KELLY GOMES SANTANA

Proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) altera a polarização de macrófagos M1 e M2 agravando o enfisema pulmonar experimental induzido por elastase

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Profa. Dra. Patrícia M. Cazita

SÃO PAULO
2021

KELLY GOMES SANTANA

Proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) altera a polarização de macrófagos M1 e M2 agravando o enfisema pulmonar experimental induzido por elastase

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Profa. Dra. Patrícia M. Cazita

SÃO PAULO
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santana, Kelly Gomes

Proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) altera a polarização de macrófagos M1 e M2 agravando o enfisema pulmonar experimental induzido por elastase / Kelly Gomes Santana. -- São Paulo, 2021.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Patrícia Miralda Cazita.

Descritores: 1.Proteínas de transferência de ésteres de colesterol 2.Macrófagos 3.Fenótipo 4.Inflamação 5.Doença pulmonar obstrutiva crônica 6.Enfisema pulmonar 7.Elastase pancreática 8.Interleucina-10 9.Arginase 1

USP/FM/DBD-103/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Lípidos (LIM-10) da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo junto ao programa de pós-graduação em Endocrinologia da FMUSP. Apoio financeiro FAPESP 2017/22940-6 (02/19-01/21). Comissão de ética no uso de animais – CEUA 949/2018.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Juraci e Marinalva, que sempre me deram incentivo, apoio e coragem para lutar por meus sonhos e alcançar cada um dos meus objetivos. Sempre com muito amor, carinho e paciência, me ensinando sobre a vida e como eu deveria caminhar para ser uma pessoa melhor e realizada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me abençoar com tantas oportunidades de crescimento pessoal e profissional, me capacitando com inteligência, força e sabedoria para desenvolver com qualidade e honra tudo o que tenho feito.

À minha família. Meus pais que sempre foram meu porto seguro e base para tudo o que sempre fiz na vida, me incentivando, dando forças quando eu não tinha, me ensinando a não desistir nunca e a fazer as coisas com muito amor, respeito e humildade onde quer que eu fosse. À minha irmã Karina, da qual a maioria dos meus colegas de trabalho já ouviram muitas histórias, porque realmente fazemos parte de tudo na vida uma da outra. Seu carinho, sabedoria, puxões de orelha e parceria em todos os momentos, com certeza fizeram de mim uma pessoa melhor. Sua visão diferenciada do mundo me levou a olhar em direções diferentes e meu crescimento com certeza não seria o mesmo sem ela. Ao meu irmão Rodrigo, sua esposa Natiane e minhas sobrinhas Júlia e Laura, por acreditarem em mim, por me receberem sempre com muita alegria, me ouvir e compartilhar dos meus momentos de alegria (inclusive os de nem tanta alegria assim), me fortalecendo e colocando ânimo onde muitas vezes não tinha. À minha tia Noélia, pelo carinho, orações, por sempre me incentivar a ir mais longe e por me tratar sempre como uma filha. A minha amiga Bruna Silva (irmã que Deus me deu), pela amizade, carinho e companheirismo em todos os momentos. Obrigada por me ajudar a ser uma pessoa mais forte e me abençoar com os momentos de muita brincadeira e descontração com sua princesa Geovanna.

A todos da minha família que não citei, afinal somos abençoados em ter uma família tão grande, com muitos tios (muitos mesmos, são pelo menos 17, rs), primos e amigos tão próximos que considero da família. Obrigada pelo apoio, carinho e por compartilharem dos meus sonhos.

À minha orientadora Dra. Patrícia M. Cazita, pela confiança, companheirismo, e dedicação para que este projeto pudesse ser concluído. Por ser um exemplo de pesquisadora, sempre solícita, detalhista e determinada, me ensinando que devemos fazer o nosso trabalho com muita qualidade e responsabilidade, contribuindo para minha formação e crescimento profissional. Pela amizade e parceria com dias de muito trabalho, bate papo, puxões de orelha (muitos, rs), conselhos, e claro, momentos de muita risada.

Sou muito grata por tudo, e hoje vejo o quanto eu cresci no profissional e pessoal trabalhando com você.

Ao Dr. Eder Quintão, por toda contribuição ao trabalho, disponibilidade em ensinar, ajudar, compartilhar seu conhecimento, sempre nos mostrando uma maneira crítica e diferente de pensar e pelas histórias maravilhosas que sempre nos ensina algo.

À Dra. Edna Nakandakare, pelo incentivo na busca de aprendizado e por permitir que mesmo envolvida em outras atividades de rotina do laboratório eu pudesse desenvolver em paralelo meu projeto de mestrado.

À Dra. Valéria Sutti Nunes, por se preocupar e estar sempre pronta para ajudar, com muito conhecimento, técnica e sempre com um sorriso no rosto. Pela amizade e parceria nesses 8 anos de laboratório.

À Elda Dantas, agradeço o carinho e parceria nos cuidados com os animais CETP. Pelas muitas conversas sobre a vida e por me incentivar a nunca desistir.

À Dra. Marisa Passarelli, pelos conhecimentos transmitidos e profissionalismo.

Dr. Sérgio Catanozi, pelos ensinamentos e orientação com os animais.

À Dra. Ana Maria Pitta Lottenberg, pelo exemplo de profissionalismo e como pessoa, sempre aberta a novas reflexões e disposta a ajudar no que precisar.

À Dra. Mônica Neves, pelas discussões durante as reuniões científicas e sugestões construtivas.

À Me. Juliana Tironi, pela amizade e por ser um exemplo de profissional e inspiração. Pela disposição em ajudar, tirar minhas dúvidas e sempre conseguir um tempinho no meio de toda correria.

À Dra. Aritania Santos, por me ensinar tanta coisa sobre biologia molecular e me ajudar na realização e compreensão de muitas técnicas. Por acreditar em mim, me incentivando a não desistir e pela amizade que fizemos durante esse tempo. Agradeço por compartilhar comigo sua fé em Deus, por me incluir em suas orações e pelos vários bate papos sobre trabalho, família, fé e muitos outros assuntos sempre muito construtivos.

Aos colaboradores do ICB (Instituto de ciências biomédicas), Dr. Niels O. S. Câmara, Dra. Cristiane Naffah, Omar Amoroso e Dra. Theresa Ramalho pela parceria e contribuições técnicas nas análises por citometria de fluxo. Pelo estímulo à busca do conhecimento e ajuda neste percurso para compreensão sobre o mundo da imunologia.

Ao Leandro Ianuzzi pelo auxílio no cuidado com os animais mantidos no biotério e pela amizade.

À Dra. Iolanda Tibério, ao Dr. Renato Righetti e a Silvia Fukuzaki do laboratório de terapêutica experimental, pela contribuição técnica e busca em unir nossos conhecimentos para gerar algo novo e importante na área de lípidos e enfisema pulmonar.

À Dra. Paula Ramos (Paulinha), por compartilhar seu conhecimento e me ajudar sempre que precisei (seja no trabalho ou vida pessoal). Pela amizade, conversas sobre trabalho e principalmente sobre a vida. Agradeço por me ensinar a ser mais crítica e me estimular na busca pelo autoconhecimento e crescimento pessoal/profissional.

À Cláudia Souza pela amizade, disposição em ajudar e paciência. Pelo apoio sempre que precisei, pelos almoços e conversas com direito a momentos de desabafo e muitas risadas.

Ao Me. Guilherme Ferreira, por nos ajudar a entender estatística.

À Me. Monique Mello, pela parceria, amizade e conversas construtivas.

À Ana Paula Bochi, pela amizade, por estar pronta para ajudar em qualquer situação, sempre com um sorriso no rosto, pelas longas conversas sobre trabalho e sobre a vida.

À Rosibel e todos os funcionários e alunos do LIM-10. Pelo incentivo, disposição em ajudar, parceria, conversas e momentos de descontração.

À Janaína Garcia, minha parceira desde a graduação, uma irmã que eu ganhei e sempre estive do meu lado para me incentivar, ajudar e compartilhar dos meus momentos de alegria e inclusive os de tristeza. Agradeço pela amizade, pelo exemplo de mulher forte, profissional, guerreira e por me ensinar a nunca desistir.

Aos meus amigos e colegas de trabalho que não estão mais no laboratório, mas que estiveram comigo no início dessa jornada: Fabiana Ferreira, Dra. Tatiana Venâncio, Dr. Diego Gomes, Dra. Karolline Santana, Dra. Adriana Saldiba, Dr. Rodrigo Iborra e Dra.

Milessa Afonso. Obrigada por me receberam de braços abertos, pelo conhecimento compartilhado, amizade, bate papo, almoços, e muitas risadas dentro e fora do laboratório.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo 2017/22940-6) pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

“Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês”, diz o Senhor, “planos de fazê-los prosperar e não de lhes causar dano, planos de dar-lhes esperança e um futuro”.

Jeremias 29:11

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Doença pulmonar obstrutiva crônica	21
1.2 Macrófagos na DPOC	22
1.3 Perfil fenotípico de macrófagos	23
1.4 Metabolismo de lipídeos na DPOC	25
1.5 Proteína de transferência de colesterol esterificado	27
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVO	35
4 METODOLOGIA.....	36
4.1 Modelo Animal	36
4.2 Seleção dos animais selvagens (WT) e transgênicos para CETP humana (CETP)	37
4.2.1 Genotipagem para CETP.....	37
4.2.2 Atividade da CETP.....	39
4.2.3 Perfil de Lipoproteína (FPLC)	40
4.2.4 Genotipagem para NNT	41
4.3 Cultura celular de macrófagos	42
4.4 Análise fenotípica de macrófagos M1 e M2 na presença de CETP.....	43
4.4.1 CETP endógena.....	43
4.4.2 CETP exógena.....	43
4.5 Expressão gênica.....	44
4.6 Análise de citocinas.	46
4.7 Indução de enfisema pulmonar por instilação de elastase	46
4.7.1 Avaliação da mecânica respiratória.....	46
4.7.2 Determinação de óxido nítrico (E _{NO})	47
4.7.3 Lavado broncoalveolar	47

4.7.4 Estudo histopatológico	48
4.7.5 Imunohistoquímica.....	48
4.7.6 Análise do intercepto linear médio (Lm)	49
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5 RESULTADOS	51
5.1 Resultados <i>in vitro</i>	51
5.2.1 Análise fenotípica de macrófagos M1 e M2 na presença de CETP endógena .	51
5.2.2 Expressão gênica	52
5.2.3 Secreção de citocinas e CETP no meio de cultura celular	54
5.2.4 Análise fenotípica de macrófagos M1 e M2 na presença da CETP recombinante	55
5.2.5 Expressão gênica na presença de CETP recombinante	56
5.2.6 Secreção de citocinas na presença de CETP recombinante	57
5.2 In vivo - Indução de enfisema pulmonar por instilação de elastase	58
5.2.1 Mecânica pulmonar	58
5.2.2 Contagem total e diferencial de leucócitos e a concentração de citocinas do lavado broncoalveolar (LBA).....	59
5.2.3 Imunohistoquímica.....	60
5.2.4 Perfil lipídico.....	61
5.2.5 Perfil das lipoproteínas por FPLC	62
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÃO	69
8 ANEXO	70
8.1 Aprovação da Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP	70
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE ABREVIACÕES

¹⁴C: Carbono 14

ABCA-1 (ATP-binding cassette transporter A1): transportador A1 contendo cassette de ligação ao ATP

AM: macrófagos alveolares

Apo-A1: apolipoproteína A-1

ApoLP: apolipoproteína

CD (cluster of differentiation): grupo de diferenciação

CE: colesterol esterificado

CETP: proteína de transferência de colesterol esterificado

CL: colesterol livre

CPT1: Carnitina palmitoil transferase I

DAMP: padrões moleculares associados a danos

DCV: doença cardiovascular

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica

ELISA: ensaio e imunoabsorção enzimática

F4/80: EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1

FL: fosfolípidos

FPLC (Fast protein liquid chromatography): cromatografia líquida de proteína rápida

Gal-9: galectina 9

HDL: lipoproteína de alta densidade

HMG-CoA: 3-hidroxi-3metilglutaril coenzima A

IFN: Interferon

IL: Interleucina

ILLUMINATE (Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events): Investigação da Gestão do Nível Lipídico para Compressão do Impacto em Eventos Ateroscleróticos

IM: macrófagos intersticiais

iNOS: Óxido nítrico sintase indutível

KC: célula de Kupffer

kDa: quilodalton

LCAT: lecitina colesterol aciltransferase

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LIF (leukemia inhibitory factor): fator inibidor de leucemia

LP: lipoproteína

LPS: lipopolissacarídeo

LRP: proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de densidade baixa

LXR: receptor x do fígado

MCF (macrophage chemotactic factor): fator quimiotático de macrófago

MD-2 (myeloid differentiation factor 2): fator de diferenciação mielóide 2

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

MMP-12 (Macrophage metalloelastase): metaloelastase de macrófago

NFkB: fator nuclear KB

NFR (natural flanking regions): regiões naturais flanqueadoras

NNT: transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida

NO: óxido nítrico

PAMP: padrões moleculares associados a patógenos

Pb: pares de base

PBS: tampão fosfato

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PLTP: proteína de transferência de fosfolípidos

PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor): Receptor ativado por proliferador de peroxissoma

QM: quilomícrom

REVEAL (*Randomized Evaluation of the Effects of Anacetrapib Through Lipid-modification*)

ROS: espécies reativas de oxigênio

SBF: soro fetal bovino

Siglec-F (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin F): Lectina F semelhante a imunoglobulina de ligação a ácido siálico

SR-B1: *scavenger receptor class B type I*

SREBP (Sterol regulatory element-binding protein): Proteínas de Ligação a Elemento Regulador de Esterol

STAT (signal transducers and activators of transcription): transdutores e ativadores do sinal de transcrição

TG: triglicérides

TGF- β (Transforming growth factor beta): Fator de crescimento transformador beta

Th (T helper cell): células T

TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain 3): Imunoglobulina de células T e domínio da mucina 3

TLR (Toll-like receptor): Receptor tipo Toll

TNF alfa: fator de necrose tumoral alfa

TRC: transporte reverse de colesterol

TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells-1): receptor desencadeador expresso em células mieloides-1

UV: ultra-violeta

VLDL: lipoproteína de densidade muito baixa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Equilíbrio dinâmico da polarização de macrófagos.. Erro! Indicador não definido.	
Figura 2 Variação da atividade da CETP entre as espécies de vertebrados. Erro! Indicador não definido.	
Figura 3 Transporte reverso de colesterol. Erro! Indicador não definido.	
Figura 4 Estrutura do transgene da CETP.	36
Figura 5 Avaliação da expressão do gene da CETP humana em camundongos C57BL6/J.....	38
Figura 6 Atividade da CETP plasmática dos animais WT e CETP.	39
Figura 7 Perfil de lipoproteínas plasmáticas dos animais WT e CETP.....	40
Figura 8 Avaliação da expressão do gene da NNT em camundongos C57BL6/J.....	42
Figura 9 Análise fenotípica de macrófagos M1 e M2 na presença da CETP endógena	51
Figura 10 Expressão mRNA de genes associados à polarização de macrófagos M1, M2 e metabolismo de lípidos na presença de CETP endógena.....	53
Figura 11 Secreção de citocinas e CETP no meio de cultura celular	54
Figura 12 Análise fenotípica de macrófagos M1 e M2 na presença da CETP recombinante. Expressão de CD80 (A) e CD206 (B)	55
Figura 13 Avaliação da expressão de genes associados à polarização de macrófagos M1 e M2 na presença de CETP recombinante.....	56
Figura 14 Secreção de citocinas no meio de cultura celular.	57
Figura 15 Mecânica pulmonar.....	58
Figura 16 Contagem total e diferencial de leucócitos e a concentração de citocinas do lavado broncoalveolar (LBA).....	59
Figura 17 Fotomicrografia de lâminas coradas por imuno-histoquímica para marcadores inflamatórios	60
Figura 18 Imunohistoquímica para CETP nas vias aéreas e parênquima pulmonar, determinação do intercepto linear médio(Lm)	61
Figura 19 e Tabela 1. Concentração plasmática de colesterol e triglicérides totais e nas frações de lipoproteínas isoladas por FPLC	62

RESUMO

Santana KG. *Proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) altera a polarização de macrófagos M1 e M2 agravando o enfisema pulmonar experimental induzido por elastase* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) tem sido discutida como pró ou antiaterogênica, como também seu papel na resposta inflamatória, à endotoxemia e à sepse experimental, e em humanos na sobrevivência à sepse. Alterações funcionais no metabolismo das lipoproteínas (LP) e nas populações de células imunes, incluindo os macrófagos, ocorrem na sepse e podem também se relacionar a comorbidades como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Os macrófagos são células inflamatórias importantes no desenvolvimento e formação do enfisema pulmonar; dependendo do microambiente podem apresentar fenótipo M1 ou M2. Foi relatado que a CETP do plasma é predominantemente derivada das células de Kupffer, e que macrófagos de peritônio e os derivados de medula óssea expressam CETP contribuindo para sua concentração no plasma. Avaliamos aqui o papel da CETP na polarização dos macrófagos e no enfisema pulmonar induzido por elastase (ELA) em camundongos machos transgênicos para CETP e controles irmãos selvagens (WT). Nossos resultados mostram que macrófagos derivados da medula óssea de camundongos CETP apresentam perfil fenotípico de polarização reduzido para M1 e aumento para M2 (avaliação da CETP exógena), com aumento de IL-10. Comparados aos controles, a função pulmonar piora em camundongos CETP expostos a elastase com aumento do intercepto linear médio pulmonar, o que reflete no alargamento dos espaços aéreos resultante da destruição do parênquima apresentando maior expressão de arginase-1 e de IL-10, ambos marcadores de M2. O perfil de citocinas revelou aumento de IL-6 no plasma e de IL-10 no lavado bronco-alveolar (LBA), corroborando a imuno-histoquímica pulmonar no grupo CETP ELA comparado ao WT ELA. O tratamento com elastase induziu no grupo CETP aumento de VLDL-C e redução de HDL-C, com aumento de TG em HDL. Nossos resultados *in vivo* mostram que instilação de elastase na presença de CETP promove no pulmão fenótipo favorável a M2 com efeito deletério na DPOC experimental e corroboram com o resultado *in vitro* onde a CETP promoveu fenótipo de polarização de macrófagos M2. Levantamos

então a possibilidade de que a CETP possa atuar como proteína pró ou anti-inflamatória dependendo do tipo de tecido, órgão ou patologia.

