Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Camila Oliveira da Silva Meira

Equilíbrio HAT/HDAC, encurtamento telomérico e o papel dos monócitos do sangue periférico na geração de macrófagos M1 e M2 nos diferentes fenótipos e gravidade da DPOC

Rio de Janeiro
2023

Camila Oliveira da Silva Meira

Equilíbrio HAT/HDAC, encurtamento telomérico e o papel dos monócitos do sangue periférico na geração de macrófagos M1 e M2 nos diferentes fenótipos e gravidade da DPOC

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M514 Meira, Camila Oliveira da Silva.
Equilíbrio HAT/HDAC, encurtamento telomérico e o papel dos monócitos do sangue periférico na geração de macrófagos M1 e M2 nos diferentes fenótipos e gravidade da DPOC / Camila Oliveira da Silva Meira. – 2023.
115 f.

Orientador: Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto
Coorientadora: Dra. Jeane de Souza Nogueira

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Doença pulmonar obstrutiva crônica. 2. Monócitos - Teses. 3. Macrófagos - Teses. 4. Encurtamento do telômero. I. Pôrto, Luís Cristóvão de Moraes Sobrino. II. Nogueira, Jeane de Souza. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.24

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

_____ _____
Assinatura Data

Camila Oliveira da Silva Meira

Equilíbrio HAT/HDAC, encurtamento telomérico e o papel dos monócitos do sangue periférico na geração de macrófagos M1 e M2 nos diferentes fenótipos e gravidade da DPOC

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia humana e experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 02 de fevereiro de 2023.

Banca examinadora:

_____

Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Dra. Jeane de Souza Nogueira (Coorientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof. Dr. Thiago Prudente Bártholo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof.ª Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins

Fundação Oswaldo Cruz

_____

Prof.ª Dra. Tatiana Victoni

Universidade de Lyon

Rio de Janeiro

2023

DEDICATÓRIA

A minha família, por todo apoio concedido.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu amigo de todas as horas e um pai sempre presente, ajudando nas minhas escolhas e me ensinando o caminho por onde seguir.

Ao Prof. Dr. Luís Cristóvão Pôrto por ter aberto as portas do laboratório para meu crescimento profissional e pessoal.

À Dra. Jeane de Souza Nogueira pela orientação e ensinamento que me fizeram crescer profissionalmente. Sou grata por todo incentivo.

À professora Tatiana Victoni que me orientou durante a graduação e mestrado, e me apresentou ao projeto possibilitando a continuação durante o doutorado.

Às professoras Andréa Monte Alto Costa e Bruna Romana de Souza pela oportunidade oferecida e pelos conhecimentos transmitidos.

À Dra. Claudia Henrique Costa e ao Dr. Thiago Bártholo pelas colaborações para o desenvolvimento deste trabalho.

As professoras Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins, Tatiana Victoni, Jeane de Souza Nogueira e ao professor Thiago Prudente Bártholo, por terem aceitado o convite em avaliar este trabalho e pela disponibilidade para formação da banca examinadora.

A toda equipe técnica do Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação (HLA-UERJ) e o Laboratório de Reparo Tecidual (LRT) pelo apoio.

Ao meu esposo Wanderson Meira, por ser meu companheiro e incentivador. Os dias ao seu lado são mais leves.

A minha mãe Cleuza Maria de Oliveira pelo apoio e incentivo profissional. Obrigada pelo seu amor e por ser a minha base.

Ao meu irmão Jorge Leandro de Oliveira, que nunca mediu esforços para me ajudar e sempre demonstrou sua satisfação em me ver crescer profissionalmente.

A todos os pacientes e voluntários que se propuseram a participarem da pesquisa.

Aos meus amigos e a todos que de maneira direta e indireta ajudaram nessa etapa da minha vida.

O Senhor nos concederá a felicidade, e a nossa terra produzirá farta colheita.

Salmos 85:12

RESUMO

MEIRA, Camila Oliveira da Silva. **Equilíbrio HAT/HDAC, encurtamento telomérico e o papel dos monócitos do sangue periférico na geração de macrófagos M1 e M2 nos diferentes fenótipos e gravidade da DPOC.** 2023. 115f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma patologia heterogênea em sua apresentação clínica. Três principais fenótipos são propostos: misto DPOC-asma, exacerbador e enfisema; assim como diferentes graus da doença: leve, moderado, grave e muito grave. Apesar de muitos tipos celulares contribuírem na fisiopatologia da doença, os macrófagos são os que possuem maior atuação no quadro inflamatório da DPOC. A base molecular da amplificação da inflamação na DPOC ainda não foi completamente elucidada, o balanço das histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs) têm sido reportados como elementos influentes na transcrição de genes pró-inflamatórios. Além disso, a DPOC tem sido uma doença relacionada ao envelhecimento. A resposta inflamatória e a senescência celular são eventos críticos em sua patogênese. O objetivo deste estudo foi investigar a expressão de HATs e HDACs, o comprimento dos telômeros, o perfil dos monócitos e o seu potencial de diferenciação para macrófagos do tipo M1 e M2 nos diferentes fenótipos clínicos e gravidade da doença. Contribuíram para esta pesquisa, 105 voluntários com DPOC atendidos no ambulatório de Pneumologia da Policlínica Universitária Piquet Carneiro, 42 voluntários fumantes e 73 voluntários controles não fumantes. A avaliação da expressão de HAT e HDAC e a análise relativa do comprimento telomérico de células do sangue periférico foram realizadas por PCR em tempo real. A caracterização do perfil de monócitos clássicos, intermediários e não clássico do sangue periférico, e do perfil M1 e M2 de monócitos diferenciados foram realizadas por citometria de fluxo. A diferenciação de monócitos foi induzida, por cinco dias, em quatro condições distintas de cultura: M1 (GM-CSF ou GM-CSF + LPS) e M2 (M-CSF ou M-CSF + IL-4). Identificamos uma redução de HDAC2 nos pacientes DPOC leve, moderados e grave, além de, uma redução significativa na expressão de HDAC3 nos pacientes DPOC moderados e graves, um aumento na expressão de HDAC4 nos DPOC leve e uma redução na expressão de EP300 (HAT) em DPOC graves. Em relação aos fenótipos, houve uma redução significativa na expressão de HDAC2 nos classificados como enfisema e exacerbador e uma redução de HDAC3 apenas no fenótipo enfisema. Surpreendentemente, o encurtamento telomérico foi constatado em voluntários fumantes, pacientes misto DPOC-asma, exacerbador e enfisema, assim como nas classificações de todos os graus da doença. Também encontramos um aumento de monócitos intermediários nos pacientes com DPOC leve, moderada, grave e muito grave. O fenótipo exacerbador apresentou um aumento de monócitos intermediários e não clássicos. Em relação aos perfis de células diferenciadas, os pacientes com DPOC demonstraram um predomínio dos marcadores CD163 e CD206, relativos ao subtipo M2. Nossos dados sugerem que os pacientes com DPOC apresentam alterações genéticas, com assinaturas diferenciadas nos fenótipos e estágios de gravidade, assim como alterações nos perfis celulares, determinantes na qualidade da resposta imunológica e importantes para futuros tratamentos e terapias personalizadas.

Palavras-chave: DPOC; histonas; telômero; monócito; macrófago.

ABSTRACT

MEIRA, Camila Oliveira da Silva. **HAT/HDAC balance, telomere shortening and the role of peripheral blood monocytes in the generation of M1 and M2 macrophages in different phenotypes and severity of COPD** 2023. 115f. Tese - (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a heterogeneous pathology in its clinical presentation. Three main phenotypes are proposed: mixed COPD-asthma, exacerbator and emphysema; as well as different degrees of the disease: mild, moderate, severe, and very severe. Although many cell types contribute to the pathophysiology of the disease, macrophages are the ones that have the greatest effect on the inflammatory condition of COPD. The molecular basis of inflammation amplification in COPD has not yet been fully elucidated, the balance of histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) have been reported as influential elements in the transcription of pro-inflammatory genes. Furthermore, COPD has been an aging-related disease. The inflammatory response and cellular senescence are critical events in its pathogenesis. The aim of this study was to investigate the expression of HATs and HDACs, telomere length, monocyte profile and their differentiation potential for M1 and M2 type macrophages in different clinical phenotypes and disease severity. Contributed to this research, 105 volunteers with COPD treated at the pneumology ambulatory of the Piquet Carneiro University Polyclinic, 42 smokers and 73 non-smokers control volunteers. Evaluation of HAT and HDAC expression and relative analysis of telomere length of peripheral blood cells were performed by real-time PCR. Characterization of the profile of classical, intermediate, and non-classical peripheral blood monocytes and the M1 and M2 profile of differentiated monocytes were performed by flow cytometry. The differentiation of monocytes was induced, during five days, in 4 different culture conditions: M1 (GM-CSF or GM-CSF + LPS) and M2 (M-CSF or M-CSF + IL-4). We identified a reduction in HDAC2 in mild, moderate, and severe COPD patients, in addition to, a significant reduction in HDAC3 expression in moderate and severe COPD patients, an increase in HDAC4 expression in mild COPD, and a reduction in EP300 (HAT) expression in severe COPD. Regarding the phenotypes, there was a significant reduction in HDAC2 expression in those classified as emphysema and exacerbator and a reduction in HDAC3 only in the emphysema phenotype. Surprisingly, telomere shortening was verified in smoker volunteers, mixed COPD-asthma, exacerbator and emphysema patients, as well as in classifications of all disease degrees. We also found an increase in intermediate and non-classical monocytes in patients with mild, moderate, severe and very severe COPD. The exacerbator phenotype showed an increase in intermediate and non-classical monocytes. Regarding the profiles of differentiated cells, patients with COPD showed a predominance of markers CD163 and CD206, related to the M2 subtype. Our data suggest that patients with COPD have important genetic changes, with different signatures between phenotypes and severity stages, as well as changes in cell profiles, determinants to the quality of the immune response and important for future treatments and personalized therapies.

Keywords: COPD. Histones. Telomere. Monocyte. Macrophage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Características pulmonares DPOC 23
Figura 2 - Resposta inflamatória associada à DPOC 28
Figura 3 - Subpopulações de monócitos humano 29
Figura 4 - Geração de monócito e migração para o tecido 32
Figura 5 - Macrófagos M1 e M2 36
Figura 6 - Fenótipos dos macrófagos no tecido pulmonar de pacientes com DPOC 38
Figura 7- Estrutura esquemática do nucleossomo 40
Figura 8 - Acetilação e desacetilação de histonas 41
Figura 9 - Classificações das HATs 43
Figura 10 - Encurtamento gradual dos telômeros 49
Figura 11- Problema da replicação final.....52
Figura 12 - Fluxograma com o tamanho amostral do estudo e sua distribuição em cada técnica. 61
Figura 13- Expressão de EP300, HDAC2, HDAC3 e HDAC4 no sangue periférico dos pacientes com DPOC, fumantes e não fumantes.....69
Figura 14 - Expressão de EP300, HDAC2, HDAC3 e HDAC4 no sangue periférico dos pacientes com DPOC leve, moderada, grave e muito grave. 71
Figura 15 - Expressão de EP300, HDAC2, HDAC3 e HDAC4 no sangue periférico dos diferentes fenótipos dos pacientes com DPOC 73
Figura 16 - Tamanho dos telômeros dos pacientes com DPOC, fumantes e não fumantes.....74
Figura 17 - Tamanho dos telômeros nos pacientes com DPOC com diferentes gravidades e fenótipos de DPOC 75
Figura 18 - Avaliação das subpopulações de monócitos do sangue periférico nos pacientes com DPOC e não fumantes. 77
Figura 19 - Avaliação das subpopulações de monócitos do sangue periférico nas diferentes gravidades e fenótipos da DPOC. 78
Figura 20 - Expressão de CD38 e CD86 nos macrófagos derivados do sangue periférico humano de pacientes DPOC 80
Figura 21 - Expressão de CD163 e CD206 nos macrófagos derivados do sangue periférico humano.....82

TABELAS

Tabela 1 – Classificação espirométrica da gravidade da DPOC 22
Tabela 2 – Classificações das HDACs 45
Tabela 3 – Características clínicas e demográficas da população de estudo 68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACO	Asma-DPOC
ADP	Adenosina difosfato
AP	Proteína ativadora
ANOVA	Análise de variância One-way
Arg	Arginase
ATP	Adenosina trifosfato
CCR	Receptor de quimiocina CC
CD	Grupamento de diferenciação
CDK	Quinase dependente de ciclina
CDT1	Licenciamento de cromatina e fator de replicação de DNA1
COVID	Doença do coronavírus
CVF	Capacidade vital forçada
CXC	Quimiocinas separadas por um aminoácido
CXCR	Receptor de quimiocina CXC
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DKC1	Disqueratose congênita 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EFC	Extrato da fumaça do cigarro
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FACS	Separador celular ativado por fluorescência
FcR	Receptor da região do fragmento cristalizável
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G-CSF	Fator estimulador de colônias granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos-monócitos
GOLD	Iniciativa global para doença pulmonar obstrutiva crônica
HAT	Histonas acetiltransferases
HDAC	Histonas desacetilases
IC	Imunocomplexos

IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
Inos	Óxido nítrico sintase induzível
KO	knock-out
LBA	Lavado bronco-alveolar
LPA	Lesão pulmonar aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Macrófago classicamente ativado
M2	Macrófago alternativamente ativado
MA	Macrófago alveolar
MDM	Macrófagos derivados de monócitos
MEC	Matriz extracelular
MFI	Média de intensidade de fluorescência
MMPs	Metaloproteinase da matriz
NAD	Diftamida ADP ribosiltransferase
NFk-B	Fator nuclear kappa-B
NO	Óxido nítrico
NOP10	Ribonucleoproteína NOP10
NRCF	Cofatores de receptores nucleares
OMS	Organização mundial da saúde
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PE	Ficoeritrina
PM	Material particulado
Pol	Polimerase
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
PTMs	Modificações pós-translacionais
RB	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
SASP	Fenótipo secretor associado à senescência
SA-βgal	β-galactosidase associada à senescência

SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SIRT	Sirtuína
TC	Células T citotóxicas
TERC	Componente de RNA da telomerase
TERT	Transcriptase reversa da telomerase
TF	Fator de Transcrição
TGF	Fator de crescimento transformador
Th	Linfócitos T auxiliares / *T helper*
TIMP	Inibidor de metaloproteinase
TLR	Receptores do tipo *Toll*
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VEF1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

µL	Microlitro
µm	Micrómetro
µM	Micromolar
µg	Micrograma
CO_2	Dióxido de carbono
mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
ºC	Grau Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotação por minuto

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 16
1 **REVISÃO DA LITERATURA** 19
1.1 **DPOC- Definição** 19
1.2 **DPOC- Epidemiologia** 19
1.3 **DPOC- Fatores de risco** 19
1.4 **DPOC- Sintomas** 20
1.5 **DPOC- Diagnóstico** 21
1.6 **DPOC- Fisiopatologia** 22
1.7 **Fenótipos em DPOC** 24
1.8 **Resposta inflamatória na DPOC** 27
1.9 **Monócitos: fenótipo e função** 28
1.10 **Polarização de macrófagos** 33
1.10.1 Macrófago M1 classicamente ativado 33
1.10.2 Macrófago M2 alternativamente ativado 34
1.11 Regulação epigenética na DPOC 39
1.11.1 Histona acetiltransferases na DPOC 42
1.11.2 Histona desacetilases na DPOC 44
1.12 **Papel dos telômeros na DPOC** 48
1.13 **Telomerase** 50
1.14 **Senescência celular** 53
1.14.1 Senescência celular na DPOC 54
2 **JUSTIFICATICA** 57
3 **OBJETIVOS** 59
3.1 **Objetivo geral** 59
3.2 **Objetivos específicos:** 59
4 **MATERIAS E MÉTODOS** 60
4.1 **População de estudo** 60
4.2 **Caracterização do perfil de monócitos do sangue periférico humano** 62
4.3 **Obtenção dos monócitos do sangue periférico humano** 62
4.4 **Cultura celular e estímulo** 63
4.5 **Caracterização do perfil de macrófagos** 63
4.6 **Extração de RNA** 64
4.7 **Análise da expressão de HAT e HDAC** 64

4.8 **Extração de DNA** 65
4.9 **Quantificação relativa do tamanho dos telômeros por PCR em tempo real** 66
4.10 **Análises estatísticas** 67
5 **RESULTADOS** 68
5.1 **Características clínicas dos controles, fumantes e pacientes com DPOC** 68
5.2 **Expressão de EP300, HDAC2, HDAC3 e HDAC4 nos pacientes com DPOC, fumantes e não fumantes** 69
5.3 **Expressão de EP300, HDAC2, HDAC3 e HDAC4 nas diferentes gravidades da DPOC** 70
5.4 **Expressão de EP300, HDAC2, HDAC3 e HDAC4 nos diferentes fenótipos da DPOC** 72
5.5 **Comprimento telomérico nos pacientes com DPOC, fumantes e não fumantes** 74
5.6 **Comprimento telomérico nas diferentes gravidades e fenótipos de DPOC** 75
5.7 **Perfil dos monócitos nos pacientes com DPOC e não fumantes** 76
5.8 **Perfil dos monócitos nas diferentes gravidades e fenótipos da DPOC** 77
5.9 **Expressão de CD38, CD86, CD163 e CD206 nos macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico humano de pacientes com DPOC e não fumantes** 79
6 **DISCUSSÃO** 83
CONCLUSÃO 88
REFERÊNCIAS 89
ANEXO – Aprovação do comitê de ética 112

INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é referida pela Iniciativa global para doença pulmonar obstrutiva crônica (GOLD) como prevenível e tratável com sintomas pulmonares e extrapulmonares que contribuem para a gravidade dos pacientes acometidos. A DPOC é caracterizada por limitação no fluxo aéreo que não é totalmente reversível. A prevalência da DPOC em adultos com mais de 40 anos é em torno de 9-10% no mundo, sendo uma importante causa de morbidade/mortalidade no mundo (GOLD, 2021; VIEGI; PISTELLI; SHERRILL; MAIO et al., 2007). O principal fator de risco implicado ao desenvolvimento da DPOC é o tabagismo em mais de 90% dos casos (SALVI; BARNES, 2009). Entretanto, apenas uma minoria, em torno de 15% dos fumantes, desenvolve DPOC (LOKKE; LANGE; SCHARLING; FABRICIUS et al., 2006). Este fato, em conjunto com a observação de famílias com maior susceptibilidade à DPOC, indica que existe um componente genético importante implicado na gênese desta doença. A DPOC é altamente heterogênea em sua apresentação clínica e progressão, e devido a isso, uma diferenciação em fenótipos específicos foi proposta. Três principais fenótipos foram descritos, misto DPOC-asma, exacerbador e enfisema com hiperinsuflação (MIRAVITLLES; CALLE; SOLER-CATALUNA, 2012).

As células atuantes na inflamação da DPOC são macrófagos, células epiteliais, neutrófilos, linfócitos T CD8 e nos períodos de exacerbação, eosinófilos (BARNES; SHAPIRO; PAUWELS, 2003). Os macrófagos possuem um papel de destaque no desenvolvimento da DPOC, e estão aumentados em 5-10 vezes no lavado bronco-alveolar (LBA), parênquima pulmonar e nas vias aéreas dos pacientes (BARNES, 2008; PANZNER; LAFITTE; TSICOPOULOS; HAMID et al., 2003; TURATO; DI STEFANO; MAESTRELLI; MAPP et al., 1995). Estas células são derivadas de monócitos circulantes, distinguidos em três subtipos: clássicos, envolvidos nos processos inflamatórios; intermediários; e não clássicos envolvidos nos processos de remodelamento tecidual (YANG; ZHANG; YU; YANG et al., 2014; ZIEGLER-HEITBROCK; ANCUTA; CROWE; DALOD et al., 2010). Estes subtipos podem favorecer a diferenciação de macrófagos teciduais em um perfil de macrófago classicamente ativado (M1), altamente competentes na produção de citocinas pró-inflamatória, com atividades microbicidas e citotóxicas ou macrófago

alternativamente ativado (M2), associados à reposta Th2, resolução da inflamação, reparo tecidual e redução de citocinas pró-inflamatórias. (MARTINEZ; SICA; MANTOVANI; LOCATI, 2008). Os macrófagos são dinâmicos durante a doença inflamatória, podendo variar entre os fenótipos M1 a M2, para responder as necessidades imunológicas decorrente do microambiente pulmonar. A diversidade e plasticidade são características dos macrófagos in vivo (SICA; MANTOVANI, 2012). Sendo assim as mudanças dinâmicas dos macrófagos na DPOC refletem e influenciam os estádios de inflamação e remodelamento do ambiente pulmonar. Além dos componentes celulares, o ambiente inflamatório na DPOC envolve a presença de vários mediadores pró-inflamatórios como lipídios, citocinas e quimiocinas locais e circulantes, cuja liberação é regulada por fatores de transcrição genética.

A exposição a partículas nocivas, como fumaça do cigarro altera a função da barreira epitelial das vias aéreas e aumenta o estresse oxidativo promovendo senescência e ativação de vias pró-inflamatórias no epitélio das vias aéreas. O aumento do estresse oxidativo também causa modificações epigenéticas, como metilação do DNA e modificação de histonas. (CIPOLLINA; BRUNO; FASOLA; CRISTALDI et al., 2022; LIU; ZHANG; LI; ZHENG et al., 2021; TSUJI; AOSHIBA; NAGAI, 2006; VON ZGLINICKI, 2002).

