diferenciação de células T CD4 *naïves* em linfócitos TH1, Treg e TH17. Inicialmente observamos que nas células dos camundongos deletados para LXR α e LXR β ocorreu uma redução na porcentagem de linfócitos CD4+ IFN- γ + (Th1) (Fig. 10), sendo essa redução maior nas células do camundongo deficiente para LXR β . Verificamos também um quadro semelhante quanto a porcentagem de células CD4+ FOXP3+ (Fig. 11) e CD4+ IL-17+ (Th17) (Fig. 12).

Além disso, também observamos uma redução nos fatores de transcrição chave para a diferenciação de cada isoforma de linfócito, observando uma redução no fator de transcrição T-bet (10B), FOXP3 (11B) e ROR γ T (12B). Essa redução, em todos os casos, foi mais evidente quando a isoforma beta do LXR está deletada, o que sugere que essa isoforma provavelmente tem um papel mais importante na diferenciação de linfócitos TCD4+.

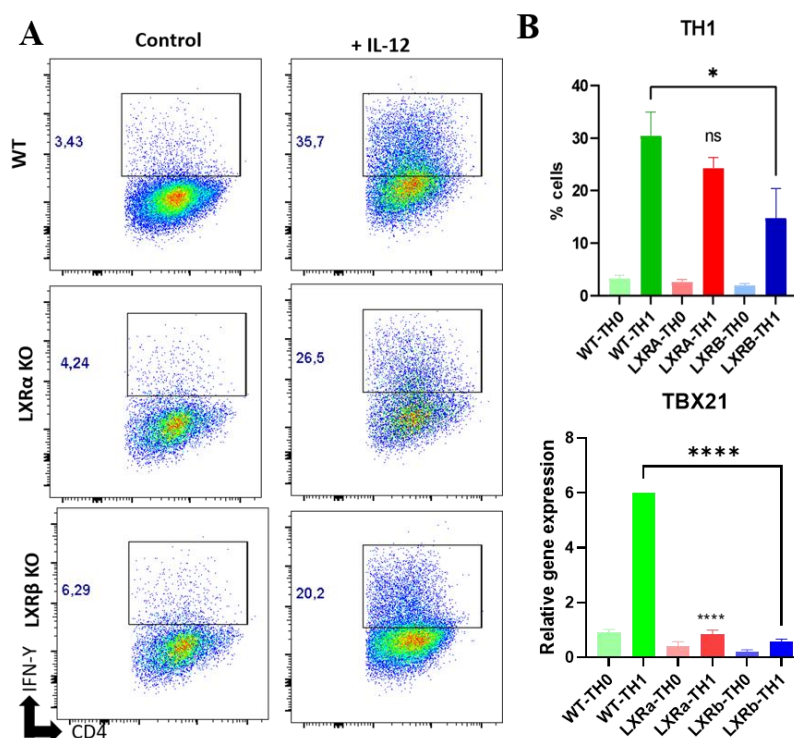


Figura 10: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos TH1, mostrando a frequência de células CD4+IFN- γ +. Os linfonodos foram coletados de camundongos WT, LXR α KO e LXR β KO e em seguida

macerados. Os linfócitos CD4 naive foram isolados por meio de separação magnética e cultivados por 3 dias sob estímulos de IL-12, anti-CD3 e anti-CD28 e marcadas para detecção intracelular da citocina IFN- γ . O controle representa uma amostra em que não foi adicionado IL-12. Cores dos anticorpos Zombie green (BB515); CD4 (APCCY7); IFN- γ (PE). Gráficos em barra representativo de 3 experimentos independentes (n=3). * p < 0,05. Dados apresentam o valor da média e erro padrão (SEM).

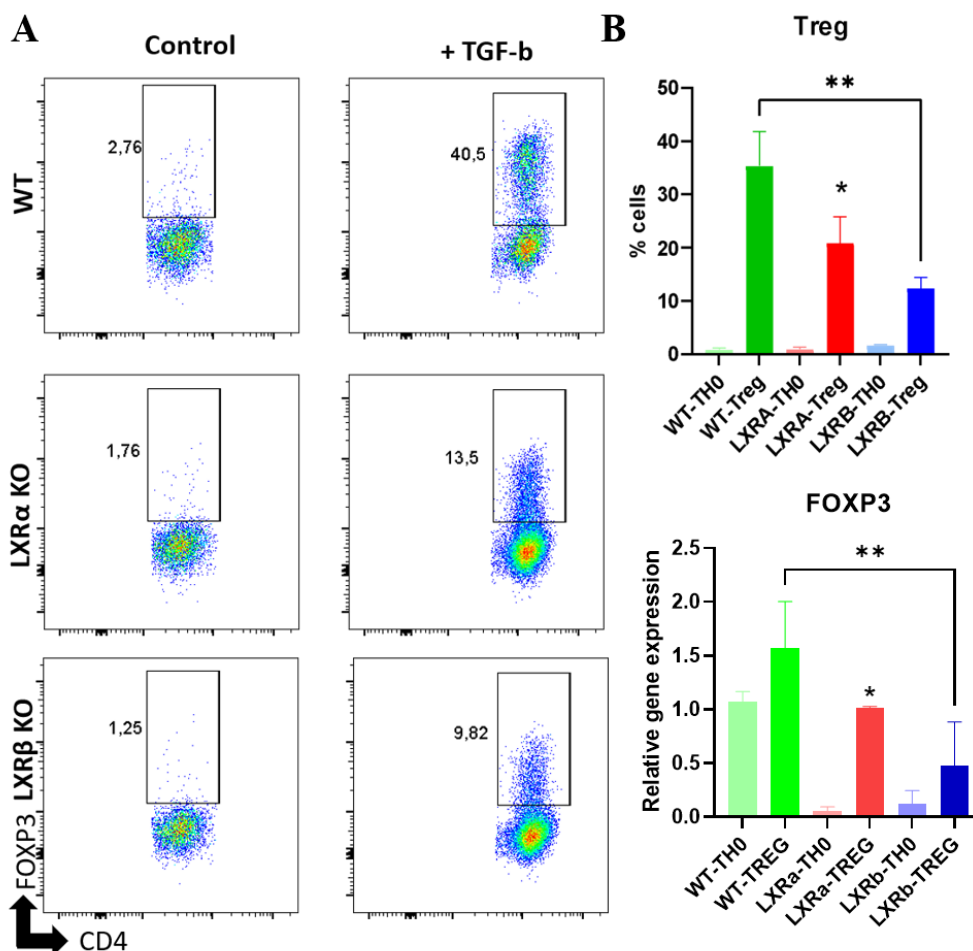


Figura 11: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos Treg, mostrando a frequência de células CD4+FOXP3+. Os linfonodos foram coletados de camundongos WT, LXR α KO e LXR β KO e em seguida macerados. Os linfócitos CD4 naive foram isolados por meio de separação magnética e cultivados por 3 dias sob estímulos de TGF- β , anti-CD3 e anti-CD28 e marcadas para detecção do fator de transcrição Foxp3. O controle representa uma amostra em que não foi adicionado TGF- β . Cores dos anticorpos Zombie green (BB515); CD4 (APCCY7); FOXP3 (PE). Gráficos em barra representativo de 3 experimentos independentes (n=3). * p < 0,05. Dados apresentam o valor da média e erro padrão (SEM).

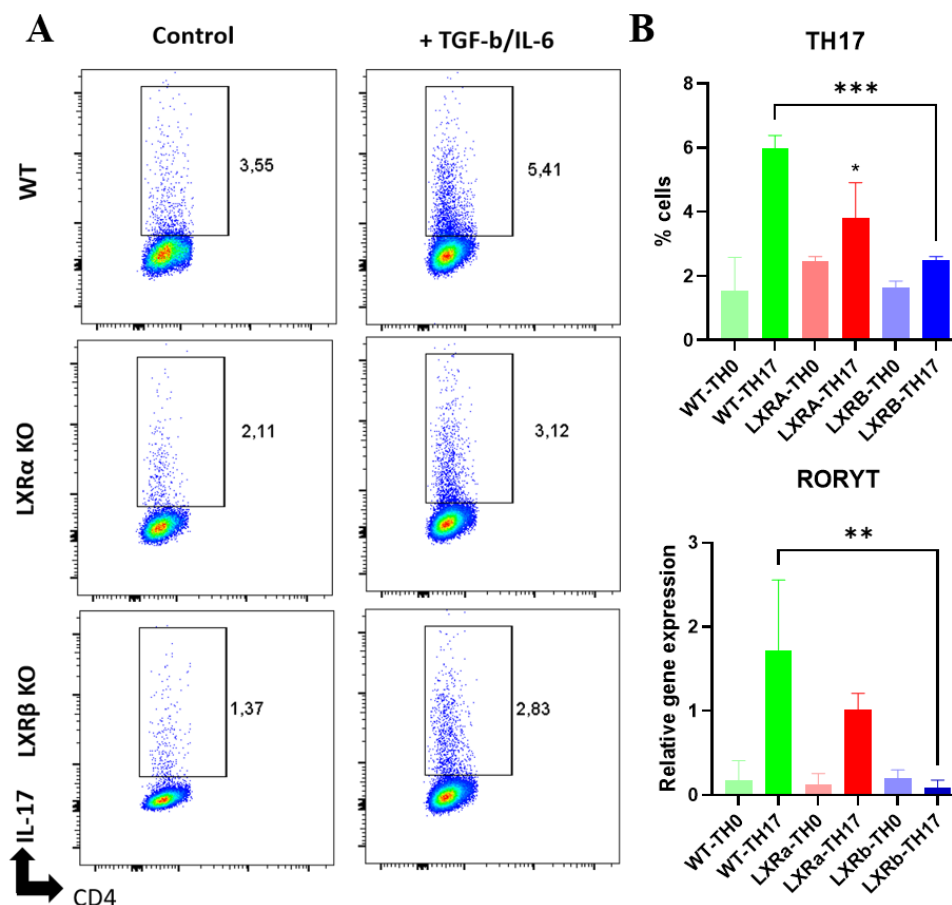


Figura 12: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos Th17, mostrando a frequência de células CD4+IL-17+. Os linfonodos foram coletados de camundongos WT, LXRαKO e LXRβKO e em seguida macerados. Os linfócitos CD4 naive foram isolados por meio de separação magnética e cultivados por 3 dias sob estímulos de TGF-β, IL-6, anti-CD3 e anti-CD28 e marcadas para detecção da citocina IL-17. O controle representa uma amostra em que não foi adicionado TGF-β e IL-6. Cores dos anticorpos Zombie green (BB515); CD4 (APCCY7); IL-17 (BUV421). Gráficos em barra representativo de 3 experimentos independentes (n=3). * p < 0,05. Dados apresentam o valor da média e erro padrão (SEM).

4.3 A ausência do LXR modula a ativação de linfócitos T CD4

Após a comprovação da importância dos receptores LXR na polarização de linfócitos T CD4, nosso próximo passo foi o de investigar a cinética de expressão gênica dos genes alvo de LXR em células TH0 (não diferenciadas) em comparação com células Treg, Th1 e Th17. Tendo em vista que esses receptores também podem agir como fatores de transcrição, controlando a expressão de genes importantes para o metabolismo lipídico (KALAANY; MANGELSDORF, 2006).

Células CD4 naive (CD4+CD62L+) foram isoladas de linfonodos e baço de

camundongos WT, LXR α KO e LXR β KO por meio do uso de *beads* magnéticas e colocadas em cultura com estímulos de anti-CD3 e anti-CD28, simulando um estado de ativação TH0, ou adicionalmente polarizadas para outros subtipos de T CD4. Após 3 dias de cultura, as células foram coletadas, o mRNA foi isolado e foi realizado o qPCR como descrito na metodologia (itens 3.2 e 3.6).

Observamos um aumento na expressão de ABCA1 apenas em células deficientes de LXR α , principalmente nos subtipos Th1 e Th17, o mesmo foi observado na expressão gênica de APOE (Fig.13A), sem diferenças entre os subtipos, por outro lado, não houveram diferenças significativas entre os grupos quanto a expressão de ABCG1.

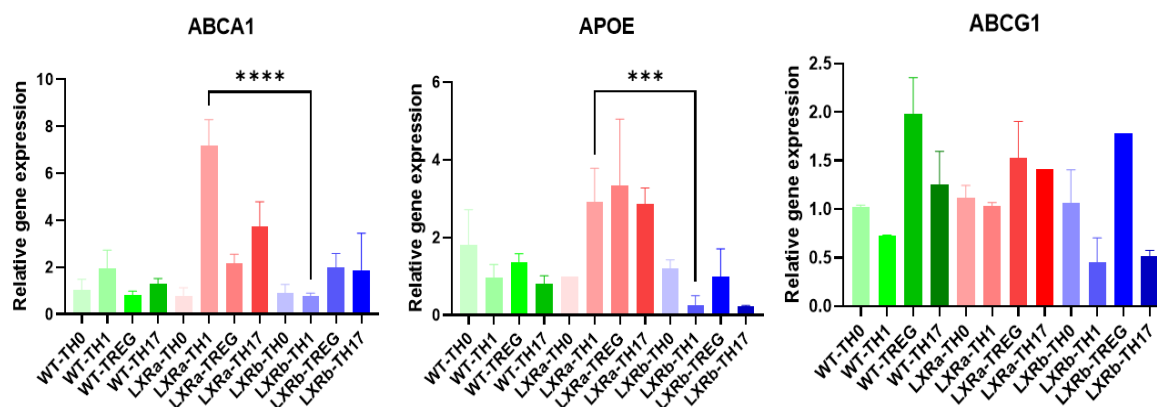


Figura 13: Expressão relativa dos genes alvos de LXR linfócitos Th1, Treg e Th17. Os linfonodos e baço foram coletados de camundongos WT, LXR α e LXR β , os linfócitos TCD4⁺ naive foram isolados via separação magnética e cultivadas por 3 dias sob estímulos de IL-12 (Th1), TGF β (Treg) e TGF β e IL-6 (Th17) na presença de anti-CD3 e anti-CD28. Após esse período o mRNA foi extraído e foi feito PCR em tempo real para genes alvos de LXR. O gene 18s foi usado como gene endógeno. Gráficos em barra representativo de 3 experimentos independentes (n=3). * p <0,05. Dados apresentam o valor da média e erro padrão (SEM).

Nas células isoladas de camundongos deficientes em LXR α KO e LXR β KO observamos uma redução da expressão do transportador de glicose GLUT1 (Fig.14), o que pode indicar uma menor captação de glicose pela célula e um aumento do fator de transcrição SREBP1, sugerindo um aumento no metabolismo de lipídios (Fig.14).

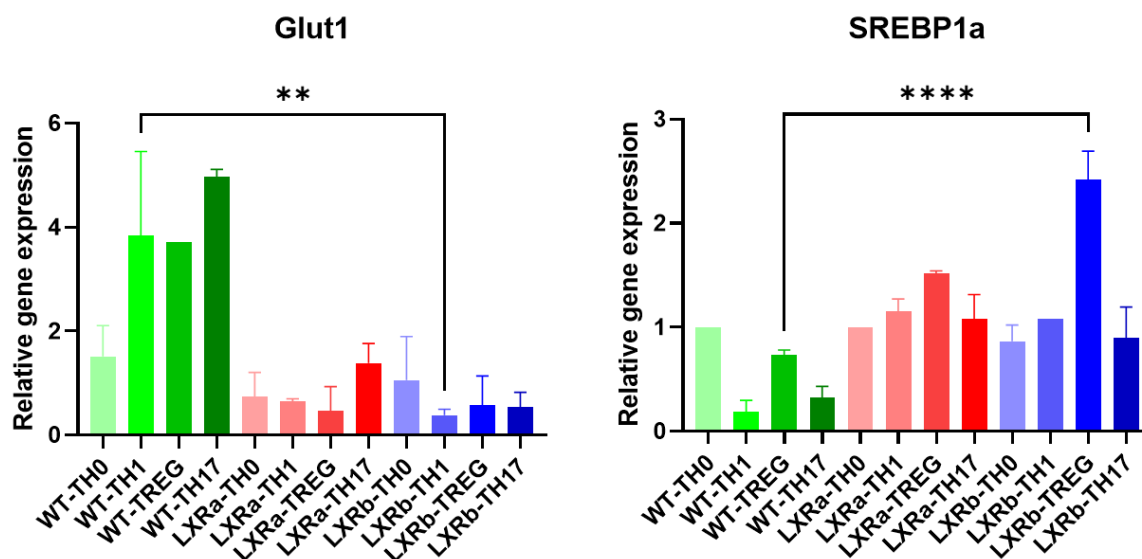


Figura 14: Expressão relativa dos genes de GLUT E SREBP1a. Os linfonodos e baço foram coletados de camundongos WT, LXR α e LXR β , os linfócitos TCD4+ naive foram isolados via separação magnética e cultivadas por 3 dias sob estímulos de IL-12 (Th1), TGF β (Treg) e TGF β e IL-6 (Th17) na presença de anti-CD3 e anti-CD28. Após esse período o mRNA foi extraído e foi feito PCR em tempo real para genes alvos de LXR. O gene 18s foi usado como gene endógeno. Gráficos em barra representativo de 3 experimentos independentes (n=3). * p < 0,05. Dados apresentam o valor da média e erro padrão (SEM).