Descritores: Proteínas de transferência de ésteres de colesterol; Macrófagos; Fenótipo; Inflamação; Doença pulmonar obstrutiva crônica; Enfisema pulmonar; Elastase pancreática; Interleucina-10; Arginase 1.

SUMMARY

Santana KG. *Cholesterol-ester transfer protein (CETP) alters M1 and M2 macrophage polarization and worsens experimental elastase-induced pulmonary emphysema* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Cholesterol-ester transfer protein (CETP) has been discussed as pro- or anti-atherogenic, as well as playing a role in the inflammatory response to endotoxemia and experimental sepsis, and in sepsis survival in humans. Functional alterations in lipoprotein (LP) metabolism and immune cell populations, including macrophages, occur in sepsis and may also relate to comorbidities such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Macrophages are important inflammatory cells in the development and formation of pulmonary emphysema; depending on the microenvironment they may exhibit M1 or M2 phenotype. It has been reported that plasma CETP is predominantly derived from Kupffer cells, and that peritoneal macrophages and those derived from bone marrow express CETP contributing to its concentration in plasma. Here we evaluated the role of CETP in macrophage polarization and elastase-induced pulmonary emphysema (ELA) in male mice transgenic for CETP and wild-type (WT) controls. Our results show that bone marrow-derived macrophages from CETP mice exhibit a reduced polarization toward the M1 phenotype, and a trend toward M2 with increased IL-10. Compared to controls, lung function worsens in CETP mice exposed to elastase with increased mean linear intercept (Lm) in lung, reflecting airspace enlargement resulting from parenchymal destruction showing increased expression of arginase-1 and IL-10, both M2 markers. The cytokine profile revealed increased IL-6 in plasma and IL-10 in broncho-alveolar lavage (BAL), corroborating with the lung immunohistochemistry in the CETP ELA group compared to WT ELA. Elastase treatment induced in the CETP group increased VLDL-C and reduced HDL-C, with increased TG in HDL. Our *in vivo* results show that elastase instillation in the presence of CETP promotes M2-like phenotype in the lung with deleterious effect in experimental COPD and corroborate with the *in vitro* result where CETP promoted M2 macrophage polarization. Thus, we raise the possibility that CETP may act as a pro- or anti-inflammatory protein depending on the type of tissue, organ or pathology.

Descriptors: Cholesterol ester transfer protein; Macrophage; Phenotype; inflammation; Chronic obstructive Pulmonary disease; Pulmonary emphysema; Pancreatic elastase Interleukin-10; Arginase 1.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença pulmonar obstrutiva crônica

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é considerada um grande problema de saúde global devido à sua alta prevalência (cerca de 10% da população adulta), incidência crescente (relacionada em parte ao envelhecimento da população) e com custos pessoais, sociais e econômicos muito significativos (Agusti *et al.*, 2020). A Organização Mundial de Saúde (OMS) contabiliza 65 milhões de pessoas em todo o mundo com grau moderado a grave de DPOC de (Rabe and Watz, 2017). No Brasil, ela contribui com, aproximadamente, com 40 mil mortes por ano (Sus, 2014). Oficialmente, a DPOC é a terceira causa de mortalidade no mundo (Vestbo *et al.*, 2013), provocada principalmente, pelo tabagismo. Desta forma, é considerada, uma doença prevenível e tratável, embora progressiva e caracterizada por limitação irreversível e persistente do fluxo aéreo (Gnatiuc and Caramori, 2014; Vogelmeier *et al.*, 2017).

As quatro principais características da DPOC são: o enfisema pulmonar, a remodelação das pequenas vias aéreas, a bronquite crônica e a hipertensão pulmonar (Wright *et al.*, 2008).

O enfisema pulmonar é definido, anatomicamente, como o alargamento dos espaços alveolares com destruição das paredes alveolares. A quantificação do enfisema *in vivo* é feita por tomografia computadorizada, podendo ser correlacionado com a histopatologia (Gevenois *et al.*, 1996).

Estudos indicam que uma das principais causas do enfisema é a degradação da matriz extracelular alveolar, onde ocorre proteólise desregulada e prolongada, principalmente de colágeno e elastina (Gharib *et al.*, 2018).

Na avaliação de pulmões com enfisema, após transplante, foi demonstrado que há aumento na presença de fibras de colágeno em comparação a pulmões não-enfisematosos (Vlahovic *et al.*, 1999). Além disso, estudos em animais com exposição à fumaça de cigarro mostraram que, embora a destruição inicial de colágeno seja limitada, há aumento significativo após longo tempo de exposição (Wright and Churg, 1995), indicando processo de reparação.

Acredita-se que os macrófagos sejam as células responsáveis pelo enfisema pulmonar, pois produzem as principais proteinases que levam à destruição do tecido

alveolar (Russell *et al.*, 2002), com número de células aumentado em, aproximadamente, 10 vezes nos pulmões de fumantes em comparação aos não-fumantes (Eidelman *et al.*, 1990). Em animais expostos à fumaça de cigarro e com desenvolvimento de enfisema pulmonar, também foi demonstrado aumento do influxo de macrófagos (Houghton *et al.*, 2006).

Toda proteinase capaz de degradar ou clivar fibras elásticas é denominada elastase, como a metaloelastase de macrófago (MMP) e a elastase pancreática, as quais possuem ação fisiológica na degradação da elastina (Filippov *et al.*, 2003). As elastases são de grande importância no desenvolvimento do enfisema pulmonar caracterizada por: 1) A elastina é degradada durante o enfisema; 2) o enfisema pulmonar é desenvolvido de forma espontânea em indivíduos deficientes para alfa1-antitripsina (Stockley, 2014). A alfa1-antitripsina atua na inibição da atividade de serina-proteases, e sua deficiência leva ao desequilíbrio protease-antiprotease, resultando na degradação das paredes alveolares e alargamento dos espaços aéreos (Campbell *et al.*, 1999); 3) Conforme descrito em diversos protocolos experimentais, a instilação de elastases em animais, resulta na degradação da elastina e em enfisema pulmonar (Kuhn and Senior, 1978; Theodoro *et al.*, 2017).

1.2 Macrófagos na DPOC

Os pulmões estão constantemente expostos ao ambiente externo do hospedeiro, portanto, os mecanismos da imunidade inata são necessários para monitorar agentes irritantes e infecções por patógenos. Esta função central é realizada por populações de células imunológicas, incluindo macrófagos, células dendríticas e células epiteliais das vias aéreas (Kopf *et al.*, 2015). As três principais populações de células mieloides no pulmão, que diferem em sua localização no tecido e origem de desenvolvimento, são: macrófagos alveolares residentes (AMs), macrófagos intersticiais residentes (IMs) e monócitos (Crowell *et al.*, 1992; Lehnert, 1992; Tan and Krasnow, 2016).

Os AMs residem nos espaços aéreos dos pulmões, enquanto os IMs são encontrado no espaço intersticial entre os alvéolos e as veias. A observação morfológica dessas duas populações indica que os AMs são maiores em tamanho comparados aos IMs (Hopstadter *et al.*, 2010). Além disso, a caracterização fenotípica de AMs e IMs em camundongos mostrou diferenças nos valores de expressão de marcadores MHC II

(complexo principal de histocompatibilidade II), CD11b, CD14, CD45, CD54, CD68, CD71, CD204, CD206 e Siglec-F (Feng and Mao, 2012; Misharin *et al.*, 2013; Zaynagetdinov *et al.*, 2013).

Os macrófagos residentes nos pulmões foram caracterizados como células CD11c⁺ CD11b^{lo} e podem ser distinguidas das células recrutadas durante inflamação induzida por endotoxina ou vírus, pela expressão de CD11b.

Em humanos, os AMs são descritos como células CD45⁺ CD206⁺ CD14^{lo} CD71⁺ CD169⁺; por outro lado os IMs foram descritos como células CD45⁺ CD206⁺ CD14^{hi} CD71⁻ CD169⁻ (Yu *et al.*, 2016). Outro estudo sugere uma alta expressão do receptor de manose (MR ou CD206) em ambas as populações de macrófagos AM e IM (Bharat *et al.*, 2016).

1.3 Perfil fenotípico de macrófagos

Os macrófagos constituem uma população heterogênea de fagócitos altamente especializados, sendo células apresentadoras de antígenos que representam um componente importante do infiltrado leucocitário nos locais de inflamação, infecção, danos teciduais e crescimento tumoral. São originados da diferenciação dos monócitos circulantes (Gordon and Taylor, 2005; Ginhoux and Guilliams, 2016). Atuam como células efetoras centrais na defesa do hospedeiro a patógenos desempenhando papel-chave na resposta imunológica inata, adaptativa e na remodelação e reparo tecidual (Mosser and Edwards, 2008; Murray and Wynn, 2011). Os macrófagos são células com fenótipos e programas funcionais distintos (Gordon and Taylor, 2005; Stout *et al.*, 2005; Mosser and Edwards, 2008). Tal heterogeneidade depende de sua capacidade de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), diferentes formas de ativação em resposta a estímulos como das citocinas, e danos moleculares associados a patógenos (DAMPs) e metabólitos (Stout *et al.*, 2005; Bosco *et al.*, 2008; Sica and Mantovani, 2012).

Os macrófagos possuem plasticidade funcional, como sua capacidade de mudar rapidamente e reversivelmente entre seus diferentes estados de ativação como M1 ou M2 (Stout *et al.*, 2005). Esses subconjuntos principais de macrófagos polarizados foram definidos, com base no tipo de estimulação *in vitro*, pela expressão de algumas moléculas de superfície, perfil de secreção e propriedades funcionais, e representam os extremos de uma sequência contínua de estados de ativação: os macrófagos classicamente ativados

(tipo 1 pró-inflamatório ou M1) e alternativamente ativados (tipo 2 anti-inflamatório ou M2) (Gordon and Taylor, 2005; Sica and Mantovani, 2012).

Os macrófagos do tipo M1 possuem propriedades efectoras pró-inflamatórias e imunoestimuladoras induzidas por Th1 e se originam em resposta à estimulação com fatores microbianos, como LPS e citocinas, como IFN gama, TNF, e IL-1 beta, ou uma combinação dos dois (Edwards *et al.*, 2006; Davis, M. J. *et al.*, 2013). Ainda representam uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio e intermediários nitrogenados que medeiam a defesa antimicrobiana e destruição tecidual (Martinez *et al.*, 2008; Mosser and Edwards, 2008). Expressam a forma induzida de óxido nítrico sintase (NOS2 ou iNOS) para produzir NO a partir de L-arginina.

Por outro lado, os M2 compreendem várias formas de macrófagos, não classicamente ativados, originários da exposição a diferentes estímulos, como citocinas advindas de células Th2, como IL-4 ou IL-13 (M2a), complexos imunes em combinação com IL-1 beta ou LPS (M2b) (Anderson and Mosser, 2002; Edwards *et al.*, 2006), citocinas anti-inflamatórias, IL-10 e TGF beta, ou glicocorticoides (M2c), IL-6, LIF e MCF (M2d) (Duluc *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2008) (**Fig. 3**). Os M2 participam da resolução do processo inflamatório e exibem funções de remodelação e reparo do tecido, promovem a cicatrização, angiogênese, resistência a parasitas e também crescimento de tumores pela produção de citocinas anti-inflamatórias e componentes da matriz extracelular (Gordon and Taylor, 2005; Edwards *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2006).

Figura 1 Equilíbrio dinâmico da polarização de macrófagos. Os macrófagos não ativados (M0), podem receber diversos estímulos durante a inflamação ou reparo tecidual. Na inflamação, as células podem ser estimuladas por moléculas como LPS, IFN, TNF ou IL-1 beta que desencadeiam uma cascata de sinalização inflamatória levando à ativação celular e à polarização clássica M1. As células do tipo M1 liberam citocinas e fatores inflamatórios como iNOS, TNF, IL-6 IL-18 e IL-1 beta. Para que ocorra o equilíbrio e reparação tecidual durante a inflamação, ocorre o estímulo com moléculas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL13 induzindo a polarização de macrófagos alternativamente ativados (M2) que levará ao controle do processo inflamatório. As células M2 secretam moléculas anti-inflamatórias como Arg-1, YM, MR e IL-10. Figura adaptada (Capobianco and Rovere-Querini, 2013).

Os macrófagos, em geral, expressam outras moléculas importantes e determinantes na sua polarização em M1 ou M2 como TREM1 (*Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1*), o TIM3 (*T cell immunoglobulin and mucin domain-3*) e a galectina 9. O TREM1 é um receptor da família das imunoglobulinas, com função principal de identificar antígenos, modulando a resposta inflamatória (Sun *et al.*, 2020). Sua expressão é aumentada, principalmente, durante a inflamação aguda, promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e como IL-1 beta e IL-6 (Wu *et al.*, 2012) e está significativamente aumentada junto com os marcadores M1 na biópsia hepática de pacientes obesos diabéticos e obesos não diabéticos, sugerindo que a superexpressão de TREM-1 e a polarização de macrófagos M1 está associada a resistência à insulina induzida por obesidade.

A Imunoglobulina de células T e domínio da mucina 3 (TIM-3) é um receptor altamente expresso em células Th1 e células citotóxicas, que leva à sinalização negativa de apoptose. A galectina 9 é o ligante do TIM-3, sendo expressa em todas as células, e quando se liga ao receptor, pode inibir a função dos macrófagos regulando negativamente a liberação de fatores inflamatórios (Zhang *et al.*, 2019).

1.4 Metabolismo de lipídeos na DPOC

O colesterol é componente essencial das membranas celulares, sendo necessário para a proliferação celular. Vários intermediários da via de biossíntese do colesterol modulam as funções das células imunológicas influenciando vias de sinalizações ou pela ligação a receptores nucleares (Spann and Glass, 2013).

Foram demonstrados valores elevados de colesterol e apolipoproteína M sérica em pacientes com DPOC grave (Li *et al.*, 2016; Zafirova-Ivanovska *et al.*, 2016), como

também aumento de produtos de colesterol oxidado como 27-hidroxicolesterol e 25-hidroxicolesterol nas vias aéreas de pacientes com DPOC comparados a indivíduos saudáveis (Kikuchi *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2018).

As proteínas de ligação a elementos de responsivos a esterol (SREBPs) regulam a expressão de genes que codificam enzimas necessárias para a síntese de colesterol e ácidos graxos insaturados (Shimano and Sato, 2017). Foi demonstrado que a deleção da proteína de ativação da clivagem da SREBP (Scap) em células epiteliais alveolares levou à redução da síntese de fosfolípidos, e aumento no armazenamento, síntese e transferência de lipídios em fibroblastos do pulmão (Besnard *et al.*, 2009). Além disso, ocorre acúmulo de lipídios no fígado por meio da modulação AMPK e SREBP1 induzidos pelo fumo (Yuan *et al.*, 2009).

A inibição da HMG-CoA redutase com estatinas, reduziu a ativação de genes envolvidos em processos inflamatórios e a ativação de células imunológicas no pulmão de pacientes com DPOC (Mroz *et al.*, 2015). O tratamento com estatinas, antes e durante a exposição a fumaça em modelo animal, levou à redução do influxo de células totais, neutrófilos e macrófagos no pulmão e vias aéreas (Davis, B. B. *et al.*, 2013).

As células residentes no pulmão, captam colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) circulantes por meio de receptores específicos, inibindo, assim, a biossíntese do colesterol pulmonar (Hass and Longmore, 1980; Yasuda *et al.*, 2010). A principal fonte de vitamina E que promove a produção de surfactante pelas células do tipo II (Pian and Dobbs, 1997) e o crescimento de fibroblastos pulmonares (Bjorkerud and Bjorkerud, 1994) advém da HDL (Kolleck *et al.*, 1999). Entretanto, quantidades excessivas de colesterol prejudicam função do surfactante, sugerindo a importância crítica da homeostase do colesterol alveolar para a fisiologia pulmonar normal (Vockeroth *et al.*, 2010). Ainda não está claro se as partículas de lipoproteínas comparáveis às descritas no soro existem no compartimento alveolar. Como os lipídios do surfactante são diretamente expostos aos oxidantes ambientais, a oxidação dos lipídios alveolares em espécies citotóxicas e pró-inflamatórias representam um problema único para o pulmão.

Várias proteínas desempenham um papel central no transporte reverso de colesterol (TRC), incluindo apoA-I, apoE, ABCA-I e LXR, que de modo geral atuam: na captação de colesterol dos tecidos para formação de HDL, interação com receptores celulares do

fígado para captação de lipoproteínas, efluxo do excesso de colesterol celular e na indução ou repressão da transcrição gênica, respectivamente.

Foi demonstrado redução da concentração de apo A-I no pulmão de pacientes com DPOC e em camundongos expostos à fumaça de cigarro. Nesses últimos a superexpressão de apoA-I reduziu a inflamação pulmonar, estresse oxidativo, ativação de metaloproteinases e a apoptose (Kim *et al.*, 2016).