A base molecular da amplificação e persistência da inflamação na DPOC ainda não foi completamente elucidada, o balanço das histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs) que promovem a acetilação e a desacetilação das histonas respectivamente têm sido reportados como elementos influentes na transcrição de genes pró-inflamatórios (SILVERMAN, 2006). Entender o perfil de expressão e atividade destas enzimas (HAT e HDAC) nos diferentes fenótipos de pacientes com DPOC poderá trazer conhecimentos na fisiopatologia da doença e contribuições no desenvolvimento de alvos específicos de inibição e consequentemente no melhor direcionamento e perspectiva de sua terapêutica específica de acordo com a classificação de seu fenótipo.

Além disso, a DPOC está relacionada ao envelhecimento e tem sido associada ao desgaste acelerado dos telômeros (XIE; LIU; CAO; GUO et al., 2020). Já se sabe que o encurtamento dos telômeros estão associado ao risco de DPOC e a diminuição da função pulmonar (RODE; BOJESEN; WEISCHER; VESTBO et al., 2013).

O comprimento dos telômeros leucocitários tem sido utilizado como biomarcador do envelhecimento (MAZIDI; PENSON; BANACH, 2017), o que melhora o método de tratamento e o efeito de terapias direcionadas em pacientes com insuficiência da medula óssea, estes pacientes apresentaram um encurtamento telomérico (ALDER; HANUMANTHU; STRONG; DEZERN et al., 2018). Vários estudos avaliaram o comprimento dos telômeros no contexto da DPOC (ALBRECHT; SILLANPAA; KARRASCH; ALVES et al., 2014; MORLA; BUSQUETS; PONS; SAULEDA et al., 2006; TSUJI; AOSHIBA; NAGAI, 2006), porém a relação entre o comprimento dos telômeros nos diferentes perfis dos pacientes com DPOC e gravidade não foi estudada anteriormente.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 DPOC- Definição

A DPOC é frequente (9-10%), evitável e tratável, e se caracteriza por uma obstrução persistente, progressiva e irreversível das vias aéreas. A DPOC está associada a uma resposta inflamatória intensa no pulmão devido principalmente à exposição a partículas e gases nocivos (GOLD, 2021).

1.2 DPOC- Epidemiologia

A DPOC é uma das principais causas mundiais de morbidade e mortalidade resultando em um impacto socioeconômico significativo e crescente. Segundo dados recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS) a DPOC já é considerada a terceira causa de mortalidade no mundo (WHO, 2021). As taxas de morbidade e mortalidade variam de acordo com o país, e sua prevalência e impacto tende a aumentar nas próximas décadas devido à exposição contínua aos fatores de risco e ao envelhecimento da população. Com mais pessoas vivendo por mais tempo, atingindo assim a idade em que a DPOC normalmente se desenvolve (DIAZ-GUZMAN; MANNINO, 2014; HAGSTAD; BACKMAN; BJERG; EKERLJUNG *et al.*, 2015).

1.3 DPOC- Fatores de risco

Mundialmente, o tabagismo é o principal causador dos distúrbios do sistema respiratório e de doenças pulmonares, como a DPOC e o câncer de pulmão (TAYLOR; DUMMER, 2010; WHO, 2019; YAO; RAHMAN, 2009). Os fumantes têm a maior prevalência, função pulmonar diminuída e a exposição passiva à fumaça do

cigarro também pode contribuir para o desenvolvimento da doença. Embora o tabagismo seja o principal fator de risco, a DPOC também é causada pela exposição ocupacional a gases tóxicos ou poeira (BERGDAHL; TOREN; ERIKSSON; HEDLUND *et al.*, 2004; HUMERFELT; GULSVIK; SKJAERVEN; NILSSEN *et al.*, 1993), poluição interna e externa (WANG; AARON; MADRIGANO; HOFFMAN *et al.*, 2019), uso de combustíveis de biomassa (BALCAN; AKAN; UGURLU; HANDEMIR *et al.*, 2016; PO; FITZGERALD; CARLSTEN, 2011) e suscetibilidade genética (GOLD, 2021).

A poluição interna, como a queima de madeira, resíduos de carvão, em locais mal ventilados é um fator de risco para o desenvolvimento da doença (OROZCO-LEVI; GARCIA-AYMERICH; VILLAR; RAMIREZ-SARMIENTO *et al.*, 2006) e a poluição externa, resultante de combustíveis fósseis, principalmente proveniente dos veículos está associada à diminuição da função respiratória. No entanto, embora pareça que esse tipo de poluição possa levar ao desenvolvimento da DPOC, a sua ação parece ser pequena e seu papel ainda não está claro (EISNER; ANTHONISEN; COULTAS; KUENZLI *et al.*, 2010).

A deficiência da α1-antitripsina é o fator de risco genético mais bem estudado. A α1-antitripsina é uma enzima que tem como função inibir a elastes neutrofílica (BUTTAR; BERNSTEIN, 2018). Quando a elastase neutrofílica está ativa ela tem a capacidade de clivar a elastina, que é necessária para manter a elasticidade pulmonar, o que comumente observa-se nos pacientes que possuem essa deficiência é a destruição dos sacos alveolares bem como dos bronquíolos respiratórios (BRODE; LING; CHAPMAN, 2012; DA COSTA; NORONHA FILHO; MARQUES; DA CRUZ *et al.*, 2019; PARR; GUEST; REYNOLDS; DOWSON *et al.*, 2007; STOLLER, 2022).

1.4 **DPOC- Sintomas**

Os principais sintomas da DPOC são: tosse crônica, hipersecreção de muco, expectoração e dispneia (VESTBO; HURD; AGUSTI; JONES *et al.*, 2013). Esses sintomas podem estar presentes por vários anos antes da limitação do fluxo aéreo e

são frequentemente, ignorados ou despercebidos pelos pacientes e atribuídos ao envelhecimento ou falta de condicionamento físico (GOLD, 2021).

A tosse crônica, muitas vezes, é o primeiro sintoma que o paciente desenvolve, porém não é considerada pelo indivíduo como um sintoma da DPOC e sim como uma consequência da exposição ao tabagismo ou a fatores ambientais. No início, a tosse pode ser intermitente, mas depois pode ser regular estando presente todos os dias, muitas vezes durante o dia inteiro. É comum que após uma crise de tosse os pacientes liberem pequenas quantidades de escarro viscoso, contendo neutrófilos e eosinófilos (GOLD, 2021).

A expectoração pode ocorrer por três meses durante dois anos consecutivos, e é definida como bronquite crônica. A presença de escarro purulento é sinal do aumento de mediadores inflamatórios que pode identificar o início de uma exacerbação (SOLER; ESPERATTI; EWIG; HUERTA *et al.*, 2012; STOCKLEY; O'BRIEN; PYE; HILL, 2000). Exacerbação é definida pelo GOLD como um evento no curso natural da doença, caracterizado pela presença de tosse e/ou produção de muco e dispneia (GOLD, 2021).

1.5 **DPOC- Diagnóstico**

Para o diagnóstico clínico da DPOC, são consideradas as seguintes variáveis: histórico de exposições a fatores de risco para a doença, assim como tosse crônica, produção de muco e dispneia. O diagnóstico da DPOC deve ser confirmado pelo exame de espirometria. Na espirometria é medido o volume de ar exalado forçadamente no ponto máximo da inspiração (CVF: capacidade vital forçada) e o volume de ar exalado durante o primeiro segundo (VEF1: volume expiratório no primeiro segundo). O indivíduo com DPOC apresenta a razão entre o VEF1 e a CVF inferior a 70%. Através deste exame de função pulmonar também é avaliado a gravidade da doença. A DPOC é classificada em quatro graus que são eles: grau I - leve, grau II - moderado, grau III - grave, grau IV - muito-grave (GOLD, 2021) (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação espirométrica da gravidade da DPOC

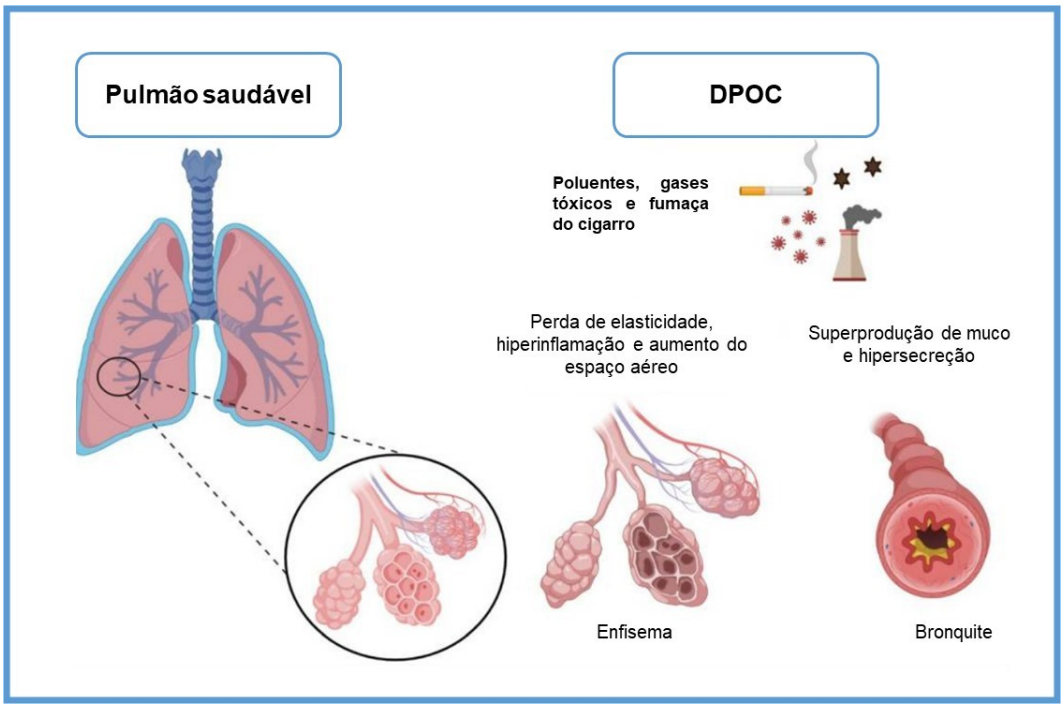
Gravidade	Características
Grau I: leve	VEF1/CVF < 0,70 VEF1 ≥ 80% do previsto
Grau II: moderado	VEF1/CVF < 0,70 50% ≤ VEF1< 80% do previsto
Grau III: grave	VEF1/CVF < 0,70 30% ≤ VEF1< 50% do previsto
Grau IV: muito grave	VEF1/CVF < 0,70 VEF1< 30% do previsto

Fonte: Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of COPD, 2021.

1.6 DPOC- Fisiopatologia

As mudanças fisiopatológicas características da DPOC são observadas na traqueia, brônquios, bronquíolos e vasculatura pulmonar, o que leva à restrição progressiva do fluxo aéreo e resulta no enfisema que promove a destruição alveolar e como consequência a redução da função pulmonar e a bronquite crônica que aumenta a produção de muco, estreitamento das vias aéreas e reduz o fluxo aéreo (CELLI, 2010; HOGG; TIMENS, 2009) (Figura 1).

Figura 1 - Características pulmonares DPOC



Legenda: Fisiopatologia da DPOC. O processo inflamatório pode alterar os brônquios, bronquíolos e parênquima pulmonar, o que ocasiona à restrição progressiva do fluxo aéreo, enfisema (destruição dos septos alveolares, aumento do espaço aéreo e perda da retração elástica devido à hiperinflamação e estresse oxidativo) e bronquite crônica (hipersecreção de muco pelas células caliciformes) diminuindo assim o fluxo de ar.
Fonte: Adaptado de: (RODRIGUES; CUNHA; SOARES; SILVA et al., 2021).

Nos pulmões dos pacientes com DPOC há um aumento no número de células inflamatórias específicas, inflamação crônica, reparos repetitivos e mudanças estruturais do tecido (BARNES, 2016). As mudanças estruturais das vias aéreas incluem: o aumento de células caliciformes e glândulas submucosas (ambas promovendo a hipersecreção do muco, a metaplasia escamosa do epitélio); espessamento da parede das vias aéreas; fibrose; exsudato inflamatório; o estreitamento das vias aéreas; destruição da parede alveolar; apoptose das células epiteliais e do endotélio; enfisema centrolobular (dilatação e destruição dos bronquíolos respiratórios comumente vistos em fumantes) e enfisema panacinar (destruição dos sacos alveolares bem como dos bronquíolos respiratórios observados em indivíduos com deficiência da α1-antitripsina). As mudanças inflamatórias e estruturais das vias aéreas aumentam com a gravidade da doença (GOLD, 2018).

A maioria dos pacientes com DPOC apresentam doenças crônicas concomitantes, que podem ser: perda de massa muscular esquelética e fraqueza, osteoporose, depressão, anemia crônica e doença cardiovascular. Essas doenças atingem, especialmente, pacientes em estágio mais avançado (MILLER; EDWARDS; AGUSTI; BAKKE *et al.*, 2013).

Como já mencionado a DPOC é heterogênea em sua manifestação clínica, progressão e lesões pulmonares. Existem muitas pesquisas sobre os fenótipos da DPOC para promover abordagens clínicas mais especializadas para os pacientes com DPOC. A seguir, esses fenótipos serão abordados.

1.7 **Fenótipos em DPOC**

Miravitlles e colaboradores estabeleceram três fenótipos centrais: DPOC-Asma, Exacerbador e Enfisema com hiperinsuflação (AGUSTI; SOBRADILLO; CELLI, 2011; HAN; AGUSTI; CALVERLEY; CELLI *et al.*, 2010; MIRAVITLLES; CALLE; SOLER-CATALUNA, 2012).

a) Asma-DPOC (ACO) - A sobreposição segundo a GOLD e a *Global Initiative for Asthma*, é “caracterizada pela limitação persistente do fluxo aéreo com várias características geralmente associadas à asma e várias características geralmente associadas à DPOC” (BATEMAN; HURD; BARNES; BOUSQUET *et al.*, 2008; VOGELMEIER; CRINER; MARTINEZ; ANZUETO *et al.*, 2017a). Em pacientes asmáticos os distúrbios fisiopatológicos clássicos são: inflamação das grandes vias aéreas com fenótipo Th2 e inflamação eosinofílica. Nos pacientes com DPOC a inflamação ocorre inicialmente nas pequenas vias aéreas e apresenta uma inflamação neutrofílica e linfocítica CD8 (BARNES, 2008). Embora esses dois fenótipos sejam controversos há uma crescente conscientização de que haja uma sobreposição dessas características inflamatórias em ambos os fenótipos. Os pacientes com ACO possuem uma combinação dos seguintes fatores: histórico de asma e/ou atopia, reversibilidade no teste broncodilatador, eosinofilia notável nas secreções respiratórias e/ou periféricas, imunoglobulina E (IgE) elevada, teste

de puntura positivo para alérgenos e altas concentrações de exalação de óxido nítrico (NO) (ALSHABANAT; ZAFARI; ALBANYAN; DAIRI *et al.*, 2015; CORHAY; SCHLEICH; LOUIS, 2014; MIRAVITLLES; CALLE; SOLER-CATALUNA, 2012; MIRAVITLLES; SOLER-CATALUNA; CALLE; MOLINA *et al.*, 2012; PIRAS; MIRAVITLLES, 2012; RHEE, 2015). Esses pacientes apresentam melhor resposta aos corticoides (CHEN; XU; XIAO, 2013; MIRAVITLLES; CALLE; SOLER-CATALUNA, 2012). Os pacientes com sobreposição de asma e DPOC apresentam uma maior gravidade quando comparados a outros pacientes com DPOC (KURASHIMA; TAKAKU; OHTA; TAKAYANAGI *et al.*, 2016). Tanto a GOLD quanto a *Global Initiative for Asthma* recomendam o tratamento da sobreposição asma-DPOC de acordo com o fenótipo mais dominante (THOMSON, 2017; VOGELMEIER; CRINER; MARTINEZ; ANZUETO *et al.*, 2017a).

b) Exacerbador - É o grupo de indivíduos com duas ou mais exacerbações por ano (CALVERLEY; RABE; GOEHRING; KRISTIANSEN *et al.*, 2009; THOMSON, 2017), com intervalo de pelo menos quatro semanas após o término do tratamento ou seis semanas do início dos sintomas caso os pacientes não tenham recebido nenhum tratamento (HAN; AGUSTI; CALVERLEY; CELLI *et al.*, 2010). Caso o paciente tenha sido internado no ano anterior também é classificado como um fenótipo exacerbador (GIBSON; MCDONALD, 2015; MIRAVITLLES; CALLE; SOLER-CATALUNA, 2012; SUZUKI; TADA; KAWATA; MATSUURA *et al.*, 2015). Geralmente esse grupo apresenta uma obstrução mais grave das vias aéreas. Outros parâmetros também são avaliados para analisar a gravidade da doença, como por exemplo, a escala de dispneia do *Medical Research Council,* índice de massa corporal, obstrução do fluxo aéreo, dispneia e índice de exercício. As exacerbações estão associadas à diminuição acelerada da função pulmonar, o qual tem efeito na qualidade de vida e na mortalidade. (DONALDSON; SEEMUNGAL; BHOWMIK; WEDZICHA, 2002). O tratamento com os esteroides inalatórios e os inibidores da fosfodiesterase proporcionam benefício terapêutico em pacientes com esse fenótipo (CALVERLEY; ANDERSON; CELLI; FERGUSON *et al.*, 2007; RENNARD; CALVERLEY; GOEHRING; BREDENBROKER *et al.*, 2011; WEDZICHA; RABE; MARTINEZ; BREDENBROKER *et al.*, 2013). O uso de macrolídeos reduz as

exacerbações, hospitalizações e tem efeitos anti-inflamatórios, diminuem a produção de citocinas pró-inflamatórias e os níveis de espécies reativas de oxigênio (ALBERT; CONNETT; BAILEY; CASABURI *et al.*, 2011; BLASI; MANTERO; ALIBERTI, 2012; KANOH; RUBIN, 2010; POMARES; MONTON; ESPASA; CASABON *et al.*, 2011; SEEMUNGAL; WILKINSON; HURST; PERERA *et al.*, 2008; SUZUKI; YANAI; YAMAYA; SATOH-NAKAGAWA *et al.*, 2001).

c) Enfisema com hiperinsuflação - Está principalmente presentes nos fumantes (LABAKI; MARTINEZ; MARTINEZ; GALBAN *et al.*, 2017). As características clínicas são: intolerância ao exercício físico, dispneia, sinais de hiperinsuflação e tendência a baixo índice de massa corporal (GOLD, 2021; MIRAVITLLES; CALLE; SOLER-CATALUNA, 2012). Sua definição está ligada a anatomia patológica ao nível dos bronquíolos terminais. O número de macrófagos e neutrófilos aumenta com a liberação de metaloproteinases de matriz, elastases e colagenases que degradam a matriz parenquimatosa (RUSSELL; CULPITT; DEMATOS; DONNELLY *et al.*, 2002). Diferentes fenótipos de enfisema já foram descritos, incluindo fenótipos panlobulares, centrolobulares e paraseptais. O fenótipo panlobular está associado a um índice de massa corporal reduzido independentemente do VEF; o fenótipo centrolobular está associado a um maior histórico de tabagismo; o paraseptal parece estar associado a menos sintomas e menor comprometimento fisiológico (SMITH; AUSTIN; NEWELL; D'SOUZA *et al.*, 2014). Esses pacientes parecem ter uma melhor reposta quando tratados com terapia broncodilatadora de ação prolongada (BURGE; WEDZICHA, 2003; MIRAVITLLES; CALLE; SOLER-CATALUNA, 2012). A descrição cuidadosa dos fenótipos tem importantes implicações terapêuticas.

1.8 Resposta inflamatória na DPOC

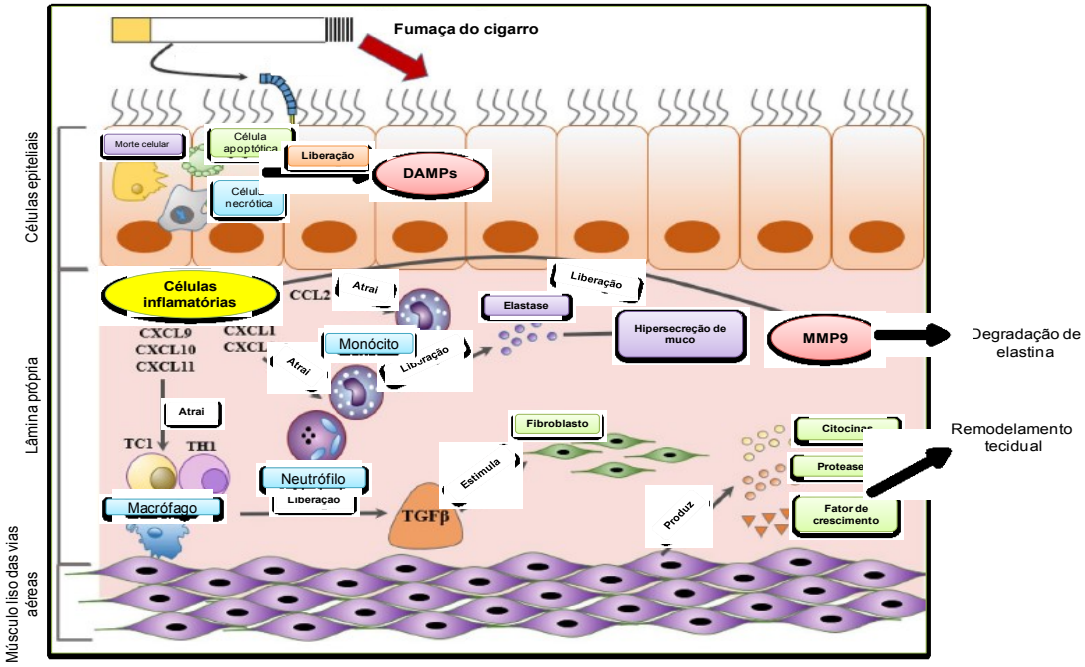
A resposta inflamatória na DPOC está relacionada com estresse oxidativo, desequilíbrio protease-antiprotease e aumento de células e mediadores inflamatórios. (AGHASAFARI; GEORGE; PIDAPARTI, 2019).