Tendo em vista a redução de Glut1 observada tanto nas células do camundongo LXR α KO como nas do LXR β KO, nosso próximo passo foi o de tentar entender como essa redução estaria ocorrendo. Quando linfócitos T são ativados via TCR e correceptor CD28, o fator nuclear kappa b (NF-Kb) é ativado (CHENG; MONTECALVO; KANE, 2011). Isso gera a ativação de vários alvos transcricionais como IL-2 que é produzida de forma autócrina e induz a proliferação e sobrevivência de linfócitos T (OH; GHOSH, 2013).

Após a ativação de NF-Kb, ocorre um aumento da translocação de Glut1 para a superfície de linfócitos TCD4 como consequência da necessidade metabólica para a proliferação, o que indica uma participação do NF-Kb na diferenciação dos linfócitos T CD4 (FINLAY, 2012; FRAUWIRTH; THOMPSON, 2004a). Assim, realizamos um *Western Blott* para a subunidade do NF-kB p65 fosforilada (pP65) em linfócitos diferenciados em Th1 e controles não diferenciados (Th0). Observamos uma redução na fosforilação de P65 nas células isoladas de camundongos LXR α KO e nas células obtidas de camundongos LXR β KO, todavia, essa redução foi maior nas células deficientes em LXR β (Fig. 15).

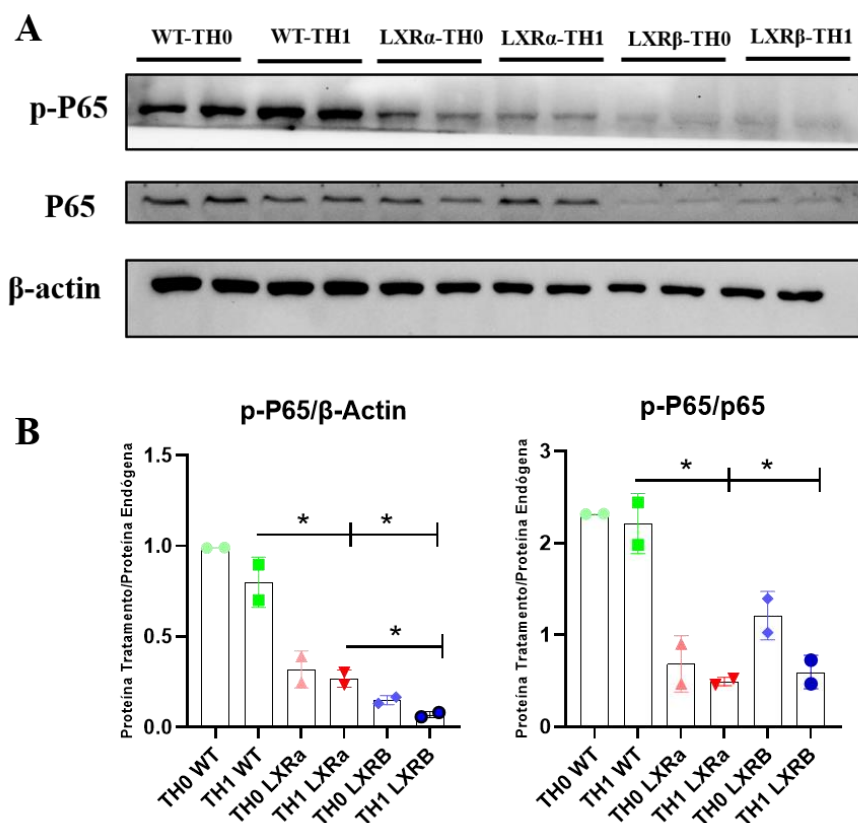


Figura 15: Análise por Western Blott de linfócitos Th1. Os linfonodos e baço foram coletados de camundongos WT, LXR α e LXR β , os linfócitos TCD4⁺ naive foram isolados via separação magnética e cultivadas por 3 dias sob estímulos de IL-12 (Th1) na presença de anti-CD3 e anti-CD28. Após 3 dias os linfócitos foram estimulados com PMA e Ionomicina por 15 minutos e as proteínas foram extraídas e quantificadas para o uso, todas as amostras foram padronizadas para a concentração de 15 μ g/ μ L. (A) *Western Blott* para a subunidade p-65 do NF-kB. (B) Gráficos em barras representativos das quantificações realizadas a partir das bandas do *Western Blott*. A expressão das proteínas foi quantificada usando o software ImageJ e foi realizada a razão entre as proteínas do teste e a proteína endógena. Gráficos em barra representativo de 1 experimento independente (n=1). * p <0,05. Dados apresentam o valor da média e erro padrão (SEM).

4.4 A ativação e inibição de LXR α e LXR β afeta a diferenciação de linfócitos TCD4⁺

Após analisar o impacto da deficiência dos LXRs na diferenciação de linfócitos T CD4, nosso próximo passo foi o de analisar a influência da ativação desses receptores na diferenciação em Th1 e Th17. Uma vez que já foi demonstrada que a ativação dos LXRs por meio do uso de agonistas tem uma ação anti-inflamatória (HEROLD *et al.*, 2017b; SOLT; KAMENECKA; BURRIS, 2012) e sua inibição tem um

efeito pró-inflamatório (ZHUANG *et al.*, 2013b), nosso intuito foi o de verificar se o uso de agonistas e antagonistas de LXR já empregados na literatura, teriam um efeito específico em algum desses receptores, com o intuito de avaliar qual seria o papel da ativação ou inibição de cada isoforma na diferenciação de linfócitos TCD4+. Sendo assim, é importante salientar que o mecanismo a ser observado nessa situação não é o da deficiência dos LXRs e sim o da ativação desses receptores de forma individual e o impacto destes na ativação e diferenciação desses linfócitos.

Dessa forma, nesse experimento o esperado seria que o uso de agonistas do LXR apresentassem um efeito anti-inflamatório, reduzindo a diferenciação em Th1 e Th17 e o uso do antagonista apresentasse um efeito oposto, aumentando a diferenciação em Th1 e Th17. A importância desse estudo está centrada no fato de que as terapias baseadas no uso do agonistas do LXR para o tratamento de doenças inflamatórias apresentaram resultados inesperados, como o aumento dos níveis de triglicerídeos na corrente sanguínea (FESSLER, 2018). Esses resultados apontam para uma necessidade de desenvolvimento de fármacos mais específicos, como direcionados para a ativação de apenas uma única isoforma do LXR.

Assim, primeiro foi realizada uma padronização da diferenciação com diferentes concentrações do agonista de LXR (GW3965) em células isoladas de camundongos WT. Após a seleção da concentração a ser utilizada, tratamos células T CD4 *naive* com GW3965 a 3 uM, por 30 minutos, seguido dos estímulos de diferenciação para os perfis Th1 e Th17. Observamos uma redução na porcentagem de células CD4+IFN- γ + (Th1) (Fig. 16) e CD4+ IL-17+ (Th17) (Fig. 17) quando tratadas com o agonista de LXR GW3965. Esse dado indica que a ativação do LXR tem um efeito anti-inflamatório nas duas isoformas do LXR.

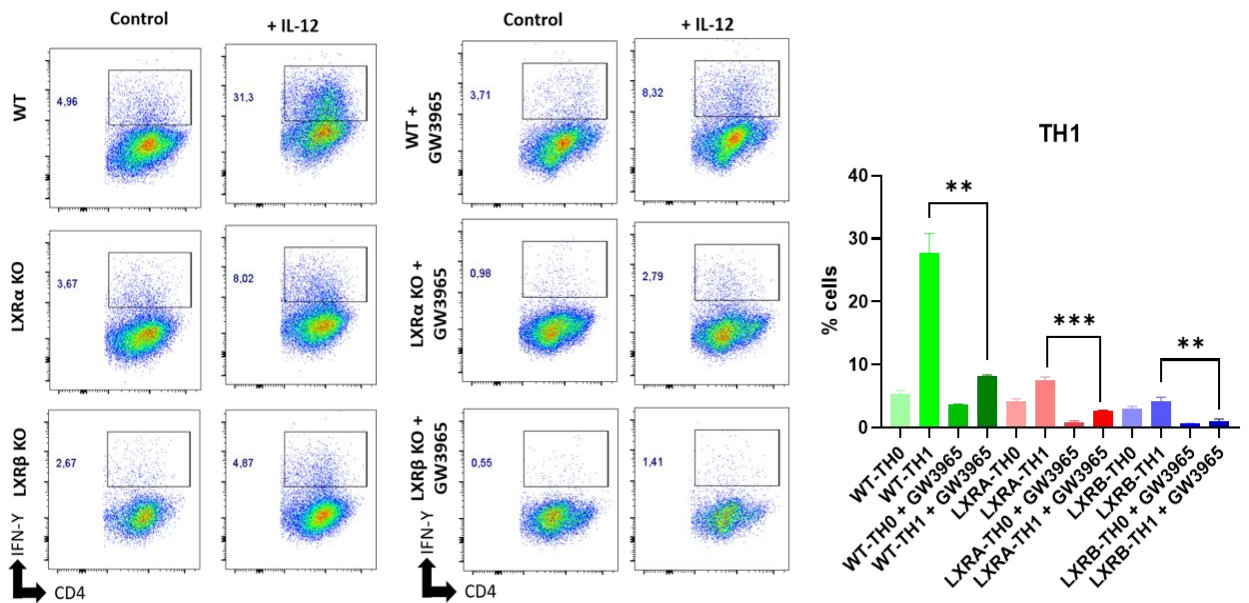


Figura 16: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos Th1, mostrando a frequência de células CD4+IFN- γ +. Cores dos anticorpos Zombie green (BB515); CD4 (APCCY7); IFN- γ (PE). Gráficos em barras representativos de 3 experimentos independentes (n=3). * p < 0,05. Dados apresentam o valor da média e erro padrão (SEM).

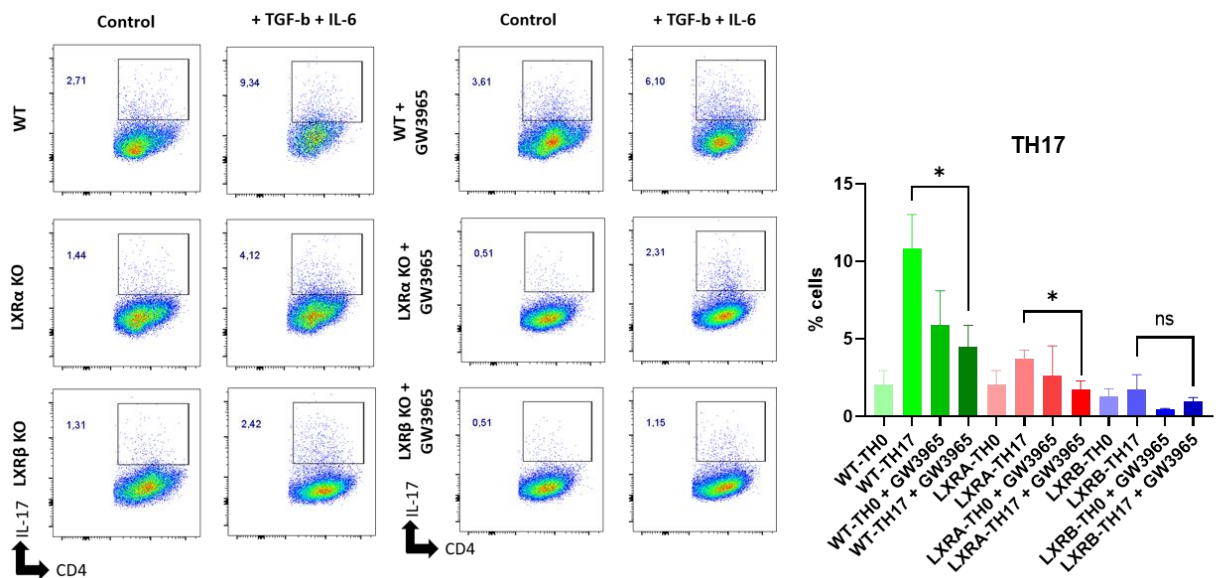


Figura 17: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos TH17, mostrando a frequência de células CD4+IL-17+. O controle representa uma amostra em que não foi adicionado TGF- β e IL-6. Cores dos anticorpos Zombie green (BB515); CD4 (APCCY7); IL-17 (BUV421). Gráficos em barras representativos de 3 experimentos independentes (n=3). * p < 0,05. Dados apresentam o valor da média e erro padrão (SEM).

Em seguida, observamos o papel da inibição do LXR por meio do uso do PFG-2 α na diferenciação de linfócitos TCD4+. Dessa forma, tratamos células T CD4 *naive* com PFG-2 α a 5 μ M, por 30 minutos, seguido dos estímulos de diferenciação para os perfis Th1. Observamos um aumento na porcentagem de células CD4+IFN- γ + (Th1) (Fig. 18) tanto nas células do animal LXR α KO como nas do LXR β KO. Mostrando assim, que a inibição do LXR tem um efeito pró-inflamatório e o inibidor do LXR atuou nas duas isoformas desse receptor.

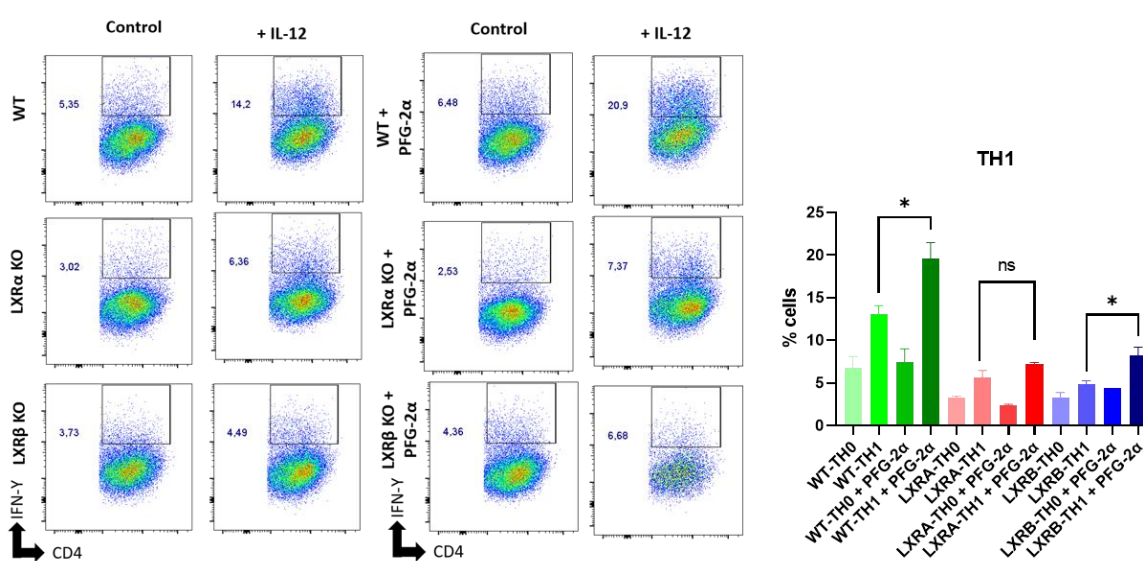


Figura 18: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos Th1, mostrando a frequência de células CD4+IFN- γ +. O controle representa uma amostra em que não foi adicionado IL-12. Cores dos anticorpos Zombie green (BB515); CD4 (APCCY7); IFN- γ (PE). Gráfico em barra representativo de 1 experimento independente (n=1). * p < 0,05. Dados apresentam o valor da média e erro padrão (SEM).