Camundongos que não expressam ABCA1 têm acúmulo de colesterol em macrófagos alveolares e células do tipo II, proteinase alveolar e dificuldade respiratória (Bates *et al.*, 2005).

A entrada de colesterol nas células leva à produção de óxidos de colesterol. Estes liberam o complexo LXR/RXR (*liver X receptor/retinoid X receptor*) de seus repressores, ativando a transcrição dos receptores ABCA-1 e ABCG-1, favorecendo o efluxo de colesterol. Assim, agonistas de LXR têm sido alvo de interesse terapêutico em várias patologias (Leanca *et al.*, 2010).

Aumento de LXR no tecido pulmonar (epitélio alveolar e pequenas vias aéreas) foi demonstrado em pacientes com DPOC e fumantes. Estudos sugerem que os agonistas de LXR têm potencial para serem usados como agentes terapêuticos na DPOC. O tratamento de camundongos com agonistas sintéticos diminui o influxo de leucócitos no espaço aéreo, regula positivamente as enzimas antioxidantes e diminui as citocinas pró-inflamatórias no espaço aéreo em vários modelos de lesão pulmonar aguda e infecção (Birrell *et al.*, 2007; Smoak *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 2009; Crisafulli *et al.*, 2010). O estudo também relatou que a ativação farmacológica de LXR compromete a defesa do hospedeiro contra a infecção pulmonar por *K. pneumoniae*, provavelmente devido ao recrutamento de neutrófilos alveolar reduzido (Smoak *et al.*, 2008). Isso contrasta com um estudo recente de Korf *et al.*, em que foi relatada expressão de LXR contribui para a eliminação e imunidade específica de células T contra *Mycobacterium tuberculosis* (Korf *et al.*, 2009). Talvez a regulação da defesa pulmonar do hospedeiro por LXR pode ser específica do patógeno ou depender do ácido colestenoico, um agonista de LXR endógeno em que o pulmão é a fonte principal (Mjos, 1988; Craig *et al.*, 1989; Babiker *et al.*, 1999).

1.5 Proteína de transferência de colesterol esterificado

A proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) é uma glicoproteína com peso molecular de 66-74 kDa. O gene que codifica a CETP está localizado no

cromossomo 16, sendo regulado por vários fatores, dentre eles os agentes inflamatórios (Agellon *et al.*, 1990; Masuccimagoulas *et al.*, 1995; Hardardottir *et al.*, 1996).

A CETP é produzida por vários órgãos e seu RNA mensageiro é expresso no fígado, baço, intestino delgado, adrenais e tecido adiposo (Jiang *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 1996). Os tecidos hepático e adiposo foram considerados as duas principais fontes de CETP circulante em seres humanos. Alguns estudos apontaram ainda que os hepatócitos são os responsáveis pela expressão e secreção hepática da proteína (Pape, Ulrich, *et al.*, 1991). Porém, recentemente, Wang *et al.* reportaram que a CETP plasmática é predominantemente derivada das células de Kupffer (KCs) (Wang *et al.*, 2015). Macrófagos de peritônio e, principalmente, os derivados de medula óssea contribuem para a concentração plasmática de CETP em camundongos (Van Eck *et al.*, 2007).

A atividade plasmática da CETP possui uma variação considerável entre os vertebrados (Ha and Barter, 1982) (**Fig. 2**). Camundongos apresentam baixa atividade, enquanto coelho e macaco atividade elevada, no ser humano, a atividade de CETP é considerada intermediária (Marcel *et al.*, 1990).

Figura 2 Variação da atividade da CETP entre as espécies de vertebrados. Cada barra representa a concentração média da CETP plasmática. O número de animais analisados em cada espécie é apresentado entre parênteses (Cheung *et al.*, 1996).

A CETP participa do transporte reverso de colesterol (TRC) ao estimular a transferência do colesterol dos tecidos periféricos para as HDL (primeira etapa do TRC) e ainda estimular a

ação da LCAT remodelando a partícula de HDL (Oliveira *et al.*, 1997) (**Fig. 3**).

Figura 3 Transporte reverso de colesterol. 1) A apolipoproteína A-I (apoA-I) e as partículas nascentes de HDL (pré-beta HDL) removem o excesso de colesterol celular por meio da interação com o receptor ABCA1 ou ABCG1 (*ATP-binding cassette transporters A1 e G1*). 2) Após esterificação do colesterol pela LCAT, formam-se gradativamente, partículas maiores de HDL. O colesterol esterificado pode ser diretamente removido das HDL pelo receptor SR-BI no fígado ou nos órgãos esteroidogênicos. 3) Indiretamente por ação da CETP, o CE é transferido para as lipoproteínas contendo ApoB (VLDL, IDL e LDL) podendo ser removido pelos receptores B/E ou LRP no fígado, secretado na bile e excretado nas fezes.

A CETP atua na remodelação das lipoproteínas (LP) ao promover a transferência de colesterol esterificado (CE) das lipoproteínas de alta densidade (HDL) em troca triglicerídeos das lipoproteínas ricas em apolipoproteína B (Drayna *et al.*, 1987; Stein and Stein, 2005). O aumento do conteúdo de TG nas HDL facilita a atividade da lipase hepática reconstituindo as partículas pequenas de HDL, as pré-beta HDL, que são mediadoras do efluxo celular de colesterol (Francone *et al.*, 1996).

O remodelamento da partícula de HDL pela CETP facilita a captação de CE da HDL pelo fígado de camundongo e por células que expressam muito SR-BI, o receptor natural para colesterol esterificado advindo das HDL. Por outro lado, a CETP pode prover o enriquecimento das lipoproteínas ricas em ApoB com colesterol, ação potencialmente aterogênica, particularmente quando a captação hepática destas partículas está comprometida (Collet *et al.*, 1999; Oliveira and De Faria, 2011).

No plasma a CETP encontra-se na sua maior parte ligada às partículas de HDL, sendo considerada molécula chave no metabolismo desta lipoproteína. A concentração

plasmática de CETP encontra-se elevada em indivíduos hipercolesterolêmicos quando comparados aos controles (Tall *et al.*, 1987).

Neste sentido, a literatura sugere que o aumento na atividade de CETP pode promover aterogênese ao estimular a transferência de CE para LDL em pacientes com baixa concentração de HDL (Tall *et al.*, 1987). Humanos com deficiência de CETP, por defeitos genéticos, apresentam concentrações plasmáticas elevadas de HDL-C (Brown *et al.*, 1989).

Além de seu papel estabelecido na troca de lipídeos entre as lipoproteínas, foi demonstrado que a CETP facilita a troca lipídios entre as membranas celulares e entre as membranas celulares e as lipoproteínas. Observações sugerem que a CETP possa ter uma ação local ou intracelular, uma vez que está presente em vários tecidos, com atividade de transferência lipídica em locais de contato da membrana inter-organelas. Possui ampla especificidade para superfícies de membrana como entre as membranas do retículo endoplasmático (ER). (Hashimoto *et al.*, 1984; Vassiliou and Mcpherson, 2004).

A fim de facilitar os estudos moleculares em roedores foi desenvolvido um camundongo transgênico que expressa o minigene da CETP humana sob o controle das suas regiões flanqueadoras naturais (NFR - *natural flanking regions*,) (Jiang *et al.*, 1992), e muito do que sabemos sobre a regulação gênica da expressão da CETP vem desse modelo (Fig. 4). Por exemplo, a expressão da CETP hepática demonstrou ser fortemente induzida pelo colesterol, provavelmente por ativação do receptor X do fígado (LXR) em camundongos transgênicos e macacos (Pape, Rehberg, *et al.*, 1991).

Foi demonstrado que alterações na composição lipídica do fígado podem afetar a atividade biológica dos macrófagos na inflamação hepática aguda (Furuhashi *et al.*, 2007). Depois do reconhecimento das substâncias estranhas, as KCs são ativadas, e ocorre a liberação de citocinas inflamatórias, e recrutamento de células do sistema imunológico, como monócitos do sangue e neutrófilos (Dixon *et al.*, 2013).

O primeiro estudo populacional sobre CETP e aterosclerose (*Honolulu Heart Program*) mostrou que a deficiência genética de CETP está associada com aumento da prevalência de doença aterosclerótica, sendo então um fator de risco independente para a doença, apesar da elevação moderada de HDL-C no plasma (Zhong *et al.*, 1996). Investigações populacionais posteriores indicaram efeito oposto, ou seja, a deficiência de CETP resultando em proteção contra aterosclerose (Moriyama *et al.*, 1998; Brousseau *et al.*, 2002).

Por esta razão, o envolvimento da CETP na aterogênese tem sido intensamente investigado. Modelos animais têm sido utilizados para responder estas ambiguidades, porém os resultados continuam controversos (Quintao, 2016). Por exemplo, camundongos transgênicos que expressam o gene da CETP humana desenvolvem aterosclerose mais severa com dieta rica em lípides quando comparados a animais controle, não transgênicos (Marotti *et al.*, 1993). Esta expressão do gene da CETP em camundongos *knockout* para apoE, ou para o receptor de LDL, agrava a hipercolesterolemia e provoca aterosclerose prematura (Plump *et al.*, 1999). Não obstante, a expressão do gene da CETP humana diminui a aterosclerose em camundongos hipertrigliceridêmicos (Hayek *et al.*, 1995), castrados (Cazita *et al.*, 2003; Casquero *et al.*, 2006) ou com expressão aumentada do gene da enzima lecitina-colesterol acil transferase (LCAT) (Foger *et al.*, 1999).

É possível, que seja facilitada a aterogênese em condições experimentais em que a introdução ou a expressão aumentada deste gene provoca aumento significativo da colesterolemia (Marotti *et al.*, 1993; Plump *et al.*, 1999), enquanto que em outras condições a CETP poderia ter papel protetor (Hayek *et al.*, 1995; Cazita *et al.*, 2003; Casquero *et al.*, 2006; Okada *et al.*, 2019).

Embora as estatinas diminuam o LDL-C e favoreçam a queda na mortalidade e morbidade associadas à doença da arterial coronariana, o índice de mortalidade e morbidade ainda permanece considerável. As baixas concentrações HDL-C (<0,91 mmol/L) também são apontadas como um fator de risco independente para doença coronariana prematura. Estudos epidemiológicos sugerem que aumento de HDL-colesterol de 0,03 mmol/L está associado a uma redução de 2-4% no risco de doença cardiovascular (Gordon *et al.*, 1989; Doggrell, 2017).

A inibição da CETP utilizando a classe de fármacos (torcetrapib, dalcetrapib, anacetrapib e evacetrapib) emergiu como uma estratégia terapêutica promissora para alcançar aumentos maiores do HDL-C. No entanto, o torcetrapib e dalcetrapib não reduziram os eventos cardiovasculares nos testes clínicos e foram descontinuados (Rader and Degoma, 2014). No estudo ILLUMINATE, o torcetrapib foi associado ao aumento de mortes por eventos cardiovasculares, aumento na pressão arterial, infecção e sepse (Sirtori, 2011) apesar do aumento significativo do HDL-C e marcante redução da LDL-C (Barter *et al.*, 2007; De Haan *et al.*, 2008).

Os testes com evacetrapib, mostraram aumento ~130% do HDL-C e ~37%, de redução do LDL-C e melhor efluxo de colesterol (Doggrell, 2017). Os efeitos adversos observados nos estudos anteriores, como hiperaldosteronismo e hipertensão, não foram observados com uso do evacetrapib. No entanto, a avaliação dos efeitos clínicos em pacientes com alto risco (ACCELERATE) não mostrou redução significativa nos eventos cardiovasculares ou mortalidade e foi interrompida a comercialização da droga (Ruotolo *et al.*, 2016; Eyvazian and Frishman, 2017).

Os resultados do estudo REVEAL (*Randomized Evaluation of the Effects of Anacetrapib Through Lipid-modification*) com o inibidor anacetrapib mostraram redução significativa dos principais eventos coronarianos (morte e revascularização coronariana, infarto do miocárdio) em comparação ao grupo placebo em pacientes em risco para eventos cardíacos que estavam em um regime efetivo de redução de LDL-C com atorvastatina (Bowman *et al.*, 2017; 2017). O Anacetrapib também diminuiu o LDL-C e foi mais eficiente na remoção celular de colesterol (Yvan-Charvet *et al.*, 2010; Brodeur *et al.*, 2017). O estudo foi conduzido em pessoas com elevado risco cardiovascular. Válido indagar o que ocorreria se usado em pessoas apenas com HDL muito baixo. Não foi mencionado se houve aumento de casos de câncer ou infecção e mortalidade total, como ocorreu com Torcetrapib (Doggrell, 2017; 2017). O Anacetrapib eleva a massa de CETP e talvez isto diminua os efeitos pro-inflamatórios (Brodeur *et al.*, 2017).

A CETP faz parte da família de proteínas transportadoras de lipídeos, membros dessa família formada pela proteína de aumento da permeabilidade bacteriana (BPI), a LBP, a proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) compartilham a habilidade de ligar-se a uma variedade de substratos lipídicos. A similaridade entre seus genes sugere uma ancestralidade genética comum (Bingle and Craven, 2004; Balakrishnan *et al.*, 2013). Essas proteínas estão envolvidas na imunidade inata contra bactérias por meio de sua capacidade de detectar lipopolissacarídeos, como a BPI e a LBP, ou na troca de lipídios entre partículas de lipoproteínas, como a CETP e a PLTP (Alva and Lupas, 2016). A homologia estrutural da CETP com a LBP, que atua na imunidade inata, sugere a participação da CETP em processos inflamatórios.

A possibilidade de ligação da CETP com a aterosclerose e infecção, foi revisada em humanos (Quintao, 2016). Neles mostrou-se menor concentração plasmática de CETP em pacientes que não sobreviveram à sepse comparados aos sobreviventes e uma correlação positiva entre a concentração plasmática de CETP e a sobrevida (Grion *et al.*,

2010). Demonstramos ainda envolvimento da CETP, na resposta inflamatória em camundongos que expressam o gene da CETP humana (huCETP) como sendo mais resistentes à endotoxemia e à sepse experimental quando comparados aos não transgênicos selvagens (Cazita et al., 2008; Quintao, 2016; Venancio et al., 2016). Porém esses resultados divergem de outros recentes concluindo que a CETP humana piora a inflamação e a sepse em camundongos (Dusuel *et al.*, 2020), enquanto inibição da CETP melhora a sobrevivência na sepse humana (Trinder *et al.*, 2019; Trinder *et al.*, 2020). Embora não haja explicação para essa divergência de resultados, acrescenta-se que o papel da CETP poderia também depender da espécie animal e patologia envolvida, visto que a inibição da CETP protege contra complicações hepáticas na esquistossomose por *S. japonicum* (Yokoyama *et al.*, 2015). Além disto, poderia também ter papel tecido, ou órgão específico.

2. JUSTIFICATIVA

A proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) tem sido discutida como pró ou antiaterogênica, como também seu papel na resposta inflamatória na endotoxemia e na sepse experimental, e em humanos na sobrevivência à sepse. Alterações funcionais no metabolismo das lipoproteínas (LP) e nas populações de células imunológicas, incluindo os macrófagos, ocorrem na sepse e podem também se relacionar a comorbidades como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Os macrófagos são células importantes no desenvolvimento e formação do enfisema pulmonar; dependendo do microambiente podem apresentar fenótipo M1 ou M2.

Os macrófagos produzem CETP, sua presença pode promover troca de lipídeos entre as membranas celulares, e assim, contribuir para a etiologia e resolução da DPOC (Eapen *et al.*, 2017) (Shaykhiev *et al.*, 2009). Formulamos a hipótese de que a presença da CETP possa influenciar a resposta inflamatória na modulação fenotípica dos macrófagos, desta forma, afetar o microambiente pulmonar, alterando a expressão de algumas moléculas de superfície e a secreção de mediadores inflamatórios em modelo experimental de DPOC.

3 OBJETIVO

Avaliar o papel da CETP na polarização dos macrófagos derivados da medula óssea de camundongos em M1 e M2 e na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) em modelo de enfisema pulmonar induzido por elastase.

4. METODOLOGIA

4.1 Modelo Animal

Os procedimentos do estudo foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência e animais de Laboratório (SBCAL), e aprovação pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA 949/2018) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A expressão e atividade da CETP possui uma variação considerável entre os vertebrados. Animais como camundongos e ratos, não a expressam (Ha and Barter, 1982). Dessa forma, camundongos transgênicos para CETP são ferramentas fundamentais no entendimento da regulação e função dessa proteína.

No estudo utilizamos camundongos da linhagem C57BL/6J CETP^{+/+} que foi desenvolvida no Departamento de Medicina da Universidade de Columbia (Nova York), pelo grupo do Professor Dr. Alan Tall, na qual foi inserido um minigene da CETP humana, nomeada 5203. Essa linhagem, além de conter os elementos responsivos naturais do gene da CETP, possui padrão de expressão tecidual da proteína semelhante ao humano (Jiang *et al.*, 1992) (FIGURA 5). As matrizes fundadoras de colônia foram gentilmente cedidas pela Prof^a. Helena C. F. Oliveira da UNICAMP, com a anuência do Dr. Alan Tall. Os animais foram gerados e mantidos no biotério de apoio localizado no 4º andar da FMUSP sob a responsabilidade do Dr. Luiz Fernando Onuchic e sob os cuidados da equipe de profissionais do biotério, mantidos em gaiolas plásticas (5 animais/gaiola), em condições de fotoperíodo (12 x 12h) e submetidos à alimentação com ração comercial e água *ad libitum*.