Estímulos como a fumaça de cigarro são capazes de provocar morte celular e a liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Essas moléculas ativam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), presentes nas células epiteliais pulmonares e nos macrófagos alveolares (MA). Em seguida, essas células são induzidas a liberar mediadores inflamatórios responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias como monócitos, neutrófilos e outras células e moléculas circulantes para a região pulmonar, criando, assim, o início de um ambiente inflamatório. (AGHASAFARI; GEORGE; PIDAPARTI, 2019).

Os macrófagos, células epiteliais e outras células inflamatórias atraídas para o local da inflamação liberam proteases, como as metaloproteinases (MMPs) que destroem componentes da matriz extracelular do tecido. A destruição do parênquima pulmonar leva a uma diminuição funcional nas pequenas vias aéreas e alvéolos e diminui a retração elástica pulmonar (BARNES; SHAPIRO; PAUWELS, 2003; GHARIB; MANICONE; PARKS, 2018). As proteases 3, elastase neutrofílica e as MMP-8, 9 e 12 podem estar aumentadas nos pacientes com DPOC, enquanto as proteases α-1 antitripsina e o inibidor de metaloproteinase (TIMP) estão diminuídos (JOHNSON, 2016).

As células epiteliais e os macrófagos liberam o fator de crescimento transformador-β (TGF-β) que promove a proliferação de fibroblastos que irão atuar no processo de remodelamento tecidual (BARNES, 2008). O músculo liso das vias aéreas libera proteases, citocinas e fatores de crescimento que podem atuar também nos processos de remodelamento (AGHASAFARI; GEORGE; PIDAPARTI, 2019; CHUNG, 2005) (Figura 2).

Figura 2 - Resposta inflamatória associada à DPOC



Legenda: A fumaça do cigarro ativa os receptores do tipo Toll (TLR) e as células mortas e necróticas liberam os DAMPs. As células inflamatórias são ativadas e recrutam monócitos e neutrófilos para o local lesionado (resolução). Essas células liberam elastase e MMPs, o que resulta em uma grande secreção de muco e degradação da elastina, o que pode levar ao enfisema. Os macrófagos liberam TGF-β que por sua vez estimula os fibroblastos a proliferarem (remodelamento tecidual). O músculo liso das vias aéreas libera citocina, proteases e fatores de crescimento que irão contribuir para o remodelamento tecidual.
Fonte: Adaptado de: (AGHASAFARI; GEORGE; PIDAPARTI, 2019).

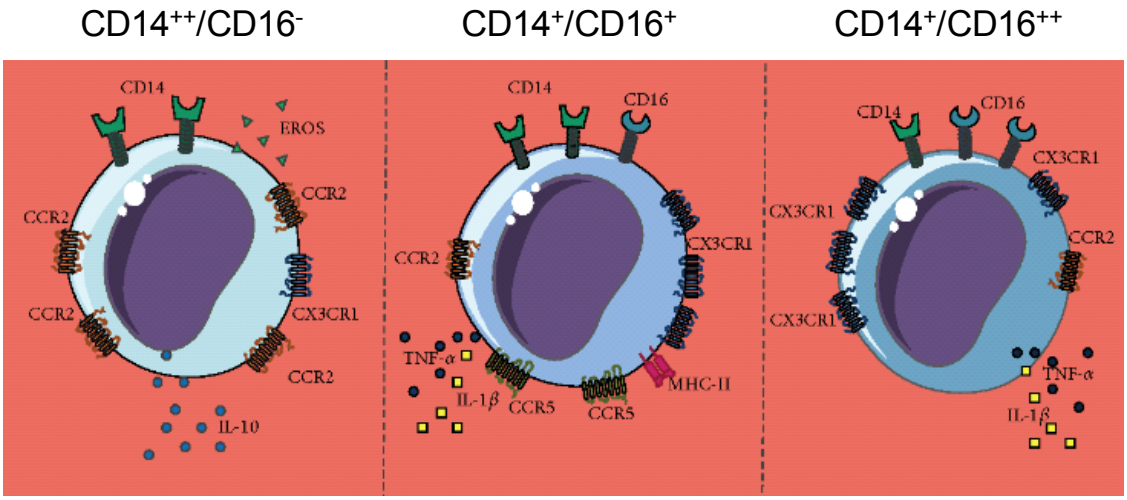
1.9 Monócitos: fenótipo e função

Os monócitos compreendem uma população de células heterogêneas que apresentam em sua superfície receptores de quimiocinas, citocinas e de reconhecimento de padrões de patógenos. Durante a inflamação, os monócitos migram para o tecido e se diferenciam em células locais como os macrófagos teciduais. Os monócitos podem se diferenciar em células efetoras e desempenhar diversas funções, como produção de citocinas pró ou anti-inflamatórias e também assegurar a integridade vascular (JAKUBZICK; RANDOLPH; HENSON, 2017).

Em adultos, os monócitos são gerados na medula óssea a partir de célula-tronco hematopoiética que dão origem a seus progenitores intermediários, incluindo o progenitor de granulócito-monócito e o de monócito comum. (LUQUE-MARTIN; MANDER; LEENEN; WINTHER, 2021)

Os monócitos humanos podem ser divididos em três subpopulações, dependendo da expressão dos marcadores de superfície celular CD14 e CD16 (Figura 3). Os monócitos $CD14^{++}/CD16^{-}$ representam o subgrupo clássico, os monócitos $CD14^{+}/CD16^{+}$ o subgrupo intermediário, enquanto os monócitos com expressão $CD14^{+}/CD16^{++}$ representam os monócitos não clássicos (ROJAS; SALAZAR; MARTINEZ; PALMAR *et al.*, 2015; YANG; ZHANG; YU; YANG *et al.*, 2014; ZIEGLER-HEITBROCK; ANCUTA; CROWE; DALOD *et al.*, 2010).

Figura 3 - Subpopulações de monócitos humano



Legenda: O monócito humano pode ser classificado de acordo com a expressão de receptores específicos da superfície celular, em monócitos clássicos ($CD14^{++}$ $CD16^{-}$), monócitos intermediários ($CD14^{+}CD16^{+}$) e monócitos não clássicos ($CD14^{+}CD16^{++}$).
Fonte: Adaptado de: (ROJAS; SALAZAR; MARTINEZ; PALMAR et al., 2015).

Os subtipos de monócitos apresentam diferenças em sua capacidade de infiltrar nos tecidos com base na expressão diferencial de receptores de quimiocina, como o CX3CR1, envolvido na sobrevivência com expressão significativa nos monócitos não clássicos; e o CCR2 (receptor de CCL2), altamente expresso em monócitos clássicos. A CCL2 atua na mobilização de monócitos da medula óssea e também está relacionada ao recrutamento de monócitos para sítios inflamatórios como placas ateroscleróticas ou sítios de infecção (AUFFRAY; FOGG; GARFA; ELAIN et al., 2007; BOYETTE; MACEDO; HADI; ELINOFF et al., 2017; LANDSMAN; BAR-ON; ZERNECKE; KIM et al., 2009).

Os monócitos clássicos $CD14^{++}/CD16^{-}$ tendem a ser recrutados primeiro e em níveis mais altos em condições inflamatórias. Eles estão envolvidos nestes processos através da liberação de mediadores inflamatórios, já os monócitos intermediários e não clássicos estão envolvidos nos processos de remodelamento tecidual (AUFFRAY; SIEWEKE; GEISSMANN, 2009; CHAVEZ-SANCHEZ; ESPINOSA-LUNA; CHAVEZ-RUEDA; LEGORRETA-HAQUET *et al.*, 2014; CHIMEN; YATES; MCGETTRICK; WARD *et al.*, 2017; THOMAS; TACKE; HEDRICK; HANNA, 2015; ZIEGLER-HEITBROCK; ANCUTA; CROWE; DALOD *et al.*, 2010). Os monócitos não clássicos têm como função patrulhar e monitorar o lado luminal dos vasos sanguíneos quanto a danos nos tecidos, e, além disso, eles também promovem o recrutamento de outras células imunes (AUFFRAY; FOGG; GARFA; ELAIN *et al.*, 2007; GINHOUX; JUNG, 2014). Outras diferenças encontradas entre os subtipos é o tamanho, morfologia e o transcriptoma (GUILLIAMS; MILDNER; YONA, 2018; OLINGY; DINH; HEDRICK, 2019).

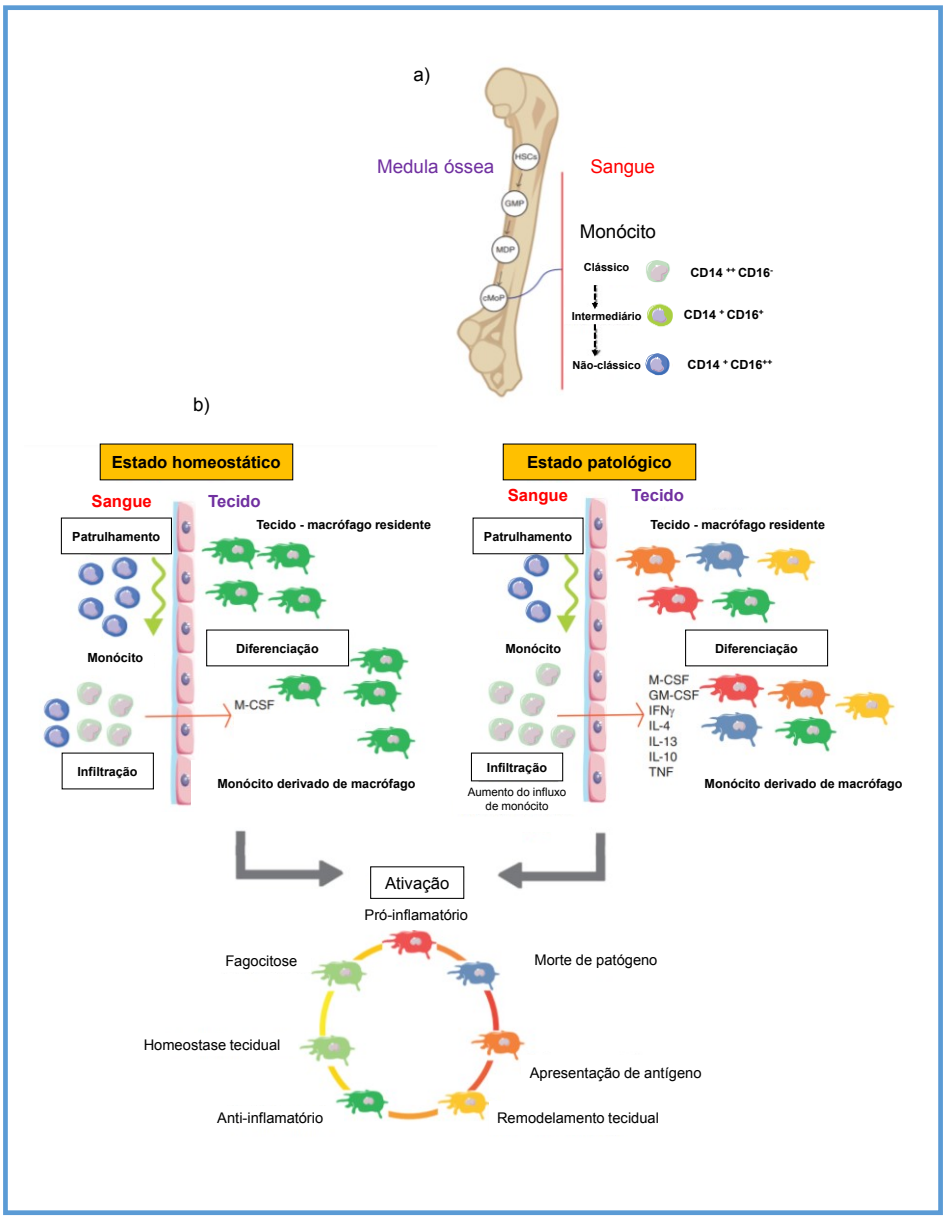
Os monócitos clássicos são recrutados para tecidos inflamados e linfonodos e produzem níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (GEISSMANN; JUNG; LITTMAN, 2003). Já os monócitos não clássicos interagem fortemente com a superfície luminal das células endoteliais vasculares e patrulham a superfície da célula endotelial com o objetivo de eliminar as células mortas e agentes infecciosos (ZIEGLER-HEITBROCK; ANCUTA; CROWE; DALOD et al., 2010).

O fenótipo dos monócitos presentes na circulação sanguínea se assemelha aos monócitos encontrados na medula óssea (SUNDERKOTTER; NIKOLIC; DILLON; VAN ROOIJEN *et al.*, 2004). Os monócitos circulantes exibem heterogeneidade fenotípica, dependendo do estado (fisiológico ou patológico), o que

provavelmente resultará na diferenciação e polarização dos fenótipos dos macrófagos no tecido (FADINI; SIMONI; CAPPELLARI; VITTURI et al., 2014).

A diferenciação e polarização são processos que impactam no fenótipo dos macrófagos (Figura 4A e B). A diferenciação é o processo pelo qual o monócito faz a transição para um estado mais maduro como o de um macrófago ou célula dendrítica derivada de monócito induzida por citocinas, fatores de crescimento ou outros estímulos. Os monócitos também podem se diferenciar em outros tipos celulares, como os osteoclastos. A polarização que às vezes é mencionada como ativação, refere-se ao fenótipo que os macrófagos maduros adquirem ao encontrar certos estímulos, como moléculas derivadas de patógenos ou citocinas, como por exemplo, o lipopolissacarídeo (LPS) ou interferon-gama (IFN-γ). Essa terminologia ainda não está completamente estabelecida já que alguns autores distinguem ativação e polarização em dois termos separados. O termo “ativação” pode estar atribuído com a capacidade de resposta e reação de uma célula a certos estímulos enquanto a “polarização” é utilizada para descrever uma mudança geral do fenótipo dos macrófagos sob certos estímulos (VAN BEEK; VAN DEN BOSSCHE; MASTROBERARDINO; DE WINTHER et al., 2019).

Figura 4 - Geração de monócitos e migração para o tecido



Legenda: Os precursores celulares na medula óssea que dão origem aos monócitos e os subtipos de monócitos humanos encontrados no sangue circulante (a). Função dos monócitos em situações homeostáticas: há uma menor quantidade dos monócitos clássico e um aumento da infiltração dos monócitos não clássico nos tecidos. Em condições patológicas: há um aumento no recrutamento e infiltração de monócitos clássicos nos tecidos. Os macrófagos respondem a estímulos patológicos adquirindo um fenótipo polarizado (ativado), como pró-inflamatório, morte de patógenos, apresentação de antígeno, anti-inflamatório ou remodelamento tecidual (b).

Fonte: Adaptado de: (LUQUE-MARTIN; MANDER; LEENEN; WINTHER, 2021).

1.10 **Polarização de macrófagos**

Os macrófagos têm diversas funções tanto na indução, quanto na resolução da inflamação, participando da imunidade inata contra infecções bacterianas, virais e fúngicas. Eles fagocitam restos celulares e células mortas, produzem mediadores inflamatórios que atuam em processos fisiológicos e patológicos e são altamente regulados para prevenir as respostas inflamatórias indesejadas aos antígenos inalados (YUAN; DONG; WANG; FU et al., 2013) (KAUR; BIRRELL; DEKKAK; REYNOLDS et al., 2015) (MANN; PERDIGUERO; KHARRAZ; AGUILAR et al., 2011).

De acordo com o perfil de expressão gênica e proteica, e mecanismos de defesa, os macrófagos podem ser classificados em: macrófago classicamente ativado (M1) pró-inflamatório e macrófago alternativamente ativado (M2) imunoregulador (MILLS; KINCAID; ALT; HEILMAN et al., 2000) (Figura 5).

Ambos os macrófagos M1 e M2 são encontrados nos pulmões de pacientes com DPOC (OSINSKA; WOLOSZ; DOMAGALA-KULAWIK, 2014).

1.10.1 Macrófago M1 classicamente ativado

Os macrófagos M1 são classicamente ativados por IFN-γ, fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), fator estimulador e colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e o LPS, presente na parede de bactérias gram-negativas, considerado um importante contaminante da fumaça do cigarro. (BOORSMA; DRAIJER; MELGERT, 2013; MARTINEZ; GORDON, 2014; MURRAY; ALLEN; BISWAS; FISHER et al., 2014; STEDMAN, 1968). Os macrófagos são a primeira linha defesa contra agentes patogênicos intracelulares, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), NO e exibem funções endocíticas aumentas (YAMASAKI; EEDEN, 2018).

Níveis aumentados da expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) foram encontrados nos macrófagos de pacientes com DPOC (ICHINOSE; SUGIURA; YAMAGATA; KOARAI et al., 2000; MAESTRELLI; PASKA; SAETTA;

TURATO et al., 2003; VAN STRAATEN; POSTMA; COERS; NOORDHOEK et al., 1998). NO e EROs induzidos por iNOS são capazes de induzir estresse oxidativo (CHOW; HERRERA ABREU; SUZUKI; DOWNEY, 2003). Portanto, a iNOS produzida em decorrência da polarização M1 promove o estresse oxidativo na DPOC. Estudos mostram que os níveis de IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α são regulados positivamente na DPOC corroborando o papel destas citocinas derivadas de macrófagos M1 no desenvolvimento da doença (BUCCHIONI; KHARITONOV; ALLEGRA; BARNES, 2003; DALDEGAN; TEIXEIRA; TALVANI, 2005; DI FRANCIA; BARBIER; MEGE; OREHEK, 1994; ICHINOSE; SUGIURA; YAMAGATA; KOARAI et al., 2000; YAMAMOTO; YONEDA; YOSHIKAWA; FU et al., 1997).

Os macrófagos M1 são células efetoras, altamente competentes na produção de citocinas pró-inflamatórias e desempenham atividades microbicidas e citotóxicas. Essas células também liberam quantidades expressivas de metaloproteinases de matriz como MMP-1 e MMP-9 em comparação com os macrófagos M2 (ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2014; MARTINEZ; GORDON, 2014) (Figura 5).

1.10.2 Macrófago M2 alternativamente ativado

Os macrófagos M2 são alternativamente ativados por glicocorticoides, IL-4, IL-10, IL-13, TGF-β e imunocomplexos (IC) através de receptores FcR de reconhecimento da região do fragmento cristalizável de imunoglobulinas. Essas células controlam a inflamação e respostas Th2, reparam o tecido danificado, liberam citocinas anti-inflamatórias que ajudam na proliferação celular e promovem a cicatrização de lesões e reparo tecidual (MARTINEZ; SICA; MANTOVANI; LOCATI, 2008).

Existem três subtipos distintos de macrófagos M2 (M2a, M2b, M2c) classificados, principalmente, devido à interação entre ligantes específicos e receptores presentes nos macrófagos (ARORA; DEV; AGARWAL; DAS *et al.*, 2018; MARTINEZ; GORDON, 2014). Os macrófagos M2a são ativados após exposição a IL-4 e IL-13 e liberam CCL17, CCL18, CCL22 e CCL24. A IL-4 ou IL-13 regulam negativamente os mediadores pró-inflamatórios, como TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-12 e IL-1β (CHIZZOLINI; REZZONICO; DE LUCA; BURGER *et al.*, 2000; GRATCHEV;

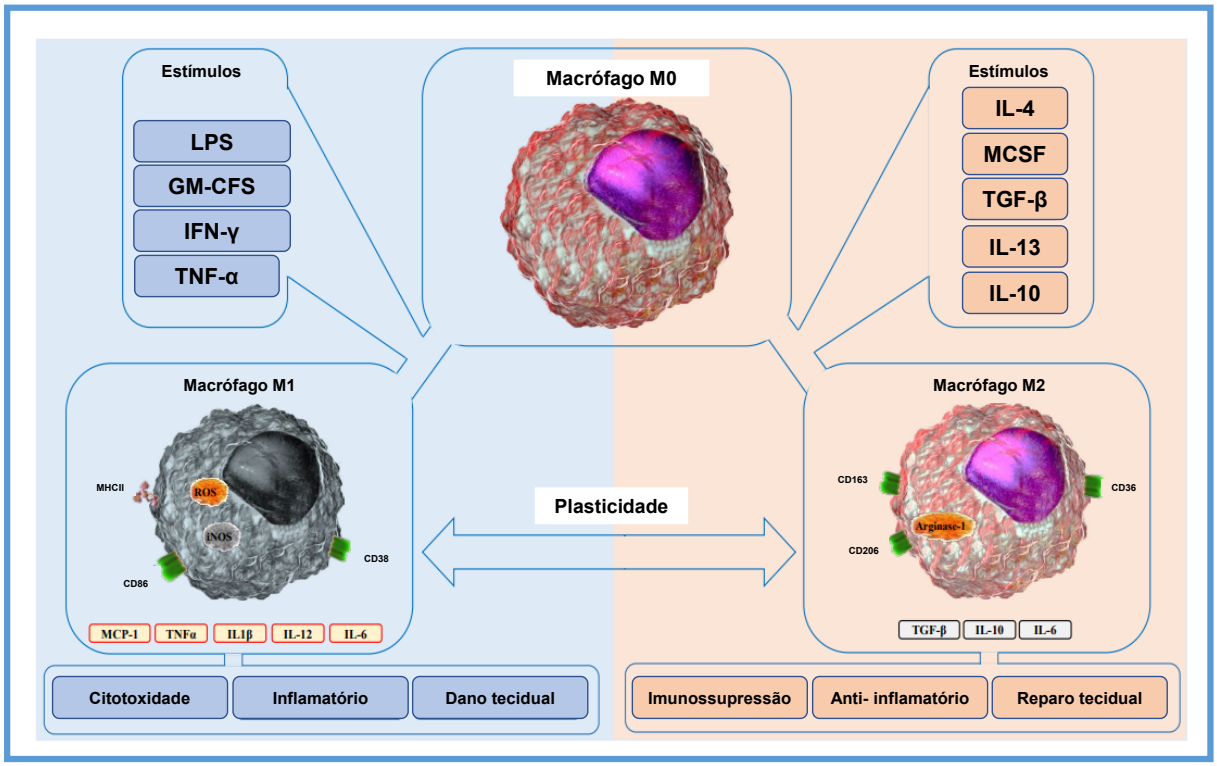
GUILLOT; HAKIY; POLITZ *et al.*, 2001; HART; BURGESS; VITTI; HAMILTON, 1989; TOROCSIK; BARDOS; NAGY; ADANY, 2005); macrófagos M2b são ativados por IC em combinação com a IL-1-β ou LPS e expressam altos níveis de IL10 e baixos níveis de IL12 (ANDERSON; MOSSER, 2002); macrófagos M2c são ativados por IL-10, TGF-β e glicocorticoides e expressam altos níveis de CXCL13, CCL16 e CCL18.