4.5 A Deleção das duas isoformas do LXR afeta a morfologia mitocondrial e o acúmulo de corpúsculos lipídicos

Corpúsculos lipídicos são organelas relacionadas ao metabolismo celular responsáveis por armazenar lipídeos em diferentes células, podendo variar em número, tamanho e estrutura (KORY; FARESE; WALTHER, 2016). Além do estoque de energia, esses corpúsculos tem um papel essencial em diferentes processos patológicos e fisiológicos no corpo, como prevenir o acúmulo de substâncias tóxicas no retículo endoplasmático através da regulação do estresse oxidativo e são capazes de se combinar com mitocôndrias para participar na regulação metabólica (WELTE; GOULD, 2017).

Dessa forma, tendo em vista a importância de corpúsculos lipídicos para o metabolismo celular e que trabalhos na literatura apontam que o LXR como indutor do acúmulo desses corpúsculos em diferentes tipos celulares (CRUZ-GARCIA; SCHLEGEL, 2014; VICTOR *et al.*, 2022), nosso próximo passo foi o de avaliar o impacto da deleção de LXR no acúmulo desses corpúsculos lipídicos em linfócitos TCD4+.

Para isso, realizamos uma microscopia de confocal (Fig. 19A) utilizando-se *Bodipy* para realizar a marcação de corpúsculos lipídicos, *Mitotracker red* para se marcar as mitocôndrias e Dapi para marcar o núcleo da célula. Essa análise foi realizada em linfócitos TCD4+ isolados a partir de camundongos WT, LXR α e LXR β KO. Sendo diferenciados no subtipo TH1.

Foi possível observar nas células T CD4 isoladas de camundongos deficientes em LXR β uma redução no número de mitocôndrias, sem diferenças quanto ao seu volume, ao mesmo tempo em que elas estão mais esféricas e apresentando uma redução no número de ramificações por mitocôndrias, o que sugere um perfil mais fissionado destas (Fig.19B). Além disso, nesse mesmo grupo, foi possível observar que a diferenciação no perfil TH1 aumentou o número de corpúsculos lipídicos por células, assim como o tamanho destes (Fig.19B). Isso pode ser um indicativo de que a deficiência da isoforma beta do LXR pode estar impactando no acúmulo de corpúsculos lipídicos e morfologia mitocondrial.

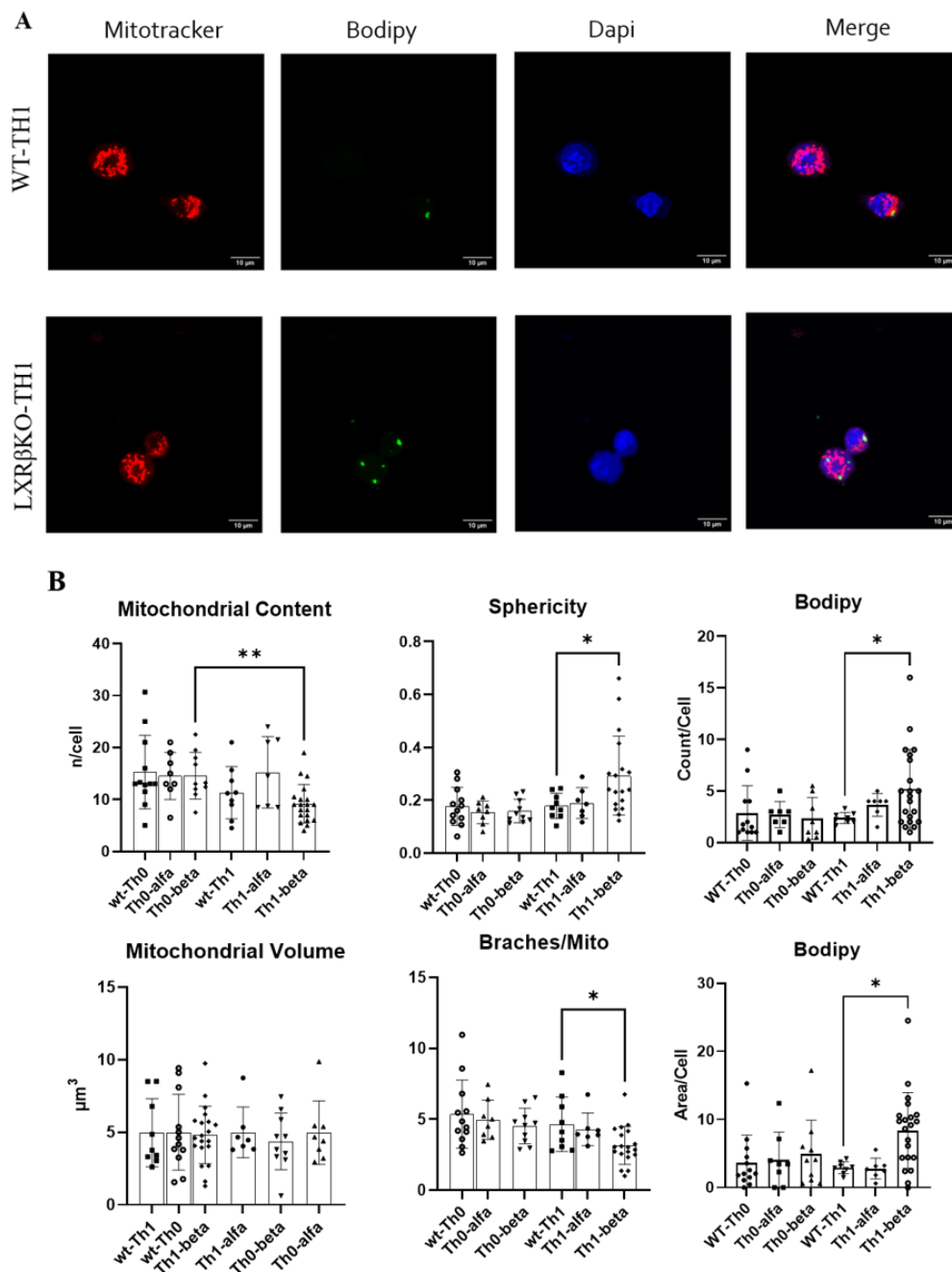


Figura 19: Microscopia Confocal de linfócitos TH1 diferenciados a partir de camundongos LXR α e LXR β KO. Os linfonodos e baço foram coletados de camundongos WT, LXR α e LXR β , os linfócitos TCD4+ naive foram isolados via separação magnética e cultivadas por 3 dias sob estímulos de IL-12 (Th1) na presença de anti-CD3 e anti-CD28 em placas com laminulas e coating com Poly D lisina. Em seguida foi realizada a marcação para microscopia Confocal utilizando os marcadores Bodipy para realizar a marcação de corpúsculos lipídicos, Mitotracker red para se marcar as mitocôndrias e Dapi para marcar o núcleo da célula. (A) Imagens representativas da microscopia confocal e marcadores utilizados. (B) Gráficos em barra apontado análises morfológicas mitocondriais e quanto ao número de corpúsculos lipídicos. Foi possível observar um aumento do número de corpúsculos lipídicos no camundongo LXR β KO diferenciado em TH1 assim como um aumento da fissão mitocondrial. Gráficos

em barra representativo de 1 experimento independente (n=1). * p <0,05. Dados apresentam o valor da média e erro padrão (SEM).

4.6 A Sumoilação do LXR não teve efeitos na polarização de linfócitos T CD4+.

Como mencionado anteriormente, a sumoilação é uma modificação pós-traducional que ocorre em LXR, sendo responsável por inibir a ativação no NF- κ B (TALAMILLO *et al.*, 2020). Todavia, pouco se sabe quanto ao efeito dessa modificação em linfócitos TCD4+. Dessa forma, tratamos linfócitos TCD4+ naive com o inibidor da sumoilação (2D08) por 30 minutos antes de serem dados os estímulos para diferenciação e fomos observar a diferenciação desses linfócitos por citometria de fluxo e a ativação dos genes alvos de LXR por meio de qPCR.

Foi usada a concentração de 1 μ M após testes prévios de resposta a diferentes dosagens e análise da viabilidade celular. Inicialmente não foi possível observar diferenças quanto a porcentagem de linfócitos Th1 (Fig.20) e Treg (Fig. 21) após o tratamento com 2D08. Além disso, apesar de ser observado uma redução na polarização em linfócitos T reguladores tanto no grupo deletado para LXR α quanto no deletado para LXR β , o 2D08 não teve efeitos significativos no grupo, sendo assim o único efeito observado é o da deleção das duas isoformas do LXR que já foi observado previamente, como demonstrado na figura 11.

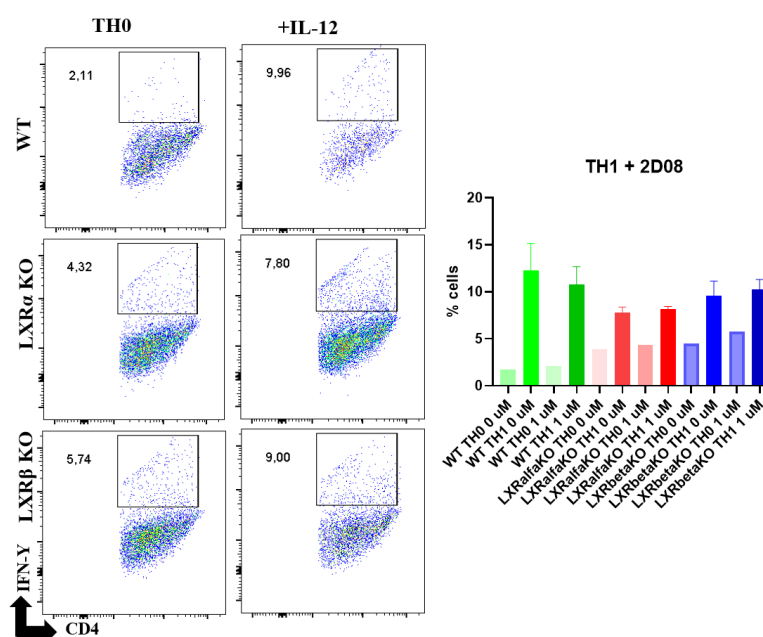


Figura 20:Análise por citometria de fluxo para os linfócitos Th1, mostrando a frequência de células

CD4+IFN- γ +. Os linfonodos foram coletados de camundongos WT, LXR α KO e LXR β KO e em seguida macerados. Os linfócitos CD4 naive foram isolados por meio de separação magnética e em seguida tratados com 2D08 a uma concentração de 1 μ M por 30 minutos. Após isso as células foram cultivadas por 3 dias sob estímulos de IL-12, anti-CD3 e anti-CD28 e marcadas para detecção intracelular da citocina IFN- γ . O controle representa uma amostra em que não foi adicionado IL-12. Cores dos anticorpos Zombie green(BB515); CD4 (APCCY7); IFN- γ (PE). Gráficos em barra representativo de 1 experimento independente(n=1). * $p < 0,05$. Dados apresentam o valor da média e erro padrão (SEM).

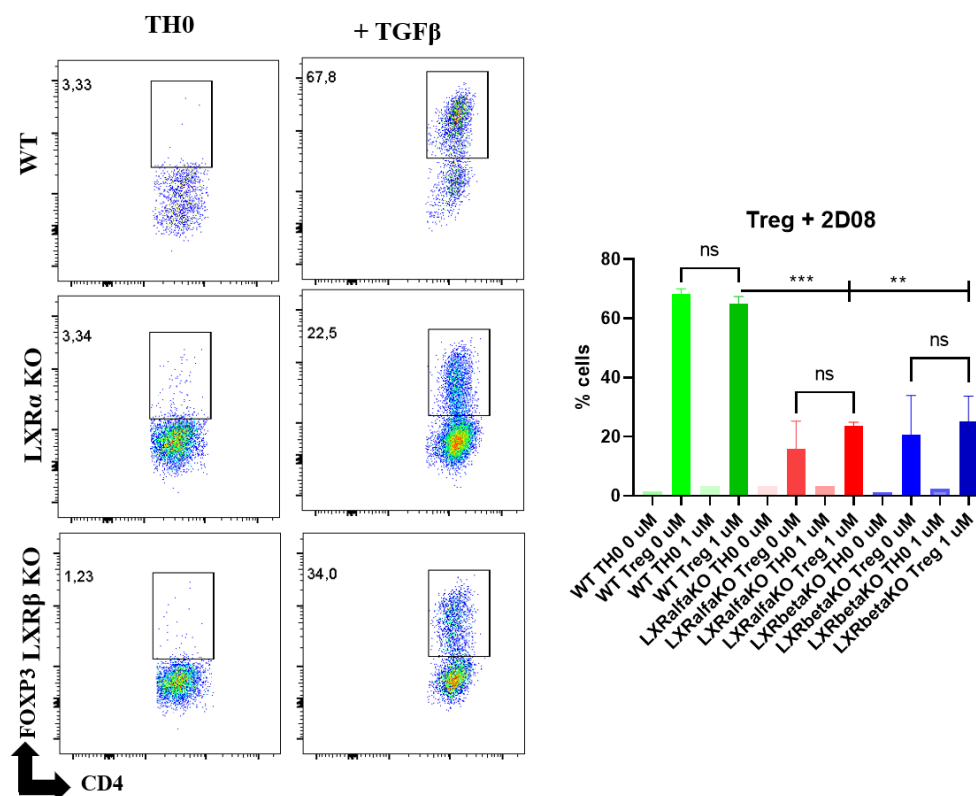


Figura 21: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos Treg, mostrando a frequência de células CD4+ FOXP3+. Os linfonodos foram coletados de camundongos WT, LXR α KO e LXR β KO e em seguida macerados. Os linfócitos CD4 naive foram isolados por meio de separação magnética e em seguida tratados com 2D08 a uma concentração de 1 μ M por 30 minutos. Após isso as células foram cultivadas por 3 dias sob estímulos de TGF- β , anti-CD3 e anti-CD28 e marcadas para detecção intracelular do fator de transcrição FOXP3. O controle representa uma amostra em que não foi adicionado TGF- β . Cores dos anticorpos Zombie green (BB515); CD4 (APCCY7); FOXP3 (PE). Gráficos em barras representativo de 1 experimento independente (n=1). * $p < 0,05$. Dados apresentam o valor da média e erro padrão (SEM).

No entanto, quanto a expressão relativa dos genes alvos de LXR após o tratamento com 2D08, foi possível observar um aumento na expressão de ABCA1 nas células do camundongo WT após o tratamento com o inibidor (Fig.22A) enquanto nas células dos camundongos LXR α KO esse aumento foi drasticamente reduzido. Sem diferenças, no entanto quanto a sua expressão na presença da deleção do LXR β , o que pode apontar para um papel mais proeminente da sumoilação da isoforma alfa no LXR na regulação da expressão do transportador ABCA1.

Uma situação semelhante ocorreu na expressão de ABCG1 (Fig.22B), com um aumento significativo na sua expressão após o tratamento com 2D08 e quando as duas isoformas do LXR foram removidas o perfil se manteve, o que aponta para um efeito independente desses receptores. Por fim, a expressão de APOE não se alterou após o tratamento com 2D08 entre os grupos assim como quando as duas isoformas do LXR deletadas (Fig.22C). Esses dados indicam que o 2D08 não teve efeitos significativos na polarização de linfócitos TCD4, atuando, no entanto, na expressão dos genes alvos de LXR ABCA1 e ABCG1.