Figura 2 Estrutura do transgene da CETP. O gene da CETP humana é mostrado (em cima). As barras verticais representam éxons. Um derivado de minigene foi construído pela combinação de fragmentos de cDNA (meio). A fusão desses fragmentos produziu um éxon sintético (caixa aberta, inferior). O transgene totalmente montado (fundo) foi colocado sob o controle do promotor metalotioneína-I do camundongo (caixa hachurada) e, em seguida, usado para desenvolver camundongos transgênicos. (Agellon *et al.*, 1991).

4.2 Seleção e caracterização dos animais selvagens (WT) e transgênicos para CETP humana (CETP)

Machos transgênicos para CETP humana (CETP) e controles irmãos não transgênicos (WT) de 8 a 12 semanas de idade, pesando entre 20-25g foram obtidos a partir do cruzamento das matrizes heterozigóticas de CETP (Agellon *et al.*, 1990). A manutenção da colônia e triagem para a confirmação da expressão gênica da CETP é coordenada pela pesquisadora Patrícia M. Cazita sendo realizada por genotipagem (**Fig. 5**), a medida indireta da atividade de CETP (**Fig. 6**), pelo perfil de lipoproteínas (**Fig. 7**) e ainda pela genotipagem da NNt (**Fig. 8**). Esses animais apresentam concentração plasmática da proteína de $5,80 \pm 2,07 \mu\text{g/ml}$ semelhantes ao plasma humano (Venancio *et al.*, 2016).

4.2.1 Genotipagem para CETP

A confirmação ou não da expressão gênica da CETP foi realizada pela reação de polimerização em cadeia (PCR) a partir de DNA extraído da cauda dos animais (4mm) onde foi amplificado um fragmento da região promotora do gene da CETP humana (Cazita *et al.*, 2003). A digestão das amostras para a extração do DNA foi realizada com um mix de 100 μL de 1X *Gittshier tail lysis buffer* (Tris a 670 mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 166 mM; MgCl_2 a 65 mM) a 100°C por 10 min, em seguida adicionamos 100 μL de 1X *Gittshier tail lysis buffer* acrescido de proteinase K (20mg/mL) mantidas em banho seco a 55°C por 2h. Posteriormente as amostras foram mantidas por mais 10 min à temperatura de 100°C e centrifugadas por 2 min a 3000 RPM. O sobrenadante contendo o DNA foi retirado e armazenado em tubos de armazenamento. Foi realizado o PCR convencional utilizando a amostra (DNA) com os “primers” para CETP humana (5’ GAATGTCTCAGAGGACCTCCC3’ e 5’CTTGAACCTCGTCTCCCATCAG3’). O controle endógeno utilizando foi o “primer” para a IL-2 (5’CTAGGCCA CAGAATTGAAAGATCT3’ e 5’GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC 3’). O kit para PCR Go Taq Master Mix (Promega, USA) utiliza a seguinte ciclagem em termociclador:

94°C – 3 minutos

94°C – 30 segundos }
 63°C – 30 segundos } 35 X
 72°C – 30 segundos }
 72°C – 5 minutos
 4°C

Após realização do PCR, foi realizada a corrida de eletroforese em gel de agarose 2% e leitura em luz UV utilizando o equipamento ImageQuant 350 GE para determinação das bandas correspondentes a CETP (Fig. 5).

Figura 3 Avaliação da expressão do gene da CETP humana em camundongos C57BL6/J. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% do produto de RT-PCR de amostras (A1-A12) de DNA genômico de camundongos provenientes do cruzamento de matrizes heterozigóticas CETP^{+/+}-demonstrando a detecção do gene da CETP humana com ~160 pb (A1-A8) e controle negativo da reação o gene da IL-2~320 pb (A9-A12).

4.2.2 Atividade da CETP

A atividade da CETP (Fig. 6) foi determinada por meio de teste *in vitro* utilizando HDL com radioisótopo no colesterol éster: [^{14}C]-CE como doadora de colesterol e as lipoproteínas VLDL + LDL comoceptoras na presença do plasma dos animais como fonte da CETP (Mcpherson *et al.*, 1991; Cazita *et al.*, 2003). As lipoproteínas utilizadas neste procedimento foram obtidas de *pool* plasmático humano de doadores normolipidêmicos e isoladas por ultracentrifugação sequencial (Havel *et al.*, 1955).

Figura 4 Atividade da CETP plasmática dos animais WT e CETP. Os animais foram caracterizados segundo seus respectivos fenótipos: atividade da CETP no plasma (>15% nos transgênicos (CETP) e < 10% nos WT). Análise estatística: teste *Mann Whitney* WT vs CETP $p < 0,0001$. WT (n=28), CETP (n=33).

4.2.3 Perfil de Lipoproteína (FPLC)

O perfil das lipoproteínas (LP) do plasma (Fig. 7) foi determinado por cromatografia em gel filtração (FPLC) no sistema de cromatografia líquida AKTA Purifier (GE Healthcare Bio-Sciences –Uppsala – Sweden). Foi injetado 100µL de plasma dos animais de cada grupo na coluna Superose 6HR 10/30 (GE Healthcare 17-5172-01) e a eluição ocorreu em fluxo constante de 0,5 mL/min com tampão Tris (Tris 10mM, NaCl 150mM, EDTA 1 mM e NaN₃ 0,03%, pH 7,0). Foram coletadas frações de 0,2 ml em placas de 96 poços utilizando o coletor de frações. O colesterol total (CT) e os triglicérides (TG) do plasma e das frações de LP foram determinados por método enzimático-colorimétrico utilizando *kits* Labtest (Labtest Diagnóstica – Minas Gerais – Brasil). A identificação dos picos correspondentes as LP: VLDL, LDL e HDL foi determinada pela a absorbância do CT (Machado *et al.*, 2010).

Figura 5 Perfil de lipoproteínas plasmáticas dos animais WT e CETP. A identificação dos picos correspondentes as LP: VLDL, LDL e HDL, isoladas por FPLC, foi determinada pela absorbância do colesterol total (CT) em 500 nm pelo método enzimático-colorimétrico. (n=8).

4.2.4 Genotipagem para NNT

A NNT (transidrogenase de nucleotídeo de nicotinamida) é a principal enzima geradora de NA(D)PH em mitocôndrias. Mutação presente nessa enzima está associada a alterações do estado redox mitocondrial, a processos inflamatórios, e redução de secreção de insulina dentre outros. Os animais da linhagem C57BL/6J provenientes do Jackson Laboratory (B6-J) apresentam a mutação quando comparados a animais da mesma linhagem, porém, de outras procedências (Ronchi *et al.*, 2013).

Portanto, avaliamos a presença dessa mutação nos animais utilizados no estudo.

A extração do DNA foi realizada seguindo o protocolo de extração feito para genotipagem da CETP como descrito acima. Foi realizado o PCR convencional utilizando a amostra (DNA) com os *primers* para NNT humana:

Nnt-COM	GTAGGGCCAACTGTTTCTGCATGA
Nnt-MUT	GTGGAATTCCGCTGAGAGAACTCTT
Nnt-WT	GGGCATAGGAAGCAAATACCAAGTTG

Utilizamos amostras de camundongos ApoE e LDL-ko como controle positivo. O kit para PCR Go Taq Master Mix (Promega, USA) utiliza a seguinte ciclagem em termociclador (Salerno *et al.*, 2019):

- 1- 95°C – 5 minutos
 - 2- 95°C – 45 segundos
 - 3- 58°C – 30 segundos
 - 4- 72°C – 45 segundos
 - 5- 72°C – 5 minutos
 - 6- 4°C
- } 35 X

Após realização do PCR, foi realizada a corrida de eletroforese em gel de agarose 2% e leitura em luz UV utilizando o equipamento ImageQuant 350 GE para determinação das bandas correspondentes a NNT selvagem e NNT mutada.

Figura 6 Avaliação da expressão do gene da NNT em camundongos C57BL6/J. Eletroforese em gel de agarose a 2% do produto de RT-PCR demonstrando a detecção do gene NNT: A e B) alelo mutante (~743 pb) presente nos controles ApoE e LDL-KO; C e D) alelo selvagem (~579 pb) presente nos animais WT e CETP.

4.3 Cultura celular de macrófagos

Após eutanásia de camundongos WT e CETP com idade entre 8 e 10 semanas, células da medula óssea utilizadas para diferenciação em macrófagos (Mφs) foram obtidas por dissecação do membro posterior para exposição de fêmures e tíbias. A extremidade de cada osso foi cortada e a medula óssea lavada com meio DMEM *high glucose* contendo antibióticos, soro fetal bovino (10%) e meio condicionado advindo de células L929 (30%). A medula foi gentilmente aspirada com dissolução dos agregados celulares e as células centrifugadas por 6 min a 1000 rpm a temperatura ambiente. Em seguida semeadas em placas de cultura com 6 poços e incubadas por 5 dias, em atmosfera de CO₂ 5% e temperatura de 37°C. No quinto dia, o meio de cultura foi trocado por novo meio condicionado de células L929 (Daffu *et al.*, 2015).

4.4 Análise fenotípica de macrófagos M1 e M2 na presença de CETP

4.4.1 CETP endógena

As células indiferenciadas da medula óssea provenientes de camundongos WT e CETP foram cultivadas para a diferenciação em Mφs e posterior estímulo para polarização em M1 e M2.

Os Mφs foram cultivados em placas em atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas em meio de cultura DMEM “*high glucose*” (10% SBF) enriquecido com 5ng IFN-γ/mL (PeproTech, USA) e 50 ng de LPS/mL (Sigma-Aldrich) para polarização de Mφs M1. Para polarização de Mφs M2 as células foram tratadas com 10 ng de IL4 e IL13 (PeproTech, USA). Macrófagos M0 foram mantidos em meio DMEM *high glucose* (10% SBF) livres de ativadores da polarização. As células foram descoladas da placa após lavagem com PBS gelado e adição de 1 mL de acutase (Sigma-Aldrich) por 5 minutos, seguido da centrifugação para obtenção do botão celular. As células foram colocadas em placa de 96 poços para incubação/marcação com o *mix* de anticorpos para determinação da porcentagem de Mφs M0 (indiferenciados), M1 e M2: F4/80 (PercP) e Cd11b (APCCy7) para macrófagos totais, CD80 (APC) para M1 e CD206 (PE) para M2, na proporção 1:50. A porcentagem de células vivas e mortas foi analisada utilizando o marcador Live/Dead (1:500) por 30 min a 4°C. Em seguida foram lavadas 2x com PBS e centrifugadas por 5 minutos a 300 G, para posterior análise no FACSCanto II (Henao Agudelo, 2017).

4.4.2 CETP exógena

Para análise da influência da CETP exógena na polarização dos macrófagos em M1 e M2 utilizaram-se células oriundas apenas de animais WT. Após obtenção das células indiferenciadas da medula óssea dos camundongos, no momento dos tratamentos para polarização dos macrófagos em M0, M1 e M2, foi adicionada huCETP recombinante (CETPr) (Roar Biomedical; New York City, New York, 10032, USA) ao meio de cultura (1 µg/mL) em todas as situações. As células foram mantidas nos mesmos parâmetros utilizados na análise da CETP endógena. Após o tratamento foi realizada a coleta das células para análise por citometria de fluxo, extração do mRNA e armazenamento do meio de cultura para determinação de citocinas e CETP.

4.5 Expressão gênica

Após tratamento, os macrófagos derivados de medula óssea foram descolados da placa de cultura com scraper e PBS, e centrifugados a 1000 RPM, 4°C, para obtenção do botão celular. As células foram ressuspensas em tampão RLT acrescido de β -ME e armazenadas à -80°C. Para extração do RNA foram utilizadas colunas Qiagen (Pinto *et al.*, 2015).

Na análise de expressão gênica das células derivadas de medula óssea de animais WT e CETP por amplificação do cDNA em tempo real foram utilizadas sondas marcadas com FAM adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e primers SYBR identificados pelos seguintes códigos e sequências:

GENE	CÓDIGO DA SONDA (TAQMAN)
ABCA1	Mm00442646_m1
ARG1	Mm00475988_m1
β -actina	Mm02619580_g1
Casp3	Mm01195085_m1
Cd36	Mm00432403_m1
CETP	Hs00163942_m1
HAVCR2 (TIM3)	Mm00454540_m1
Il10	Mm01288386_m1
Il18	Mm00434225_m1
Il1b	Mm00434228_m1
Il6	Mm00446190_m1
Lgals9 (GAL9)	Mm00495295_m1
Nos2 (iNOS)	Mm01309902_m1
Nr1h2 (LXR)	Mm00437265_g1
Pparg (PPAR γ)	Mm00440940_m1
Scarb1 (SRB1)	Mm00450234_m1
Srebf1 (SREBP)	Mm00550338_m1
TNF	Mm00443258_m1
TREM1	Mm01278455_m1
Vsig4	Mm00625349_m1
TLR4	Mm00445273_m1
GENE	SEQUÊNCIA DO PRIMER (SYBR)
Hprt F	AGCAGGTCAGCAAAGAACT
Hprt R	CCTCATGGACTGATTATGGACA
MR F	CAAGTTGCCGTCTGAAGTGA
MR R	TATCTCTGTCATCCCTGTCTCT
Nnt-COM	GTAGGGCCAACTGTTTCTGCATGA
Nnt-MUT	GTGGAATTCCGCTGAGAGAACTCTT
Nnt-WT	GGGCATAGGAAGCAAATACCAAGTTG
Stat3 F	GGAAATAACGGTGAAGGTGCT
Stat3 R	CATGTCAAACGTGAGCGACT
Ym1 F	ACTGGTATAGTAGCACATCAGC
Ym1 R	AGAAGCAATCCTGAAGACACC

A PCR foi realizada utilizando-se uma solução denominada Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ou para as sondas SYBR a solução Master Mix Power SYBRTM Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). De acordo com o protocolo do produto, as temperaturas utilizadas na reação de PCR em tempo real foram:

50°C – 2 minutos
 95°C – 10 minutos
 95°C – 45 segundos } 40X
 60°C – 30 segundos }
 4°C

Resultados prévios realizados em nosso laboratório mostraram que os genes cujas expressões menos variaram nas amostras analisadas foram β -actina e GAPDH, deste modo a β -actina foi escolhida como controle endógeno do presente estudo.

O resultado da expressão gênica destas amostras foi analisado no programa DataAssist versão 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

O método escolhido para o cálculo da quantificação relativa foi o Ct (Cycle threshold) comparativo ($\Delta\Delta Ct$) (Livak and Schmittgen, 2001), devido ao grande número de amostras e genes-alvo a serem analisados. Neste método não há necessidade de utilizar curva padrão em todas as placas, reduzindo consumo de tempo e reagentes.

A normalização de dados brutos de expressão foi realizada pela normalização com β -actina (TaqMan) ou HPRT (SYBR).

As comparações CETP vs WT foram feitas pela utilização da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) após quantificação relativa (RQ), o qual é realizado pelo software e, resumidamente, baseia-se nas seguintes fórmulas:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene-alvo} - Ct \text{ controle endógeno}$$

Onde o CT gene-alvo e CT controle endógeno correspondem à média dos valores de CT das triplicatas. Em seguida utilizou-se o teste t de *Student*.

4.6 Análise de citocinas.

As citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 e a CETP foram determinadas em amostras de plasma, no lavado bronco alveolar (BA) e no meio condicionado da cultura celular pelo método de ELISA. Os kits foram adquiridos das empresas R&D Systems (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) e Cell Biolabs (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.7 Indução de enfisema pulmonar por instilação de elastase

Os animais WT e CETP foram submetidos a anestesia inalatória com isoflurano, e após assepsia da região anterior ao pescoço foi realizada uma incisão de aproximadamente 0,5 cm para expor a traqueia. Nos animais CETP foi realizada injeção em dose única de 0,667UI de elastase porcina pancreática (E-1250-Type 1, Sigma, Califórnia, EUA) no volume de 50 μ L entre os anéis cartilagosos. O grupo controle (sem elastase) WT e CETP recebeu solução fisiológica (50 μ L).

Após 28 dias foi realizada análise dos parâmetros da mecânica respiratória (Theodoro *et al.*, 2017) que compreende: determinação de óxido nítrico exalado, resistência do sistema respiratório (Rrs), elastância tecidual (Htis), resistência do tecido pulmonar (Gtis), elastância do sistema respiratório (Ers) e resistência de vias aéreas (RAW). Em seguida, foi realizado um lavado bronco alveolar (LBA), coleta de sangue total e pulmão para análises histopatológico.

4.7.1 Avaliação da mecânica respiratória

Os animais foram anestesiados com tiopental (250 mg/kg via intraperitoneal) e traqueostomizados para inserção da cânula de plástico (20 gauge, BD, MG, Brasil), que foi fixada com fio de algodão ao redor da traqueia. Os animais foram conectados ao equipamento de ventilação mecânica para pequenos animais (FlexiVenti, Scireq, Montreal, Canadá) e ventilado com volume corrente de 10 mL/kg, frequência respiratória de 120 ciclos/min e curva de fluxo inspiratório senoidal. Para abolir o esforço respiratório, os animais receberam pancurônio (0,2 mg/kg i.p). Os dados para o cálculo da mecânica pulmonar foram registrados após haver mais movimentação do animal. Para tanto, foi utilizado um sinal que produzia oscilações do fluxo aéreo com diferentes frequências prismas (0,25 a 19,625) por 16 segundos, com a válvula expiratória fechada. Os valores

de pressão gerados foram obtidos e a impedância de via aérea (pressão/fluxo) foi calculada como função das diferentes frequências produzidas. Foi utilizada uma janela de sobreposição de 75% no sinal de 16 segundos e 3 blocos de 8 segundos foram usados para o cálculo dos parâmetros da mecânica oscilatória (i), segundo a equação:

$$Z(f) = R_{aw} + i(2\pi f) l_{aw} + \frac{[G_{tis} - iH_{tis}]}{(2\pi f)^\alpha}$$

No modelo utilizado, $Z(f)$ é a impedância de via aérea em função da frequência, i é a unidade imaginária ($-1^{1/2}$), f é a frequência, l_{aw} é a inertância de vias aéreas e $\alpha = (2/\pi)^* \arctan (H_{tis}/G_{tis})$. Os parâmetros que utilizamos para descrever o modelo pulmonar são R_{aw} (resistência de vias aéreas), G_{tis} (resistência do tecido pulmonar) e H_{tis} (elastância do tecido pulmonar) (Theodoro *et al.*, 2017).