Entre os marcadores de superfície, o CD163 (receptor de manose) e o CD206 (receptor *scavenger*) foram identificados como marcadores característicos de macrófagos M2 (N; QUINTANA; GARCIA-SILVA; MAZARIEGOS et al., 2017; VAN DER VEEN; DE GROOT; MELGERT, 2020).

A polarização de macrófagos, que é regulada por citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição, está relacionada ao início e desenvolvimento de doenças inflamatórias pulmonares, como lesão pulmonar aguda (LPA), síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), SDRA relacionada à COVID-19 (doença de coronavírus 2019), asma alérgica, DPOC e fibrose pulmonar idiopática (BOOZ; ALTARA; EID; WEHBE *et al.*, 2020; CHEN; TANG; SHUAI; MENG *et al.*, 2020; HE; XIE; LU; SUN, 2017; LIU; ZOU; CHAI; YAO, 2014; SARADNA; DO; KUMAR; FU *et al.*, 2018). Deste modo, a regulação da polarização de macrófagos e moléculas inflamatórias associadas pode representar uma abordagem terapêutica valiosa para o tratamento de doenças pulmonares inflamatórias agudas e crônicas.

Os macrófagos M2 são dominantes nos fluidos do LBA de pacientes com DPOC e apresentam um aumento de citocinas, como IL-4, IL-13, IL-8 e IL10 (EAPEN; HANSBRO; MCALINDEN; KIM *et al.*, 2017; WANG; XU; MENG; ADCOCK *et al.*, 2018). Estudos mostraram que a fumaça do cigarro promove a polarização M2 em macrófagos e um aumento da expressão de MMP12 (BOORSMA; DRAIJER; MELGERT, 2013; KUMAR; KHANDELWAL; THACHAMVALLY; TRIPATHI et al., 2018; MOHANTA; SHARMA; ARINA; DEFILIPPI, 2020). Macrófagos M2 induzidos por IL-4 produzem MMP12, e demonstraram desempenhar um papel fundamental no enfisema (BOORSMA; DRAIJER; MELGERT, 2013; HAUTAMAKI; KOBAYASHI; SENIOR; SHAPIRO, 1997; LE QUEMENT; GUENON; GILLON; VALENCA *et al.*, 2008) (Figura 5).

Figura 5 - Macrófagos M1 e M2



Legenda: Os macrófagos M1 são ativados na presença de GM-CSF, TNF-α, IFN-γ e LPS. Os macrófagos M2 são ativados por IL-4, IL-13, fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), IL-10 e TGF-β.
Fonte: Adaptado de: (ARORA; DEV; AGARWAL; DAS et al., 2018).

Outra característica específica dos macrófagos M2 é aumentar a liberação de IL-10 e diminuir a liberação de IL-12 e IL-13. Além disso, essas células expressam a enzima arginase1(Arg1) (MARTINEZ; SICA; MANTOVANI; LOCATI, 2008).

A Arg1 compete com o iNOS por arginina, e assim diminui a produção de NO (DURANTE; JOHNSON; JOHNSON, 2007). A expressão da iNOS tem sido usada como um marcador para macrófago M1 (HEY; BOUCHER; VADON-LE GOFF; KETTERER *et al.*, 1997) e a Arg1 atua no mecanismo de reparo tecidual, cicatrização e fibrose, pois induz a produção de ornitina (que é precursora para síntese de prolina). Esse aminoácido é muito importante para a formação de colágeno (MORRIS, 2007).

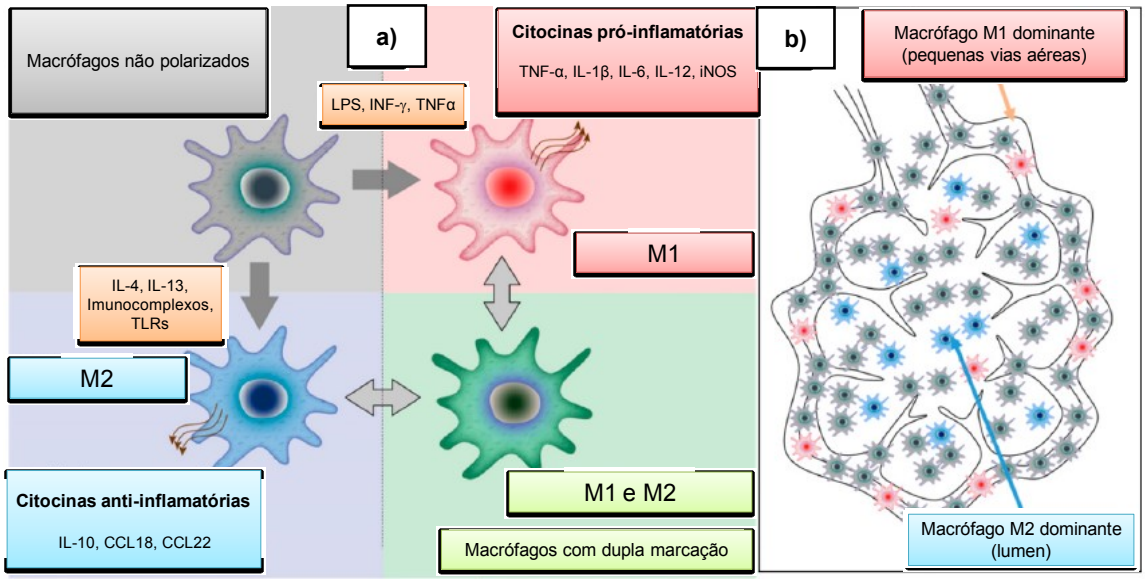
As enzimas iNOS e Arg1 são consideradas marcadores intracelulares para diferenciar as populações de macrófagos M1 e M2, porém outros marcadores de superfície como o CD38, CD80 e CD86 são expressos nos macrófagos M1 (RAGGI; PELASSA; PIEROBON; PENCO et al., 2017; SHAYKHIEV; KRAUSE; SALIT;

STRULOVICI-BAREL et al., 2009) assim como o CD200, CD206 e CD163 em macrófagos M2. (STEIN; KESHAV; HARRIS; GORDON, 1992). As MMP-12 e MMP-2, enzimas que se encontram aumentadas nos pulmões de pacientes com DPOC, estão associadas ao remodelamento tecidual e também têm sido citadas como marcadores do fenótipo M2 (BARALDO; BAZZAN; ZANIN; TURATO *et al.*, 2007).

O CD38 é uma proteína transmembranar e é expressa nas células imunes e apresenta um aumento durante as condições inflamatórias. Ela induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, proliferação e inibi a apoptose em linfócitos (COVARRUBIAS; KALE; PERRONE; LOPEZ-DOMINGUEZ *et al.*, 2020; JACKSON; BELL, 1990; MARCH; GRAUPERA; ROSA SARRIAS; LOZANO *et al.*, 2007). O CD86 é uma proteína de membrana lisossômica, expressa principalmente no citoplasma de macrófagos ela é frequentemente utilizada como marcador do macrófago M1. O CD163 é um membro importante da superfamília de receptores *scavenging* e é expresso principalmente na superfície de monócitos e macrófagos, o CD163 é utilizado como um marcador para o macrófago M2 (KIM; WEN; YANG; KIM et al., 2015). Os macrófagos M2 também expressam o receptor de manose CD206 e estão associados a uma resposta T *helper* (Th)2, reparo tecidual e fibrose (GUNDRA; GIRGIS; RUCKERL; JENKINS *et al.*, 2014; KAKU; IMAOKA; MORIMATSU; KOMOHARA *et al.*, 2014).

Estudos recentes afirmam que o microambiente da DPOC é tão complexo que podem ser identificados quatro fenótipos diferentes de macrófagos: 1) macrófagos não polarizados que não apresentam marcadores M1 e M2; 2) macrófagos positivos M1; 3) macrófagos positivos M2 e 4) macrófagos marcados para M1 e M2 (Figura 6A).

Figura 6 - Fenótipos dos macrófagos no tecido pulmonar de pacientes com DPOC



Legenda: Na DPOC, podem ser identificados quatro fenótipos diferentes: Macrófagos não polarizados que são negativos para os marcadores M1 e M2 e liberam baixas quantidades de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Após estímulo Th1, (exemplo: LPS, IFN-γ e TNF-α) estas células podem se tornar polarizadas, predominantemente, para o perfil M1 e liberam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Porém, quando são estimulados por citocinas Th2 (IL-4 e / ou IL-13), tornam-se, predominantemente, polarizados para o perfil M2 e liberam altos níveis de citocinas anti-inflamatórias (A). Os macrófagos M1 são encontrados, predominantemente, no tecido das pequenas vias aéreas e os macrófagos M2 no espaço aéreo (B).

Fonte: Adaptado de: (YAMASAKI; EEDEN, 2018).

A separação clássica de ativação de macrófagos foi expandida e alterada e já se sabe que os fenótipos de macrófagos não estão mais restritos a dois fenótipos extremos, mas se assemelham a um espectro que inclui fenótipos altamente pró-inflamatório a pró-fibrótico, pró-tumoral, anti-inflamatório, entre outros demonstrado por estudos de transcriptoma, onde a resposta a uma ampla gama de estímulos levou à indução a diversos fenótipos transcricionais (MARTINEZ; GORDON, 2014; XUE; SCHMIDT; SANDER; DRAFFEHN et al., 2014). Esse amplo espectro de respostas também foi observado em alguns estudos *in vivo* em humanos em que macrófagos alveolares do LBA de fumantes, não fumantes e pacientes com DPOC não poderiam ser incluídos em uma simples dicotomia de polarização M1 e M2 (SHAYKHIEV; KRAUSE; SALIT; STRULOVICI-BAREL *et al.*, 2009; WOODRUFF; KOTH; YANG; RODRIGUEZ *et al.*, 2005).

Recentemente foi observado que os macrófagos não polarizados estavam localizados nos tecidos das pequenas vias aéreas e nos espaços aéreos, já os macrófagos M1 estavam presentes nas pequenas vias aéreas e os M2 predominavam no lúmen dos tecidos pulmonares de indivíduos com DPOC comparados ao grupo controle (EAPEN; HANSBRO; MCALINDEN; KIM *et al.*, 2017; YAMASAKI; EEDEN, 2018) (Figura 6B).

Já foi observado que o macrófago M2 é particularmente significativo na DPOC, uma vez que essas células podem promover remodelação tecidual inadequada e fibrose, e acredita-se que contribuam para o dano tecidual na DPOC (BARNES, 2008; BOZINOVSKI; CROSS; VLAHOS; JONES *et al.*, 2005; KAKU; IMAOKA; MORIMATSU; KOMOHARA *et al.*, 2014; VLAHOS; BOZINOVSKI, 2014).

Um estudo mostrou que pacientes com DPOC grave apresentaram números aumentados de monócitos não clássicos, em comparação com indivíduos hígidos normais e pacientes com DPOC moderado. Além disso, os níveis de expressão de marcadores M2 nos monócitos em pacientes com DPOC grave foram significativamente elevados. Nesse estudo os autores propõem que esses monócitos poderiam ser precursores dos macrófagos pulmonares do tipo M2 e que essas células iniciam o seu desenvolvimento já na circulação, e podem vir a ser fontes desses macrófagos pulmonares em doenças graves (CORNWELL; KIM; FAN; VEGA *et al.*, 2018).

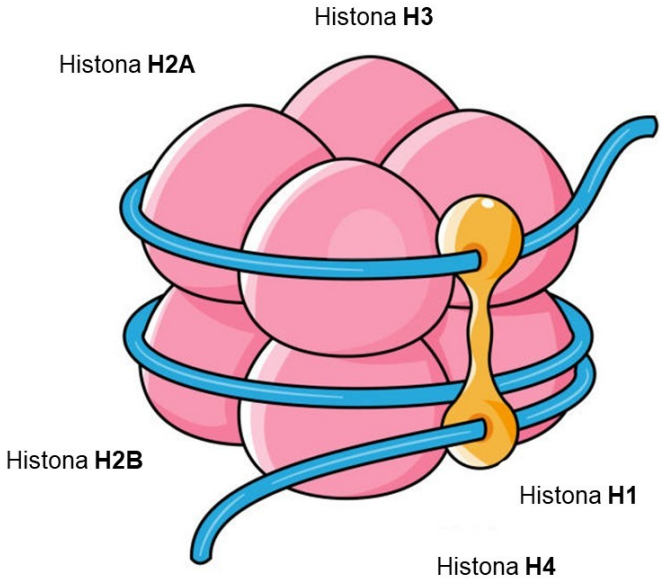
1.11 Regulação epigenética na DPOC

A inflamação na DPOC é regulada por diversos mecanismos incluindo modificações pós-traducionais (PTMs) de histonas. A mais bem estudada das PTMs é a acetilação. Mecanismos epigenéticos vêm sendo cada vez mais associados à progressão da doença na DPOC e têm demonstrado desempenhar um papel fundamental na regulação da inflamação.

As células eucarióticas apresentam em seu núcleo o DNA genômico compartimentalizado em unidades chamadas de nucleossomos. Estes são formados por aproximadamente 150 pb de DNA envolvendo um octâmero de histonas,

constituído de duas cópias das histonas H2A, H2B, H3, H4 (LUGER; DECHASSA; TREMETHICK, 2012) (Figura 7).

Figura – 7 Estrutura esquemática do nucleossomo



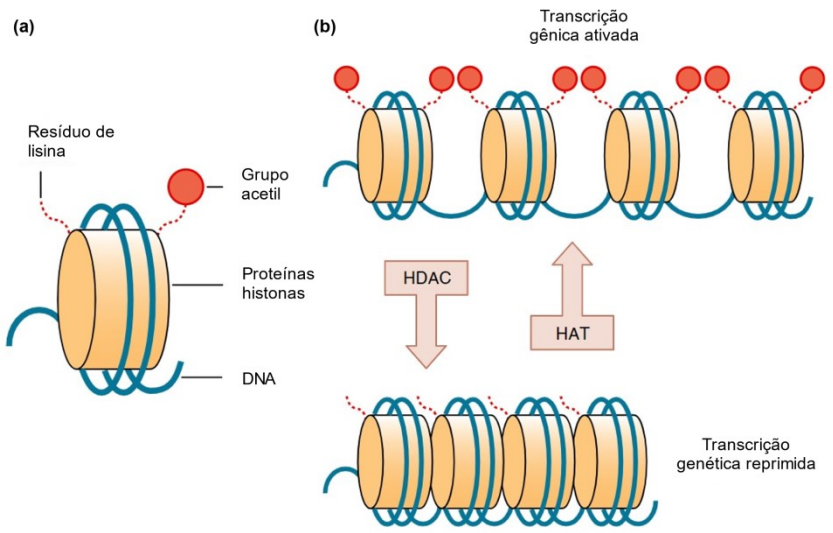
Legenda: O nucleossomo possui duas cópias de cada histona central (H2A, H2B, H3 e H4) e aproximadamente 150 pb de DNA.
Disponível em: <https://www.shutterstock.com/pt/image-vector/structure-histone-protein-dna-complex-illustration-1996300514>. Acesso em: 18 de jan. 2023.

Os nucleossomos atuam na expressão gênica, sua carga positiva se adere à carga negativa do DNA inibindo a interação com proteínas de ligação ao DNA, como os fatores de transcrição. As histonas funcionam tanto positivamente quanto negativamente na regulação da expressão gênica (CONSORTIUM, 2012). A expressão gênica é principalmente governada por modificações pós-traducionais em resíduos de aminoácidos específicos em histonas, incluindo metilação (adição de grupo metila), fosforilação (adição de grupo fosfato), ubiquitinação (adição de ubiquitina) e acetilação (adição de grupo acetila). Em especial, a acetilação e metilação em resíduos específicos de lisina são importantes para a regulação epigenética (KOUZARIDES, 2007).

A acetilação de histonas foi descoberta pela primeira vez no início da década de 1960 (ALLFREY; FAULKNER; MIRSKY, 1964; PHILLIPS, 1963). A acetilação é catalisada por enzimas conhecidas como histonas acetiltransferases (HATs),

alternativamente, as histonas desacetilases (HDACs) removem grupos acetil em um processo chamado de desacetilação de histonas (BERTOS; WANG; YANG, 2001) (Figura 8).

Figura – 8 Acetilação e desacetilação de histonas



Legenda: O nucleossomo é constituído por proteínas histonas e é a principal unidade estrutural da cromatina (a). As HAT e HDAC regulam a remodelação da cromatina e influenciam a transcrição gênica. As HATs adicionam grupos acetil em resíduos de lisina (acetilação) assim reduz a afinidade entre a histona e o DNA. As HDACs deixam a cromatina compacta impedindo a transcrição gênica (b).

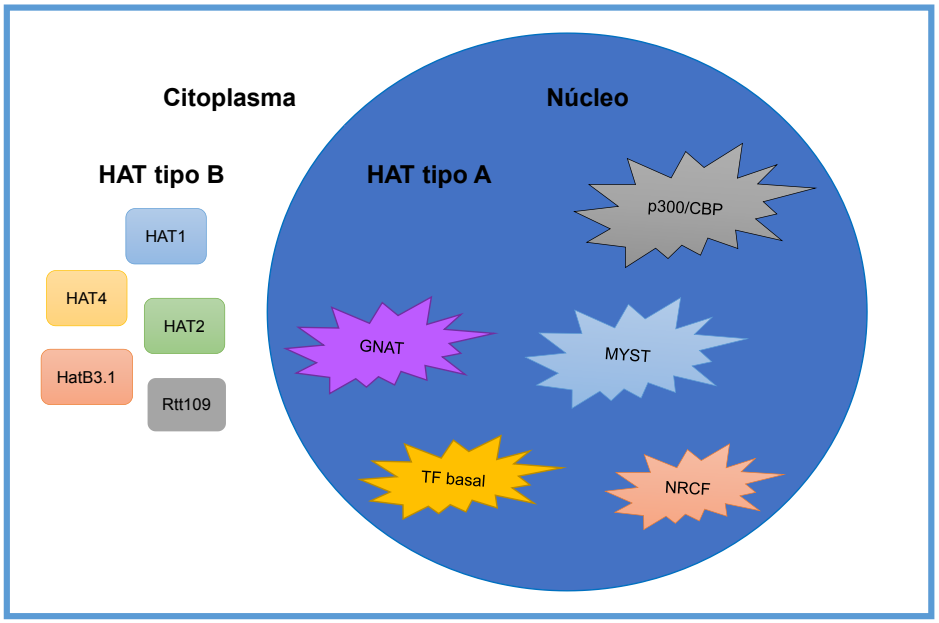
Fonte: Adaptado de: (FELICE; LEWIS; ARMUZZI; LINDSAY et al., 2015).

A acetilação/desacetilação da histona afeta a estrutura da cromatina e a expressão gênica o que pode tornar o DNA acessível à transcrição. A acetilação de resíduos de lisina leva a uma estrutura de cromatina transcricionalmente ativa (eucromatina) e a desacetilação leva a uma estrutura de cromatina inativa e condensada (heterocromatina) (MARTIRE; BANASZYNSKI, 2020).

1.11.1 Histona acetiltransferases na DPOC

As HATs são divididas em dois tipos: nucleares (HATs tipo A) e citoplasmáticas (HATs tipo B). As HATs do tipo A estão relacionadas à transcrição e são classificadas em cinco famílias: família GNAT, família p300/CBP (proteína associada à adenovírus E1A de 300 kDa/ proteína de ligação a CREB), família MYST, TF basal (Fator de Transcrição), família NRCF (cofatores de receptores nucleares). As HATs do tipo B são responsáveis pela acetilação relacionada à deposição de substratos de histonas livres, que são HAT1, HAT2 (BURGESS; ZHOU; HAN; ZHANG, 2010; PARTHUN; WIDOM; GOTTSCHLING, 1996; SKLENAR; PARTHUN, 2004; YANG; YU; SHI; SUN *et al.*, 2011) (Figura 9).