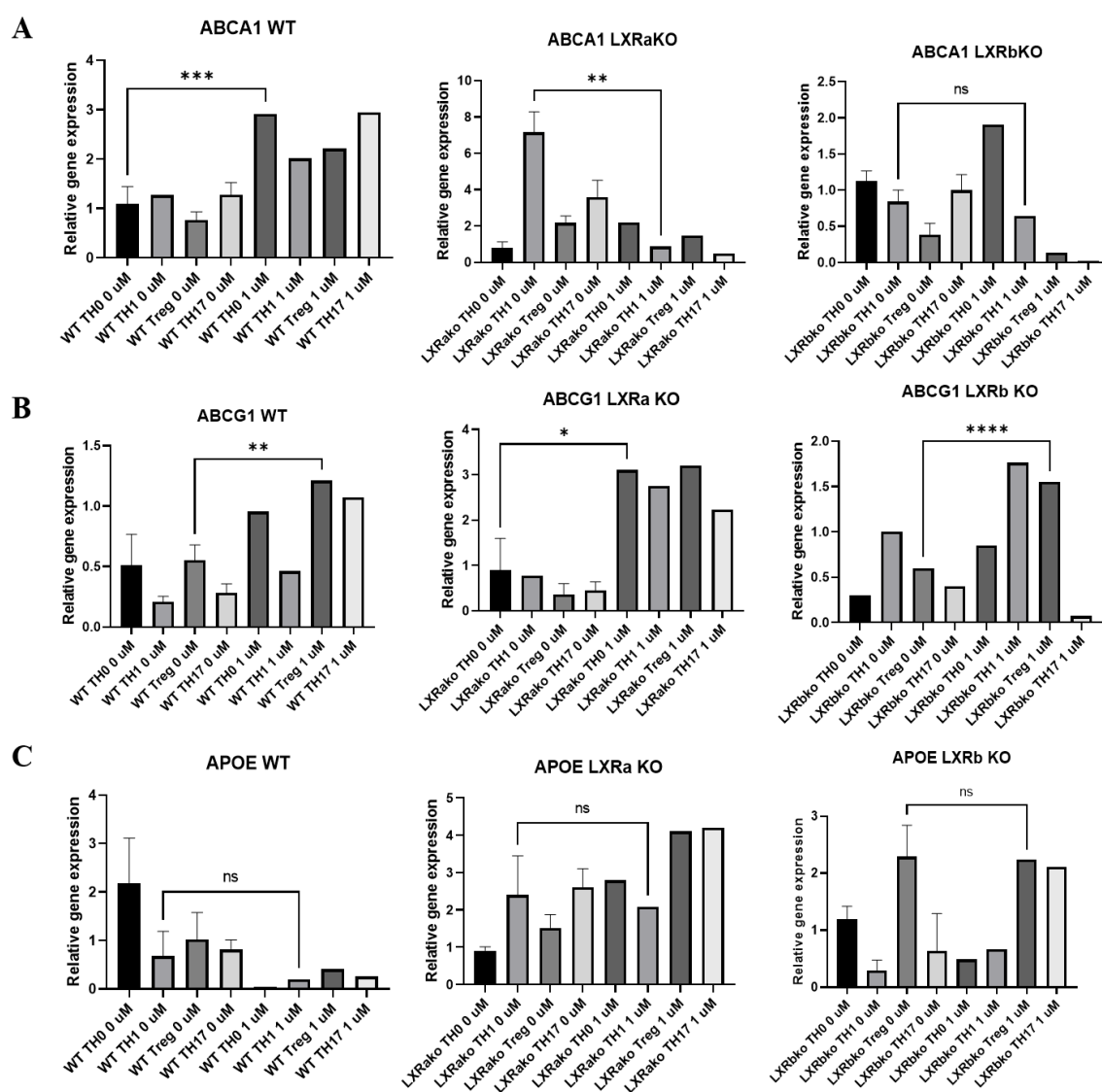


Figura 22: Expressão relativa dos genes de alvos de LXR após tratamento com 2D08. Os linfonodos e baço foram coletados de camundongos WT, LXR α e LXR β , os linfócitos TCD4⁺ naive foram isolados via separação magnética, tratados com 2D08 a uma concentração de 1 μ M por 30 minutos e cultivadas

por 3 dias sob estímulos de IL-12 (Th1), TGF β (Treg) e TGF β e IL-6 (Th17) na presença de anti-CD3 e anti-CD28. Após esse período o mRNA foi extraído e foi feito PCR em tempo real para genes alvos de LXR. (A) Expressão relativa do gene ABCA1. (B) Expressão relativa do gene ABCG1 (C) Expressão relativa do gene APOE. O gene 18s foi usado como gene endógeno. Gráficos em barras representativo de 1 experimentos independentes (n=1). * p <0,05. Dados apresentam o valor da média e erro padrão (SEM).

4.7 A resposta dos linfócitos TCD4 de camundongos deficientes de LXR é afetada num modelo antígeno específico

Com o intuito de saber se a ausência do LXR levaria a alterações funcionais em um modelo antígeno-específico, imunizamos animais WT, LXR α KO e LXR β KO na axila com o antígeno ovalbumina (OVA) emulsificado em adjuvante completo de Freud (CFA). Após 8 dias os linfonodos axilares foram removidos, macerados e colocados em cultura, sendo adicionado OVA diluída em PBS (100 ug/mL) para propiciar o reencontro dos linfócitos com o antígeno (*recall*). Essas células ficaram em cultura por 3 dias e ao final do terceiro dia foi realizada a marcação para citometria de fluxo.

Na marcação de citometria para as citocinas IFN- γ e IL-17 foi possível observar um aumento na porcentagem de linfócitos CD4+ IFN- γ + (TH1) e CD4+ IL-17+ (TH17) (Fig. 20). Além disso, por meio da técnica de ELISA foi possível observar um aumento na secreção da citocina pró-inflamatória IFN- γ (23A) e IL-17 (23B). Sendo um indicativo então de que as células do animal deletado estão mais inflamadas do que o controle, principalmente o animal LXR β KO.

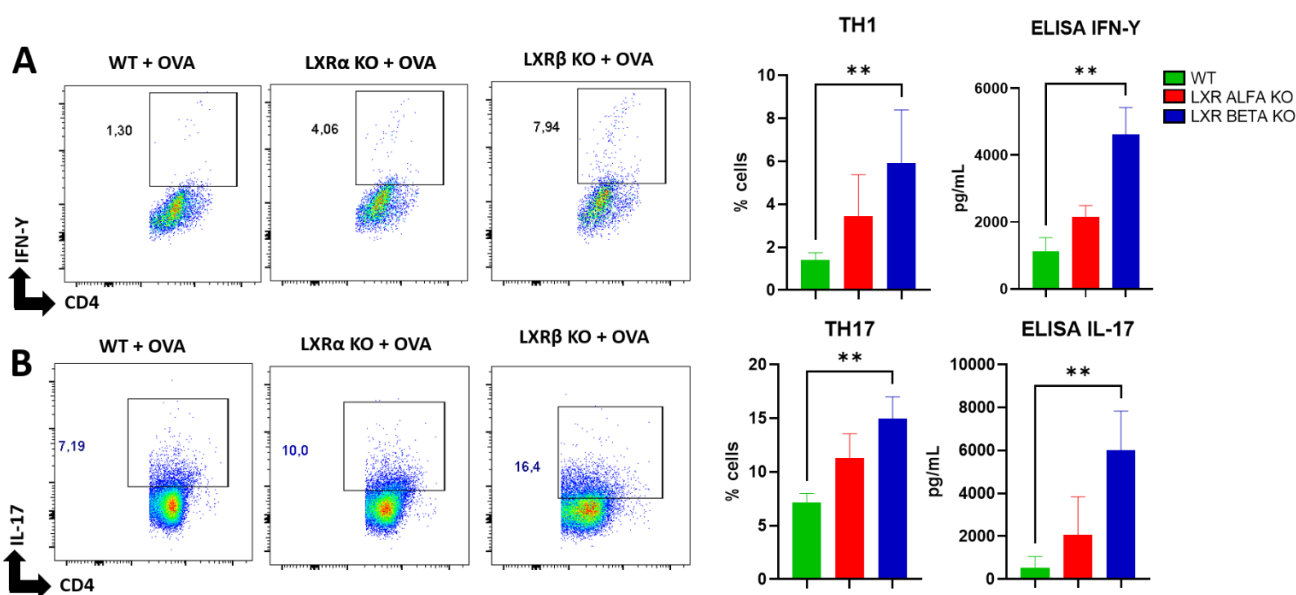
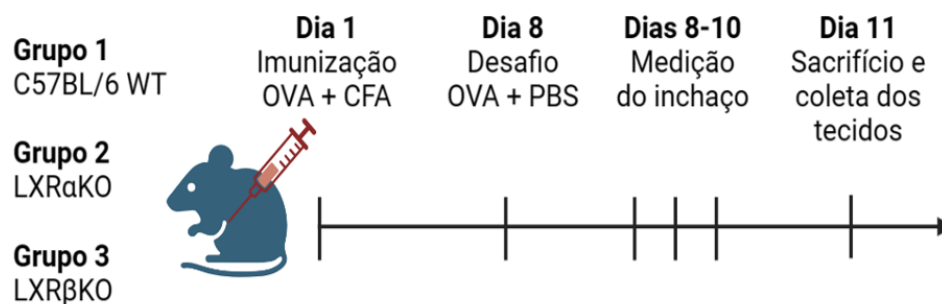


Figura 23: Análise por citometria de fluxo para os linfócitos TH1 e TH17, mostrando a frequência de células CD4+ IFN-Y+ e CD4+ IL-17+. Animais WT e LXR α KO e LXR β KO foram imunizados com OVA e CFA, após 8 dias os linfonodos axilares foram coletados e macerados. Em seguida, foi feito a *recall* das células com OVA (100ug/mL) e estas foram mantidas em cultura por 3 dias. Após esse período estas foram marcadas para citometria de fluxo para realizar a detecção das citocinas IFN-Y e IL-17 e os sobrenadantes foram coletados nos 3 dias de cultura. (A) Dot plots representativos para a marcação de linfócitos CD4+ IFN-Y+ (Th1), foi possível um aumento na porcentagem de linfócitos Th1 no camundongo deficiente para LXR α e LXR β KO, assim como na secreção da citocina IFN-Y por meio de ELISA (B) Dot plots representativos para amarração de linfócitos CD4+ IL-17+ (Th17), foi possível observar uma tendência de aumento na porcentagem de linfócitos Th17 no camundongo deficiente para LXR α e LXR β KO assim como um aumento na produção da citocina IL-17 por meio de ELISA. Cores dos anticorpos Zombie green(BB515); CD4 (APCCY7); IL-17 (BUV421) e IFN-Y (PE). Gráficos em barra representativo de 3 experimentos independentes (n=3). * p <0,05. Dados apresentam o valor da média e erro padrão (SEM).

Com o intuito de confirmar se esse efeito estaria ocorrendo *in vivo*, o experimento de imunização com OVA e CFA foi repetido e após 7 dias os animais foram então imunizados na pata esquerda com OVA diluída em 50 uL PBS (100 ug), e na pata direita foi injetado apenas PBS como controle. Após a imunização, o inchaço da pata foi medido com o auxílio de um paquímetro em vários horários até o terceiro dia (Fig.24A).

Foi possível observar que o camundongo LXR β KO apresentou um maior inchaço da pata quando em comparação com o grupo LXR α e WT e esse inchaço se manteve elevado até o último dia de ensaio (Fig.24B). O camundongo LXR α apresentou um inchaço da pata semelhante ao grupo controle (Fig.24B).

A



B

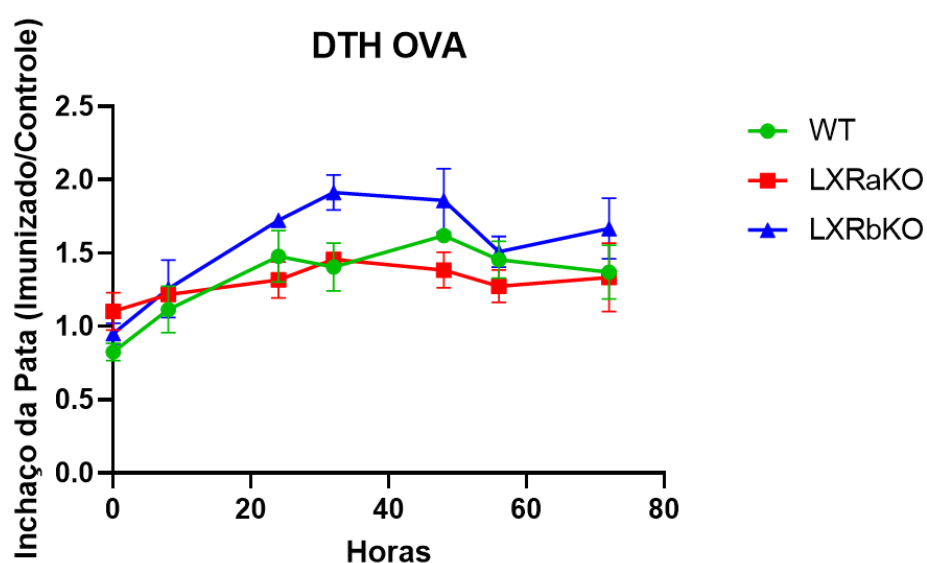


Figura 24: DTH a OVA de camundongos LXR α e beta KO. A DTH ao peptídeo OVA foi quantificada pelo inchaço relativo da pata posterior, em um período de 6-72h. Os animais imunizados foram desafiados, 7 dias após a imunização, com 100 μ g do peptídeo OVA em 50 μ L de PBS, na pata posterior esquerda. Apenas PBS foi injetado na pata posterior direita como controle. O inchaço da pata posterior esquerda relativa à pata direita foi mensurado em intervalos de 0, 8, 24, 32, 48, 56 e 72h, após o desafio. (A) Esquema de imunização dos animais. (B) Medição do inchaço da pata imunizada relativa ao controle. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes (n=3). *p <0,05. Dados apresentam o valor da média e erro padrão (SEM).

5 DISCUSSÃO

LXRs são fundamentais na homeostase dos níveis intracelulares de colesterol e conseqüentemente na prevenção de doenças inflamatórias como a aterosclerose (BILOTTA *et al.*, 2020). Nos últimos anos tem sido mostrado a importância desse receptor em doenças autoimunes, como EAE, lúpus e esclerose múltipla (CUI *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2018; BOGIE *et al.*, 2021). No entanto, pouco se sabe sobre qual isoforma de LXR seria mais importante na diferenciação de linfócitos TCD4+, principalmente num contexto de doença autoimune. Dessa forma, nesse trabalho buscamos identificar a isoforma mais importante para a polarização de linfócitos TCD4+ assim como tentar entender o mecanismo pelo qual isso ocorre.

Uma vez que o LXR atua por meio da expressão de transportadores de colesterol como ABCA1, ABCG1 e APOE promovendo o transporte reverso de colesterol (WANG, BO; TONTONNOZ, 2018). Inicialmente observamos que a expressão dos genes ABCG1 e APOE é nula em animais com deleção das isoformas alfa e beta, enquanto a de ABCA1 é menor principalmente quando LXR β é deletado. O ABCA1 e ABCG1 fazem parte da família de transportadores transmembranares ABC, realizando o transporte de colesterol dependente de ATP (KOLDAMOVA; FITZ; LEFTEROV, 2010; ORAM; VAUGHAN, 2006).

O transportador ABCA1 inicia a translocação de fosfolipídeos e colesterol da face citoplasmática para a membrana plasmática, o que causa um dobramento da membrana e uma formação de um domínio exovesicular no qual a apoa-I e apoE se ligam com alta afinidade (VAUGHAN; ORAM, 2003; VEDHACHALAM *et al.*, 2007). Auxiliando na formação de partículas de HDL e na sua liberação no meio extracelular (BAZIOTI *et al.*, 2022; VEDHACHALAM *et al.*, 2007).

Por outro lado, o ABCG1 media o efluxo de colesterol para partículas nascentes de HDL (WESTERTERP *et al.*, 2014). Uma vez que o efluxo mediado pela ABCA1 para a apoa-I e apoE é o primeiro passo para a geração de HDL, o ABCA1 se torna essencial para a geração dessas partículas. Mutações no gene que codifica o ABCA1, causa a doença de Tangier, na qual pacientes apresentam baixos níveis de HDL e aumento no risco para o desenvolvimento de aterosclerose (BODZIOCH *et al.*, 1999; RUST *et al.*, 1999).

Dessa forma, a redução da presença desse transportador, principalmente no camundongo LXR β KO pode ser um agravante para o acúmulo de colesterol nas células. Trabalhos anteriores também apontaram que a deleção dessa mesma

isoforma, por meio do uso de siRNA, reduziu a expressão tanto de ABCA1 quanto de ABCG1 (LEWANDOWSKI *et al.*, 2021).

Posteriormente averiguamos o impacto da deficiência das duas isoformas do LXR na maturação de linfócitos no timo e na periferia. Foi descrito que a deficiência de LXR α/β é importante para a função das células epiteliais tímicas (CHAN *et al.*, 2020), as quais são críticas para a maturação dos linfócitos no timo (SAWICKA *et al.*, 2014; ABRAMSON; ANDERSON, 2017). Em nossos ensaios, foi possível observar no timo que as duas isoformas do LXR são importantes para a maturação de linfócitos CD8+, sem diferenças quanto aos níveis de linfócitos TCD4+.

Todavia, tendo em vista que a porcentagem de linfócitos duplo positivos no timo também está reduzida principalmente quando a isoforma beta do LXR está deletada, é possível que a maturação de linfócitos TCD4 também esteja afetada, uma vez que um dos estágios da maturação de linfócitos é justamente a dupla expressão dos correceptores CD4 e CD8, para posterior seleção positiva (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2021). Dessa forma, podemos sugerir que as duas isoformas dos LXR são importantes para o desenvolvimento das células epiteliais tímicas, o que impactaria de forma direta a produção de linfócitos viáveis, com um impacto mais evidente para a isoforma beta nesse processo.