4.7.2 Determinação de óxido nítrico (E_{NO})

Durante a ventilação mecânica, o gás expirado foi coletado na porção expiratória do ventilador por meio de um balão impermeável ao NO (Mylar Bag, Sievers, Instruments INC., Boulder, CO, USA) durante 5 minutos. Após o tempo de coleta, os balões foram lacrados e armazenados para análise (Theodoro *et al.*, 2017).

O óxido nítrico foi determinado por quimiluminescência por meio de um analisador de resposta rápida (280 NOA – Nitric Oxide Analyzer – Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, USA). O índice da concentração de NO ar exalado foi determinado pela concentração média de NO em partes por bilhão (ppb).

4.7.3 Lavado broncoalveolar

Para análise do lavado broncoalveolar, após coleta dos parâmetros da mecânica ventilatória realizamos a infusão de 0,5 mL de solução fisiológica por 3 X consecutivas (total de 1,5 mL) com auxílio de uma seringa conectada à cânula traqueal. O volume recuperado foi centrifugado a 1000 rpm, 5°C, por 10 minutos e o botão celular ressuspenso em 200 µL de solução fisiológica. A contagem de células total foi realizada por microscopia ótica em câmara de Neubauer (400X).

A contagem diferencial foi realizada por meio da centrifugação de 100 µL do LBA (450 rpm por 6 min), e depois de secas as lâminas foram coradas pela técnica de diferenciação de Diff Quick. A contagem diferencial das células foi determinada a partir do achado de 300 leucócitos por lâmina e a diferenciação de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos em microscópio ótico com objetiva de imersão (1000X).

4.7.4 Estudo histopatológico

Os pulmões foram fixados em formaldeído 10% sob pressão constante de 20 cmH₂O por 24h. O material foi colocado em parafina para confecção das lâminas histológicas para posterior marcação específica pela técnica de histoquímica (Theodoro *et al.*, 2017).

4.7.5 Imuno-histoquímica

A parafina das lâminas silanizadas foi retirada com xilol a 60-65°C e reidratadas com etanol, água corrente e água destilada em concentrações decrescentes. Para recuperação dos epítomos antigênicos as lâminas foram colocadas em solução de citrato 10 mM (pH=6,0) e os sítios inespecíficos bloqueados com peroxidase endógena à temperatura ambiente. As lâminas foram encubadas *over night* a 4°C com anticorpo primário, lavado com Tampão fosfato (PBS) e incubado com anticorpo secundário à 37°C. Para revelação utilizamos a solução de cromógeno (DAB) e hematoxilina de Harris para contra corar.

Para cada marcador foi utilizado um anticorpo primário específico com seu respectivo anticorpo secundário. A padronização da diluição foi realizada iniciando os testes a partir da diluição sugerida pelo fabricante, e as lâminas finais coradas com os anticorpos conforme descrito a seguir:

MARCADOR	ANTICORPO PRIMÁRIO	DILUIÇÃO	ESPECIFICAÇÃO
----------	--------------------	----------	---------------

TNF	Monoclonal produzido em camundongo	1:100	SC-52746, Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-10	Monoclonal produzido em rato	1:50	SC-73309, Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
iNOS	Policlonal produzido em coelho	1:500	12613507, Labvision, Neon markers, CA, USA
Arg-1	Monoclonal produzido em camundongo	1:50	610708, BD Biosciences, United Kingdom.
CETP	Policlonal produzido em coelho	1:200	ab51771, Abcam, USA.

Para revelação utilizamos o *Vectastin Abc*, *Vector Laboratories* (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) ou *Envisionision + Dual Link System Peroxidase* (DakoCytomation, CA, EUA).

O número de células positivas para TNF, IL-10, iNOS e CETP no parênquima pulmonar e vias aéreas foi obtido pela contagem do número de pontos.

4.7.6 Análise do intercepto linear médio (Lm)

Para determinação morfométrica, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para contagem do intercepto linear médio (LM): índice que avalia o diâmetro médio dos espaços aéreos distais. A análise quantitativa foi realizada por microscopia óptica, pela contagem de pontos (“*point-counting*”), utilizando-se uma ocular e aumento de 400 X, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta dispostos em paralelo, acoplada ao microscópio de luz convencional (Theodoro *et al.*, 2017).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc. 2003) sob as seguintes modelagens: ANOVA de um fator com pós-teste *Bonferroni* e teste não paramétrico de Mann-Whitney, aceitando o nível de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados *in vitro*

5.2.1 Polarização de macrófagos na presença e ausência da CETP

Observamos *in vitro* que as células dos grupos experimentais responderam a geração de macrófagos M1 e M2 cultivados em meios polarizantes. A expressão de CD80 (M1) foi maior no grupo WT em comparação ao que expressa CETP (**Fig. 9A**). Nos macrófagos CETP aumentou a expressão de CD206 nas células na ausência de estímulo (M0) e sob estímulo para M1 (IFN γ + LPS) (**Fig.9B**). Não houve diferenças entre os grupos experimentais na polarização para M2, entretanto, observamos redução significativa da razão M1/M2 no grupo CETP comparado ao WT para M0 e M1(**Fig. 9C**).

Figura 7 Análise fenotípica de macrófagos M1 e M2 na presença da CETP endógena. Expressão de CD80 (A), CD206 (B) e a razão CD80/CD206 (C). Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos WT ou CETP, não polarizados (M0), ou estimulados para M1 (5 ng/mL de IFN γ + 50 ng/mL de LPS) ou para M2 (10 ng/mL de IL-13 + IL-4) por 24 horas. A fluorescência basal foi determinada usando células não marcadas, e a compensação foi feita com células marcadas com os respectivos fluorocromos no citômetro FACSCanto II. Foram analisados 100.000 eventos. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão comparados por teste t de *student*, não pareado. (n= 3). *p<0,05

5.2.2 Expressão gênica

A diferenciação celular dos macrófagos foi observada na expressão dos genes marcadores para M1 e M2 (**Fig. 10: M1 e M2**). Curiosamente, mesmo na ausência de estímulos nota-se maior expressão do gene NOS2 (óxido nítrico-sintase 2) e TNF, ambos considerados marcadores de M1, no grupo WT-M0 comparado ao CETP-M0. Na expressão gênica sob estímulo para M1, como esperado, observa-se aumento de NOS2, IL-6 e TNF na população M1, embora não diferindo entre WT e CETP. As expressões de arginase, YM1 e do receptor de manose CD206 (MR), considerados marcadores de M2, são maiores nessa população, embora também não haja diferença entre WT e CETP. Apenas um discreto aumento do mRNA de ABCA1 foi observado no grupo CETP-M2 em comparação ao grupo WT-M2 (**Fig. 10: M2**).

Redução da expressão gênica da CETP foi observada no grupo M1 e M2 comparado ao M0.

Figura 8 Expressão mRNA de genes associados à polarização de macrófagos M1, M2 e metabolismo de lipídeos na presença de CETP endógena. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos WT ou huCETP: células não polarizadas como controle (**M0**), ou estimuladas para **M1** com 5 ng/mL de IFN γ + 50 ng/mL de LPS, ou **M2** com 10 ng/mL de IL-13 + IL-4 por 24 horas. Expressão do mRNA das células realizado por RT-PCR. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão comparados por teste t de *student*, não pareado. (n= 3-5). *p<0,05

5.2.3 Secreção de citocinas e CETP no meio de cultura celular

O tratamento para diferenciação em M1 favoreceu a produção de citocinas TNF e IL-6 no meio de cultura do grupo WT e CETP, confirmando o estímulo inflamatório (**Fig. 11 e B**). Aumento significativo na produção de TNF no grupo M2 e de IL-10 no grupo M1 foi observado na presença de CETP (**Fig. 11A e 11C**). A secreção de CETP no meio de cultura foi similar sob todas as condições de tratamento (**Fig. 11D**).

Figura 9 Secreção de citocinas e CETP no meio de cultura celular. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos WT ou CETP, não polarizados (M0), ou estimulados para M1 (5 ng/mL de IFN γ + 50 ng/mL de LPS) ou para M2 (10 ng/mL de IL-13 + IL-4) por 24 horas. TNF- α (A), IL-6 (B), IL-10 (C) e CETP (D), determinada apenas no grupo CETP, pelo método de ELISA. Os Resultados (média $\pm$ DP) foram comparados pelo *test t* de Student não pareado. * $p < 0,05$; (n=5-8).

5.2.4 Análise fenotípica de macrófagos M1 e M2 na presença da CETP recombinante

Quando utilizamos a CETP recombinante na polarização de macrófagos, ocorre redução na polarização para M1 (CD80) em comparação ao WT sem a proteína (**Fig. 12A**). Por outro lado, macrófagos tratados com CETP expressam CD206 em todas as condições, seja na ausência ou sob estímulo para M1 e M2 em relação ao WT (**Fig. 12B**).

Figura 10 Análise fenotípica de macrófagos M1 e M2 na presença da CETP recombinante. Expressão de CD80 (A) e CD206 (B). Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos WT, não polarizados (M0), ou estimulados para M1 com 5 ng/mL de IFN γ + 50 ng/mL de LPS, ou M2 com 10 ng/mL de IL-13 + IL-4 na ausência (controle) ou presença CETP humana recombinante (1 μ g/mL) por 24 horas. Expressão do mRNA das células realizado por rtPCR (n=3). Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão comparados por test t. *p<0,05; (n= 3).

5.2.5 Expressão gênica na presença de CETP recombinante

Na análise da influência da CETP exógena (CETP recombinante adicionada ao meio de cultura), avaliamos a expressão de genes e citocinas associadas apenas à polarização de macrófagos M1 e M2. Os resultados mostram resposta aos estímulos polarizantes, porém, sem diferença entre os grupos WT e CETP (Figs. 13 e 14).

Figura 11 Avaliação da expressão de genes associados à polarização de macrófagos M1 e M2 na presença de CETP recombinante. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos WT, não polarizados (M0), ou estimulados para M1 com 5 ng/mL de IFN γ + 50 ng/mL de LPS, ou M2 com 10 ng/mL de IL-13 + IL-4 na ausência (controle) ou presença CETP humana recombinante (1 μ g/mL) por 24 horas. Expressão do mRNA das células realizado por rtPCR. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão comparados por test t de *Student* não pareado. (n= 3).

5.2.6 Secreção de citocinas na presença de CETP recombinante

Figura 12 Secreção de citocinas no meio de cultura celular. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos WT, não polarizados (M0), ou estimulados para M1 com 5 ng/mL de IFN γ + 50 ng/mL de LPS, ou M2 com 10 ng/mL de IL-13 + IL-4 na ausência (controle) ou presença CETP humana recombinante (1 μ g/mL) por 24 horas. Secreção de citocinas determinadas no meio de cultura pelo método de ELISA. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão comparados por test t. (n= 3).

5.2 In vivo - Indução de enfisema pulmonar por instilação de elastase

Após 28 dias de aplicação da elastase (ELA), analisamos a mecânica pulmonar, a contagem total e diferencial de leucócitos do lavado broncoalveolar (LBA), produção de citocinas e análise histológica dos pulmões dos animais dos grupos experimentais (**Fig. 15-19**).

5.2.1 Mecânica pulmonar

No grupo CETP ELA aumentou a elastância tecidual (Htis) e a elastância do sistema respiratório (Ers) (**Fig. 15 B e 15 C**), acompanhado da redução na resistência das vias aéreas (Raw) em comparação ao grupo WT-ELA (**Fig. 15D**). Não houve diferença de NO exalado (**Fig. 15F**).

Figura 13 Mecânica pulmonar. A) Resistência do sistema respiratório (Rrs); B) Elastância de tecidos (Htis); C) Elastância do sistema respiratório (Ers); D) Resistência de vias aéreas (RAW). E) Resistência de tecido pulmonar (Gtis); F) Óxido nítrico exalado. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão comparados por ANOVA de um fator com pós-teste *Bonferroni*. $p < 0,05$; * CETP Ela x WT Ela (n=8).

5.2.2 Contagem total e diferencial de leucócitos e a concentração de citocinas do lavado broncoalveolar (LBA).

No lavado broncoalveolar (LBA), observamos aumento significativo na contagem das células totais e diferencial de macrófagos no grupo CETP ELA comparado ao WT ELA e aos grupos controles que receberam apenas salina (SAL) (**Fig. 16 A e 16 D**).

Os eosinófilos e linfócitos foram maiores no grupo WT ELA em relação a todos os grupos experimentais (**Fig. 16 B e 16 E**). Não houve alteração dos neutrófilos (**Fig. 16C**) entre os grupos. Esses resultados foram acompanhados pelo aumento significativo de IL-10 no LBA em CETP ELA em relação ao WT ELA (**Fig. 16H**).

Figura 14 Contagem total e diferencial de leucócitos e a concentração de citocinas do lavado broncoalveolar (LBA). Células totais no lavado broncoalveolar (A), Eosinófilos (B), Neutrófilos (C), Macrófagos (D), Linfócitos (E), TNF (F), IL-6 (G), IL-10 (H). Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão comparados por ANOVA de um fator com pós-teste *Bonferroni*. $P < 0,01$: *CETP Ela x WT Sal, WT Ela, CETP Sal; **WT Ela x WT Sal, CETP Sal, CETP Ela; %CETP Ela x CETP Sal, WT Sal (n=8).

5.2.3 Imunohistoquímica

O aumento de IL-10 no lavado bronco-alveolar (LBA), corrobora o aumento de demonstrado por imuno-histoquímica no tecido pulmonar do grupo CETP ELA comparado ao WT ELA (**Fig. 17B**). Na marcação para iNOS, não houve diferença entre os grupos (**Fig. 17C**). Aumento significativo na expressão de Arg-1 no tecido pulmonar no grupo CETP (**Fig. 17D**), foi acompanhado pela presença de CETP no tecido pulmonar (**Fig. 18 A e B**). Além disso, houve aumento do intercepto linear médio (Lm) (**Fig. 18 C**).

Figura 15 Fotomicrografia de lâminas coradas por imuno-histoquímica para marcadores inflamatórios. TNF (A), IL-10 (B), iNOS (C) e Arginase 1 (D). Imagens representativas das micrografias com aumento de 1000x. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão de células positivas para os marcadores no parênquima pulmonar, comparados por ANOVA de um fator com pós-teste *Bonferroni*. $p < 0,01$: *CETP Ela x WT Sal, CETP Sal, WT Ela; **WT Ela x CETP Sal, WT sal (n=8).

Figura 16 Fotomicrografia de lâminas coradas por imunohistoquímica para CETP nas vias aéreas (A) e no parênquima pulmonar (B) e intercepto linear médio LM por contagem de pontos dos espaçamentos das vias aérea (C). Imagens representativas das fotomicrografias: CETP aumento de 1000x e (LM) 400x. Resultados expressos em média $\pm$ DP de células positivas para os marcadores nas vias aéreas e parênquima pulmonar, comparados por ANOVA de um fator com pós-teste *Bonferroni*. $p < 0,01$: & WT Sal x CETP Sal, CETP Ela; && WT Ela x CETP Sal, CETP Ela; *CETP Ela x WT Sal, CETP Sal, WT Ela; **WT Ela x CETP Sal, WT sal; (n=8).

No plasma ocorreu elevação de IL-6 plasmática (pg/mL) no grupo CETP ELA comparado ao grupo CETP salina (SAL), $3055 \pm 213,7$ vs $2029 \pm 330,5$ respectivamente. Não observamos diferença no grupo WT: $2561 \pm 601,4$ vs $2742 \pm 175,2$, WT SAL vs WT ELA respectivamente. A IL-10 plasmática não diferiu entre os grupos. WT-SAL: $204,1 \pm 220,7$; WT-ELA: $189,6 \pm 91,31$; CETP-SAL: $233,1 \pm 52,73$; CETP ELA: $114,5 \pm 85,53$.

5.2.4 Perfil lipídico

Os lipídios plasmáticos após a instilação de elastase não foram modificados (**Tabela 1**). No entanto, o tratamento com elastase induziu modificações na distribuição do colesterol nas LP dos animais CETP e WT as quais foram distintas conforme o genótipo (**Fig. 19 e tabela 1**). Em termos relativos, a elastase no grupo CETP provocou aumento de colesterol em VLDL e redução em HDL com aumento do conteúdo de TG na HDL. Isto pode ser explicado pelo aumento da atividade de CETP (%) que foi $17,06 \pm 4,42$ no grupo SAL vs $22,56 \pm 2,73$ após elastase ($p < 0,05$). Esses resultados foram

independentes da concentração plasmática de CETP ($\mu\text{g/mL}$) SAL: $1,882 \pm 0,55$ vs ELA: $1,907 \pm 0,4$.

Não foram observadas alterações no colesterol nas frações de LP no grupo WT. Entretanto, observamos aumento de TG nas partículas de VLDL e LDL com redução em HDL após a tratamento com elastase.