Figura – 9 Classificações das HATs



Legenda: As HATs são divididas em dois tipos: tipo A e tipo B. As HATs tipo A nucleares são divididas em cinco famílias: família GNAT, família p300/CBP, família MYST, família TF basal e família NRCF; tipo B são HATs citoplasmáticas. As HATs tipo B citoplasmáticas são divididas em HAT1, HAT2, HatB3. 1, Rtt109 e HAT4.
Fonte: Adaptado de: (WANG; MIAO; LIU; LI *et al.*, 2014).

As HATs acetilam os resíduos de lisina nas histonas, neutralizando sua carga positiva, e assim diminui sua capacidade de se ligar ao DNA carregado negativamente (MARTIRE; BANASZYNSKI, 2020). Há 20 anos o papel das HATs tem sido relacionado com a patogênese da DPOC, e foi demonstrado que os inibidores de HAT poderiam ser usados em aplicações clínicas como um aspecto terapêutico. (DEKKER; HAISMA, 2009).

Entre as HATs a p300 tem sido a proteína mais estudada, pois está associada à ativação transcricional de vários genes em resposta à sinalização celular. Foi observado que o aumento da atividade e expressão de p300 estava associado a diferentes doenças, incluindo fibrose pulmonar e síndrome do desconforto respiratório agudo (CHEN; HUANG; ZHAO; QI *et al.*, 2020; RUBIO; SINGH; DOBERSCH; SARVARI *et al.*, 2019). Também foi visto que a deficiência genética e a inibição farmacológica de p300 poderia anular a fibrose pulmonar tanto *in vitro* quanto *in vivo* (RUBIO; SINGH; DOBERSCH; SARVARI *et al.*, 2019; TAO; ZHANG; WEN; WANG *et al.*, 2018).

1.11.2 Histona desacetilases na DPOC

As HDACs reprimem a transcrição gênica, formando um complexo com fatores de transcrição e outras proteínas para regular processos celulares, tais como progressão do ciclo celular, sobrevivência e diferenciação. Já foram descritas 18 HDACs humanas (MARKS, 2010). Elas são divididas em quatro classes com base em sua homologia com desacetilases de levedura: classe I, classe II, classe III e classe IV. (MARKS, 2010) (Tabela 2).

Tabela 2 – Classificações das HDACs

	Classe		Tipo	Localização
HDACs dependente de Zn2	Classe I		HDAC 1	Núcleo
			HDAC 2	
			HDAC 3	
			HDAC 8	
	Classe II	Classe IIa	HDAC 4	Núcleo e citoplasma
			HDAC 5	
			HDAC 7	
			HDAC 9	
		Classe IIb	HDAC 6	Citoplasma (principalmente)
			HDAC 10	
	Classe IV		HDAC 11	Núcleo e citoplasma
HDACs dependente de NAD+	Classe III		SIRT 1	Núcleo e citoplasma
			SIRT 2	
			SIRT 3	Mitocondria
			SIRT 4	
			SIRT 5	
			SIRT 6	
			SIRT 7	

Fonte: Emerging Role of HDACs in Regeneration and Ageing in the Peripheral Nervous System: Repair Schwann Cells as Pivotal Targets, 2022.

A classe I é composta por HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8. A classe II é dividida em dois grupos: classe IIa, que inclui HDAC4, HDAC5, HDAC7 e HDAC9, e classe IIb, composta por HDAC6 e HDAC10. A classe III é composta por Sirtuinas (SIRT) 1–7. A classe IV é formada apenas por HDAC11. A atividade enzimática das HDACs classe I, classe II e classe IV depende dos íons Zn 2+. A atividade enzimática da Classe III depende dos níveis de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) + (LUO; LI, 2020).

a) As HDACs de classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8) regulam mecanismos celulares fundamentais, como proliferação celular, sobrevivência e migração. (MARKS, 2010).

b) As HDACs de classe IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 e HDAC9) são expressas no coração, músculo esquelético, cérebro e pâncreas, e desempenham um papel significativo no desenvolvimento de condrócitos e osteócitos. Eles também são relevantes para a diferenciação de timócitos e manutenção do miocárdio (DI GIORGIO; BRANCOLINI, 2016; KATHERINE VERVERIS, 2012; MARKS, 2010).

c) As HDACs classe IIb (HDAC6, HDAC10) são principalmente citoplasmáticas e parecem ser importantes para a motilidade celular. As HDAC6 e HDAC10 são expressos no cérebro, coração, fígado, rim, pâncreas e baço (CHENG; ZHENG; WANG; ZHAO *et al.*, 2021; LI; ZHANG; HASSAN; LIU *et al.*, 2018; MARKS, 2010).

d) As HDACs de classe III são dependentes de NAD + e são conhecidas como SIRTs. Estão presentes no núcleo, citoplasma e mitocôndrias e possuem atividades de desacetilases e ADP ribosil transferase que regulam outras proteínas (BURGER; CHORY, 2018; KCIUK; KONTEK, 2020).

e) As HDACs classe IV (HDAC11) regulam a expressão da IL-10 e o fator de replicação do DNA CDT1. HDAC11 tem uma localização subcelular ubíqua, mas está predominantemente no núcleo. É altamente expresso no cérebro, mas está presente no músculo esquelético, coração, rim e testículos (GAO; CUETO; ASSELBERGS; ATADJA, 2002; LI; TIAN; ZHU, 2020).

Estudos recentes vêm sugerindo as HDACs como alvos de abordagens terapêuticas (SHANMUGAM; RAKSHIT; SARKAR, 2022). Foi demostrado que a HDAC2 estava diminuída após a exposição a partículas inaláveis, de diâmetro

inferior a 2,5 micrometros (µm) (PM2.5), e que a deficiência de HDAC2 aumentou a polarização de macrófagos alveolares para o perfil M2, induzido por PM2.5, resultando em progressão da DPOC (JIANG; ZHAO; WANG; CHEN et al., 2020). Além disso, o nocaute de HDAC2 apresentou um aumento de dano ao DNA induzido pela fumaça do cigarro, resposta inflamatória e senescência celular em modelos de camundongos, reafirmando que a HDAC2 tem um papel importante na DPOC associada à fumaça do cigarro (SUNDAR; RASHID; GERLOFF; RANGEL-MORENO et al., 2018).

Adenuga e colaboradores verificaram que a expressão de HDAC2 e sua atividade enzimática em pacientes com DPOC foram significativamente reduzidas, e correlacionada com inflamação excessiva (ADENUGA; YAO; MARCH; SEAGRAVE *et al.*, 2009). A atividade diminuída de HDAC2 está associada à resistência a glicocorticoides, ao estresse oxidativo elevado, assim como a mediadores pró-inflamatórios na DPOC induzida pela fumaça do cigarro (CHUNG; ADCOCK, 2008).

A HDAC3 desacetila a lisina 122, 123, 314 e 315, que em sua forma acetilada regula negativamente a atividade do fator nuclear kappa B (NF-κB). A acetilação das lisinas 122 e 123 inibe a ligação ao DNA. A acetilação das lisinas 314 e 315 direciona o NF-κB para regiões promotoras específicas, controlando o sítio de ligação do NF-κB na asma. O NF-κB acetilado regula a transcrição de genes relacionados à proliferação e inflamação (HUANG; YANG; ZHOU; OZATO *et al.*, 2009; KIERNAN; BRES; NG; COUDART *et al.*, 2003; ROTHGIESSER; FEY; HOTTIGER, 2010; ZIESCHE; KETTNER-BUHROW; WEBER; WITTWER *et al.*, 2013). Também foi observado que os macrófagos deficientes em HDAC3 induzem apenas metade dos genes inflamatórios induzidos por LPS (CHEN; BAROZZI; TERMANINI; PROSPERINI *et al.*, 2012). Os inibidores de HDAC3 foram propostos como alvos terapêuticos para combater a inflamação na DPOC e na asma, visto que a HDAC3 é um regulador positivo da inflamação mediada por NF-κB. (LEUS; ZWINDERMAN; DEKKER, 2016). Estudos sugerem que a inibição seletiva de HDAC3 em macrófagos estimulados por LPS/IFN-γ atenuou a atividade transcricional de NF-kB resultando em efeitos anti-inflamatórios. Além disso, a regulação negativa de HDAC3 mediada por siRNA reduziu a expressão de genes pró-inflamatórios IL-1β, IL-6 e IL-12b em até 60%. Corroborando a relevância da HDAC3 na inflamação (LEUS; VAN DER WOUDEN; VAN DEN BOSCH; HOOGHIEMSTRA *et al.*, 2016).

Um estudo *in vivo* e *in vitro* com inibidores de HDAC4, sugeriu um papel anti-inflamatório no enfisema. As HDAC4 estão diminuídas em pacientes com DPOC e é importante na fibrose pulmonar. A HDAC4 pode modular a produção de matriz extracelular (MEC) em miofibroblastos pulmonares (KHALIL; XIA; BODEMPUDI; KAHM *et al.*, 2015; SAITO; ZHUANG; SHAN; DANCHUK *et al.*, 2017; SAITO; ZHUANG; SUZUKI; OTA *et al.*, 2019).

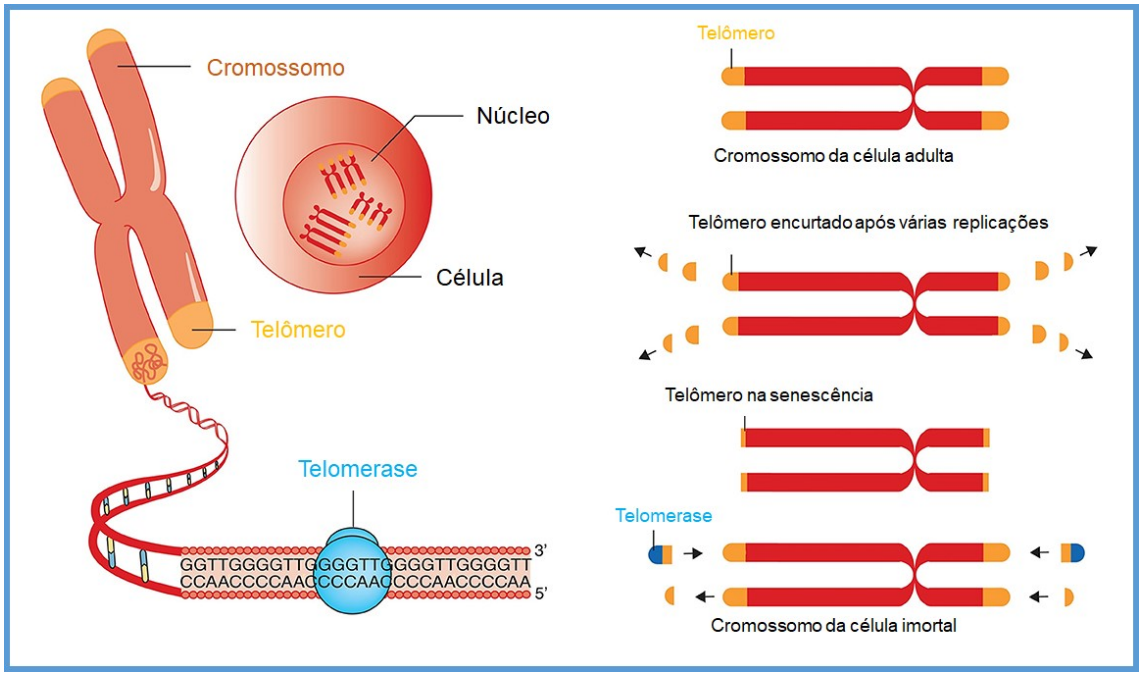
1.12 **Papel dos telômeros na DPOC**

Os telômeros são estruturas de nucleoproteínas que cobrem as extremidades dos cromossomos lineares (BLACKBURN, 1984; MEYNE; RATLIFF; MOYZIS, 1989). A cada divisão celular um pequeno fragmento de DNA nas extremidades do cromossomo permanece não replicado devido a um fenômeno fisiológico chamado problema da replicação final (HARLEY; FUTCHER; GREIDER, 1990). Para não haver uma perda da informação genética codificante, milhares de oligonucleotídeos idênticos e não codificantes são anexados às extremidades dos cromossomos. Essas porções finais de DNA não codificantes são chamadas de telômeros. Os telômeros humanos contêm aproximadamente 2.500 cópias em tandem de um hexanucleotídeo simples com a sequência 5'-TTAGGG n - 3' ligadas por um conjunto de proteínas que modulam suas funções biológicas e as protegem de serem reconhecidas como injúrias capazes de desencadear uma resposta a danos no DNA (DDR) (HARLEY; FUTCHER; GREIDER, 1990; MEYNE; RATLIFF; MOYZIS, 1989). Os telômeros também impedem que as extremidades dos cromossomos sofram degradação nucleolítica, recombinação, reparo contribuindo dessa forma, para a estabilidade genômica (BLACKBURN; EPEL; LIN, 2015; SHAMMAS, 2011; WISE; CROUT; MCNEIL; WEYANT *et al.*, 2009).

O DNA telomérico humano varia de 10 a 15 kb de repetições. A cada divisão celular o DNA telomérico encurta em 50 a 200 pb. Esse processo de encurtamento, em parte é devido à replicação incompleta da fita atrasada pelas DNA polimerases, estresse oxidativo e outros fatores moduladores (HARLEY; FUTCHER; GREIDER, 1990; SANDERS; NEWMAN, 2013). O encurtamento dos telômeros serve como um relógio para o tempo de vida replicativo das células (PALM; DE LANGE, 2008). A

divisão celular sucessiva faz com que os telômeros atinjam um comprimento criticamente curto que desencadeia a senescência celular, limitando a capacidade proliferativa da célula. Células que possuem um perfil altamente proliferativo, como por exemplos as células-tronco, resolvem esse problema com a enzima telomerase (HIYAMA; HIYAMA, 2007) (Figura 10).

Figura – 10 Encurtamento gradual dos telômeros



Legenda: Encurtamentos dos telômeros. Os telômeros encurtam a cada ciclo replicativo. A enzima telomerase tem como função estender as extremidades dos telômeros. Essa enzima prolonga a vida das células e induz a imortalidade, uma das características das células cancerígenas.
Fonte: Adaptado de: (VAISERMAN; KRASNIENKOV, 2020).

O comprimento dos telômeros dos leucócitos do sangue periférico tem sido reportado como um importante marcador de idade biológica (BLASCO, 2005). O comprimento dos telômeros dos leucócitos em adultos é de aproximadamente 11 kb e diminui anualmente em torno de 30-35 pb. Esse desgaste dos telômeros acontece com mais frequência nos dois primeiros anos de vida, que são caracterizados por um rápido crescimento somático (CHEN; KIMURA; KIM; CAO *et al.*, 2011; DLOUHA; MALUSKOVA; KRALOVA LESNA; LANSKA *et al.*, 2014; SIDOROV; KIMURA; YASHIN; AVIV, 2009; VON ZGLINICKI; MARTIN-RUIZ, 2005). A telomerase é uma

capaz de adicionar novos hexanucleotídeos às extremidades teloméricas (BODNAR; OUELLETTE; FROLKIS; HOLT *et al.*, 1998; GREIDER; BLACKBURN, 1985). Porém a maioria das células somáticas não expressa a telomerase. Elas são detectadas em grande quantidade em linhagem germinativa, células-tronco embrionárias, células imunes e em células cancerígenas (BERNARDES DE JESUS; BLASCO, 2011; TOMAS-LOBA; FLORES; FERNANDEZ-MARCOS; CAYUELA *et al.*, 2008).

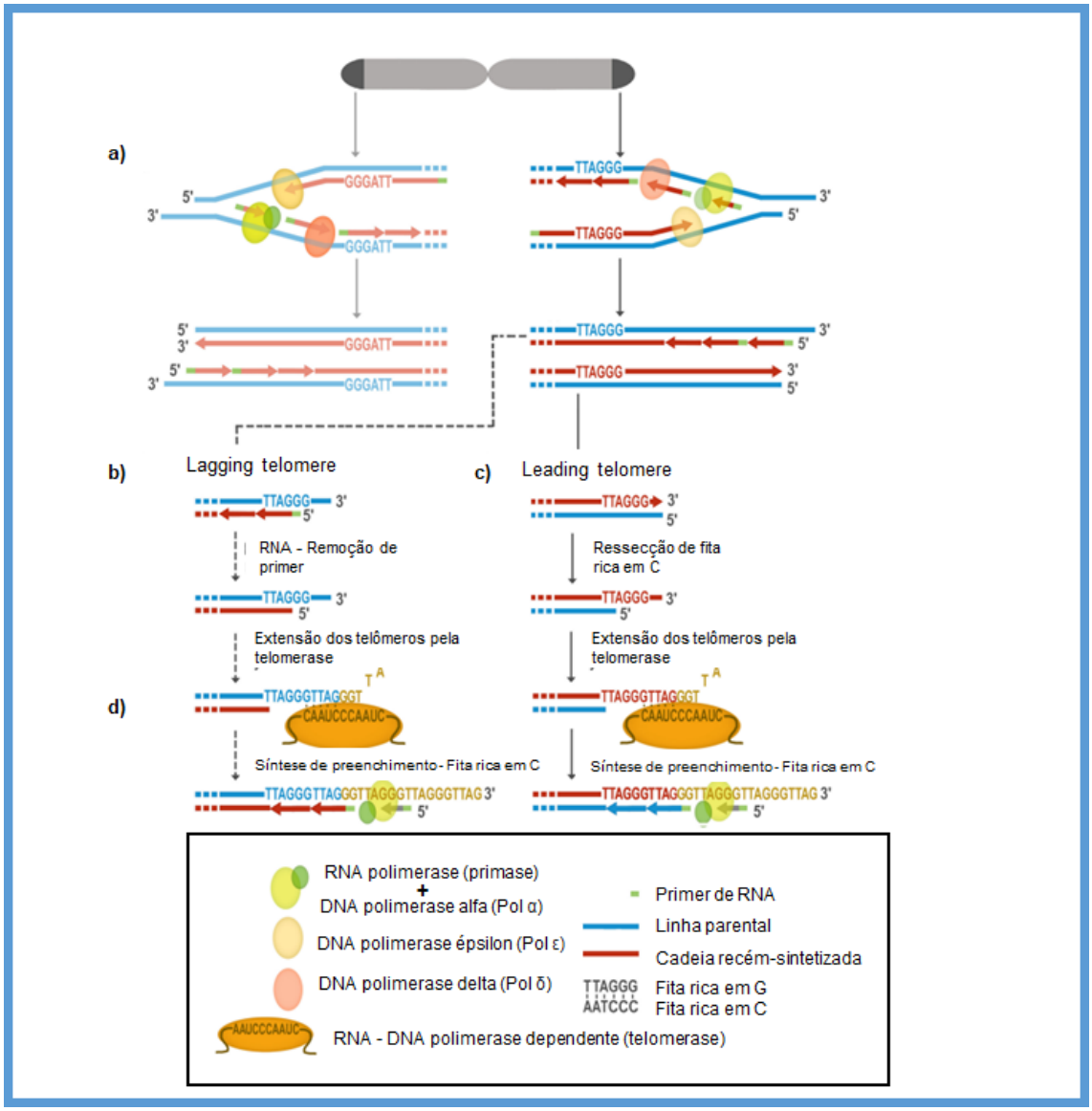
1.13 **Telomerase**

A telomerase é um complexo de ribonucleoproteína (RNP) que adiciona nucleotídeos às extremidades teloméricas. Ela possui dois componentes principais, a transcriptase reversa da telomerase (TERT) e o componente de RNA da telomerase (TERC) dotado de uma sequência complementar de DNA telomérico (3'-AUCCC-5'). O TERC fornece o molde para a síntese de novas repetições teloméricas, enquanto a TERT estende as extremidades dos cromossomos de maneira dependente do molde TERC (FENG; FUNK; WANG; WEINRICH *et al.*, 1995). Em humanos, o complexo enzimático da telomerase interage com várias proteínas, incluindo a disqueratose congênita 1 (DKC1) e a ribonucleoproteína NOP10 (NOP10), que são essenciais para a manutenção da integridade dos telômeros. A telomerase equilibra a perda de telômeros que ocorre durante cada ciclo da replicação (CONG; WRIGHT; SHAY, 2002; GU; BESSLER; MASON, 2009).

O problema da replicação final foi definido pela primeira vez por Olovnikov (OLOVNIKOV, 1971). Durante a replicação semiconservativa do DNA, cada fita de DNA serve como molde para as DNA polimerases (DNA Pol ε e DNA Pol δ) sintetizarem uma nova fita complementar. A primase é uma RNA polimerase especializada, que sintetiza um *primer* de RNA para auxiliar a replicação do DNA na fita líder e diversos *primers* iniciam a síntese do fragmento de Okazaki na fita atrasada (telômero *Lagging*) (LEMAN; NOGUCHI, 2013). O telômero recém-replicado resultante da síntese da fita atrasada retém o *primer* de RNA terminal, que é posteriormente removido. A fixação do último *primer* de RNA e em seguida a remoção do *primer*, cria uma saliência na fita de DNA rica em guanina (G). O produto inicial da síntese de DNA da fita líder (telômero *leading*) é uma fita rica em

citosina (C), que é então removida por uma exonuclease e cria uma saliência rica em G. Em células com uma polimerase de DNA dependente, essas saliências ricas em G, que são originárias de telômeros *Lagging* ou *Leading* podem ser alongadas (GILSON; GELI, 2007). A telomerase carrega sua própria molécula de RNA, que é usada como molde, e pode hibridizar os primeiros nucleotídeos de sua região molde aos nucleotídeos mais distais da saliência rica em G do DNA do telômero. A fita complementar rica em C é então preenchida pela DNA Pol α-primase (DIEDE; GOTTSCHLING, 1999; SCHRUMPFOVA; FAJKUS, 2020) (Figura 11).