Os diversos tipos de linfócitos TCD4+ tem um papel essencial na organização de uma resposta imune frente a um antígeno, o que ocorre após a diferenciação de um linfócito T CD4+ *naive* para um subtipo específico (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2021). Tendo em vista a reduzida porcentagem de linfócitos *naive* CD4+CD62+CD44- quando a isoforma beta do LXR é deletada, é possível que um organismo com essa deficiência sofra alterações na resposta frente a antígenos assim como no controle da inflamação mediada por células T reguladoras, fazendo com que o mesmo fique mais inflamado (KOUTROLOS *et al.*, 2014).

Por outro lado, linfócitos TCD4 de memória apresentam um padrão mais complexo de atuação e migração, estando presentes em grandes números pelo corpo (CHANG; WHERRY; GOLDRATH, 2014). No caso de uma vacinação contra o vírus da influenza, linfócitos TCD4 de memória são capazes de reconhecer glicoproteínas virais e podem gerar uma proteção heterotrópica contra vários tipos de vírus da influenza (ZENS; CHEN; FARBER, 2016). Nos nossos ensaios não observamos diferenças quanto aos níveis dos linfócitos de memória CD4+CD62-CD44+.

Em seguida, observamos nos linfonodos mesentéricos uma redução na porcentagem de linfócitos *naive* CD8+CD62+CD44-. Atualmente, a literatura acerca do impacto dos LXRs nos linfonodos periféricos é escassa. Uma redução na porcentagem desses linfócitos periféricos pode ser um indicativo de uma maior propensão ao desenvolvimento de infecções (APPAY; DOUEK; PRICE, 2008; ZHANG; BEVAN, 2011). Essa redução foi observada principalmente no camundongo com a deleção para a isoforma beta do LXR, o que pode ser um indicativo de uma maior importância desse receptor para o desenvolvimento desse tipo celular.

Quanto ao papel dos linfócitos de memória CD8+ CD62- CD44+, sabe-se que linfócitos TCD8 de memória são essenciais para o combate de patógenos intracelulares como vírus por meio da secreção de citocinas como IFN- γ e TNF, tendo grande eficiência contra o vírus da influenza ou o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (LA GRUTA; TURNER, 2014; LAIDLAW; CRAFT; KAECH, 2016). Sendo assim, essa redução nos níveis desses linfócitos, observada principalmente no camundongo com a deficiência para a isoforma beta do LXR, pode indicar uma resposta pobre desse organismo frente a exposição a um patógeno. Uma provável explicação para a redução na porcentagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ *naive* e o aumento de linfócitos T CD8+ de memória pode estar no fato de que a maturação desses linfócitos está afetada no timo, o que provavelmente teve um impacto direto na sua presença na periferia.

Após verificar modificações no desenvolvimento de linfócitos T no timo e periferia, partimos para verificar se a deleção de cada isoforma do LXR gera alterações funcionais em linfócitos TCD4+. Observamos uma redução na porcentagem de linfócitos CD4+IFN- γ + (Th1), CD4+FOXP3+ (Treg) e CD4+IL-17+ (Th17), onde essa redução se mostrou agravada no camundongo LXR β KO. Dados da literatura que apontam a importância do colesterol na regulação da proliferação de linfócitos T (BENSINGER *et al.*, 2008b; KIDANI *et al.*, 2013), diferenciação de células T e produção de citocinas (MA *et al.*, 2018).

Além disso, é possível que a deleção do LXR, principalmente da isoforma beta desse receptor, esteja impactando na biossíntese de glicoesfingolípídeos de membrana, uma vez que existem artigos que demonstram um papel do LXR nesse processo, o que afeta de forma direta a composição da membrana plasmática (WADDINGTON *et al.*, 2021). Isso é possível pois a sinalização via TCR (sinapse

imunológica) é diretamente influenciada pela presença de glicosíngolípídeos na membrana plasmática, influenciando assim na resposta a estimulação por citocinas e estando assim, diretamente relacionada com a polarização de linfócitos TCD4+ (GAUS *et al.*, 2005; ZHU, YUNXIANG *et al.*, 2011; MCDONALD *et al.*, 2014).

Apesar da isoforma alfa ser a mais presente em células do sistema imune (PHAN; BRUNNER, 2021), é possível que a isoforma beta tenha um papel mais importante na biossíntese de glicosíngolípídeos de membrana e, conseqüentemente, na polarização dos linfócitos, uma vez que, quando a mesma é deletada, é possível observar uma menor porcentagem de linfócitos TH1, Treg e TH17. O trabalho de Michaels *et al.*, por exemplo, apontou o LXR β com tendo uma ação fundamental para a função efetora dos linfócitos T regulatórios (MICHAELS *et al.*, 2020), mas pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais isso ocorre assim como impacto das duas isoformas do LXR na diferenciação de linfócitos Th1, Treg e Th17.

Tendo em vista a importância das duas isoformas do LXR na polarização de linfócitos TCD4+, fomos tentar entender como o LXR atua em células TCD4+ polarizadas na ausência das duas isoformas. Inicialmente observamos um aumento da expressão de ABCA1 e APOE apenas no camundongo LXR α KO principalmente nos subtipos Th1 e Th17, sem diferenças significativas, no entanto, quanto a expressão de ABCG1. Estudos anteriores mostraram que via ativação do TCR por meio de α CD3, o que é responsável pelo aumento da proliferação de linfócitos Th1 e Th17, reduz a expressão de ABCA1 e ABCG1 em cerca de 90% (BENSINGER *et al.*, 2008; ARMSTRONG *et al.*, 2010).

Dessa forma, em nossos dados foi possível observar uma redução na expressão desses transportadores tanto no camundongo WT quanto no camundongo LXR beta KO. Por outro lado, o aumento na expressão de ABCA1 e APOE podem apontar para um papel mais proeminente da isoforma alfa do LXR na modulação desses transportadores na polarização de linfócitos TCD4+, uma vez que é necessário que ocorra a redução da expressão de ABCA1, o que leva ao acúmulo de colesterol dentro da célula e é importante para a ativação de linfócitos T, via aumento da fosforilação de ZAP70 e ERK1/2 (ARMSTRONG *et al.*, 2010; BONACINA *et al.*, 2018; KRIMBOU *et al.*, 2004). Além disso, como explicado anteriormente, a ABCA1 atua somente via intermédio da APOE para a produção de partículas de HDL.

Assim, como a deleção da isoforma alfa impediu a redução desses transportadores nas células desse camundongo, é possível que essa isoforma tenha um papel mais proeminente na redução da expressão desses transportadores de colesterol após a ativação dos mesmos via TCR. Todavia, é importante salientar que a total deficiência desses transportadores podem levar a uma ativação prolongada de linfócitos TCD4+ e a posterior apoptose via acúmulo de colesterol e redução da proteína anti-apoptótica Bcl2 (BAZIOTI *et al.*, 2022; MA *et al.*, 2019). Sendo uma possibilidade de que os reduzidos níveis desses transportadores observados quando a isoforma beta do LXR está deletada sejam em decorrência do aumento da apoptose dessas células em decorrência do acúmulo de colesterol ocasionado pela redução na expressão dos transportadores de colesterol.

Em células T ativadas a demanda metabólica por uma fonte rápida de energia para o crescimento, proliferação e diferenciação celular são responsáveis por induzir a translocação de Glut1 para a superfície de linfócitos TCD4+, promovendo assim a glicólise (FRAUWIRTH; THOMPSON, 2004b; MACINTYRE *et al.*, 2014). Células T CD4 efectoras como Th1 e Th17 aumentam sua glicólise aeróbica, enquanto as T regulatórias dependem principalmente da oxidação de ácidos graxos para produzir energia (ZHU, JINFANG; YAMANE; PAUL, 2010; MICHALEK *et al.*, 2011). Quanto a linfócitos T reguladores, trabalhos recentes tem demonstrado que a presença da glicose também promove a diferenciação nesse subtipo celular, mostrando então que esse nutriente é importante para a diferenciação dos 3 subtipos celulares (YU, YU *et al.*, 2022).

Verificamos que na deficiência de LXR α e LXR β ocorre uma redução da expressão do transportador de glicose GLUT1 nos 3 subtipos de linfócitos diferenciados. Assim, uma redução da captação de glicose nessas células pode ser uma das causas da reduzida taxa de diferenciação das mesmas, uma vez que a redução na metabolização de glicose em linfócitos T reduz sua proliferação e faz com que os mesmos entrem em apoptose (RATHMELL *et al.*, 2000; VANDER HEIDEN, MATTHEW G. *et al.*, 2001; ALVES *et al.*, 2006;).

Observamos também um aumento na expressão do fator de transcrição SREBP1a, o qual está diretamente relacionado com o metabolismo de lipídeos (JIANG; ZHANG; LOU, 2020). Em trabalhos anteriores foi demonstrado que o SREBP1 tem um papel direto na supressão de linfócitos TH17 por meio da sua

interação com o fator de transcrição Ahr (JIANG; ZHANG; LOU, 2020), o que pode ser um indicativo de que essa inibição também pode ocorrer em outros tipos de linfócitos T CD4+. Além disso, é possível que os linfócitos TCD4+ utilizem o SREBP1a como uma tentativa de suprir as demandas metabólicas para a resposta efetora, uma vez que apesar desse fator de transcrição ser dispensável para a proliferação homeostática, o mesmo tem um importante papel na manutenção dos níveis lipídicos, permitindo a biogênese da membrana plasmática, crescimento celular e aumento do metabolismo oxidativo (KIDANI *et al.*, 2013).

Um dos mecanismos de indução da expressão do GLUT1 é a ativação do fosfatidil inositol 3 kinase (PI3K) que fosforila a proteína kinase b (Akt), a qual aumenta o recrutamento do GLUT1 do citoplasma para superfície celular (FINLAY, 2012). Trabalhos anteriores mostraram que a Akt regula a atividade transcricional do NF-kB ao induzir a fosforilação e subseqüentemente a degradação do inibidor kB (IkB) (OZES *et al.*, 1999; BAI; UENO; VOGT, 2009). NF-kB é um fator de transcrição com um papel essencial na diferenciação e produção de citocinas em linfócitos T, sendo importante para o comprometimento da diferenciação em Th1 (ARONICA *et al.*, 1999), Treg (LONG *et al.*, 2009) e Th17 (RUAN *et al.*, 2011).

Verificamos assim, que após a ativação de linfócitos T por meio do uso de PMA e ionomicina por 15 minutos, ocorreu uma redução na fosforilação da p-P65 (subunidade do NF-kB), tanto em linfócitos isolados de animais LXR α KO como LXR β KO, sendo que a redução nas células do animal LXR β KO foi a mais acentuada, sem expressão da p65. Isso pode ser um indicativo que a reduzida ativação via TCR, principalmente nas células obtidas a partir do animal deficiente para a isoforma beta do LXR, pode estar atuando na redução da expressão de NF-kB e assim estar reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, o que tem um efeito direto na polarização desses linfócitos. Esse efeito pode ocorrer em decorrência de uma provável alteração na biossíntese de glicosíngolipídeos, que, como mencionado anteriormente, são essenciais na formação da sinapse imunológica, de balsas lipídicas e conseqüentemente na ativação de linfócitos T via TCR (JURY; FLORES-BORJA; KABOURIDIS, 2007).

Nosso próximo passo foi o de tentar entender qual das isoformas do LXR tem um papel mais importante num contexto de ativação desse receptor. Observamos que na presença do agonista de LXR GW3965 ocorre uma redução da porcentagem de

linfócitos CD4+IFN- γ + (Th1) e CD4+IL-17+ (Th17), o que corrobora com os dados da literatura que afirmam que o LXR tem um efeito anti-inflamatório (CUI *et al.*, 2011a; HEROLD *et al.*, 2017a; MA *et al.*, 2018). Verificamos com esse experimento que o agonista do LXR GW3965 atua nas duas isoformas do LXR, sendo que a taxa de diferenciação na deleção da isoforma beta continuou sendo a menor.

Em num contexto de inibição de LXR usando a PFG-2 α , verificamos um aumento na porcentagem de linfócitos CD4+IFN- γ + (TH1). O uso da PFG-2 α como um antagonista foi demonstrado como um promotor da inflamação em células de micróglia, estando relacionado com a progressão da doença de Alzheimer (ZHUANG *et al.*, 2013a). Observamos assim, que o inibidor PFG-2 α também atuou nas duas isoformas de LXR, mostrando que ambas as isoformas são alvos dessa molécula.

Sabendo das alterações metabólicas observadas anteriormente, principalmente via redução do transportador de glicose GLUT1 e aumento do fator de transcrição SREBP1 em linfócitos diferenciados, decidimos investigar como estaria o acúmulo de corpúsculos lipídicos, uma vez que esses corpúsculos podem carregar colesterol (OLZMANN; CARVALHO, 2019) e analisar a morfologia mitocondrial desses linfócitos. Observamos em nossos ensaios um aumento no acúmulo de corpúsculos lipídicos, principalmente nas células obtidas do camundongo deficientes para a isoforma beta do LXR e diferenciadas para o subtipo TH1. O acúmulo desses corpúsculos em células que não sejam adipócitos é um marcador para diversas patologias, como a doença hepática gordurosa não alcoólica (SCORLETTI; CARR, 2022), nefropatia diabética (OPAZO-RÍOS *et al.*, 2020) e alguns tipos de câncer (PETAN, 2020).

Além disso, o acúmulo de colesterol em linfócitos T foi demonstrado como um importante indutor de exaustão celular (MA *et al.*, 2019) o que corrobora com os dados de fissão mitocondrial, uma vez que foi demonstrado que mitocôndrias em linfócitos T exaustos são mais fissionadas (LIU *et al.*, 2020). A fissão mitocondrial é tradicionalmente descrita como aumentada em linfócitos T glicolíticos (BUCK, MICHAEL D D. *et al.*, 2016). Todavia, apesar de ser observado um aumento da fissão mitocondrial nesses linfócitos, é possível que esse aumento da fissão mitocondrial esteja correlacionado com o acúmulo de corpúsculos lipídicos, ocasionando assim uma exaustão celular (LIU *et al.*, 2020).

Dentre as modificações que o LXR pode sofrer, uma modificação pós-

traducional bem caracterizada em macrófagos e micróglia é a sumoilação do LXR (LEE *et al.*, 2016), o qual esta relacionado com a inibição da ativação do NF- κ B e AP-1 (TALAMILLO *et al.*, 2020), mas pouco se sabe se esse efeito ocorreria em linfócitos TCD4+. Sabendo do efeito que a sumoilação tem nos LXRs, empregamos o uso do inibidor da sumoilação 2D08 esperando que o mesmo demonstrasse um efeito pró-inflamatório nos linfócitos. No entanto, não foi possível observar efeitos relevantes quanto a polarização de linfócitos nos perfis Th1 e Treg e expressão dos genes alvos para LXR na presença do fármaco, o que pode ser um indicativo de que a sumoilação do LXR não teria efeitos relevantes na polarização desses linfócitos. Todavia, limitações quanto a falta de especificidade do fármaco para a inibição da sumoilação do LXR poderiam apontar para efeitos não específicos dessa inibição em linfócitos T. Uma vez que a sumoilação é uma modificação pós-traducional que pode ocorrer em diversos processos celulares, como por exemplo, na PDK1, tendo um papel essencial na proliferação homeostática de linfócitos TCD4+ (SUN *et al.*, 2022).

Por fim, verificamos num modelo antígeno específico um aumento da produção das citocinas pró-inflamatória IL-17 e IFN- γ nos camundongos LXR α KO e LXR β KO com um aumento mais significativo no camundongo LXR β KO. Observamos um aumento da porcentagem de células CD4+ IFN- γ + (TH1) e CD4+ IL-17+ (TH17), principalmente no camundongo LXR β KO por meio de ensaios *in-vitro* e na secreção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, os dados *in-vitro* corroboraram com as análises *in-vivo* posteriormente realizadas, que mostraram uma maior inflamação no camundongo LXR β KO, em decorrência do aumento do inchaço na pata posterior do camundongo em um modelo de DTH.

Em trabalhos anteriores foi-se demonstrado que a ativação do LXR melhora a gravidade da encefalomielite experimental autoimune (EAE), que é um modelo de esclerose múltipla, via inibição da polarização em Th17 e a deficiência desse receptor piora o quadro da doença (CUI *et al.*, 2011c), mostrando um papel anti-inflamatório do LXR. Esse quadro observado de aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e IL-17 no camundongo LXR β KO pode estar diretamente relacionado com a redução na porcentagem de linfócitos T reguladores, uma vez que eles tem um papel essencial no controle da resposta imune inflamatória (BETTINI, MARIA; VIGNALI, 2009).