5.2.5 Perfil das lipoproteínas por FPLC

Figura 17 e Tabela 1. Concentração plasmática de colesterol e triglicérides totais e nas frações de lipoproteínas isoladas por FPLC após a instilação de elastase ou controle salina. A identificação dos picos correspondentes as LP: VLDL, LDL e HDL, isoladas por FPLC, foi determinada pela absorbância do colesterol total (CT) e triglicérides (TG) em 500 nm pelo método enzimático-colorimétrico. Média de 2-3 pools (n=4).

	WT SAL	WT ELA	CETP SAL	CETP ELA
(mg/dL)				
Colesterol (C) total	73±10	64±8	72±9	65±3
VLDL-C	5	3	13	24 ↑
LDL-C	13	7	15	12
HDL-C	55	53	45	29 ↓
TG	102±30	123±10	100±20	121±21
VLDL-TG	51	73 ↑	76	80
LDL-TG	27	37 ↑	10	19
HDL-TG	24	13 ↓	14	23 ↑

TABELA 1. Concentração plasmática de colesterol e triglicérides totais e nas frações de lipoproteínas isoladas por FPLC após a instilação de elastase (ELA) ou salina (SAL). Setas: azul = aumento; vermelho = redução.

6 DISCUSSÃO

Demonstramos pela primeira vez, que animais que expressam o gene da CETP humana morrem menos comparados aos não transgênicos durante a sepse experimental. A CETP parece realizar um papel chave na fase inicial e reversível da doença, e nesse contexto, atua em cooperação com lipoproteínas aceptoras, previamente reconhecidas veículos-chave para o transporte do LPS, e na regulação da resposta inflamatória desencadeada pelo LPS em macrófagos (Cazita et al., 2008; Quintao, 2016; Venancio et al., 2016).

A sepse pode relacionar-se com comorbidades como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Ernst *et al.*, 2017). E nesse estudo, exploramos a influência da CETP sobre a polarização dos macrófagos em fenótipos M1 e M2 e seu potencial efeito sobre a patogênese da DPOC em modelo murino de enfisema pulmonar induzido por elastase (ELA).

A cultura celular com macrófagos obtidos de camundongos transgênicos para CETP humana (CETP) e controles selvagens (WT) mostrou que na presença da CETP houve redução na polarização para M1 (**Fig. 9 A**), representado pelo marcador CD80, enquanto o marcador de M2, o receptor de manose CD206, foi maior em comparação ao WT em M0 e M1 (**Fig. 9 B**). A adição de CETP humana recombinante ao meio de cultura reforçou esses achados (**Fig. 12**).

Após um macrófago adotar um fenótipo, ele ainda retém a capacidade de continuar mudando em resposta a novas influências ambientais. A reversibilidade da polarização tem um valor terapêutico crítico, especialmente em doenças nas quais um desequilíbrio M1/M2 desempenha um papel patogênico (Funes *et al.*, 2018).

Avaliamos a relação M1/M2 nos grupos experimentais onde o grupo WT aumentou de forma significativa M1 comparado ao CETP $p < 0,05$ (**Fig. 9 C**). As evidências detalhadas nessas observações que enfatizam a polarização de macrófagos M2 no grupo CETP pode ser um alvo de interesse em imunoterapia (Funes *et al.*, 2018).

O perfil de citocinas revelou aumento de TNF, IL-6 e IL-10 nas células M1, WT e CETP. Como esperado, houve predomínio da produção de TNF na polarização para M1. Entretanto, quando analisamos a polarização para M2, a produção de TNF foi maior no grupo CETP (**Fig. 11 A**).

A presença da CETP na modulação para M1 produziu mais IL-10 (**Fig. 11 C**), mas isso não foi observado nos macrófagos sem estímulo ou naqueles estimulados para polarização em M2 (**Fig. 11 e 14**). Embora a IL-10 seja considerada citocina anti-inflamatória potente e de perfil M2 (Iyer *et al.*, 2010), sua concentração aumentou significativamente no meio de cultura das células M1. Esse efeito pode ser atribuído a ativação do receptor toll-like (TLR) via lipopolissacarídeo (LPS), ou ativação e liberação de IL-27 estimulada por interferon (IFN), com consequente ativação dos fatores de transcrição Jak /STAT1 e STAT3 fosforiladas, levando à produção de IL-10 (Iyer *et al.*, 2010). Corroborando esses achados, foi demonstrado que as principais vias de ativação da IL-10 mediada pelo TLR4 são dependentes de MyD88 e NF-k beta e de vias que envolvem a indução de IFN do tipo 1 (Doyle *et al.*, 2003; Kawai and Akira, 2006). Sendo assim, para melhor compreensão dos resultados são necessárias investigações para determinar as concentrações de proteínas e fatores de transcrição envolvidos na via de sinalização da produção de IL-10 como a Jak, STA3 e STAT1 fosforiladas ((Iyer *et al.*, 2010). A transcrição gênica de IL-10, STAT 3 e TLR4, sob condições polarizantes no período de 24 h não foram alteradas nesse estudo (**Fig. 11 C**).

As citocinas anti-inflamatórias aumentam para iniciar processo de controle da inflamação quando as bactérias estão sendo eliminadas. Também aumenta a IL-10 anti-inflamatória para conter inflamação excessiva que pode produzir dano aos órgãos, por isso é habitual a IL-10 elevar-se seguindo o TNF. Os resultados reforçam que IL-10 e TNF estão associados na polarização dos macrófagos (Couper *et al.*, 2008).

De acordo com a hipótese de que a CETP exerce papel importante na imunomodulação e favorece menor perfil de macrófagos M1, o aumento significativo de IL-10 no grupo CETP comparado ao grupo WT ajudaria compreender o duplo papel da CETP em diferentes situações, a saber: 1) perfil anti-inflamatório, conferindo maior sobrevida na endotoxemia em animais CETP comparados aos WT (Cazita *et al.*, 2008; Venancio *et al.*, 2016), embora isso seja contestado (Dusuel *et al.*, 2020); 2) piora da inflamação e aumento do dano tecidual em modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por elastase, que resultou no alargamento dos espaços aéreos alveolares (Lm) em animais CETP comparados aos WT, conferindo agravamento do enfisema pulmonar (**Fig. 17 B e 18C**).

Na avaliação da expressão gênica, observamos que as células dos grupos experimentais responderam à geração de macrófagos M1 e M2 em condições

polarizantes, sem diferença significativa entre os grupos (**Fig. 10 e 13**). Observamos aumento da expressão dos genes Nos2 (óxido nítrico sintase 2), IL-6 e TNF associados à polarização para M1 e de arginase (ARG 1), YM1 e o receptor de manose CD206 (MR) moléculas expressas em M2. A expressão dos genes Nos2 e TNF, ambos considerados marcadores de M1, foi menor em CETP-M0 comparado a WT-M0. Os demais genes apresentaram expressão semelhante na ausência de estímulo. (**Fig. 10 -M0**).

Demonstramos em cultura celular de macrófagos, que a presença de CETP, tanto endógena quanto exógena, reduziu a captação de LPS em comparação aos WT. Aumento da ativação de NF-k beta com produção de TNF-alpha foi observada nos macrófagos na ausência de CETP (Venancio *et al.*, 2016). Outro estudo (Zhu *et al.*, 2010) mostrou que o acúmulo de colesterol em macrófagos aumenta a resposta inflamatória mediada pelos receptores toll-like4 (TLR4) exacerbando a secreção de citocinas pró-inflamatórias mediada por LPS. Isso indica que a concentração celular de colesterol tem influência direta na imunoregulação. Nesse sentido o recrutamento de TLR4 para “*lipid-rafts*” é decorrente do aumento do colesterol nesses microdomínios de membrana. Podemos especular que CETP na ausência de estímulo polarizante atue na redução de colesterol nesses microdomínios celulares prejudicando o recrutamento do TLR4 e reduzindo a liberação de citocinas.

Aumento da transcrição de ABCA1 foi observado no grupo CETP-M2 em comparação ao grupo WT-M2. Demonstrou-se em macrófagos que o ABCA1 promove IL-10 e diminui a secreção de citocinas pró-inflamatórias, onde o ABCA1 ativa a PKA e contribui para a resposta inflamatória tipo M2 (Ma *et al.*, 2012).

Vários outros genes que conectam o metabolismo de lipídeos e a inflamação, LXR, PPAR gama, SRB1, CD36 e SREBP, foram avaliados e não diferiram entre os grupos experimentais. Redução da expressão do mRNA para CETP foi observada na geração de macrófagos M1 e M2 em condições polarizantes. Estudos anteriores demonstraram redução da expressão da CETP na presença de LPS (Masuccimagoulas *et al.*, 1995). Entretanto o conteúdo de CETP secretada no meio de cultura, não diferiu entre M0, M1 e M2.

É sabido que a expressão hepática de CETP é regulada pelo LXR (Honzumai *et al.*, 2010). Agonistas de LXR atenuam a liberação induzida por LPS de TNF alpha e prostaglandina E2 de células isoladas de Kupffer (Wang *et al.*, 2009), sugerindo que os

LXRs mantêm o status de ativação pró-inflamatório das células de Kupffer baixo, o que coincide com uma alta expressão de CETP.

Na indução de enfisema pulmonar em modelo experimental por instilação de elastase (ELA) em animais CETP e seus respectivos controles WT, encontramos piora funcional nos parâmetros da mecânica pulmonar no grupo CETP ELA, caracterizada por aumento da elastância tecidual (Htis) e elastância do sistema respiratório (Ers) (**Fig. 15B e 15C**), acompanhados de redução na resistência das vias aéreas (Raw) em comparação ao grupo WT-ELA (**Fig 15D**), sem apresentar diferença de NO exalado (**Fig. 15F**). As alterações da mecânica estão de acordo com o aumento do intercepto linear médio, o que reflete em alargamento dos espaços aéreos resultante da destruição do parênquima pulmonar no grupo CETP ELA (**Fig. 18C**).

O perfil de citocinas no LBA, revelou aumento de IL-10 corroborando os dados de imuno-histoquímica no tecido pulmonar no grupo CETP ELA comparado ao WT ELA (**Fig. 16H**). Esses achados foram acompanhados pela elevação de células totais e macrófagos e no LBA do grupo CETP ELA comparado ao WT ELA e aos grupos SAL (**Fig. 16A e 16D**).

Os eosinófilos e linfócitos foram maiores no grupo WT ELA em relação a todos os grupos experimentais (**Fig. 16B e 16E**). O papel dos eosinófilos na patogenia da DPOC é ainda controverso e muitos casos ocorrem com eosinofilia no tecido sem o aumento concomitante de eosinófilos no sangue (Campos and Pereira, 2009). Não houve alteração dos neutrófilos (**Fig. 16C**) e do NO exalado (**Fig. 15F**) entre os grupos experimentais, provavelmente pela grande variação individual. A marcação para iNOs no tecido pulmonar também não diferiu (**Fig. 17C**).

No plasma ocorreu elevação de IL-6 plasmática (pg/mL) no grupo CETP ELA (3055 ± 213) comparado ao grupo CETP Salina ($2029 \pm 330,5$), podendo indicar resposta inflamatória sistêmica após a elastase. Não observamos diferença na concentração de IL-6 no grupo WT (SAL: 2742 ± 175 vs ELA: $2561 \pm 601,4$). A concentração plasmática de IL-10 (pg/mL) não diferiu entre os grupos WT (SAL: $204,1 \pm 220,7$ vs ELA: $189,6 \pm 91,31$) e CETP (SAL: $233,1 \pm 52,73$ vs ELA: $114,5 \pm 85,53$). Esses resultados concordam com o fato de pacientes com DPOC grave apresentarem relação IL-6/IL-10 mais alta e concentração mais baixa de IL-10 (Silva *et al.*, 2018).

Ao contrário do observado no plasma, a IL-10 elevou-se no grupo CETP ELA no parênquima pulmonar e foi acompanhada por maior expressão de Arg-1, ambas

consideradas marcadores de macrófagos do tipo M2 (**Fig. 17A e 17D**). O aumento de Arg-1 sugere agravamento na atividade catabólica, mas também pode ter implicações na fibrose pulmonar e na resistência das vias aéreas (Eapen *et al.*, 2017). Esses dados corroboram aqueles *in vitro* da polarização dos macrófagos na presença de CETP para o tipo M2 e são potencialmente importantes na compreensão da fisiopatologia da resposta do trato respiratório na presença da CETP e na etiologia da DPOC.

Os lipídios plasmáticos após a instilação de elastase não se modificaram (**tabela 1**). No entanto, o tratamento com elastase induziu modificações na distribuição do colesterol nas LP dos animais CETP e WT as quais foram distintas conforme o genótipo. Em termos relativos, a elastase no grupo CETP provocou aumento de VLDL-C e uma redução de HDL-C, com aumento de HDL-TG. Isso pode ser explicado pelo aumento da atividade da CETP (SAL: $17,06 \pm 4,42$ vs ELA: $22,56 \pm 2,73$). Esses resultados foram independentes da concentração plasmática de CETP ($\mu\text{g/mL}$): (SAL: $1,882 \pm 0,55$ vs ELA: $1,907 \pm 0,41$).

Os resultados indicam que a expressão de CETP no grupo elastase levou a modificações desfavoráveis com aumento de apoB-LP e redução de HDL. Pode-se inferir que a redução de HDL-C também tenha contribuído para a piora da resposta inflamatória no grupo CETP ELA. Não foram observadas alterações no colesterol nas frações de LP no grupo WT. Observamos um aumento de TG nas partículas de VLDL e LDL com redução em HDL após a elastase. No entanto, na avaliação do perfil lipídico na DPOC de grau leve, moderado e grave não ocorrem diferenças significativas nas concentrações de LDL, apolipoproteína B ou HDL entre os grupos. As concentrações de triglicerídeos foram reduzidas e apoA1 aumentou nos casos mais graves (Sin and Man, 2003).

Nossos resultados concordam com outra investigação mostrando macrófagos alveolares com fenótipo M2 dominante em indivíduos com DPOC (Eapen *et al.*, 2017). Outro estudo encontrou aumento da deposição de macrófagos alveolares M2 no modelo de DPOC de camundongo e aumento de expressão da via TGF beta/Smad em macrófagos M2, tanto *in vitro* quanto *in vivo* indicando que macrófagos M2 contribuem para a DPOC por meio da alteração do perfil fenotípico dos macrófagos (He *et al.*, 2017).

Apesar das limitações de observações em modelo animal para a fisiologia humana, nossos resultados são inéditos e se somam ao fato de serem escassos os estudos sobre participação da CETP na resposta inflamatória, e principalmente, sobre o seu papel nos macrófagos e possíveis efeitos tanto na sepse como na DPOC.

Considerando a diversidade dos macrófagos M2 ativados alternativamente em subtipos: M2a, M2b, M2c e M2d (Duluc *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2008), podemos inferir que a CETP possa favorecer a polarização de algum desses subtipos a depender do microambiente, o que precisa ser melhor investigado.

7 CONCLUSÃO

Os resultados *in vivo* mostram que instilação de elastase na presença de CETP promove no pulmão fenótipo favorável a M2 com efeito deletério na DPOC experimental e corroboram com os dados *in vitro* onde a CETP promoveu fenótipo de polarização de macrófagos M2. Levantamos então a possibilidade de que a CETP possa atuar como proteína pró ou anti-inflamatória dependendo do tipo de tecido, órgão ou patologia.

8 ANEXO

8.1 Aprovação da Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP

MEDICINA
USP

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada **“INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA DE TRANSFERÊNCIA DE COLESTEROL ESTERIFICADO (CETP) NA CAPTAÇÃO, DISTRIBUIÇÃO CELULAR E EXCREÇÃO HEPÁTICA DE LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)”**, registrada com o nº 949/2018, sob a responsabilidade de **Patrícia Miralda Cazita e Kelly Gomes Santana**, apresentada pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 07.02.18.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 08-01-2018 Término: 08-01-2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo transgênico
Nº de animais	40
Peso/Idade	08 a 12 semanas
Sexo	machos
Origem	Divisão de Med. Molecular da Unv. de Columbia, NY, EUA

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 07 de Fevereiro de 2018

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGELLON, L. B. et al. ORGANIZATION OF THE HUMAN CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN GENE. **Biochemistry**, v. 29, n. 6, p. 1372-1376, Feb 1990. ISSN 0006-2960. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1990CN39400004 >.

_____. REDUCED HIGH-DENSITY-LIPOPROTEIN CHOLESTEROL IN HUMAN CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN TRANSGENIC MICE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 17, p. 10796-10801, Jun 1991. ISSN 0021-9258. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1991FQ77400017 >.

AGUSTI, A.; VOGELMEIER, C.; FANER, R. COPD 2020: changes and challenges. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 319, n. 5, p. L879-L883, Nov 2020. ISSN 1040-0605. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000595210900018 >.

ALVA, V.; LUPAS, A. N. The TULIP superfamily of eukaryotic lipid-binding proteins as a mediator of lipid sensing and transport. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 8, p. 913-923, Aug 2016. ISSN 1388-1981. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000385785500016 >.

ANDERSON, C. F.; MOSSER, D. M. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 72, n. 1, p. 101-106, Jul 2002. ISSN 0741-5400. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000176769100013 >.

BABIKER, A. et al. Elimination of cholesterol as cholestenoic acid in human lung by sterol 27-hydroxylase: evidence that most of this steroid in the circulation is of pulmonary origin. **Journal of Lipid Research**, v. 40, n. 8, p. 1417-1425, Aug 1999. ISSN 0022-2275. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000081865200005 >.