Figura – 11 Problema da replicação final



Legenda: Replicação do DNA em eucariotos. A síntese do DNA é realizada pela DNA Pol ε e DNA Pol δ (a). Síntese de DNA da fita atrasada (telômero *lagging*), remoção do *primer* de RNA e extensão dos telômeros pela telomerase (b). Síntese de DNA da fita líder (telômero *leading*), ressecção da fita rica em C por uma exonuclease e extensão dos telômeros pela telomerase (c). A telomerase possui a sua própria molécula de RNA, que é usada como molde. A fita complementar rica em C é preenchida pela DNA Pol α-primase (d).

Fonte: Adaptado de: (SCHRUMPFOVA; FAJKUS, 2020).

A telomerase está ativa em células em divisão contínua para resolver o problema de replicação final. Porém a sua atividade não controlada em células somáticas pode ser tumorigênica. Já foi observado que de fato a telomerase é regulada positivamente em mais de 90% de todos os cânceres (KIM; PIATYSZEK; PROWSE; HARLEY *et al.*, 1994). A expressão da telomerase é reprimida nas células somáticas após a diferenciação, impedindo o alongamento indesejado dos telômeros que pode levar à imortalidade replicativa. A expressão exógena da telomerase em células somáticas promove o alongamento dos telômeros, contornando a senescência e permitindo a divisão celular contínua (BODNAR; OUELLETTE; FROLKIS; HOLT *et al.*, 1998). A perda da telomerase nas células em divisão contínua da linhagem germinativa leva ao encurtamento progressivo dos telômeros e resulta em senescência (BLASCO; LEE; HANDE; SAMPER *et al.*, 1997; LEE; BLASCO; GOTTLIEB; HORNER *et al.*, 1998).

1.14 **Senescência celular**

A senescência celular consiste em um estado de parada de crescimento irreversível caracterizada por alterações morfológicas e secreção de diversos fatores extracelulares, como as citocinas, fatores de crescimento e proteases. Esses fatores extracelulares têm efeitos autócrinos e parácrinos definidos como fenótipo secretor associado à senescência (SASP). A maioria das células senescentes tem a atividade de β-galactosidase associada à senescência (SA-βgal), resultado do aumento da massa lisossomal em células senescentes, e além disso ausência de marcadores proliferativos e aumento da expressão de inibidores do ciclo celular, supressores de tumor e marcadores de dano ao DNA (RODIER; CAMPISI, 2011).

A senescência pode ocorrer durante o desenvolvimento embrionário ou em resposta a agentes estressores, como danos ao DNA, mutações oncogênicas, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e inibição da autofagia (HAMSANATHAN; ALDER; SELLARES; ROJAS *et al.*, 2019; MUNOZ-ESPIN; SERRANO, 2014; RODIER; CAMPISI, 2011). Esses estímulos ativam vias de sinalização, como MKK3/MKK6, RAS, MYC, PI3K e TGFβ, que promove à ativação de inibidores do ciclo celular e da proteína supressora de tumor retinoblastoma (RB) (MUNOZ-

ESPIN; SERRANO, 2014). Essas vias interagem para promover a senescência através da ativação e desfosforilação de RB, que interrompe a proliferação celular, impedindo a transcrição de genes envolvidos na fase S do ciclo celular. (ZHANG, 2007). Os inibidores de quinase dependente de ciclina (CDK), que mantêm RB em um estado não fosforilado, incluem os membros INK4 p15, p16, p18 e p19 e os membros CIP/KIP p21, p27 e p57. A ativação do supressor tumoral p53 pela quinase mutada de ataxia-telangiectasia (ATM) /quinase relacionada à Rad3 (ATR) e quinases Chk1/Chk2 após dano genômico promove a senescência através da ativação subsequente de p21 e desfosforilação de RB (HELT; CLIBY; KENG; BAMBARA *et al.*, 2005; ZHANG, 2007).

Para definir a senescência em culturas de células e tecidos geralmente são necessários vários marcadores e ensaios funcionais, que incluem os inibidores de CDK p16 e p21, analisar o comprimento dos telômeros, avaliar a SA-βgal, estudos de proliferação e marcadores de danos no DNA, como histona fosforilada (HAMSANATHAN; ALDER; SELLARES; ROJAS *et al.*, 2019; MUNOZ-ESPIN; SERRANO, 2014).

1.14.1 Senescência celular na DPOC

A DPOC é reconhecida como uma doença do envelhecimento pulmonar acelerado. Estudos crescentes sugerem que há um acúmulo de células senescentes dentro dos pulmões de pacientes com DPOC que contribui para o reparo tecidual desregulado e a secreção de diversas proteínas inflamatórias, denominado SASP. A senescência celular na DPOC está relacionada à disfunção dos telômeros, danos ao DNA e estresse oxidativo (XIE; LIU; CAO; GUO *et al.*, 2020). A exposição ao extrato da fumaça do cigarro (EFC) e a fumaça do cigarro pode contribuir para a senescência celular em culturas de células e tecidos pulmonares de camundongos, induzindo encurtamento ou danos dos telômeros (AHMAD; SUNDAR; TORMOS; LERNER *et al.*, 2017; BIRCH; ANDERSON; CORREIA-MELO; JURK *et al.*, 2015; SAITO; ARAYA; ITO; TSUBOUCHI *et al.*, 2019).

Estudos mostraram um aumento de células senescentes em pacientes com DPOC em comparação com fumantes da mesma idade ou controles saudáveis não

fumantes. Frequências aumentadas já foram descritas em pneumócitos tipo II, células endoteliais e células do músculo liso da artéria pulmonar com coloração positiva de marcadores de senescência celular, como p16 ou p21 no tecido pulmonar de pacientes com DPOC ou enfisema em comparação com fumantes ou controles não fumantes (AMSELLEM; GARY-BOBO; MARCOS; MAITRE *et al.*, 2011; AOSHIBA; ZHOU; TSUJI; NAGAI, 2012; COTTAGE; PETERSON; KEARLEY; BERLIN *et al.*, 2019; NOUREDDINE; GARY-BOBO; ALIFANO; MARCOS *et al.*, 2011; TSUJI; AOSHIBA; NAGAI, 2004; 2006).

Estudos anteriores mostraram telômeros curtos em pacientes jovens e idosos com DPOC com limitação grave do fluxo aéreo em comparação com controles jovens e idosos, sugerindo que o encurtamento dos telômeros pode estar envolvido no envelhecimento acelerado nesses indivíduos (CASAS-RECASENS; MENDOZA; LOPEZ-GIRALDO; GARCIA et al., 2021). Além disso, também foi observado que o tabagismo está significativamente associado à perda de telômeros em linfócitos circulantes (MORLA; BUSQUETS; PONS; SAULEDA et al., 2006).

Sadr e colaboradores mostraram que o comprimento dos telômeros em pacientes com DPOC foi menor do que em controles fumantes e não fumantes, independentemente da idade e sexo (SADR; NOORI MUGAHI; HASSANZADEH; NADJI et al., 2015). Em um estudo observacional Cordoba-Lanus e colaboradores mostraram que encurtamento acelerado dos telômeros ao longo do tempo está associado a pior função das trocas gasosas alveolares, pior hiperinsuflação pulmonar e acometimento extrapulmonar em pacientes com DPOC (CORDOBA-LANUS; CAZORLA-RIVERO; GARCIA-BELLO; MAYATO et al., 2021).

Definir marcadores confiáveis de senescência na DPOC não é uma tarefa muito fácil, pois as células senescentes são significativamente heterogêneas com perfis proteômicos e de expressão gênica distintos, dependendo do tipo de célula e estressores (HAMSANATHAN; ALDER; SELLARES; ROJAS *et al.*, 2019; MATJUSAITIS; CHIN; SARNOSKI; STOLZING, 2016; MUNOZ-ESPIN; SERRANO, 2014). Além disso, os biomarcadores de senescência, como os fatores pró-inflamatórios característicos da SASP, são frequentemente inespecíficos, ocorrendo em outros contextos celulares e inflamatórios. Outro aspecto crítico são os múltiplos mediadores moleculares da senescência que contribuem na patologia da doença. Por exemplo, camundongos knock-out p16 (KO) expostos à fumaça do cigarro não têm diminuição da inflamação pulmonar ou aumento do espaço aéreo em

comparação com os controles, o que sugere que outras vias além daquelas reguladas por p16 contribuem para a senescência celular induzida pela fumaça do cigarro na DPOC e enfisema (SUNDAR; RASHID; GERLOFF; LI *et al.*, 2018). Embora haja essas complexidades, vários estudos mostraram associações entre os marcadores de senescência e os processos patológicos na DPOC.

2 JUSTIFICATICA

A doença pulmonar obstrutiva crônica é considerada umas das principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo (HALBERT; NATOLI; GANO; BADAMGARAV *et al.*, 2006; MATHERS; LONCAR, 2006). A DPOC é uma doença heterogênea em sua apresentação clínica, apresenta diferentes gravidades e é caracterizada por uma obstrução progressiva e persistente do fluxo aéreo. (PATEL; PATEL; SINGH; SINGH et al., 2019). Pesquisas sobre os fenótipos da DPOC (DPOC-asma, exacerbador e enfisema com hiperinsuflação) permitem abordagens clínicas mais individualizadas para pacientes com a doença. A inflamação crônica observada na DPOC está associada ao aumento na liberação de vários mediadores pró-inflamatória como lipídios, citocinas e quimiocinas, que são regulados por fatores de transcrição genética. As células atuantes na inflamação da DPOC são macrófagos, células epiteliais, neutrófilos, linfócitos T CD8 e nos períodos de exacerbação, eosinófilos (BARNES; SHAPIRO; PAUWELS, 2003). O macrófago desempenha um papel central na fisiopatologia da DPOC. Embora muitos estudos tenham caracterizado o perfil dos macrófagos, o fenótipo dessas células nos diferentes fenótipos e gravidade da DPOC ainda não está bem compreendido. A base molecular da amplificação da inflamação na DPOC ainda não foi completamente elucidada, o balanço das histonas acetiltransferases e histonas desacetilases têm sido reportados como elementos influentes na transcrição de genes pró-inflamatórios (SILVERMAN, 2006). Entender o perfil de expressão e atividade destas enzimas (HAT e HDAC) nos diferentes fenótipos e gravidade da DPOC poderá trazer conhecimentos na fisiopatologia da doença e contribuições no desenvolvimento de alvos específicos de inibição e consequentemente no melhor direcionamento e perspectiva de sua terapêutica específica de acordo com a classificação de seu fenótipo e gravidade da DPOC. Além disso, as modificações das histonas desempenham um papel importante na regulação do dano/reparo do DNA, instabilidade genômica e envelhecimento prematuro A DPOC é uma doença relacionada ao envelhecimento. A senescência celular pulmonar e a resposta inflamatória são os principais eventos na patogênese da DPOC. Evidências crescentes sugerem um acúmulo de células senescentes nos pulmões de pacientes com DPOC contribui para o reparo tecidual desregulado e a secreção de múltiplas

proteínas inflamatórias. (KRISHNAN; CHOW; WANG; ZHANG *et al.*, 2011; OGIWARA; UI; OTSUKA; SATOH *et al.*, 2011; SARG; KOUTZAMANI; HELLIGER; RUNDQUIST *et al.*, 2002; VEMPATI; JAYANI; NOTANI; SENGUPTA *et al.*, 2010; YUAN; PU; ZHANG; LOU, 2009). Foi demonstrado que o HDAC2 protege contra a resposta a danos no DNA e senescência celular/envelhecimento prematuro por meio de um mecanismo epigenético em resposta ao estresse oxidativo (CHUNG; ADCOCK, 2008). Já foi observada uma redução na expressão de HDAC2 e sua atividade enzimática em pacientes com DPOC (ADENUGA; YAO; MARCH; SEAGRAVE *et al.*, 2009) o que pode contribuir para o envelhecimento prematuro. O comprimento dos telômeros é considerado um biomarcador do envelhecimento (HARLEY; FUTCHER; GREIDER, 1990; ZAKIAN, 1995). A avaliação do comprimento telomérico trará uma melhor compreensão sobre o envelhecimento precoce nos diferentes fenótipos e gravidade da DPOC e poderá contribuir para tratamentos mais eficazes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar se os pacientes DPOC (com diferentes fenótipos e gravidades) e fumantes sem a doença apresentam alterações genéticas específicas na expressão gênica de HAT-HDAC e nos telômeros, assim como, alterações no perfil celular de monócitos e macrófagos diferenciados.

3.2 Objetivos específicos:

a) Avaliar a expressão gênica de EP300 (HAT) e HDAC2, HDAC3 e HDAC4 nos diferentes fenótipos clínicos e gravidade de pacientes DPOC, assim como, em indivíduos fumantes sem a doença e controles saudáveis, acima de 40 anos;
b) Analisar o comprimento relativo dos telômeros nos diferentes fenótipos clínicos e gravidade de pacientes DPOC, assim como, em indivíduos fumantes sem a doença e controles saudáveis acima de 40 anos;
c) Examinar a frequência de monócitos circulantes clássicos ($CD14^{++}/CD16^{-}$), intermediários ($CD14^{+}/CD16^{+}$) e não clássicos ($CD14^{+}/CD16^{++}$) no sangue periférico de pacientes com DPOC e controles saudáveis acima de 40 anos;
d) Verificar o potencial de diferenciação de monócitos do sangue periférico de pacientes com DPOC e controles saudáveis acima de 40 anos quanto à expressão de marcadores associados aos perfis de macrófagos do tipo M1 (CD38+ e CD86+) e do tipo M2 (CD163+ e CD206+).

4 MATERIAS E MÉTODOS

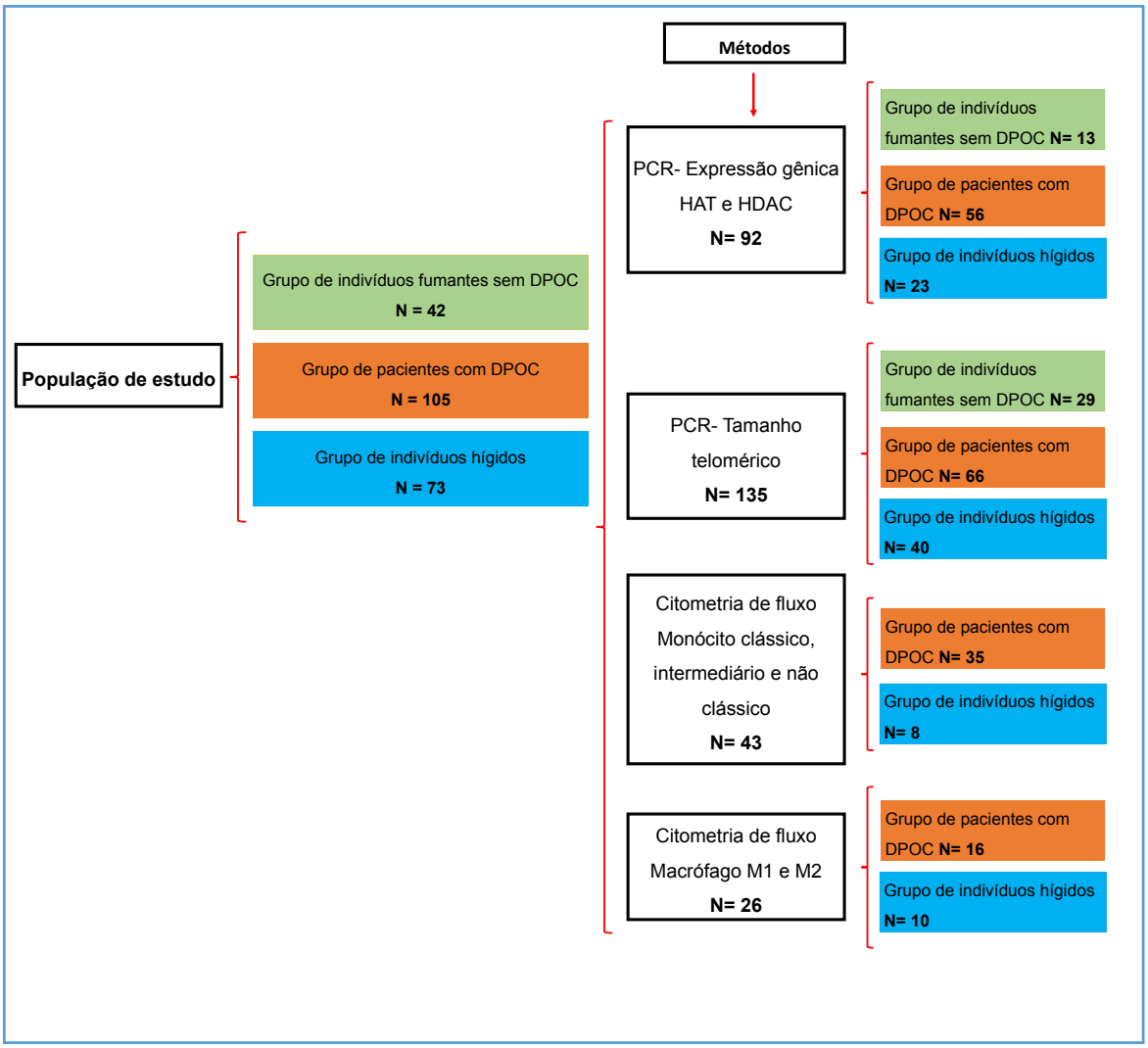
4.1 População de estudo

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ, (CAAE): 18267619.7.0000.5259 e número do parecer: 3.655.838 (anexo 1). Todos os sujeitos recrutados assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A população do estudo é composta de pacientes advindos dos Ambulatórios de DPOC e Tabagismo do Serviço de Pneumologia e Tisiologia – UERJ. Os indivíduos hígidos foram selecionados entre funcionários da instituição.

Os voluntários elegíveis para o estudo foram divididos em três grupos: O primeiro corresponde ao grupo controle hígido, incluindo não fumantes sem evidência de doença pulmonar à espirometria com idade ≥ 40 anos; O segundo grupo corresponde aos indivíduos fumantes sem evidência de doença pulmonar à espirometria com idade ≥ 40 anos; O terceiro grupo é composto por pacientes com DPOC com idade ≥ 40 anos, diagnóstico da doença comprovado por espirometria, além de carga tabágica superior a 20 maços por ano. A espirometria apresentou VEF1/CVF < 0,7 após o uso de salbutamol 400 µg caracterizando distúrbio ventilatório obstrutivo. Os pacientes com DPOC foram subdivididos de acordo com critérios clínicos que definem os três diferentes fenótipos para este estudo. As características dos pacientes com DPOC, fumantes e controles recrutados estão descritos por Bartholo e colaboradores (BARTHOLO; PORTO; POZZAN; NASCIMENTO *et al.*, 2019).

Foram recrutados um total de 105 pacientes com DPOC, 42 fumantes sem DPOC e 73 indivíduos hígidos controles. O quantitativo de amostras de participantes utilizadas em cada técnica está representado na Figura 12 e mais detalhes sobre as faixas etárias estão representados na tabela 3.

Figura 12 - Fluxograma com o tamanho amostral do estudo e sua distribuição em cada técnica



Legenda: Distribuição do quantitativo de amostras de pacientes, fumantes e controles hígidos incluídas no estudo e em cada técnica realizada.

4.2 **Caracterização do perfil de monócitos do sangue periférico humano**

Alíquotas de 100 µL de sangue foram incubadas com 5 µL de anticorpos anti-CD14- FITC, anti-CD16-PE e anti-HLDR-PC5 (Beckman Coulter) durante 10 minutos no escuro. Em seguida, foram adicionados 2 mL de tampão de lise de hemácia (BD biociences) durante 10 minutos; os tubos foram centrifugados a 1700 rpm durante 5 minutos, a 20ºC; o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em PBS 1x. Após nova centrifugação durante 5 minutos, o pellet celular foi ressuspendido em 500 µL de PBS1x com formol (1%) para fixar as células. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACS Calibur, BD, sendo obtidos 200.000 eventos. Os linfócitos T foram excluídos pela ausência de CD14, as células NK e neutrófilos foram excluídos pela falta de HLA-DR. Os dados foram analisados pelo programa Kalunza v5. Os resultados foram expressos em valores individuais (%). A compensação foi realizada utilizando anticorpos com fluorocromos de cor única para PE e FITC, respectivamente.

4.3 **Obtenção dos monócitos do sangue periférico humano**

Para essa etapa, foram colhidos 2 tubos de sangue em EDTA dos doadores voluntários. Posteriormente, esse sangue foi diluído na proporção 1:1 em PBS1x contendo 2 mM de EDTA (Invitrogen Eugene, OR, EUA). Em seguida, o sangue diluído foi adicionado lentamente em um tubo de 50 mL contendo 10 mL de Ficoll-Paque Plus (Ge Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido). O tubo foi centrifugado a 500xg durante 30 minutos a 20 ºC. O anel leucocitário formado foi coletado, com o auxílio de uma pipeta, transferido para um tubo de 15 mL e diluído com PBS1x (+EDTA) até 12 mL. Em seguida, foi realizada uma centrifugação de 500xg durante 10 minutos a 20 ºC. Após o descarte do sobrenadante, o pellet celular formado foi ressuspendido em 1 mL de meio de cultura completo RPMI 1640-Glutamax (SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA) com 1% de penicilina e 0,5% de estreptomicina (Invitrogen Eugene, OR, EUA). As células foram contadas na câmara

de Neubauer e semeadas em placas de 24 poços na concentração de $2x10^6$ células/mL/poço.