Essa hipótese corrobora com dados na literatura que apontam o LXR β KO

como um fator essencial na funcionalidade das Tregs e na sua ausência, camundongos desenvolvem uma doença autoimune fatal, devido a uma exacerbada produção de citocinas inflamatórias como IFN- γ e IL-17 (MICHAELS *et al.*, 2020). Observamos, então, que a deleção do LXR β tem um papel importante na função efetora de linfócitos Th1, Treg e Th17, tendo em vista que quando essa isoforma está deletada, observamos um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias frente a um modelo de resposta à um antígeno específico. No entanto, apesar de usarmos um modelo dependente da ação de linfócitos T, o modelo animal utilizado neste trabalho apresenta a deleção em todo o corpo do receptor LXR. É necessário levar em consideração que efeitos secundários em outras células podem ocorrer. Sendo uma opção futura a realização de testes em um modelo com deleção específica para LXR em linfócitos T CD4+, com o intuito de confirmar os dados obtidos.

6 CONCLUSÃO

Resumo dos principais resultados obtidos:

- Os LXRs são necessários para a diferenciação de linfócitos TCD4 nos perfis Th1, Th17 e Treg;
- O uso do antagonista (PGF2 α) e agonista (GW3965) de LXR atuam nas duas isoformas, modulando assim a diferenciação de linfócitos TCD4+;
- A inibição da sumoilação não alterou a diferenciação de linfócitos TCD4+ em Th1 e Treg;
- A reduzida taxa de diferenciação e produção de citocinas pode está relacionada com a redução da ativação do NF-Kb e transcrição de GLUT1;
- Células obtidas de animais LXR β KO diferenciadas no subtipo TH1 apresentaram um maior acúmulo de corpúsculos lipídicos e fissão mitocondrial;
- Animais LXR β KO apresentaram uma maior produção da citocina pró-inflamatória IL-17 e IFN- γ do que os LXR α KO *in-vivo*;
- Ambas as isoformas dos LXRs são importantes para a maturação, desenvolvimento e diferenciação de linfócitos TCD4+, com um papel mais proeminente do LXR β .

Este trabalho teve como principal intuito investigar o papel dos LXRs na diferenciação de linfócitos TCD4+. Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que a isoforma beta do LXR apresentou um papel mais relevante na polarização de linfócitos TCD4+. Sugerimos que a menor polarização está ocorrendo devido a uma redução na ativação da via do NF-kb nesses linfócitos, o que tem um impacto direto no seu metabolismo, como, por exemplo, reduzindo os níveis de GLUT1 nessas células. (Fig.25).

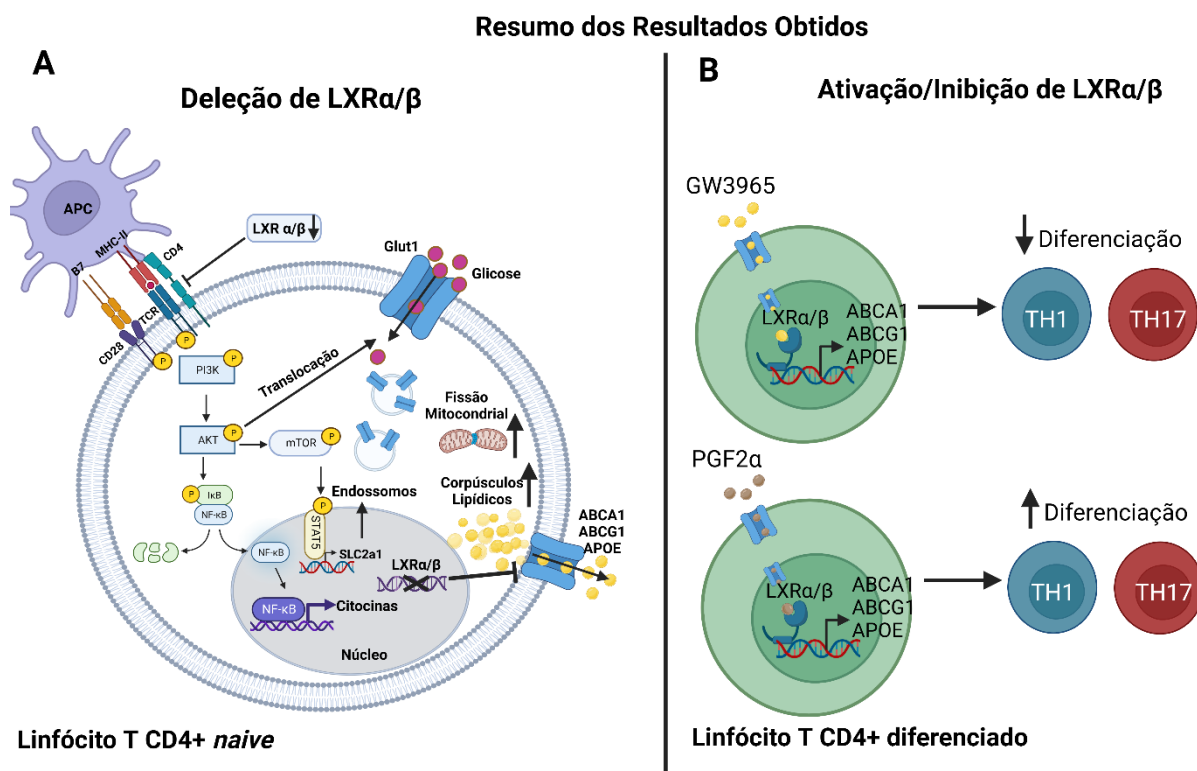


Figura 25: Mecanismo de ação proposto quando ao papel dos LXRs na diferenciação de linfócitos TCD4+. (A) Segundo os dados obtidos, quando o LXR é deletado, principalmente a isoforma beta, isso afetaria a biossíntese de glicoesfingolípídeos de membrana, o que impactaria de forma direta na formação da sinapse imunológica e dessa forma, na sinalização via TCR. Com uma sinalização do TCR impactada, a ativação do NF- κ B não ocorreria, dessa forma impedindo sua translocação para o núcleo e a produção de citocinas pró-inflamatórias. A redução na ativação do NF- κ B também teria um impacto a translocação de GLUT1 para a superfície da célula impedindo assim a entrada de glicose pela célula. A deleção do LXR, principalmente da isoforma beta, levaria a uma redução dos transportadores de colesterol e a um aumento do acúmulo de corpúsculos lipídicos dentro da célula e fissão mitocondrial. (B) A ativação do LXR por meio do uso do agonista GW3965 atuou nas duas isoformas do LXR reduzindo a polarização em Th1 e Th17, enquanto o uso do antagonista PGF2 α teve um efeito oposto, aumentando a diferenciação em Th1, o que aponta para um efeito anti-inflamatório do LXR nas duas isoformas desse receptor.

7 REFERÊNCIAS

A-GONZALEZ, Noelia *et al.* Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity*, v. 31, n. 2, p. 245–258, 21 ago. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19646905/>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

ABBAS, Abul K; LICHTMAN, Andrew H; PILLAI, Shiv. Cellular and Molecular Immunology - 10th Edition. p. 600, 2021. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/books/cellular-and-molecular-immunology/abbas/978-0-323-75748-5>>. Acesso em: 6 maio 2022.

ABRAMSON, Jakob; ANDERSON, Graham. Thymic Epithelial Cells. *Annual review of immunology*, v. 35, p. 85–118, 26 abr. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28226225/>>. Acesso em: 9 maio 2022.

ACTOR, Jeffrey K. Autoimmunity: Regulation of Response to Self. *Introductory Immunology*. [S.l.]: Elsevier, 2019a. p. 91–102.

ACTOR, Jeffrey K. Immune Hypersensitivities. *Introductory Immunology*. [S.l.]: Elsevier, 2019b. p. 103–110.

AGUILAR-BALLESTER, María *et al.* Impact of Cholesterol Metabolism in Immune Cell Function and Atherosclerosis. *Nutrients*, v. 12, n. 7, p. 1–19, 1 jul. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3400846/>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

AHN, Eunseon *et al.* Role of PD-1 during effector CD8 T cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 115, n. 18, p. 4749–4754, 1 maio 2018. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1718217115>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

ALBERTS, Bruce *et al.* The Adaptive Immune System. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21070/>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

ALVES, Nuno L. *et al.* The Noxa/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells. *Immunity*, v. 24, n. 6, p. 703–716, jun. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16782027/>>. Acesso em: 3 ago. 2022.

ANDERSON, Mark S.; SU, Maureen A. Aire and T cell Development. *Current opinion in immunology*, v. 23, n. 2, p. 198, abr. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/213073725/>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

APPAY, Victor; DOUEK, Daniel C.; PRICE, David A. CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nature Medicine* 2008 14:6, v. 14, n. 6, p. 623–628, 5 jun. 2008. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nm.f.1774>>. Acesso em: 25 jan. 2023.

ARMSTRONG, Allison J. *et al.* ATP-Binding Cassette Transporter G1 Negatively Regulates Thymocyte and Peripheral Lymphocyte Proliferation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 184, n. 1, p. 173, 1 jan. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/203316475/>>. Acesso em: 3 ago. 2022.

ARONICA, MA *et al.* Preferential role for NF-kappa B/Rel signaling in the type 1 but not type 2 T cell-dependent immune response in vivo - PubMed. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10528218/>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

EVERY, Danielle T. *et al.* IL-21-Induced Isotype Switching to IgG and IgA by Human Naive B Cells Is Differentially Regulated by IL-4. *The Journal of Immunology*, v. 181, n. 3, p. 1767–1779, 1 ago. 2008. Disponível em: <<https://journals.aai.org/jimmunol/article/181/3/1767/38340/IL-21-Induced-Isotype-Switching-to-IgG-and-IgA-by>>. Acesso em: 26 abr. 2023.

BAI, Dong; UENO, Lynn; VOGT, Peter K. Akt-mediated regulation of NFkB and the essentialness of NFkB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, v. 125, n. 12, p. 2863, 12 dez. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/182767458/>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

em: 28 jul. 2022.

BAZIOTI, Venetia *et al.* T cell cholesterol efflux suppresses apoptosis and senescence and increases atherosclerosis in middle aged mice. *Nature Communications* 2022 13:1, v. 13, n. 1, p. 1–23, 1 jul. 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-022-31135-4>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

BECEIRO, Susana *et al.* Liver X Receptor Nuclear Receptors Are Transcriptional Regulators of Dendritic Cell Chemotaxis. *Molecular and Cellular Biology*, v. 38, n. 10, p. 534–551, 1 maio 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1128/MCB.00534-17>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

BENSINGER, Steven J. *et al.* LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell*, v. 134, n. 1, p. 97–111, 11 jul. 2008a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18614014/>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

BENSINGER, Steven J. *et al.* LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell*, v. 134, n. 1, p. 97–111, 11 jul. 2008b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18614014/>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

BENTAL, Michal; DEUTSCH, Carol. Metabolic changes in activated T cells: An NMR study of human peripheral blood lymphocytes. *Magnetic Resonance in Medicine*, v. 29, n. 3, p. 317–326, 1 mar. 1993. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mrm.1910290307>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

BETTINI, Maria; VIGNALI, Dario AA. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Current opinion in immunology*, v. 21, n. 6, p. 612, dez. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1910290307/>>. Acesso em: 25 jul. 2022.

BETTINI, Matthew L.; VIGNALI, Dario A.A. Development of Thymically-Derived Natural Regulatory T Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1183, p. 1, 10 jan. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1910290307/>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

BILOTTA, Maria Teresa *et al.* Liver X Receptors: Regulators of Cholesterol Metabolism, Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 2867, 3 nov. 2020.

BODZIOCH, Marek *et al.* The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nature Genetics* 1999 22:4, v. 22, n. 4, p. 347–351, ago. 1999. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ng0899_347>. Acesso em: 23 jan. 2023.

BOGIE, Jeroen F.J. *et al.* Liver X receptor beta deficiency attenuates autoimmune-associated neuroinflammation in a T cell-dependent manner. *Journal of Autoimmunity*, v. 124, p. 102723, 1 nov. 2021.

BONACINA, Fabrizia *et al.* Myeloid apolipoprotein E controls dendritic cell antigen presentation and T cell activation. *Nature communications*, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30082772/>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

BUCK, Michael D D. *et al.* Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate Through Metabolic Programming. *Cell*, v. 166, n. 1, p. 63, 6 jun. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27011111/>>. Acesso em: 23 jan. 2023.

BUCK, Michael D.; O'SULLIVAN, David; PEARCE, Erika L. T cell metabolism drives immunity. *Journal of Experimental Medicine*, v. 212, n. 9, p. 1345–1360, 24 ago. 2015. Disponível em: <www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20151159>. Acesso em: 3 dez. 2020.

CALKIN, Anna C.; TONTONNOZ, Peter. Liver x receptor signaling pathways and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 30, n. 8, p. 1513–1518, ago. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20631351/>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

CERMENATI, G. *et al.* Liver X receptors, nervous system, and lipid metabolism. *Journal of Endocrinological Investigation*, v. 36, n. 6, p. 435–443, 18 jun. 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.3275/8941>>. Acesso em: 4 dez. 2020.

CHAKRABARTI, R.; ENGLEMAN, E. G. Interrelationships between mevalonate metabolism and the mitogenic signaling pathway in T lymphocyte proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, n. 19, p. 12216–12222, 5 jul. 1991. Disponível em: <<http://www.jbc.org/article/S0021925818988848/fulltext>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

CHAN, Christopher T. *et al.* Liver X receptors are required for thymic resilience and T cell output. *Journal of Experimental Medicine*, v. 217, n. 10, 27 jul. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1084/jem.20200318>>. Acesso em: 6 maio 2022.

CHANG, John T.; WHERRY, E. John; GOLDRATH, Ananda W. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nature Immunology* 2014 15:12, v. 15, n. 12, p. 1104–1115, 14 nov. 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ni.3031>>. Acesso em: 16 ago. 2022.

CHENG, Jing; MONTECALVO, Angela; KANE, Lawrence P. Regulation of NF- κ B induction by TCR/CD28. *Immunologic research*, v. 50, n. 2–3, p. 113–117, ago. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21717079/>>. Acesso em: 27 jul. 2022.

CHITGOPEKER, Pooja; SAHNI, Debjani. T-cell receptor gene rearrangement detection in suspected cases of cutaneous T-cell lymphoma. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 134, n. 4, p. 1–5, 1 abr. 2014. Disponível em: <<http://www.jidonline.org/article/S0022202X15366999/fulltext>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

CHO, Bryan K. *et al.* Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, n. 6, p. 2976–2981, 16 mar. 1999. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.96.6.2976>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

CHOI, Ji Yeon *et al.* Mer signaling increases the abundance of the transcription factor LXR to promote the resolution of acute sterile inflammation. *Science signaling*, v. 8, n. 365, 24 fev. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25714463/>>. Acesso em: 18 abr. 2023.

CIERI, Nicoletta *et al.* IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood*, v. 121, n. 4, p. 573–584, 24 jan. 2013. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/121/4/573/31229/IL-7-and-IL-15-instruct-the-generation-of-human>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

CROTTY, Shane. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity*, v. 50, n. 5, p. 1132–1148, 21 maio 2019.

CRUZ-GARCIA, Lourdes; SCHLEGEL, Amnon. Lxr-driven enterocyte lipid droplet formation delays transport of ingested lipids. *Journal of lipid research*, v. 55, n. 9, p. 1944–1958, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25030662/>>. Acesso em: 13 jan. 2023.

CUI, Guoliang *et al.* Liver X receptor (LXR) mediates negative regulation of mouse and human Th17 differentiation. *The Journal of clinical investigation*, v. 121, n. 2, p. 658–670, 1 fev. 2011a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21266776/>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

CUI, Guoliang *et al.* Liver X receptor (LXR) mediates negative regulation of mouse and human Th17 differentiation. *Journal of Clinical Investigation*, v. 121, n. 2, p. 658–670, 1 fev. 2011b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21266776/>>. Acesso em: 5 dez. 2020.

CUI, Guoliang *et al.* Liver X receptor (LXR) mediates negative regulation of mouse and human Th17 differentiation. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 121, n. 2, p. 658–670, 1 fev. 2011c. Disponível em: <<http://www.jci.org>>. Acesso em: 15 ago. 2022.