BALAKRISHNAN, A. et al. Bactericidal/permeability increasing protein: A multifaceted protein with functions beyond LPS neutralization. **Innate Immunity**, v. 19, n. 4, p. 339-347, Aug 2013. ISSN 1753-4259. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000321741900001 >.

BARTER, P. J. et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 21, p. 2109-2122, Nov 2007. ISSN 0028-4793. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000251076500003 >.

BATES, S. R. et al. Pulmonary abnormalities due to ABCA1 deficiency in mice. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 289, n.

6, p. L980-L989, Dec 2005. ISSN 1040-0605. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000233137900013 >.

BESNARD, V. et al. Deletion of Scap in Alveolar Type II Cells Influences Lung Lipid Homeostasis and Identifies a Compensatory Role for Pulmonary Lipofibroblasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 6, p. 4018-4030, Feb 2009. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000262872500070 >.

BHARAT, A. et al. Flow Cytometry Reveals Similarities Between Lung Macrophages in Humans and Mice. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 54, n. 1, p. 147-149, Jan 2016. ISSN 1044-1549. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000373705200016 >.

BINGLE, C. D.; CRAVEN, C. J. Meet the relatives: a family of BPI- and LBP-related proteins. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 2, p. 53-55, Feb 2004. ISSN 1471-4906. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000189086700001 >.

BIRRELL, M. A. et al. Novel role for the liver X nuclear receptor in the suppression of lung inflammatory responses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 44, p. 31882-31890, Nov 2007. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000250480300008 >.

BJORKERUD, S.; BJORKERUD, B. LIPOPROTEINS ARE MAJOR AND PRIMARY MITOGENS AND GROWTH PROMOTERS FOR HUMAN ARTERIAL SMOOTH-MUSCLE CELLS AND LUNG FIBROBLASTS IN-VITRO. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v. 14, n. 2, p. 288-298, Feb 1994. ISSN 1049-8834. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1994MV73500016 >.

BOSCO, M. C. et al. Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. **Immunobiology**, v. 213, n. 9-10, p. 733-749, 2008. ISSN 0171-2985. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000260388300006 >.

BOWMAN, L. et al. Randomized Evaluation of the Effects of Anacetrapib through Lipid-modification (REVEAL)-A large-scale, randomized, placebo-controlled trial of the clinical effects of anacetrapib among people with established vascular disease: Trial design, recruitment, and baseline characteristics. **American Heart Journal**, v. 187, p. 182-190, May 2017. ISSN 0002-8703. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000401053600020 >.

BRODEUR, M. R. et al. Dalcetrapib and anacetrapib differently impact HDL structure and function in rabbits and monkeys. **Journal of Lipid Research**, v. 58, n. 7, p. 1282-1291, Jul 2017. ISSN 0022-2275. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000404576500002 >.

BROUSSEAU, M. E. et al. Cholesteryl ester transfer protein TaqI B2B2 genotype is associated with higher HDL cholesterol levels and lower risk of coronary heart disease end points in men with HDL deficiency - Veterans Affairs HDL Cholesterol Intervention Trial. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 22, n. 7, p. 1148-1154, Jul 2002. ISSN 1079-5642. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000176978700019 >.

BROWN, M. L. et al. MOLECULAR-BASIS OF LIPID TRANSFER PROTEIN-DEFICIENCY IN A FAMILY WITH INCREASED HIGH-DENSITY LIPOPROTEINS. **Nature**, v. 342, n. 6248, p. 448-451, Nov 1989. ISSN 0028-0836. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1989CB42600074 >.

CAMPOS, L. E. M.; PEREIRA, L. F. F. Pulmonary eosinophilia. **Jornal Brasileiro De Pneumologia**, v. 35, n. 6, p. 561-573, Jun 2009. ISSN 1806-3713. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000269020100010 >.

CAPOBIANCO, A.; ROVERE-QUERINI, P. Encometriosis, a disease of the macrophage. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013 2013. ISSN 1664-3224. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000209374100009 >.

CASQUERO, A. C. et al. Atherosclerosis is enhanced by testosterone deficiency and attenuated by CETP expression in transgenic mice. **Journal of Lipid Research**, v. 47, n. 7, p. 1526-1534, Jul 2006. ISSN 0022-2275.

CAZITA, P. M. et al. HUMAN CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN EXPRESSION ENHANCES THE MOUSE SURVIVAL RATE IN AN EXPERIMENTAL SYSTEMIC INFLAMMATION MODEL: A NOVEL ROLE FOR CETP. **Shock**, v. 30, n. 5, p. 590-595, Nov 2008. ISSN 1073-2322. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000260146800017 >.

_____. Cholesteryl ester transfer protein expression attenuates atherosclerosis in ovariectomized mice. **Journal of Lipid Research**, v. 44, n. 1, p. 33-40, Jan 2003. ISSN 0022-2275. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000180478500004 >.

CHEUNG, M. C.; WOLFBAUER, G.; ALBERS, J. J. Plasma phospholipid mass transfer rate: Relationship to plasma phospholipid and cholesteryl ester transfer activities and lipid parameters. **Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1303, n. 2, p. 103-110, Sep 1996. ISSN 0005-2760. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1996VK39800003 >.

COLLET, X. et al. Remodeling of HDL by CETP in vivo and by CETP and hepatic lipase in vitro results in enhanced uptake of HDL CE by cells expressing scavenger receptor B-I. **Journal of Lipid Research**, v. 40, n. 7, p. 1185-1193, Jul 1999. ISSN 0022-2275. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000081198900002 >.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: The master regulator of immunity to infection. **Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 5771-5777, May 2008. ISSN 0022-1767. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000257507000005 >.

CRAIG, W. Y.; PALOMAKI, G. E.; HADDOW, J. E. CIGARETTE-SMOKING AND SERUM-LIPID AND LIPOPROTEIN CONCENTRATIONS - AN ANALYSIS OF PUBLISHED DATA. **Bmj-British Medical Journal**, v. 298, n. 6676, p. 784-788, Mar 1989. ISSN 1756-1833. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1989T847900019 >.

CRISAFULLI, C. et al. Effects of Liver x receptor agonist treatment on signal transduction pathways in acute lung inflammation. **Respiratory Research**, v. 11, p. 15, Feb 2010. ISSN 1465-993X. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000275506100001 >.

CROWELL, R. E. et al. ALVEOLAR AND INTERSTITIAL MACROPHAGE POPULATIONS IN THE MURINE LUNG. **Experimental Lung Research**, v. 18, n. 4, p. 435-446, Jul-Aug 1992. ISSN 0190-2148. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1992JE76700001 >.

DAFFU, G. et al. RAGE Suppresses ABCG1-Mediated Macrophage Cholesterol Efflux in Diabetes. **Diabetes**, v. 64, n. 12, p. 4046-4060, Dec 2015. ISSN 0012-1797. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000365932900012 >.

DAVIS, B. B. et al. Simvastatin inhibits smoke-induced airway epithelial injury: implications for COPD therapy. **European Respiratory Journal**, v. 42, n. 2, p. 350-361, Aug 2013. ISSN 0903-1936. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000323586100009 >.

DAVIS, M. J. et al. Macrophage M1/M2 Polarization Dynamically Adapts to Changes in Cytokine Microenvironments in *Cryptococcus neoformans* Infection. **Mbio**, v. 4, n. 3, p. 10, May-Jun 2013. ISSN 2150-7511. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000321187400026 >.

DE HAAN, W. et al. Torcetrapib does not reduce atherosclerosis beyond atorvastatin and induces more proinflammatory lesions than atorvastatin. **Circulation**, v. 117, n. 19, p. 2515-2522, May 2008. ISSN 0009-7322. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000255776700013 >.

DIXON, L. J. et al. Kupffer Cells in the Liver. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 2, p. 785-797, Apr 2013. ISSN 2040-4603. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000319906100007 >.

DOGGRELL, S. No cardiovascular benefit with evacetrapib - is this the end of the road for the 'cetrapibs'? **Expert Opin Pharmacother**, 2017. Available at: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=No+cardiovascular+benefit+with+evacetrapib+-+is+this+the+end+of+the+road+for+the+%27cetrapibs%27> >.

DOYLE, S. E. et al. Toll-like receptor 3 mediates a more potent antiviral response than toll-like receptor 4. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 7, p. 3565-3571, Apr 2003. ISSN 0022-1767. Available at: <<Go to ISI>://WOS:000181754100015 >.

DRAYNA, D. et al. CLONING AND SEQUENCING OF HUMAN CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN CDNA. **Nature**, v. 327, n. 6123, p. 632-634, Jun 1987. ISSN 0028-0836. Available at: <<Go to ISI>://WOS:A1987H783500091 >.

DULUC, D. et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4319-4330, Dec 2007. ISSN 0006-4971. Available at: <<Go to ISI>://WOS:000252001200037 >.

DUSUEL, A. et al. **Human CETP lacks lipopolysaccharide transfer activity, but worsens inflammation and sepsis outcomes in mice.** J Lipid Res. 2020.

EAPEN, M. S. et al. Abnormal M1/M2 macrophage phenotype profiles in the small airway wall and lumen in smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Scientific Reports**, v. 7, p. 12, Oct 2017. ISSN 2045-2322. Available at: <<Go to ISI>://WOS:000413084800089 >.

EDWARDS, J. P. et al. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 6, p. 1298-1307, Dec 2006. ISSN 0741-5400. Available at: <<Go to ISI>://WOS:000242484100014 >.

EIDELMAN, D. et al. CELLULARITY OF THE ALVEOLAR WALLS IN SMOKERS AND ITS RELATION TO ALVEOLAR DESTRUCTION - FUNCTIONAL IMPLICATIONS. **American Review of Respiratory Disease**, v. 141, n. 6, p. 1547-1552, Jun 1990. ISSN 0003-0805. Available at: <<Go to ISI>://WOS:A1990DH87900032 >.

ERNST, P. et al. The Risk of Sepsis with Inhaled and Oral Corticosteroids in Patients with COPD. **Copd-Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v. 14, n. 2, p. 137-142, 2017 2017. ISSN 1541-2555. Available at: <<Go to ISI>://WOS:000398033800001 >.

EYVAZIAN, V. A.; FRISHMAN, W. H. Evacetrapib Another CETP Inhibitor for Dyslipidemia With No Clinical Benefit. **Cardiology in Review**, v. 25, n. 2, p. 43-52, Mar-Apr 2017. ISSN 1061-5377. Available at: <<Go to ISI>://WOS:000397408100001 >.

FENG, Y. H.; MAO, H. Expression and preliminary functional analysis of Siglec-F on mouse macrophages. **Journal of Zhejiang University-Science B**, v. 13, n. 5, p. 386-394, May 2012. ISSN 1673-1581. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000303477200008 >.

FOGER, B. et al. Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 52, p. 36912-36920, Dec 1999. ISSN 0021-9258.

FRANCONE, O. L.; ROYER, L.; HAGHPASSAND, M. Increased pre beta-HDL levels, cholesterol efflux, and LCAT-mediated esterification in mice expressing the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and human apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenes. **Journal of Lipid Research**, v. 37, n. 6, p. 1268-1277, Jun 1996. ISSN 0022-2275. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1996UU47600011 >.

FUNES, S. C. et al. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. **Immunology**, v. 154, n. 2, p. 186-195, Jun 2018. ISSN 0019-2805. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000439790700004 >.

FURUHASHI, M. et al. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 959-U2, Jun 21 2007. ISSN 0028-0836. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000247373100038 >.

GEVENOIS, P. A. et al. Comparison of computed density and microscopic morphometry in pulmonary emphysema. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 154, n. 1, p. 187-192, Jul 1996. ISSN 1073-449X. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1996UW82700032 >.

GHARIB, S. A.; MANICONE, A. M.; PARKS, W. C. Matrix metalloproteinases in emphysema. **Matrix Biology**, v. 73, p. 34-51, Nov 2018. ISSN 0945-053X. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000449242700004 >.

GINHOUX, F.; GUILLIAMS, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 439-449, Mar 2016. ISSN 1074-7613. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000372784200001 >.

GNATIUC, L.; CARAMORI, G. COPD in nonsmokers: the biomass hypothesis - to be or not to be? **European Respiratory Journal**, v. 44, n. 1, p. 8-10, Jul 2014. ISSN 0903-1936. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000338906700003 >.

GONG, H. B. A. et al. Activation of the Liver X Receptor Prevents Lipopolysaccharide-induced Lung Injury. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 44, p. 30113-30121, Oct 2009. ISSN 0021-9258. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000271090000014 >.

GORDON, D. J. et al. HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN CHOLESTEROL AND CARDIOVASCULAR-DISEASE - 4 PROSPECTIVE AMERICAN-STUDIES. **Circulation**, v. 79, n. 1, p. 8-15, Jan 1989. ISSN 0009-7322. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1989R718300002 >.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 12, p. 953-964, Dec 2005. ISSN 1474-1733. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000233774600012 >.

HA, Y. C.; BARTER, P. J. DIFFERENCES IN PLASMA CHOLESTERYL ESTER TRANSFER ACTIVITY IN 16 VERTEBRATE SPECIES. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 71, n. 2, p. 265-269, 1982. ISSN 0305-0491.

HARDARDOTTIR, I. et al. Endotoxin and cytokines decrease serum levels and extra hepatic protein and mRNA levels of cholesteryl ester transfer protein in Syrian hamsters. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 11, p. 2585-2592, Jun 1996. ISSN 0021-9738. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1996UQ23800024 >.

HASHIMOTO, S.; MORTON, R. E.; ZILVERSMIT, D. B. FACILITATED TRANSFER OF CHOLESTERYL ESTER BETWEEN ROUGH AND SMOOTH MICROSOMAL-MEMBRANES BY PLASMA-LIPID TRANSFER PROTEIN. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 120, n. 2, p. 586-592, 1984 1984. ISSN 0006-291X. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1984SQ70400041 >.

HASS, M. A.; LONGMORE, W. J. REGULATION OF LUNG SURFACTANT CHOLESTEROL-METABOLISM BY SERUM-LIPOPROTEINS. **Lipids**, v. 15, n. 6, p. 401-406, 1980. ISSN 0024-4201. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1980JX05500003 >.

HAVEL, R. J.; EDER, H. A.; BRAGDON, J. H. DISTRIBUTION AND CHEMICAL COMPOSITION OF ULTRACENTRIFUGALLY SEPARATED LIPOPROTEINS IN HUMAN SERUM. **Journal of Clinical Investigation**, v. 34, n. 9, p. 1345-1353, 1955. ISSN 0021-9738.

HAYEK, T. et al. DECREASED EARLY ATHEROSCLEROTIC LESIONS IN HYPERTRIGLYCERIDEMIC MICE EXPRESSING CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN TRANSGENE. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 4, p. 2071-2074, Oct 1995. ISSN 0021-9738.

HE, S. et al. Characteristics and potential role of M2 macrophages in COPD. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v. 12, p. 3029-3039, 2017. ISSN 1178-2005. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000413137800001 >.

HENAO AGUDELO, J. **Mesenchymal Stromal Cell-Derived Microvesicles**

Regulate an Internal Pro-Inflammatory Program in Activated Macrophages. NOS., B. T. M. M. R.-S. A. M. S. M. A.-C. R.-S. A. A. D. Front

Immunol.: eCollection 2017.

HONZUMI, S. et al. LXR alpha regulates human CETP expression in vitro and in transgenic mice. **Atherosclerosis**, v. 212, n. 1, p. 139-145, Sep 2010. ISSN 0021-9150. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000281459900022 >.

HOPPSTADTER, J. et al. Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 activation in human alveolar and lung interstitial macrophages. **Respiratory Research**, v. 11, Sep 2010. ISSN 1465-993X. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000282553600001 >.

HOUGHTON, A. M. et al. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 3, p. 753-759, Mar 2006. ISSN 0021-9738. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000235854300026 >.

IYER, S. S.; GHAFFARI, A. A.; CHENG, G. Lipopolysaccharide-Mediated IL-10 Transcriptional Regulation Requires Sequential Induction of Type I IFNs and IL-27 in Macrophages. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 11, p. 6599-6607, Dec 2010. ISSN 0022-1767. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000284311500025 >.

JIA, J. et al. Cholesterol metabolism promotes B-cell positioning during immune pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **Embo Molecular Medicine**, v. 10, n. 5, p. 17, May 2018. ISSN 1757-4676. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000431632400008 >.

JIANG, X. C. et al. DIETARY-CHOLESTEROL INCREASES TRANSCRIPTION OF THE HUMAN CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN GENE IN TRANSGENIC MICE - DEPENDENCE ON NATURAL FLANKING SEQUENCES. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 4, p. 1290-1295, Oct 1992. ISSN 0021-9738. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1992JU68100017 >.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, n. 5, p. 816-825, May 2006. ISSN 1350-9047. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000236938300014 >.

KIKUCHI, T. et al. Increase of 27-Hydroxycholesterol in the Airways of Patients With COPD. **Chest**, v. 142, n. 2, p. 329-337, Aug 2012. ISSN 0012-3692. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000307418200014 >.

KIM, C. et al. Attenuation of Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice by Apolipoprotein A-1 Overexpression. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 54, n. 1, p. 91-102, Jan 2016. ISSN 1044-1549. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000373705200011 >.

KOLLECK, I. et al. HDL is the major source of vitamin E for type II pneumocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 7-8, p. 882-890, Oct 1999. ISSN 0891-5849. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000082856700018 >.

KOPF, M.; SCHNEIDER, C.; NOBS, S. P. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. **Nature Immunology**, v. 16, n. 1, p. 36-44, Jan 2015. ISSN 1529-2908. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000346494200007 >.

KORF, H. et al. Liver X receptors contribute to the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1626-1637, Jun 2009. ISSN 0021-9738. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000266601000027 >.