4.4 Cultura celular e estímulo

As células foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas em estufa a 37 ºC com 5% de CO^2. Após 1 hora de incubação, o meio RPMI 1640-GlutaMAX foi removido para retirada das células não aderentes. Neste protocolo, as células que aderiram são predominantemente monócitos. Em seguida essas células foram cultivadas por 5 dias em meio de cultura completo RPMI 1640-Glutamax contendo 1% de penicilina; 0,5% estreptomicina e 10% de soro fetal bovino; e suplementado com 50 ng/mL de GM-CSF (R&D System, Canadá, EUA), nas culturas para o perfil M1; ou 10 ng/mL M-CSF (R&D System, Canadá, EUA) nas culturas para o perfil M2.

Após 4 dias, o meio de cultura foi removido e as células diferenciadas foram privadas do GM-CSF e M-CSF por 24 horas. Foram acrescentadas nas culturas de M1, LPS (0,1 µg/mL) (E. coli 055: B5, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); e nas culturas M2, IL-4 (10 ng/mL) (R&D System, Canadá, EUA) como estímulos durante 24 horas.

4.5 Caracterização do perfil de macrófagos

Após 5 dias, a placa foi retirada da estufa e com o auxílio de uma ponteira de 200 µL as células diferenciadas foram desprendidas suavemente e coletadas em tubos de 12 mL. Após uma lavagem em 4 mL de PBS1x, as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS1x e contadas em câmara de Neubauer.

Para a etapa de marcação, as suspensões celulares foram distribuídas em placa de fundo U (até $2x10^6$ células/poço) e posteriormente incubadas, no escuro, com os anticorpos de superfície: anti-CD38-FITC, anti-CD86-PE Cyanine5, anti-CD163-PE Cyanine7 e anti-CD206-PE (Invitrogen) em 100 µL de PBS1x (+10% FCS) durante 20 minutos. A seguir, as células foram lavadas com 150 µL de PBS1x

(+10% FCS), durante 6 minutos, em centrifugação de 1700rpm e ressuspensas em 200µl de PBS1x. As amostras foram adquiridas no citômetro Gallios (Beckman Coulter) e analisadas no programa Flowjo (BD).

4.6 **Extração de RNA**

Aproximadamente 3 mL de sangue total foi coletado em tubo Tempus (Applied Biosystems) contendo um reagente estabilizante que lisa as células sanguíneas. Este reagente inativa RNases celulares e precipita seletivamente o RNA; o DNA genômico e as proteínas permanecem em solução. Para a extração de RNA foi utilizado o kit: Tempus Spin RNA Isolation Kit (Applied Biosystems). Em resumo, foi adicionado aproximadamente 400 mL do RNA ressuspenso no filtro de purificação e centrifugado por 30 segundos a 16.000 × g. Após centrifugação, o filtro de purificação foi lavado três vezes com tampões de lavagem do kit. Em seguida, foi adicionado 100 µL de ácido ribonucléico no filtro de purificação, incubado por 2 minutos a 70° C e centrifugado por 30 segundos a 16.000 × g. As amostras de RNA extraídas foram quantificadas e a pureza avaliada através do espectro de absorbância no aparelho NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA); e armazenadas em temperatura de -80ºC até a sua utilização.

Para a síntese do cDNA de fita simples a partir do RNA total foi utilizado o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), para a transcrição reversa em um termociclador. Utilizamos os seguintes parâmetros no termociclador: Etapa 1: 25° C durante 10 minutos; Etapa 2: 37° C durante 120 minutos; Etapa 3: 85° C 5 minutos; Etapa 4: 4° C. O cDNA obtido foi armazenado à –80°C até a realização da expressão gênica.

4.7 **Análise da expressão de HAT e HDAC**

Para a avaliação da expressão gênica foram utilizadas sondas TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems), respectivas para os genes: HDAC2

(Hs00231032_m1), HDAC3 (Hs00187320_m1), HDAC4 (Hs01041638_m1), EP300 (Hs00914223_m1) e GAPDH (Hs02758991_g1) (gene de referência) e TaqMan Master Mix II com UNG (Applied Biosystems) para a reação de PCR em tempo real no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems).

As reações de PCR foram preparadas em um volume final de 20 µL/amostra. Para a reação foram utilizados: 10 µL TaqMan® Universal Master Mix II (2×) (Applied Biosystems), 1 µL TaqMan® Gene Expression Assay (20×) (Applied Biosystems) e 9 cDNA template + H_2O. A leitura foi realizada no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems) utilizando placas de 0,1 mL e filme selante recomendados pelo equipamento.

Utilizamos os seguintes ajustes para o alvo e gene de referência: incubação UNG 50 °C durante 2 minutos, ativação da polimerase 95°C 10 minutos, desnaturação de 95°C durante 15 segundos, anelamento e extensão (40 ciclos) a 60°C durante 1 minuto. As quantificações foram efetuadas em duplicatas e em todas as placas foram acrescentados dois poços de H_2O como controle negativo de reação. Os dados de Ct gerados foram planilhados e analisados pelo método de 2-ΔΔCt (método de Livak).

4.8 **Extração de DNA**

Alíquotas de 200 µL do sangue periférico humano foram utilizadas para extração do DNA genômico. Foi utilizado kit comercial Biopur kit extração mini spin plus, seguindo as instruções do fabricante. Em resumo, foi adicionado 25 µL de proteinase K e 200 µL do sangue periférico em um microtubo de centrifugação de 1,5 mL. Em seguida foi adicionado 200 µL de tampão de Lise S e homogeneizado vigorosamente em vórtex de 10 a 20 segundos. Os microtubos foram incubados a 56°C por 15 minutos. Foi adicionado 210 µL de Etanol (96-100%) e as amostras foram transferidas para o microtubo spin S e centrifugado por 1 minuto a 11.000xg. Após centrifugação, o microtubo-filtro é lavado com os tampões de lavagem do kit SI e SII. Em seguida o microtubo-filtro foi colocado em um microtubo de eluição S e adicionado com 200 µL de tampão de eluição S previamente aquecido a 56°C. O

tampão foi dispensado diretamente sobre a membrana de sílica, incubado por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugado por 1 minuto a 11.000xg. As amostras de DNA extraídas foram quantificadas e a pureza avaliada através do espectro de absorbância no aparelho NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA); e armazenadas em temperatura de -80ºC até a sua utilização em alguma das técnicas.

4.9 **Quantificação relativa do tamanho dos telômeros por PCR em tempo real**

O comprimento dos telômeros foi avaliado através da técnica de PCR em tempo real pelo método CT comparativo (ΔΔCT). Foi realizada a quantificação de uma região do DNA telomérico, comparado ao de uma região do gene de referência, β-globina.

Os seguintes primers foram utilizados para a reação:

Tel 1b: 5’ CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT 3’

Tel 2b: 5’ GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT 3’

HBB1: 5’ GCT TCT GAC ACA ACT GTG TTC ACT AGC 3’

HBB2: 5’ CAC CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3’

(CALLICOTT; WOMACK, 2006; CAWTHON, 2002; O'CALLAGHAN; DHILLON; THOMAS; FENECH, 2008).

As reações de PCR foram preparadas em um volume final de 20 µL/amostra. Para a reação dos telômeros foram utilizados: 10 µL SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1,2 µL do primer tel 1b (10 µM), 1,8 µL do primer tel 2b (10 µM), 2 µL de DNA e 5,0 µL de H_2O. Já a reação da β-globina, utilizou-se: 10 µL SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,8 µL do primer HBB1 (10 µM) e 0,8 µL do primer HBB2 (10 µM), 2 µL de DNA e 6,4 µL de H_2O. A leitura foi realizada no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems) utilizando placas de 0,1 mL e filme selante recomendados pelo equipamento.

O alvo e o gene de referência foram rodados em placas separadas com ajustes distintos. Para os telômeros, utilizamos os seguintes parâmetros: desnaturação de 95°C durante 10 minutos, anelamento e extensão (40 ciclos) a 95°C durante 15 segundos e 54°C durante 2 minutos. Para a β-globina: desnaturação de 95ºC durante 10 minutos, anelamento e extensão (40 ciclos) a 95º

durante 15 segundos e 58ºC durante 1 minuto. Em ambos os casos, foram realizadas curvas de *melting*, a uma temperatura de 60°C. As quantificações foram efetuadas em duplicatas e em todas as placas foram acrescentados dois poços de H_2O como controle negativo de reação.

Os dados de Ct gerados foram planilhados e analisados pelo método de 2-ΔΔCt (método de Livak).

4.10 **Análises estatísticas**

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média. A normalidade de todos os dados foi testada por meio do teste Shapiro-Wilk. Os dados foram analisados através da análise de variância One-way (ANOVA), seguido do postest Bonferroni. Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todos os dados foram plotados em gráficos utilizando o software GraphPadPrism (GraphPadPrism version 6.0, San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Características clínicas dos controles, fumantes e pacientes com DPOC

As características clínicas e os dados de função pulmonar dos 104 pacientes com DPOC; 42 fumantes e 73 não fumantes estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3 – Características clínicas e demográficas da população de estudo

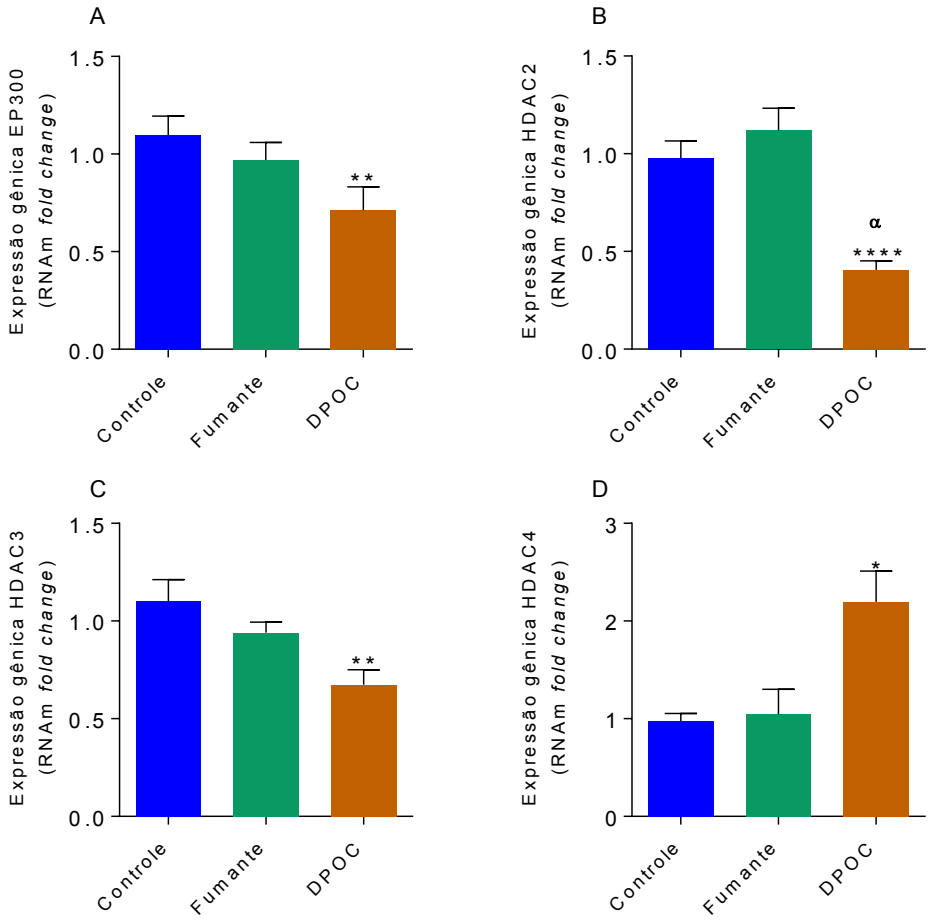
	Controles		Fenótipos DPOC			
Variável	**Controle (N =73)**	**Fumante (N =42)**	**Misto DPOC-Asma N=14**	**Enfisema N=25**	**Exacerbador N=27**	**Não classificado N=22**
Gênero Masculino / Feminino	25/48	15/27	7/7	12/13	19/8	14/8
Idade (anos)	56 ± 1,13 (42-84)	58 ± 1,10 (42-76)	60 ± 2,10 (46-72)	66 ± 1,56 (54-79)	67 ± 1,55 (53-83)	71 ± 1,9 (55-87)
Tabagismo (maço/ano)	0	39 ± 1,92	60 ± 7,31	44 ± 2,8	48 ± 5,55	45 ± 5,94
VEF_1, litro	2,58 ± 0,08	2,38 ± 0,081	1,68 ± 0,14	4,6 ± 3,35	1,56 ± 0,13	1,58 ± 0,16
VEF_1, %	98,99 ± 2,12	92,42 ± 1,59	68,28 ± 4,09	50 ± 4,58	58,42 ± 3,99	67,57 ± 5,12
CVF, litro	3,19 ± 0,10	3,02 ± 0,12	3 ± 0,26	2,61 ± 0,17	3,06 ± 0,18	2,83 ± 0,17
CVF, %	97,22 ± 2,03	93,14 ± 1,95	100 ± 5,08	87,88 ± 3,81	91,95 ± 4,83	99,07 ± 5,66

Abreviações: DPOC, doença pulmonar obstrutiva crônica;
VEF, volume expiratório forçado; CVF, capacidade vital forçada.
Os dados são apresentados como ^{média} ± EP

5.2 **Expressão de EP300, HDAC2, HDAC3 e HDAC4 nos pacientes com DPOC, fumantes e não fumantes**

A expressão gênica foi quantificada por PCR em tempo real, o cálculo da expressão gênica foi realizado utilizando o gene GAPDH como gene de referência. Os resultados demonstraram uma redução significativa na expressão de EP300, HDAC2 e HDAC3 e um aumento de HDAC4 nos pacientes com DPOC quando comparados aos fumantes e controles saudáveis não fumante (Figura 13).

Figura 13 - Expressão de EP300, HDAC2, HDAC3 e HDAC4 no sangue periférico dos pacientes com DPOC, fumantes e não fumantes

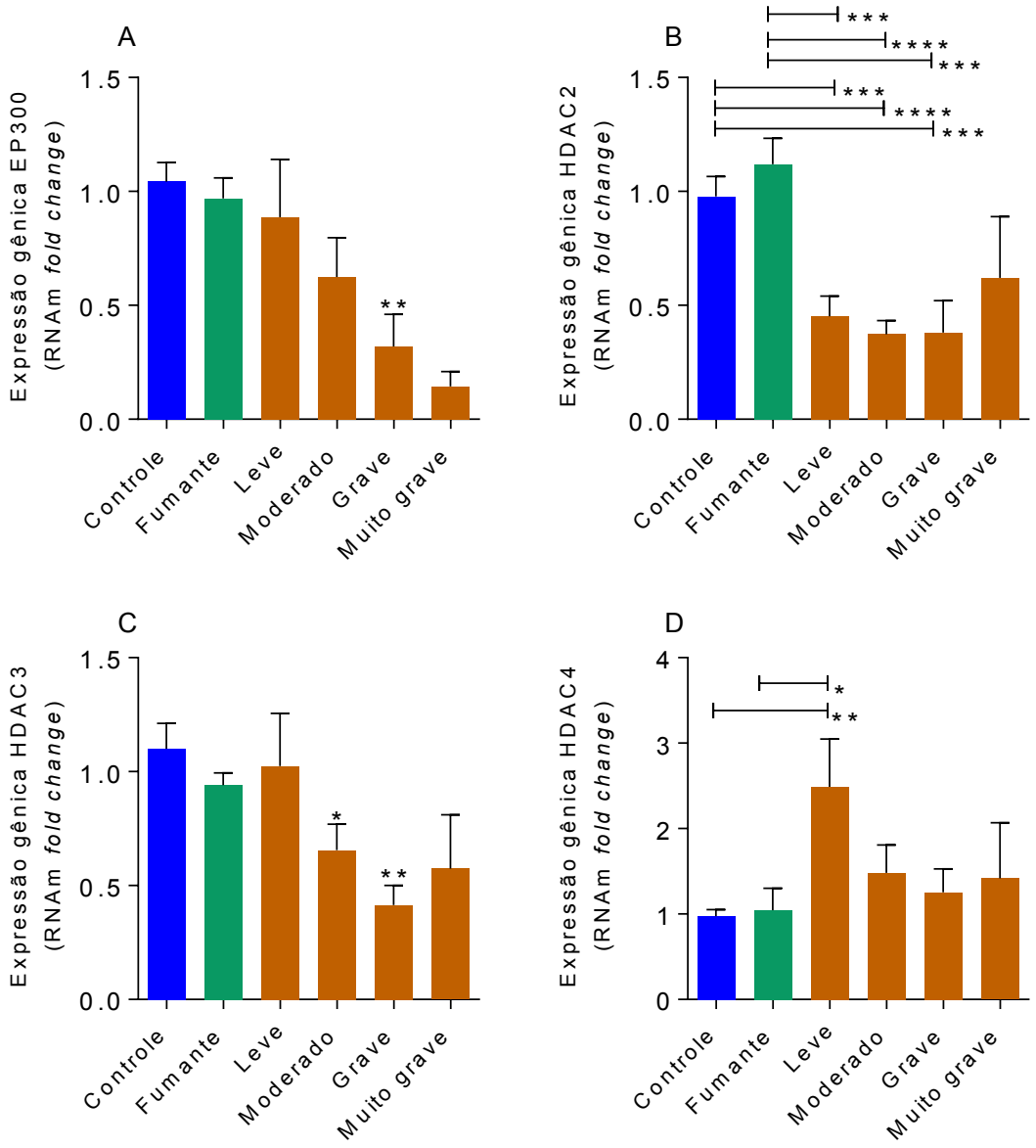


Legenda: Expressão do gene EP300, HDAC2, HDAC3 e HDAC4 em células totais do sangue periférico de controles saudáveis não fumantes (n=23), fumantes (n=13) e pacientes DPOC (n=56). A estatística foi realizada através de uma análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida de um teste de Bonferroni. Os dados representam a média ± erro padrão da média. * p <0,05, ** p <0,01 e **** p < 0,0001 comparado ao controle.

5.3 Expressão de EP300, HDAC2, HDAC3 e HDAC4 nas diferentes gravidades da DPOC

Os pacientes com DPOC foram classificados nas seguintes gravidades: leve, moderado, grave e muito-grave. Entender o perfil de expressão e atividade destas enzimas (HAT e HDAC) nas diferentes gravidades da DPOC poderá trazer contribuições no desenvolvimento de alvos específicos de inibição e consequentemente no melhor direcionamento para tratamentos específicos de acordo com a gravidade da DPOC. Em seguida, analisamos a expressão dos genes EP300, HDAC2, HDAC3 e HDAC4 nos pacientes DPOC com gravidades diferentes da doença comparados aos de controles saudáveis não fumantes e fumantes. Observamos uma redução significativa de EP300 nos pacientes DPOC graves (Figura 14A), assim como uma redução de HDAC2 nos pacientes DPOC leve, moderados e graves (Figura 14B). A expressão de HDAC3 estava reduzida apenas nos pacientes DPOC moderados e graves (Figura 14C) e um aumento na expressão de HDAC4 foi observada somente nos pacientes DPOC leves (Figura 14D).

Figura 14 - Expressão de EP300, HDAC2, HDAC3 e HDAC4 no sangue periférico dos pacientes com DPOC leve, moderada, grave e muito grave

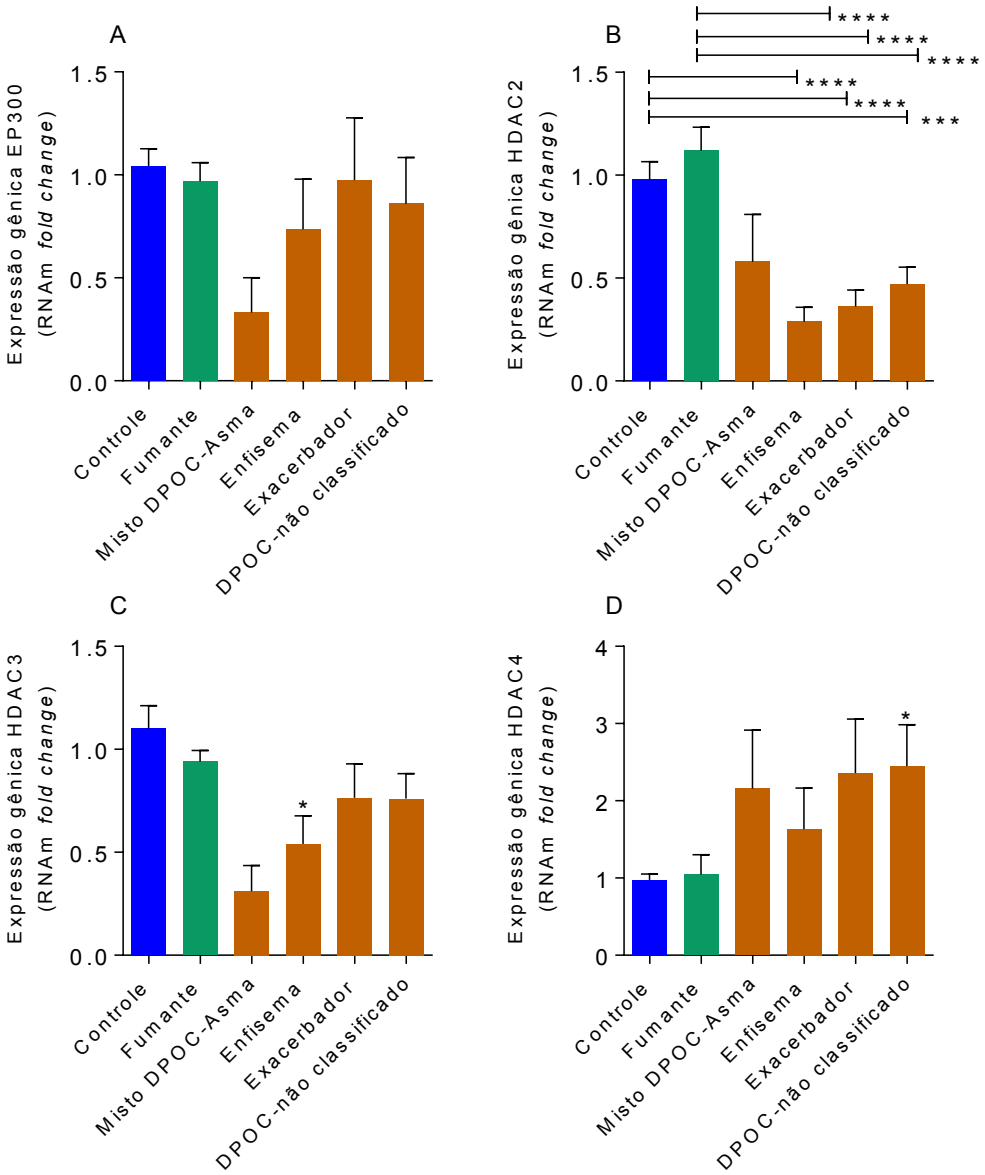


Legenda: Expressão do gene EP300, HDAC2, HDAC3 e HDAC4 em células totais do sangue periférico de controles não fumantes (n=23), fumantes (n=13) e DPOC leve (n=18), moderado (n=24), grave (n=11) e muito grave (n=3). A estatística foi realizada através de uma análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida de um teste de Bonferroni. Os dados representam a média ± erro padrão da média. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0, 001 e **** p < 0,0001 comparado ao controle.