CUI, Guoliang *et al.* Liver X receptor (LXR) mediates negative regulation of mouse and human Th17 differentiation. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 121, n. 2, p. 658, 2 fev. 2011d. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3026720/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20110202/)>. Acesso em: 3 ago. 2022.

DARDALHON, Valérie *et al.* Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nature Immunology* 2018 19:7, v. 19, n. 7, p. 665–673, 20 jun. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41590-018-0120-4>>. Acesso em: 18 abr. 2023.

DARDALHON, Valérie *et al.* Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *Journal of autoimmunity*, v. 31, n. 3, p. 252, nov. 2008. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3178062/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18711113/)>. Acesso em: 18 abr. 2023.

DEBERARDINIS, Ralph J.; LUM, Julian J.; THOMPSON, Craig B. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent modulation of carnitine palmitoyltransferase 1A expression regulates lipid metabolism during hematopoietic cell growth. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 49, p. 37372–37380, 8 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.jbc.org/article/S0021925820719113/fulltext>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

DUPAGE, Michel; BLUESTONE, Jeffrey A. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nature reviews. Immunology*, v. 16, n. 3, p. 149–163, 1 mar. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26875830/>>. Acesso em: 25 jul. 2022.

EDINGER, Aimee L.; THOMPSON, Craig B. Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Molecular Biology of the Cell*, v. 13, n. 7, p. 2276–2288, 13 out. 2002. Disponível em: <<https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.01-12-0584>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

EGGENHUIZEN, Peter J.; NG, Boaz H.; OOI, Joshua D. Treg Enhancing Therapies to Treat Autoimmune Diseases. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 19, p. 1–18, 1 out. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32977677/>>. Acesso em: 25 jul. 2022.

ENDO-UMEDA, Kaori *et al.* Myeloid LXR (Liver X Receptor) Deficiency Induces Inflammatory Gene Expression in Foamy Macrophages and Accelerates Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 42, n. 6, p. 719–731, 1 jun. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35477277/>>. Acesso em: 18 abr. 2023.

FAHY, Eoin *et al.* A comprehensive classification system for lipids1. *Journal of Lipid Research*, v. 46, n. 5, p. 839–861, 1 maio 2005. Disponível em: <<http://www.jlr.org/article/S002227520339687/fulltext>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

FAHY, Eoin *et al.* Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, v. 50, n. SUPPL., p. S9–S14, 1 abr. 2009. Disponível em: <<http://www.jlr.org/article/S002227520305800/fulltext>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

FESSLER, Michael B. The challenges and promise of targeting the Liver X Receptors for treatment of inflammatory disease. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 181, p. 1–12, 1 jan. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28720427/>>. Acesso em: 3 dez. 2020.

FINLAY, David K. Regulation of glucose metabolism in T cells: New insight into the role of phosphoinositide 3-kinases. *Frontiers in Immunology*, v. 3, n. AUG, p. 247, 2012.

FOND, Aaron M. *et al.* Apoptotic cells trigger a membrane-initiated pathway to increase ABCA1. *The Journal of clinical investigation*, v. 125, n. 7, p. 2748–2758, 1 jul. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26075824/>>. Acesso em: 18 abr. 2023.

FRAUWIRTH, Kenneth A.; THOMPSON, Craig B. Regulation of T Lymphocyte Metabolism. *The Journal of Immunology*, v. 172, n. 8, p. 4661–4665, 15 abr. 2004a. Disponível em: <<https://www.jimmunol.org/content/172/8/4661>>. Acesso em: 27 jul. 2022.

FRAUWIRTH, Kenneth A.; THOMPSON, Craig B. Regulation of T Lymphocyte Metabolism. *The*

Journal of Immunology, v. 172, n. 8, p. 4661–4665, 15 abr. 2004b. Disponível em: <<https://www.jimmunol.org/content/172/8/4661>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

GERMAIN, Ronald N. T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nature Reviews Immunology* 2002 2:5, v. 2, n. 5, p. 309–322, 2002. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nri798>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

GETT, Amanda V.; HODGKIN, Philip D. Cell division regulates the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, n. 16, p. 9488–9493, 4 ago. 1998. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.95.16.9488>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

GEYEREGGER, René *et al.* Liver X receptors interfere with cytokine-induced proliferation and cell survival in normal and leukemic lymphocytes. *Journal of leukocyte biology*, v. 86, n. 5, p. 1039–1048, 11 ago. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19671841/>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

GHITTONI, Raffaella *et al.* Simvastatin inhibits T-cell activation by selectively impairing the function of Ras superfamily GTPases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 19, n. 6, p. 1–24, abr. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15677697/>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

GUDMUNDSDOTTIR, Hrefna; WELLS, Andrew D.; TURKA, Laurence A. Dynamics and Requirements of T Cell Clonal Expansion In Vivo at the Single-Cell Level: Effector Function Is Linked to Proliferative Capacity. *The Journal of Immunology*, v. 162, n. 9, p. 5212–5223, 1 maio 1999. Disponível em: <<https://journals.aai.org/jimmunol/article/162/9/5212/32148/Dynamics-and-Requirements-of-T-Cell-Clonal>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

HAN, Shuhong *et al.* Liver X Receptor Agonist Therapy Prevents Diffuse Alveolar Hemorrhage in Murine Lupus by Repolarizing Macrophages. *Frontiers in immunology*, v. 9, n. FEB, 2 fev. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29456535/>>. Acesso em: 6 maio 2022.

HAYES, Sandra M.; LI, Li Qi; LOVE, Paul E. TCR signal strength influences $\alpha\beta/\gamma\delta$ lineage fate. *Immunity*, v. 22, n. 5, p. 583–593, 1 maio 2005. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S1074761305001093/fulltext>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

HE, Xi; PARK, Kyewon; KAPPES, Dietmar J. The role of ThPOK in control of CD4/CD8 lineage commitment. *Annual review of immunology*, v. 28, p. 295–320, 23 abr. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20307210/>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

HEIDEN, Matthew G.Vander; CANTLEY, Lewis C.; THOMPSON, Craig B. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 22 maio 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19460998/>>. Acesso em: 5 dez. 2020.

HEROLD, Martin *et al.* Liver X receptor activation promotes differentiation of regulatory T cells. *PLoS one*, v. 12, n. 9, 1 set. 2017a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28926619/>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

HEROLD, Martin *et al.* Liver X receptor activation promotes differentiation of regulatory T cells. *PLoS ONE*, v. 12, n. 9, 1 set. 2017b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28926619/>>. Acesso em: 6 maio 2022.

HIEBL, Verena *et al.* Natural products as modulators of the nuclear receptors and metabolic sensors LXR, FXR and RXR. *Biotechnology Advances*, v. 36, n. 6, p. 1657–1698, 1 nov. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29548878/>>. Acesso em: 3 dez. 2020.

HINDINGER, Claudia *et al.* Liver X receptor activation decreases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience Research*, v. 84, n. 6, p. 1225–1234, 1 nov. 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jnr.21038>>. Acesso em: 5 dez. 2020.

IM, Seung Soon; OSBORNE, Timothy F. Liver X Receptors in Atherosclerosis and Inflammation. *Circulation research*, v. 108, n. 8, p. 996, 4 abr. 2011. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3082200/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/220111174/)>. Acesso em: 25 jul. 2022.

ISTVAN, Eva S. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *American Heart Journal*, v. 144, n. 6 SUPPL., 1 dez. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12486413/>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

JAKOBSSON, Tomas *et al.* GPS2 Is Required for Cholesterol Efflux by Triggering Histone Demethylation, LXR Recruitment, and Coregulator Assembly at the ABCG1 Locus. *Molecular Cell*, v. 34, n. 4, p. 510–518, 14 maio 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19481530/>>. Acesso em: 3 dez. 2020.

JALIL, Antoine *et al.* Revisiting the Role of LXRs in PUFA Metabolism and Phospholipid Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 15, 1 ago. 2019. Disponível em: <[pmc/articles/PMC6696407/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35444444/)>. Acesso em: 18 abr. 2023.

JIANG, Tao; ZHANG, Guangji; LOU, Zhaohuan. Role of the Sterol Regulatory Element Binding Protein Pathway in Tumorigenesis. *Frontiers in Oncology*, v. 10, p. 1788, 8 set. 2020.

JOACHIMS, Michelle L. *et al.* Human $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ Thymocyte Development: TCR Gene Rearrangements, Intracellular TCR β Expression and $\gamma\delta$ Developmental Potential – Differences between Men and Mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 176, n. 3, p. 1543, 2 fev. 2006. Disponível em: <[pmc/articles/PMC1592528/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/161111174/)>. Acesso em: 11 jan. 2023.

JOHNSTON, Robert J. *et al.* Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science*, v. 325, n. 5943, p. 1006–1010, 21 ago. 2009. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1175870>>. Acesso em: 18 abr. 2023.

JOHNSTON, Robert J. *et al.* STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation. *Journal of Experimental Medicine*, v. 209, n. 2, p. 243–250, 13 fev. 2012. Disponível em: <www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20111174>. Acesso em: 18 abr. 2023.

JURY, Elizabeth C.; FLORES-BORJA, Fabian; KABOURIDIS, Panagiotis S. Lipid rafts in T cell signalling and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 18, n. 5–3, p. 608, 2007. Disponível em: <[pmc/articles/PMC2596300/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/161111174/)>. Acesso em: 23 jan. 2023.

KALAANY, Nada Y.; MANGELSDORF, David J. LXRs and FXR: The Yin and Yang of cholesterol and fat metabolism. *Annual Review of Physiology*, v. 68, p. 159–191, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16460270/>>. Acesso em: 5 dez. 2020.

KIDANI, Yoko *et al.* Sterol regulatory element-binding proteins are essential for the metabolic programming of effector T cells and adaptive immunity. *Nature immunology*, v. 14, n. 5, p. 489–499, maio 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23563690/>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

KOLDAMOVA, Radosveta; FITZ, Nicholas F.; LEFTEROV, Iliya. The role of ATP-binding cassette transporter A1 in Alzheimer's disease and neurodegeneration. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1801, n. 8, p. 824, ago. 2010. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3712769/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/201111174/)>. Acesso em: 23 jan. 2023.

KORNBERG, Michael D. The immunologic Warburg effect: Evidence and therapeutic opportunities in autoimmunity. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, v. 12, n. 5, 1 set. 2020. Disponível em: <[pmc/articles/PMC7507184/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35444444/)>. Acesso em: 11 jan. 2023.

KORY, Nora; FARESE, Robert V.; WALTHER, Tobias C. Targeting Fat: Mechanisms of Protein Localization to Lipid Droplets. *Trends in Cell Biology*, v. 26, n. 7, p. 535–546, 1 jul. 2016.

KOUTROLOS, Michail *et al.* Treg cells mediate recovery from EAE by controlling effector T cell proliferation and motility in the CNS. *Acta Neuropathologica Communications*, v. 2, n. 1, 27 jan. 2014. Disponível em: <[pmc/articles/PMC4268825/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2596300/)>. Acesso em: 25 jul. 2022.

KRIMBOU, Larbi *et al.* Molecular interactions between apoE and ABCA1: impact on apoE lipidation. *Journal of Lipid Research*, v. 45, n. 5, p. 839–848, 1 maio 2004.

LA GRUTA, Nicole L.; TURNER, Stephen J. T cell mediated immunity to influenza: mechanisms of viral control. *Trends in immunology*, v. 35, n. 8, p. 396–402, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25043801/>>. Acesso em: 16 ago. 2022.

LAIDLAW, Brian J.; CRAFT, Joseph E.; KAECH, Susan M. The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory. *Nature Reviews Immunology* 2016 16:2, v. 16, n. 2, p. 102–111, 19 jan. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nri.2015.10>>. Acesso em: 16 ago. 2022.

LEE, Jee Hoon *et al.* Small heterodimer partner SHP mediates liver X receptor (LXR)-dependent suppression of inflammatory signaling by promoting LXR SUMOylation specifically in astrocytes. *Science signaling*, v. 9, n. 439, 2 ago. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27485016/>>. Acesso em: 19 jan. 2023.

LEWANDOWSKI, Cutler T. *et al.* Metabolomic analysis of a selective ABCA1 inducer in obesogenic challenge provides a rationale for therapeutic development. *EBioMedicine*, v. 66, 1 abr. 2021. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S2352396421000803/fulltext>>. Acesso em: 23 jan. 2023.

LI, Juan *et al.* Simvastatin and Atorvastatin inhibit DNA replication licensing factor MCM7 and effectively suppress RB-deficient tumors growth. *Cell Death & Disease*, v. 8, n. 3, p. e2673, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31031094/>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

LI, Pingping *et al.* NCoR repression of LXRs restricts macrophage biosynthesis of insulin-sensitizing omega 3 fatty acids. *Cell*, v. 155, n. 1, 26 set. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24074869/>>. Acesso em: 18 abr. 2023.

LIU, Yi Na *et al.* Hypoxia Induces Mitochondrial Defect That Promotes T Cell Exhaustion in Tumor Microenvironment Through MYC-Regulated Pathways. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 21 ago. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3472844/>>. Acesso em: 25 jan. 2023.

LIVÁK, Ferenc *et al.* $\alpha\beta$ Lineage-committed thymocytes can be rescued by the $\gamma\delta$ T cell receptor (TCR) in the absence of TCR β chain. *European Journal of Immunology*, v. 27, n. 11, p. 2948–2958, 1 nov. 1997. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.1830271130>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

LONG, Meixiao *et al.* Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity*, v. 31, n. 6, p. 921–931, 18 dez. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20064449/>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

MA, Xingzhe *et al.* Cholesterol Induces CD8+ T Cell Exhaustion in the Tumor Microenvironment. *Cell metabolism*, v. 30, n. 1, p. 143–156.e5, 2 jul. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31031094/>>. Acesso em: 23 jan. 2023.

MA, Xingzhe *et al.* Cholesterol negatively regulates IL-9-producing CD8 + T cell differentiation and antitumor activity. *The Journal of experimental medicine*, v. 215, n. 6, p. 1555–1569, 1 jun. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29743292/>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

MACINTYRE, Andrew N. *et al.* The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metabolism*, v. 20, n. 1, p. 61–72, 1 jul. 2014. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S1550413114002125/fulltext>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

MACIVER, Nancie J.; MICHALEK, Ryan D.; RATHMELL, Jeffrey C. Metabolic Regulation of T Lymphocytes. *https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095956*, v. 31, p. 259–283, 21 mar. 2013. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-immunol-032712-095956>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

MAILLEUX, Jo *et al.* Active liver X receptor signaling in phagocytes in multiple sclerosis lesions. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, v. 24, n. 3, p. 279–289, 1 mar. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28273782/>>. Acesso em: 15 ago. 2022.

MARTINEZ-SANCHEZ, Mariana E. *et al.* Role of cytokine combinations on CD4+ T cell differentiation, partial polarization, and plasticity: Continuous network modeling approach. *Frontiers in Physiology*, v. 9, n. AUG, 2 ago. 2018. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6089340/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31811111/)>. Acesso em: 5 dez. 2020.

MATALONGA, Jonathan *et al.* The Nuclear Receptor LXR Limits Bacterial Infection of Host Macrophages through a Mechanism that Impacts Cellular NAD Metabolism. *Cell Reports*, v. 18, n. 5, p. 1241–1255, 31 jan. 2017.

MCDONALD, Georgia *et al.* Normalizing glycosphingolipids restores function in CD4+ T cells from lupus patients. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 124, n. 2, p. 712, 2 fev. 2014. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC3904606/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24811111/)>. Acesso em: 28 jul. 2022.

MICHAELS, Anthony J *et al.* Nuclear receptor LXR β controls fitness and functionality of activated T cells. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1084/jem.20201311>>. Acesso em: 6 maio 2022.

MICHALEK, Ryan D. *et al.* Cutting Edge: Distinct Glycolytic and Lipid Oxidative Metabolic Programs Are Essential for Effector and Regulatory CD4+ T Cell Subsets. *The Journal of Immunology*, v. 186, n. 6, p. 3299–3303, 15 mar. 2011. Disponível em: <<https://www.jimmunol.org/content/186/6/3299>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

MURPHY, Kenneth M.; STOCKINGER, Brigitta. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nature immunology*, v. 11, n. 8, p. 674, ago. 2010. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC3249647/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20611111/)>. Acesso em: 25 jul. 2022.