LEANCA, C. C. et al. HDL: the yin-yang of cardiovascular disease. **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia**, v. 54, n. 9, p. 777-784, Dec 2010. ISSN 0004-2730. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000286868900002 >.

LEHNERT, B. E. PULMONARY AND THORACIC MACROPHAGE SUBPOPULATIONS AND CLEARANCE OF PARTICLES FROM THE LUNG. **Environmental Health Perspectives**, v. 97, p. 17-46, Jul 1992. ISSN 0091-6765. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1992JL41100004 >.

LI, H. et al. High apolipoprotein M serum levels correlate with chronic obstructive pulmonary disease. **Lipids in Health and Disease**, v. 15, p. 7, Mar 2016. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000372580100001 >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000173949500003 >.

MA, L. et al. ABCA1 Protein Enhances Toll-like Receptor 4 (TLR4)-stimulated Interleukin-10 (IL-10) Secretion through Protein Kinase A (PKA) Activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 48, p. 40502-40512, Nov 2012. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000311448800041 >.

MACHADO, R. M. et al. Intake of trans Fatty Acids Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Reduces Adipose Tissue Fat Content. **Journal of Nutrition**, v. 140, n. 6, p. 1127-1132, Jun 2010. ISSN 0022-3166. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000277800700011 >.

MARCEL, Y. L. et al. DISTRIBUTION AND CONCENTRATION OF CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN IN PLASMA OF NORMOLIPEMIC SUBJECTS. **Journal of Clinical Investigation**, v. 85, n. 1, p. 10-17, Jan 1990. ISSN 0021-9738. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1990CH52200003 >.

MAROTTI, K. R. et al. SEVERE ATHEROSCLEROSIS IN TRANSGENIC MICE EXPRESSING SIMIAN CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN. **Nature**, v. 364, n. 6432, p. 73-75, Jul 1993. ISSN 0028-0836. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1993LK81800061 >.

MARTINEZ, F. O. et al. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: New molecules and patterns of gene expression. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 10, p. 7303-7311, Nov 2006. ISSN 0022-1767. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000242009700084 >.

_____. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 13, p. 453-461, Jan 2008. ISSN 1093-9946. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000255775700036 >.

MASUCCIMAGOULAS, L. et al. DECREASED CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN (CETP) MESSENGER-RNA AND PROTEIN AND INCREASED HIGH-DENSITY-LIPOPROTEIN FOLLOWING LIPOPOLYSACCHARIDE ADMINISTRATION IN HUMAN CETP TRANSGENIC MICE. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 4, p. 1587-1594, Apr 1995. ISSN 0021-9738. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1995QQ59600023 >.

MCPHERSON, R. et al. PLASMA-CONCENTRATIONS OF CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN IN HYPERLIPOPROTEINEMIA - RELATION TO CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN-ACTIVITY AND OTHER LIPOPROTEIN VARIABLES. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v. 11, n. 4, p. 797-804, Jul-Aug 1991. ISSN 1049-8834.

MERCK, S. D. **CETP inhibitors (anacetrapib) meets primary end point in CV disease (REVEAL)**: Physician's Academy for Cardiovascular Education 2017.

MISHARIN, A. V. et al. Flow Cytometric Analysis of Macrophages and Dendritic Cell Subsets in the Mouse Lung. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 49, n. 4, p. 503-510, Oct 2013. ISSN 1044-1549. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000325351700001 >.

MJOS, O. D. LIPID EFFECTS OF SMOKING. **American Heart Journal**, v. 115, n. 1, p. 272-275, Jan 1988. ISSN 0002-8703. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1988L747500008 >.

MORIYAMA, Y. et al. A low prevalence of coronary heart disease among subjects with increased high-density lipoprotein cholesterol levels, including those with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency. **Preventive Medicine**, v. 27, n. 5, p. 659-667, Sep-Oct 1998. ISSN 0091-7435. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000076369000003 >.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958-969, Dec 2008. ISSN 1474-1733. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000261197200015 >.

MROZ, R. M. et al. ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF ATORVASTATIN TREATMENT IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE. A CONTROLLED PILOT STUDY. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 111-128, Feb 2015. ISSN 0867-5910. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000350616600012 >.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723-737, Nov 2011. ISSN 1474-1733. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000296584700011 >.

OKADA, T. O., T. et al. **Shotgun proteomic analysis reveals proteome alterations in HDL of patients with cholesteryl ester transfer protein deficiency**. *J Clin Lipidol*: 317-325 p. 2019.

OLIVEIRA, H. C. F. et al. Human Cholesteryl ester transfer protein gene proximal promoter contains dietary cholesterol positive responsive elements and mediates expression in small intestine and periphery while predominant liver and spleen expression is controlled by 5'-distal sequences - CIS-acting sequences mapped in transgenic mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 50, p. 31831-31838, Dec 1996. ISSN 0021-9258. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1996VY34000016 >.

OLIVEIRA, H. C. F.; DE FARIA, E. C. Cholesteryl Ester Transfer Protein: The Controversial Relation to Atherosclerosis and Emerging New Biological Roles. **Iubmb Life**, v. 63, n. 4, p. 248-257, Apr 2011. ISSN 1521-6543. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000289719000004 >.

OLIVEIRA, H. C. F. et al. Cholesteryl ester transfer protein activity enhances plasma cholesteryl ester formation - Studies in CETP transgenic mice and human genetic CETP deficiency. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 17, n. 6, p. 1045-1052, Jun 1997. ISSN 1079-5642. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1997XF78100006 >.

PAPE, M. E. et al. MOLECULAR-CLONING, SEQUENCE, AND EXPRESSION OF CYNOMOLGUS MONKEY CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN - INVERSE CORRELATION BETWEEN HEPATIC CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN MESSENGER-RNA LEVELS AND PLASMA HIGH-DENSITY-LIPOPROTEIN LEVELS. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v. 11, n. 6, p. 1759-1771, Nov-Dec 1991. ISSN 1049-8834. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1991GQ63000016 >.

_____. EVIDENCE THAT THE NONPARENCHYMAL CELLS OF THE LIVER ARE THE PRINCIPAL SOURCE OF CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN IN PRIMATES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 20, p. 12829-12831, Jul 1991. ISSN 0021-9258. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1991FX13200006 >.

PIAN, M. S.; DOBBS, L. G. Lipoprotein-stimulated surfactant secretion in alveolar type II cells: Mediation by heterotrimeric G proteins. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 273, n. 3, p. L634-L639, Sep 1997. ISSN 1040-0605. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1997XU86300018 >.

PINTO, P. R. et al. Aerobic exercise training enhances the in vivo cholesterol trafficking from macrophages to the liver independently of changes in the expression of genes involved in lipid flux in macrophages and aorta. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, p. 12, Sep 2015. ISSN 1476-511X. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000361286200001 >.

PLUMP, A. S. et al. Increased atherosclerosis in apoE and LDL receptor gene knock-out mice as a result of human cholesteryl ester transfer protein transgene expression. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 19, n. 4, p. 1105-1110, Apr 1999. ISSN 1079-5642.

QUINTAO, E. C. R. The controversy over the use of cholesteryl ester transfer protein inhibitors: is there some light at the end of the tunnel? **European Journal of Clinical**

Investigation, v. 46, n. 6, p. 581-589, Jun 2016. ISSN 0014-2972. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000379669300010 >.

RABE, K. F.; WATZ, H. Chronic obstructive pulmonary disease. **Lancet**, v. 389, n. 10082, p. 1931-1940, May 2017. ISSN 0140-6736. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000400973500029 >.

RADER, D. J.; DEGOMA, E. M. Future of Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibitors. In: CASKEY, C. T. (Ed.). **Annual Review of Medicine, Vol 65**. Palo Alto: Annual Reviews, v.65, 2014. p.385-403. (Annual Review of Medicine). ISBN 978-0-8243-0565-9.

RONCHI, J. A. et al. A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 63, p. 446-456, Oct 2013. ISSN 0891-5849. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000323094700045 >.

RUOTOLO, G. et al. Impact of the Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibitor Evacetrapib on Cholesterol Efflux Capacity in High Risk Patients Within the ACCELERATE Trial. **Circulation**, v. 134, Nov 11 2016. ISSN 0009-7322. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000396816608052 >.

RUSSELL, R. E. K. et al. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 4, p. L867-L873, Oct 2002. ISSN 1040-0605. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000177954500025 >.

SALERNO, A. G. et al. Lack of mitochondrial NADP(H)-transhydrogenase expression in macrophages exacerbates atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. **Biochemical Journal**, v. 476, p. 3769-3789, Dec 2019. ISSN 0264-6021. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000509881200006 >.

SHAYKHIEV, R. et al. Smoking-Dependent Reprogramming of Alveolar Macrophage Polarization: Implication for Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Journal of Immunology**, v. 183, n. 4, p. 2867-2883, Aug 2009. ISSN 0022-1767. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000268906500076 >.

SHIMANO, H.; SATO, R. SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology - divergent pathophysiology. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 12, p. 710-730, Dec 2017. ISSN 1759-5029. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000414767300016 >.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 3, p. 787-795, Mar 2012. ISSN 0021-9738. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000301021500002 >.

SILVA, B. S. A. et al. Severity of COPD and its relationship with IL-10. **Cytokine**, v. 106, p. 95-100, Jun 2018. ISSN 1043-4666. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000431937300013 >.

SIN, D. D.; MAN, S. F. P. Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiovascular diseases? The potential role of systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. **Circulation**, v. 107, n. 11, p. 1514-1519, Mar 25 2003. ISSN 0009-7322. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000181764600013 >.

SIRTORI, C. R. Investigational CETP antagonists for hyperlipidemia and atherosclerosis prevention. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 20, n. 11, p. 1543-1554, Nov 2011. ISSN 1354-3784. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000295718200007 >.

SMOAK, K. et al. Effects of liver X receptor agonist treatment on pulmonary inflammation and host defense. **Journal of Immunology**, v. 180, n. 5, p. 3305-3312, Mar 2008. ISSN 0022-1767. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000256730000070 >.

SPANN, N. J.; GLASS, C. K. Sterols and oxysterols in immune cell function. **Nature Immunology**, v. 14, n. 9, p. 893-900, Sep 2013. ISSN 1529-2908. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000323377700006 >.

STEIN, O.; STEIN, Y. Lipid transfer proteins (LTP) and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 178, n. 2, p. 217-230, Feb 2005. ISSN 0021-9150.

STOUT, R. D. et al. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 1, p. 342-349, Jul 2005. ISSN 0022-1767. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000230050900045 >.

SUN, H. F.; FENG, J. G.; TANG, L. L. Function of TREM1 and TREM2 in Liver-Related Diseases. **Cells**, v. 9, n. 12, p. 17, Dec 2020. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000601890400001 >.

SUS, D. D. I. D. Bronquite crônica causa 40 mil mortes a cada ano, revela dados do DATASUS. DATASUS, 2014. Available at: < <http://datasus1.saude.gov.br/noticias/atualizacoes?start=150> >. Accessed on: 18 de março de 2021.

TALL, A. et al. ACCELERATED TRANSFER OF CHOLESTERYL ESTERS IN DYSLIPIDEMIC PLASMA - ROLE OF CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN. **Journal of Clinical Investigation**, v. 79, n. 4, p. 1217-1225, Apr 1987. ISSN 0021-9738. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1987G605300028 >.

TAN, S. Y. S.; KRASNOW, M. A. Developmental origin of lung macrophage diversity. **Development**, v. 143, n. 8, p. 1318-1327, Apr 2016. ISSN 0950-1991. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000385261300010 >.

THEODORO, O. A. et al. A Plant Proteinase Inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* Attenuates Pulmonary Mechanics, Inflammation and Remodeling Induced by Elastase in Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, Feb 2017. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000395457700171 >.

TRINDER, M. et al. Cholesteryl Ester Transfer Protein Influences High-Density Lipoprotein Levels and Survival in Sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 199, n. 7, p. 854-862, Apr 2019. ISSN 1073-449X. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000463002100013 >.

_____. **Inhibition of Cholesteryl Ester Transfer Protein Preserves High-Density Lipoprotein Cholesterol and Improves Survival in Sepsis.** *Circulation* 2020.

VAN ECK, M. et al. Important role for bone marrow-derived cholesteryl ester transfer protein in lipoprotein cholesterol redistribution and atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice. **Circulation Research**, v. 100, n. 5, p. 678-685, Mar 2007. ISSN 0009-7330.

VASSILIOU, G.; MCPHERSON, R. Role of cholesteryl ester transfer protein in selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by adipocytes. **Journal of Lipid Research**, v. 45, n. 9, p. 1683-1693, Sep 2004. ISSN 0022-2275. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000223923500012 >.

VENANCIO, T. M. et al. CETP Lowers TLR4 Expression Which Attenuates the Inflammatory Response Induced by LPS and Polymicrobial Sepsis. **Mediators of Inflammation**, p. 12, 2016. ISSN 0962-9351. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000376326600001 >.

VESTBO, J. et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease GOLD Executive Summary. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 187, n. 4, p. 347-365, Feb 2013. ISSN 1073-449X. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000315075800006 >.

VLAHOVIC, G. et al. Cellular and connective tissue changes in alveolar septal walls in emphysema. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 160, n. 6, p. 2086-2092, Dec 1999. ISSN 1073-449X. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000084248000047 >.

VOCKEROTH, D. et al. Role of cholesterol in the biophysical dysfunction of surfactant in ventilator-induced lung injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 298, n. 1, p. L117-L125, Jan 2010. ISSN 1040-0605. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000272827900014 >.

VOGELMEIER, C. F. et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report GOLD Executive Summary. **Respirology**, v. 22, n. 3, p. 575-601, Apr 2017. ISSN 1323-7799. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000397947200023 >.

WANG, Y. et al. Plasma Cholesteryl Ester Transfer Protein Is Predominantly Derived From Kupffer Cells. **Hepatology**, v. 62, n. 6, p. 1710-1722, Dec 2015. ISSN 0270-9139. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000367013200043 >.

WANG, Y. Y. et al. LIVER X RECEPTOR AGONIST GW3965 DOSE-DEPENDENTLY REGULATES LPS-MEDIATED LIVER INJURY AND MODULATES POSTTRANSCRIPTIONAL TNF-alpha PRODUCTION AND P38 MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE ACTIVATION IN LIVER MACROPHAGES. **Shock**, v. 32, n. 5, p. 548-553, Nov 2009. ISSN 1073-2322. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000271409700015 >.

WRIGHT, J. L.; CHURG, A. SMOKE-INDUCED EMPHYSEMA IN GUINEA-PIGS IS ASSOCIATED WITH MORPHOMETRIC EVIDENCE OF COLLAGEN BREAKDOWN AND REPAIR. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 268, n. 1, p. L17-L20, Jan 1995. ISSN 1040-0605. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1995QB29200004 >.

WRIGHT, J. L.; COSIO, M.; CHURG, A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 295, n. 1, p. L1-L15, Jul 2008. ISSN 1040-0605. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000257335900001 >.

WU, J. et al. The Proinflammatory Myeloid Cell Receptor TREM-1 Controls Kupffer Cell Activation and Development of Hepatocellular Carcinoma. **Cancer Research**, v. 72, n. 16, p. 3977-3986, Aug 2012. ISSN 0008-5472. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000307881100011 >.

YASUDA, T. et al. Tissue-Specific Liver X Receptor Activation Promotes Macrophage Reverse Cholesterol Transport In Vivo. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 30, n. 4, p. 781-U313, Apr 2010. ISSN 1079-5642. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000275712500023 >.

YOKOYAMA, S.; OKUMURA-NOJI, K.; LU, R. Prevention of fatal hepatic complication in schistosomiasis by inhibition of CETP. **Journal of Biomedical Research**, v. 29, n. 3, p. 176-188, 2015. ISSN 1674-8301. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000359971000002 >.

YU, Y. R. A. et al. Flow Cytometric Analysis of Myeloid Cells in Human Blood, Bronchoalveolar Lavage, and Lung Tissues. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 54, n. 1, p. 13-24, Jan 2016. ISSN 1044-1549. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000373705200003 >.

YUAN, H. W.; SHYY, J. Y. J.; MARTINS-GREEN, M. Second-hand smoke stimulates lipid accumulation in the liver by modulating AMPK and SREBP-1. **Journal of Hepatology**, v. 51, n. 3, p. 535-547, Sep 2009. ISSN 0168-8278. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000269735300016 >.

YVAN-CHARVET, L. et al. Cholesterol Efflux Potential and Antiinflammatory Properties of High-Density Lipoprotein After Treatment With Niacin or Anacetrapib. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 30, n. 7, p. 1430-U405, Jul 2010. ISSN 1079-5642. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000278856600021 >.

ZAFIROVA-IVANOVSKA, B. et al. **The Level of Cholesterol in COPD Patients with Severe and Very Severe Stage of the Disease**: Open Access Maced J Med Sci 2016.

ZAYNAGETDINOV, R. et al. Identification of Myeloid Cell Subsets in Murine Lungs Using Flow Cytometry. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 49, n. 2, p. 180-189, Aug 2013. ISSN 1044-1549. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000322618300002 >.

ZHANG, W. et al. Lipopolysaccharide mediates time-dependent macrophage M1/M2 polarization through the Tim-3/Galectin-9 signalling pathway. **Experimental Cell Research**, v. 376, n. 2, p. 124-132, Mar 2019. ISSN 0014-4827. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000460714000003 >.

ZHONG, S. B. et al. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 12, p. 2917-2923, Jun 1996. ISSN 0021-9738. Available at: < <Go to ISI>://WOS:A1996UT42900033 >.