NASI, Milena *et al.* Thymic output and functionality of the IL-7/IL-7 receptor system in centenarians: implications for the neolymphogenesis at the limit of human life. *Aging Cell*, v. 5, n. 2, p. 167–175, 1 abr. 2006. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1474-9726.2006.00204.x>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

NOMURA, Sayaka *et al.* Styrylphenylphthalimides as Novel Transrepression-Selective Liver X Receptor (LXR) Modulators. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, v. 6, n. 8, p. 902–907, 13 ago. 2015. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4538439/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25811111/)>. Acesso em: 3 dez. 2020.

OH, Hyunju; GHOSH, Sankar. NF- κ B: roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets. *Immunological reviews*, v. 252, n. 1, p. 41–51, mar. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23405894/>>. Acesso em: 27 jul. 2022.

OLZMANN, James A.; CARVALHO, Pedro. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 20, n. 3, p. 137, 1 mar. 2019. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6746329/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31811111/)>. Acesso em: 25 jan. 2023.

OPAZO-RÍOS, Lucas *et al.* Lipotoxicity and Diabetic Nephropathy: Novel Mechanistic Insights and Therapeutic Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 2632*, v. 21, n. 7, p. 2632, 10 abr. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/7/2632/htm>>. Acesso em: 23 jan. 2023.

ORAM, John F.; VAUGHAN, Ashley M. ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circulation research*, v. 99, n. 10, p. 1031–1043, nov. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17095732/>>. Acesso em: 23 jan. 2023.

OZES, Osman Nidal *et al.* NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, v. 401, n. 6748, p. 82–85, 2 set. 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10485710/>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

PALMER, Clovis S. *et al.* Glucose Metabolism Regulates T Cell Activation, Differentiation, and Functions. *Frontiers in Immunology*, v. 6, p. 1, 22 jan. 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00001/abstract>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

PALMER, Ed. Negative selection — clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nature Reviews Immunology* 2003 3:5, v. 3, n. 5, p. 383–391, maio 2003. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nri1085>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

PEARCE, Erika L. Metabolism in T cell activation and differentiation. *Current Opinion in Immunology*, v. 22, n. 3, p. 314–320, jun. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20189791/>>. Acesso em: 5 dez. 2020.

PENG, Dacheng *et al.* A novel potent synthetic steroidal liver X receptor agonist lowers plasma cholesterol and triglycerides and reduces atherosclerosis in LDLR–/– mice. *British Journal of Pharmacology*, v. 162, n. 8, p. 1792, 2011. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3081122/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/213081122/)>. Acesso em: 25 jul. 2022.

PETAN, Toni. Lipid Droplets in Cancer. p. 1–34, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/112_2020_51>. Acesso em: 23 jan. 2023.

PHAN, Truong San; BRUNNER, Thomas. The versatility of liver X receptors in T cell homeostasis: Location, location, location! *The Journal of experimental medicine*, v. 218, n. 4, 5 abr. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33475707/>>. Acesso em: 6 maio 2022.

POURCET, Benoit *et al.* The nuclear receptor LXR modulates interleukin-18 levels in macrophages through multiple mechanisms. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 1–12, 6 maio 2016. Disponível em: <www.nature.com/scientificreports>. Acesso em: 4 dez. 2020.

QUEHENBERGER, Oswald *et al.* Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *Journal of Lipid Research*, v. 51, n. 11, p. 3299–3305, 1 nov. 2010.

RANGEL RIVERA, Guillermo O. *et al.* Fundamentals of T Cell Metabolism and Strategies to Enhance Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 782, 18 mar. 2021.

RASHEED, Adil; CUMMINS, Carolyn. Beyond the Foam Cell: The Role of LXRs in Preventing Atherogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 8, p. 2307, 7 ago. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/19/8/2307>>. Acesso em: 3 dez. 2020.

RATHMELL, Jeffrey C. *et al.* In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Molecular cell*, v. 6, n. 3, p. 683–692, 2000a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11030347/>>. Acesso em: 3 ago. 2022.

RATHMELL, Jeffrey C. *et al.* In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Molecular Cell*, v. 6, n. 3, p. 683–692, 1 set. 2000b. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S1097276500000666/fulltext>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

REBOLDI, Andrea; DANG, Eric. Cholesterol metabolism in innate and adaptive response. *F1000Research*, v. 7, 2018. Disponível em: <[pmc/articles/PMC6192436/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31192436/)>. Acesso em: 17 abr. 2023.

REPA, Joyce J. *et al.* Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β . *Genes & Development*, v. 14, n. 22, p. 2819, 11 nov. 2000. Disponível em: <[pmc/articles/PMC317055/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11317055/)>. Acesso em: 25 jul. 2022.

ROMANO, Marco *et al.* Past, present, and future of regulatory T cell therapy in transplantation and autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. JAN, p. 43, 2019.

RUAN, Qingguo *et al.* The Th17 immune response is controlled by the Rel-ROR γ -ROR γ T transcriptional axis. *The Journal of experimental medicine*, v. 208, n. 11, p. 2321–2333, 24 out. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22006976/>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

- RUST, Stephan *et al.* Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nature Genetics* 1999 22:4, v. 22, n. 4, p. 352–355, ago. 1999. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ng0899_352>. Acesso em: 23 jan. 2023.
- SALES, K. J.; JABBOUR, H. N. Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in reproductive tract physiology and pathology. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, v. 71, n. 3–4, p. 97–117, 1 jul. 2003.
- SAWICKA, Maria *et al.* From pre-DP, post-DP, SP4, and SP8 Thymocyte Cell Counts to a Dynamical Model of Cortical and Medullary Selection. *Frontiers in immunology*, v. 5, n. FEB, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24592261/>>. Acesso em: 9 maio 2022.
- SCHMITT, Nathalie; UENO, Hideki. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. *Current Opinion in Immunology*, v. 34, p. 130–136, 1 jun. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25879814/>>. Acesso em: 3 dez. 2020.
- SCHULMAN, Ira G. Liver X receptors link lipid metabolism and inflammation. *FEBS Letters*, v. 591, n. 19, p. 2978–2991, 1 out. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34793866/>>. Acesso em: 3 dez. 2020.
- SCORLETTI, Eleonora; CARR, Rotonya M. A new perspective on NAFLD: Focusing on lipid droplets. *Journal of hepatology*, v. 76, n. 4, p. 934–945, 1 abr. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34793866/>>. Acesso em: 23 jan. 2023.
- SEOL, Wongi; CHOI, Hueng Sik; MOORE, David D. Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, v. 9, n. 1, p. 72–85, 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7760852/>>. Acesso em: 25 jul. 2022.
- SHI, Qingyang *et al.* Intracellular Cholesterol Synthesis and Transport. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 10, 21 mar. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34793866/>>. Acesso em: 17 abr. 2023.
- SIMONS, K.; IKONEN, E. How cells handle cholesterol. *Science*, v. 290, n. 5497, p. 1721–1726, 1 dez. 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11099405/>>. Acesso em: 3 dez. 2020.
- SMOLEN, Josef S.; ALETAHA, Daniel; MCINNES, Iain B. Rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)*, v. 388, n. 10055, p. 2023–2038, 22 out. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27156434/>>. Acesso em: 15 ago. 2022.
- SOLT, Laura A.; KAMENECKA, Theodore M.; BURRIS, Thomas P. LXR-mediated inhibition of CD4+ T helper cells. *PloS one*, v. 7, n. 9, 28 set. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23029557/>>. Acesso em: 6 maio 2022.
- STEFFENSEN, Knut R.; JAKOBSSON, Tomas; GUSTAFSSON, Jan Åke. Targeting liver X receptors in inflammation. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, v. 17, n. 8, p. 977–990, ago. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23738533/>>. Acesso em: 3 dez. 2020.
- SUN, Fei *et al.* SUMOylation of PDPK1 Is required to maintain glycolysis-dependent CD4 T-cell homeostasis. *Cell Death & Disease*, v. 13, n. 2, 1 fev. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34793866/>>. Acesso em: 23 jan. 2023.
- SWAMY, Mahima *et al.* A Cholesterol-Based Allosteric Model of T Cell Receptor Phosphorylation. *Immunity*, v. 44, n. 5, p. 1091–1101, 17 maio 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27192576/>>. Acesso em: 11 jan. 2023.
- TALAMILLO, Ana *et al.* SUMOylation in the control of cholesterol homeostasis. *Open Biology*, v. 10, n. 5, p. 1–10, 1 maio 2020. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rsob.200054>>. Acesso em: 4 dez. 2020.

TAYLOR, Janice M.W. *et al.* Overexpression of steroidogenic acute regulatory protein increases macrophage cholesterol efflux to apolipoprotein AI. *Cardiovascular research*, v. 86, n. 3, p. 526–534, jun. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20083572/>>. Acesso em: 25 jul. 2022.

TONTONOZ, P. Transcriptional and posttranscriptional control of cholesterol homeostasis by liver X receptors. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, v. 76, p. 129–137, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21859674/>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

TREUTER, Eckardt; VENTECLEF, Nicolas. Transcriptional control of metabolic and inflammatory pathways by nuclear receptor SUMOylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1812, n. 8, p. 909–918, ago. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21172431/>>. Acesso em: 3 dez. 2020.

VALLEDOR, Annabel F. The innate immune response under the control of the LXR pathway. *Immunobiology*, v. 210, n. 2–4, p. 127–132, 19 ago. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16164019/>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

VAN DER WINDT, Gerritje J.W. *et al.* CD8 memory T cells have a bioenergetic advantage that underlies their rapid recall ability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 35, p. 14336–14341, 27 ago. 2013. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1221740110>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

VANDER HEIDEN, Matthew G. *et al.* Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Molecular and cellular biology*, v. 21, n. 17, p. 5899–5912, set. 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11486029/>>. Acesso em: 3 ago. 2022.

VAUGHAN, Ashley M.; ORAM, John F. ABCA1 redistributes membrane cholesterol independent of apolipoprotein interactions. *Journal of lipid research*, v. 44, n. 7, p. 1373–1380, jul. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12700343/>>. Acesso em: 23 jan. 2023.

VEDHACHALAM, Charulatha *et al.* Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *The Journal of biological chemistry*, v. 282, n. 34, p. 25123–25130, 24 ago. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17604270/>>. Acesso em: 23 jan. 2023.

VICTOR, Matheus B. *et al.* Lipid accumulation induced by APOE4 impairs microglial surveillance of neuronal-network activity. *Cell stem cell*, v. 29, n. 8, p. 1197–1212.e8, 4 ago. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35931030/>>. Acesso em: 13 jan. 2023.

W VAN DER WINDT, Gerritje J *et al.* T-cell memory differentiation: insights from transcriptional signatures and epigenetics. *Immunology*, v. 139, n. 3, p. 277–284, 1 jul. 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imm.12074>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

WADDINGTON, Kirsty E. *et al.* LXR directly regulates glycosphingolipid synthesis and affects human CD4+ T cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 118, n. 21, 25 maio 2021.

WALCHER, Daniel *et al.* LXR activation inhibits chemokine-induced CD4-positive lymphocyte migration. *Basic research in cardiology*, v. 105, n. 4, p. 487–494, jul. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20364260/>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

WANG, Bo *et al.* Phospholipid Remodeling and Cholesterol Availability Regulate Intestinal Stemness and Tumorigenesis. *Cell stem cell*, v. 22, n. 2, p. 206–220.e4, 1 fev. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29395055/>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

WANG, Bo; TONTONOZ, Peter. Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. *Nature reviews. Endocrinology*, v. 14, n. 8, p. 452–463, 1 ago. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29904174/>>. Acesso em: 29 maio 2022.

WANG, Feng *et al.* Inhibition of T cell receptor signaling by cholesterol sulfate, a naturally occurring derivative of membrane cholesterol. *Nature immunology*, v. 17, n. 7, p. 844–850, 21 jun. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27213689/>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

WELTE, Michael A.; GOULD, Alex P. Lipid droplet functions beyond energy storage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1862, n. 10, p. 1260–1272, 1 out. 2017.

WESTERTERP, Marit *et al.* ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation. *Circulation research*, v. 114, n. 1, p. 157–170, 3 jan. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24385509/>>. Acesso em: 23 jan. 2023.

WHERRY, E. John; BLATTMAN, Joseph N.; AHMED, Rafi. Low CD8 T-Cell Proliferative Potential and High Viral Load Limit the Effectiveness of Therapeutic Vaccination. *Journal of Virology*, v. 79, n. 14, p. 8960–8968, jul. 2005. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.79.14.8960-8968.2005>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

WILLY, Patricia J. *et al.* LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes & development*, v. 9, n. 9, p. 1033–1045, 1 maio 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7744246/>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

WOFFORD, Jessica A. *et al.* IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood*, v. 111, n. 4, p. 2101–2111, 15 fev. 2008. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/111/4/2101/133301/IL-7-promotes-Glut1-trafficking-and-glucose-uptake>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

XIAO, Ji *et al.* Activation of liver X receptors promotes inflammatory cytokine mRNA degradation by upregulation of tristetrarprolin. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 49, n. 3, p. 277–283, 1 mar. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28119310/>>. Acesso em: 3 dez. 2020.

XU, Jihong *et al.* Liver X receptor agonist regulation of Th17 lymphocyte function in autoimmunity. *Journal of leukocyte biology*, v. 86, n. 2, p. 401–409, ago. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19406833/>>. Acesso em: 25 jul. 2022.

YOON, Chong Hyeon *et al.* Activation of liver X receptors suppresses inflammatory gene expressions and transcriptional corepressor clearance in rheumatoid arthritis fibroblast like synoviocytes. *Journal of Clinical Immunology*, v. 33, n. 1, p. 190–199, 1 jan. 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10875-012-9799-4>>. Acesso em: 25 jul. 2022.

YU, Di *et al.* The Transcriptional Repressor Bcl-6 Directs T Follicular Helper Cell Lineage Commitment. *Immunity*, v. 31, n. 3, p. 457–468, 18 set. 2009. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S1074761309003148/fulltext>>. Acesso em: 26 abr. 2023.

YU, Yu *et al.* Glucose promotes regulatory T cell differentiation to maintain intestinal homeostasis. *iScience*, v. 25, n. 9, p. 105004, 16 set. 2022.

ZAMPELAS, Antonis; MAGRIPLIS, Emmanuella. New Insights into Cholesterol Functions: A Friend or an Enemy? *Nutrients*, v. 11, n. 7, 1 jul. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33000000/>>. Acesso em: 25 jul. 2022.

ZENS, Kyra D.; CHEN, Jun Kui; FARBER, Donna L. Vaccine-generated lung tissue-resident memory T cells provide heterosubtypic protection to influenza infection. *JCI Insight*, v. 1, n. 10, p. 85832, 7 jul. 2016.

ZHANG, Nu; BEVAN, Michael J. CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity*, v. 35, n. 2, p. 161–168, 26 ago. 2011.

ZHONG, Limei *et al.* Liver X receptor regulates mouse GM-CSF-derived dendritic cell differentiation in vitro. *Molecular Immunology*, v. 60, n. 1, p. 32–43, 2014. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24747959/>>. Acesso em: 3 dez. 2020.

ZHONG, Shumei *et al.* Nonsynonymous mutations within APOB in human familial hypobetalipoproteinemia: evidence for feedback inhibition of lipogenesis and postendoplasmic reticulum degradation of apolipoprotein B. *The Journal of biological chemistry*, v. 285, n. 9, p. 6453–6464, 26 fev. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20032471/>>. Acesso em: 25 jul. 2022.

ZHU, Jinfang; YAMANE, Hidehiro; PAUL, William E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual review of immunology*, v. 28, p. 445–489, 23 abr. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20192806/>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

ZHU, Rongtao *et al.* Role of liver X receptors in cholesterol efflux and inflammatory signaling (Review). *Molecular Medicine Reports*, v. 5, n. 4, p. 895, abr. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21402703/>>. Acesso em: 25 jul. 2022.

ZHU, Yunxiang *et al.* Lowering glycosphingolipid levels in CD4+ T cells attenuates T cell receptor signaling, cytokine production, and differentiation to the Th17 lineage. *The Journal of biological chemistry*, v. 286, n. 17, p. 14787–14794, 29 abr. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21402703/>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

ZHUANG, Jingjing *et al.* Regulation of prostaglandin F2 α against β amyloid clearance and its inflammation induction through LXR/RXR heterodimer antagonism in microglia. *Prostaglandins & other lipid mediators*, v. 106, p. 45–52, 2013a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24076168/>>. Acesso em: 25 jul. 2022.

ZHUANG, Jingjing *et al.* Regulation of prostaglandin F2 α against β amyloid clearance and its inflammation induction through LXR/RXR heterodimer antagonism in microglia. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, v. 106, p. 45–52, 2013b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24076168/>>. Acesso em: 5 dez. 2020.