5.4 **Expressão de EP300, HDAC2, HDAC3 e HDAC4 nos diferentes fenótipos da DPOC**

São descritos três fenótipos principais na DPOC: DPOC-Asma, Exacerbador e Enfisema com hiperinsuflação, porém os sintomas podem se sobrepor, dificultado a classificação dos fenótipos. Esses indivíduos são chamados de não classificados, pois apresentam características que não são exclusivas de um único fenótipo. A identificação desses fenótipos nos pacientes DPOC permitem abordagens clínicas mais eficazes e individualizadas. Realizamos uma análise comparativa entre os controles saudáveis, fumantes e os diferentes fenótipos da DPOC: enfisema, exacerbador, misto DPOC-Asma e não classificados. Observamos que a expressão de EP300 nos fenótipos de DPOC, excetuando o misto DPOC-Asma, está próxima ao dos controles saudáveis não fumantes e fumantes (Figura 15A). Também houve uma redução significativa na expressão de HDAC2 evidenciada nos fenótipos de enfisema, exacerbador e DPOC não classificados quando comparados aos controles fumantes e não fumantes (figura 15B). O fenótipo enfisema foi o único que apresentou uma redução significativa na expressão de HDAC3 (Figura 15C), assim como, os DPOC não classificados que também foram os únicos com expressão aumentada significativa no gene de HDAC4 (Figura 15D).

Figura15 - Expressão de EP300, HDAC2, HDAC3 e HDAC4 no sangue periférico dos diferentes fenótipos dos pacientes com DPOC

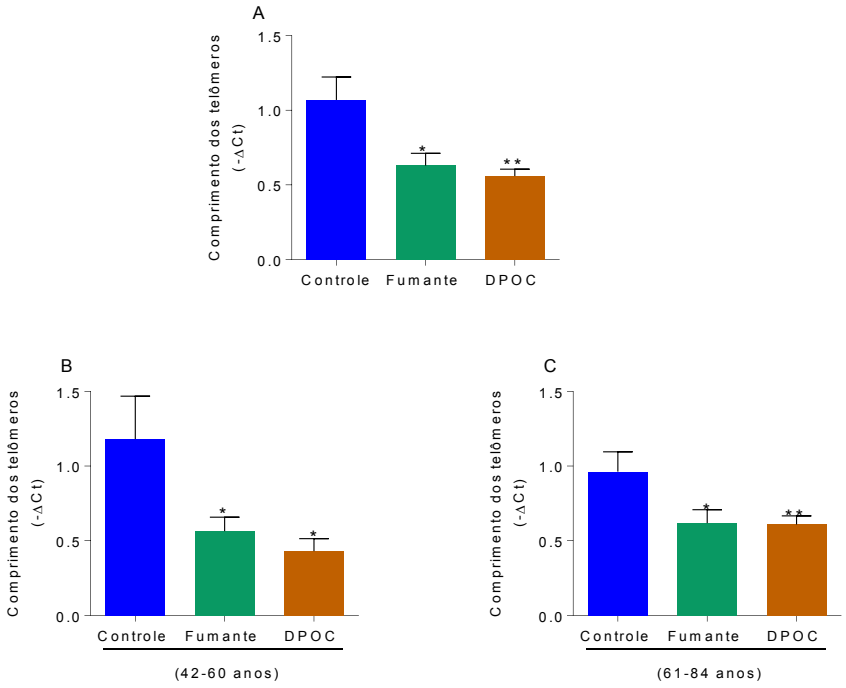


Legenda: Expressão do gene EP300, HDAC2, HDAC3 e HDAC4 em células totais do sangue periférico de controles não fumantes (n=23), fumantes (n=13), misto DPOC-Asma (n=5), enfisema (n=14), exacerbador (n=14) e DPOC-não classificados (n=23). A estatística foi realizada através de uma análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida de um teste de Bonferroni. Os dados representam a média ± erro padrão da média. * p <0,05, *** p <0,001, ****p < 0,0001 comparado ao controle.

5.5 Comprimento telomérico nos pacientes com DPOC, fumantes e não fumantes

O comprimento dos telômeros foi avaliado através da técnica de PCR em tempo real, o cálculo da expressão gênica foi realizado utilizando o gene β-globina como gene de referência. Neste estudo observamos que os indivíduos fumantes e pacientes com DPOC apresentam um encurtamento significativo dos telômeros em relação ao grupo controle (Figura 16A). Mesmo separando em duas faixas de idade distintas (42-60 anos e 61-84), os fumantes e pacientes com DPOC continuam apresentando redução telomérica em comparação ao grupo controle não fumante (Figura 16B e C).

Figura 16 - Tamanho dos telômeros dos pacientes com DPOC, fumantes e não fumantes

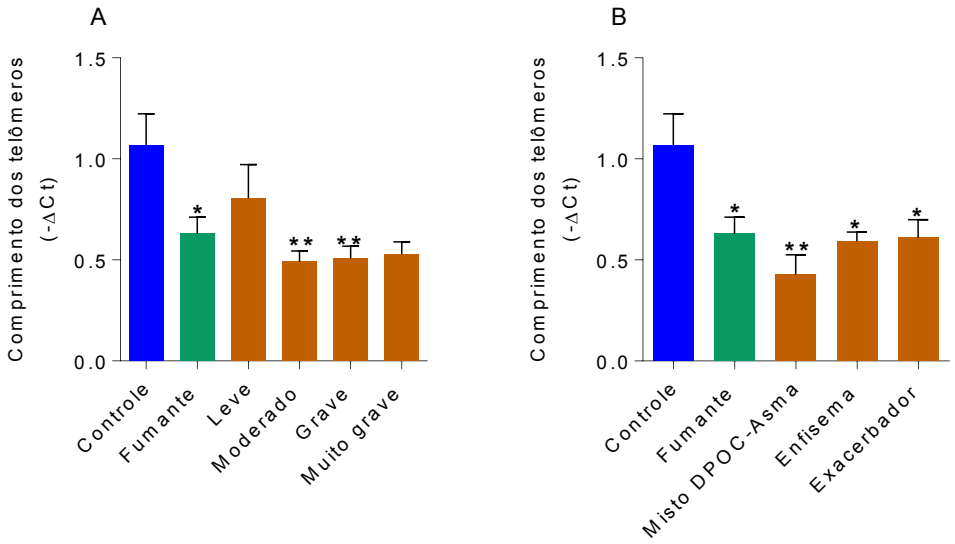


Legenda: Tamanho dos telômeros em controles não fumantes (n=40), fumantes (n=29) e pacientes DPOC (n=66). A estatística foi realizada através de uma análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida de um teste de Bonferroni. Os dados representam a média ± erro padrão da média. * p <0,05, **p <0.01 comparado ao controle.

5.6 **Comprimento telomérico nas diferentes gravidades e fenótipos de DPOC**

Quando avaliamos entre as gravidades, os indivíduos fumantes e pacientes com DPOC moderado e grave apresentaram telômeros significativamente mais curtos do que o grupo controle não fumante (Figura 17A). Já entre os diferentes fenótipos, telômeros significativamente mais curtos foram observados entre os fumantes e pacientes com DPOC de todos os fenótipos (misto DPOC-Asma, enfisema e exacerbador) (Figura 17B).

Figura 17 - Tamanho dos telômeros nos pacientes com DPOC com diferentes gravidades e fenótipos de DPOC

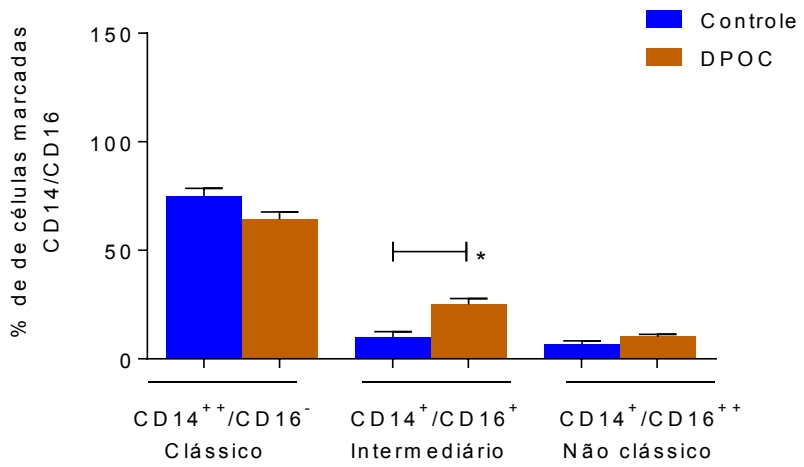


Legenda: Tamanho dos telômeros em controles saudáveis não fumantes, fumantes e DPOC com diferentes: A. gravidades - leve, n=13 (61-84 anos, n=13); moderado, n=30 (42-60 anos n=13; 61-84 anos, n=17); grave, n=19 (42-60 anos, n=7; 61-84 anos, n=12); e muito grave, n=3 (42-60 anos, n=1; 61-84 anos, n=2); e B. fenótipos - misto DPOC-Asma, n=14 - (42-60 anos, n=7; 61-84 anos, n=7); enfisema, n=25 (42-60 anos n=6; 61-84 anos n=19); exacerbador, n=27 (42-60 anos, n=4; 61-84 anos, n=23). A estatística foi realizada através de uma análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida de um teste de Bonferroni. Os dados representam a média ± erro padrão da média. * p <0,05, **p <0.01 comparado ao controle.

5.7 **Perfil dos monócitos nos pacientes com DPOC e não fumantes**

Como segunda etapa do estudo, avaliamos as alterações a nível celular. Os monócitos circulantes exibem heterogeneidade fenotípica que provavelmente resultará na diferenciação e polarização dos fenótipos dos macrófagos no tecido. Os subtipos dos monócitos são: clássicos, intermediários e não clássicos. O perfil dessas células impacta no fenótipo dos macrófagos. Pacientes com DPOC apresentam alterações no perfil dos monócitos em relação a indivíduos hígidos. Nesse estudo temos com objetivo avaliar se os monócitos circulantes já apresentam uma predisposição para um determinado perfil. Para avaliar quantitativamente os monócitos presentes no sangue periférico dos participantes, a expressão dos marcadores CD14 e CD16 foram analisadas através da técnica citometria de fluxo para caracterização dos perfis: clássicos, intermediários e não clássicos. Nenhuma diferença foi observada nos monócitos clássicos e não clássicos atribuídos a perfis associados a funções opostas. Verificamos apenas um maior número de monócitos intermediários $CD14^{+}/CD16^{+}$ nas amostras de pacientes com DPOC quando comparado ao grupo controle (Figura 18).

Figura 18 - Avaliação das subpopulações de monócitos do sangue periférico nos pacientes com DPOC e não fumantes

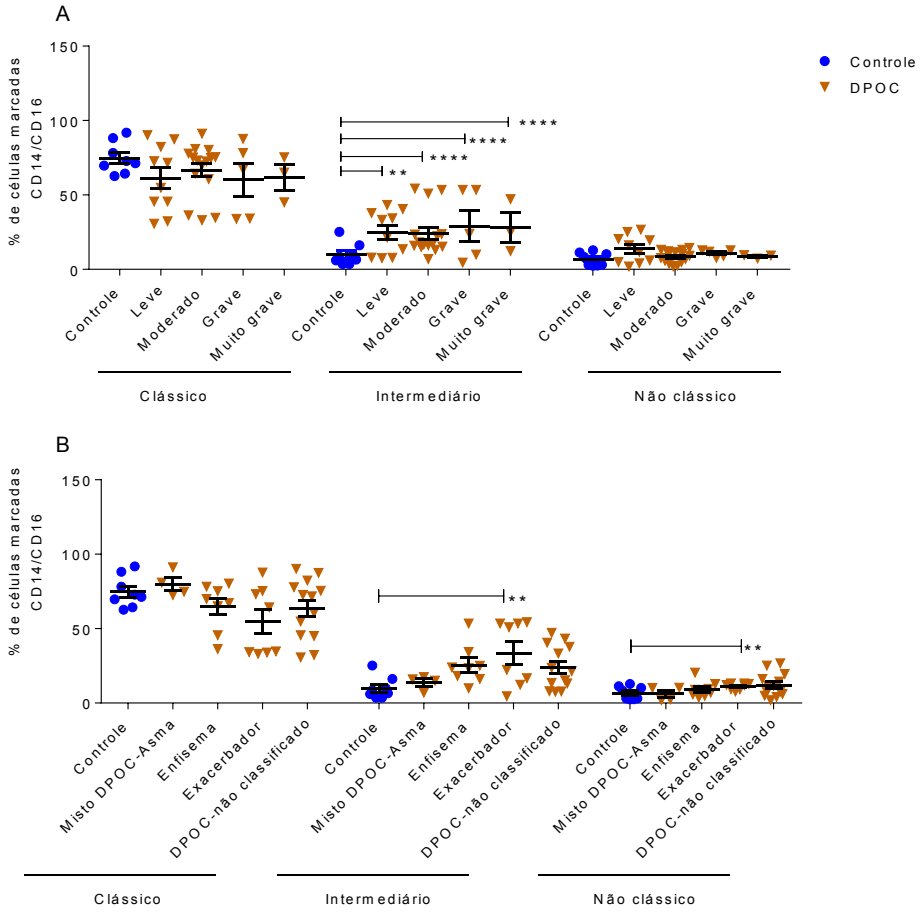


Legenda: As subpopulações de monócitos clássicos ($CD14^{++}/CD16^{-}$), intermediários ($CD14^{+}/CD16^{+}$) e não clássicos ($CD14^{+}/CD16^{++}$) foram determinados por citometria de fluxo em controles não fumantes (n=8) e DPOC (n=35). A estatística foi realizada através de uma análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida de um teste de Bonferroni. Os dados representam a média ± erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado ao controle.

5.8 **Perfil dos monócitos nas diferentes gravidades e fenótipos da DPOC**

Quando avaliamos a expressão dos marcadores CD14 e CD16 nas diferentes gravidades da DPOC, observamos um aumento dos monócitos intermediários nos pacientes DPOC leve, moderado, grave e muito grave quando comparado ao grupo controle (Figura 19A). Quando avaliamos a expressão dos marcadores CD14 e CD16, o fenótipo exacerbador foi o único que apresentou um aumento dos monócitos intermediários e não clássicos (Figura 19B).

Figura 19 - Avaliação das subpopulações de monócitos do sangue periférico nas diferentes gravidades e fenótipos da DPOC

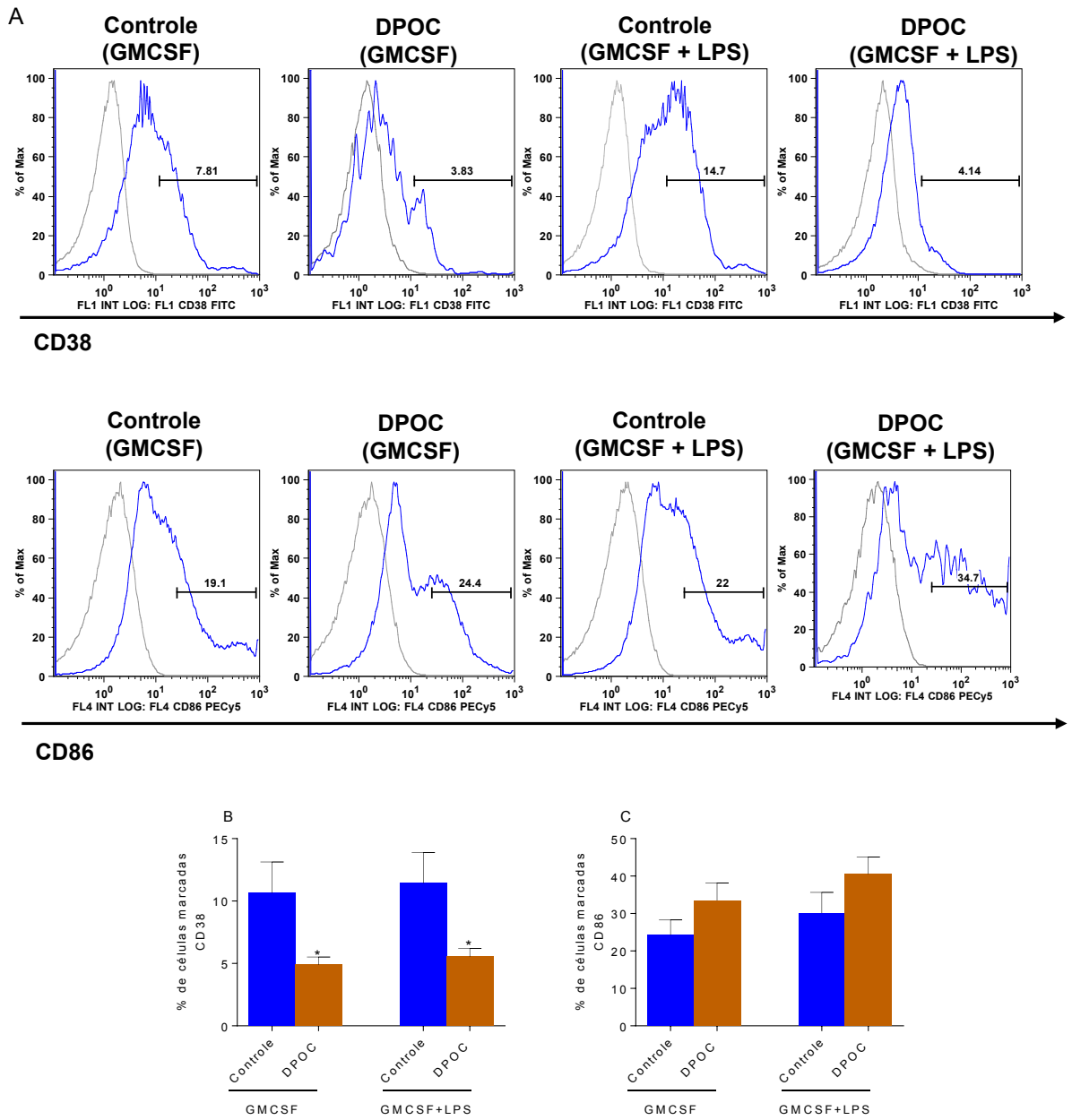


Legenda: As subpopulações de monócitos clássicos ($CD14^{++}/CD16^{-}$), monócitos intermediários ($CD14^{+}/CD16^{+}$) e monócitos não clássicos ($CD14^{+}/CD16^{++}$) foram determinados por citometria de fluxo em controles não fumantes e DPOC com diferentes: A. gravidades (leve, n=10; moderado, n=15; grave, n=6 e muito grave, n=4) e B. fenótipos (misto DPOC-Asma, n=4; enfisema, n=10; exacerbador, n=8 e DPOC-não classificado (n=13). A estatística foi realizada através de uma análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida de um teste de Bonferroni. Os dados representam a média ± erro padrão da média. ** p <0,01 e **** p <0,0001. comparado ao controle.

5.9 Expressão de CD38, CD86, CD163 e CD206 nos macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico humano de pacientes com DPOC e não fumantes

Investigamos a expressão dos marcadores M1 CD38 e CD86 em culturas de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico humano. As expressões desses marcadores foram analisadas através da técnica citometria de fluxo. Comparado aos controles, os pacientes DPOC expressam menos CD38, independente se receberam estímulo ou não com LPS (0,1µg/mL) (Figura 20A e B). Já o marcador CD86, não observamos diferença entre controles e pacientes DPOC (Figura 20A e C).

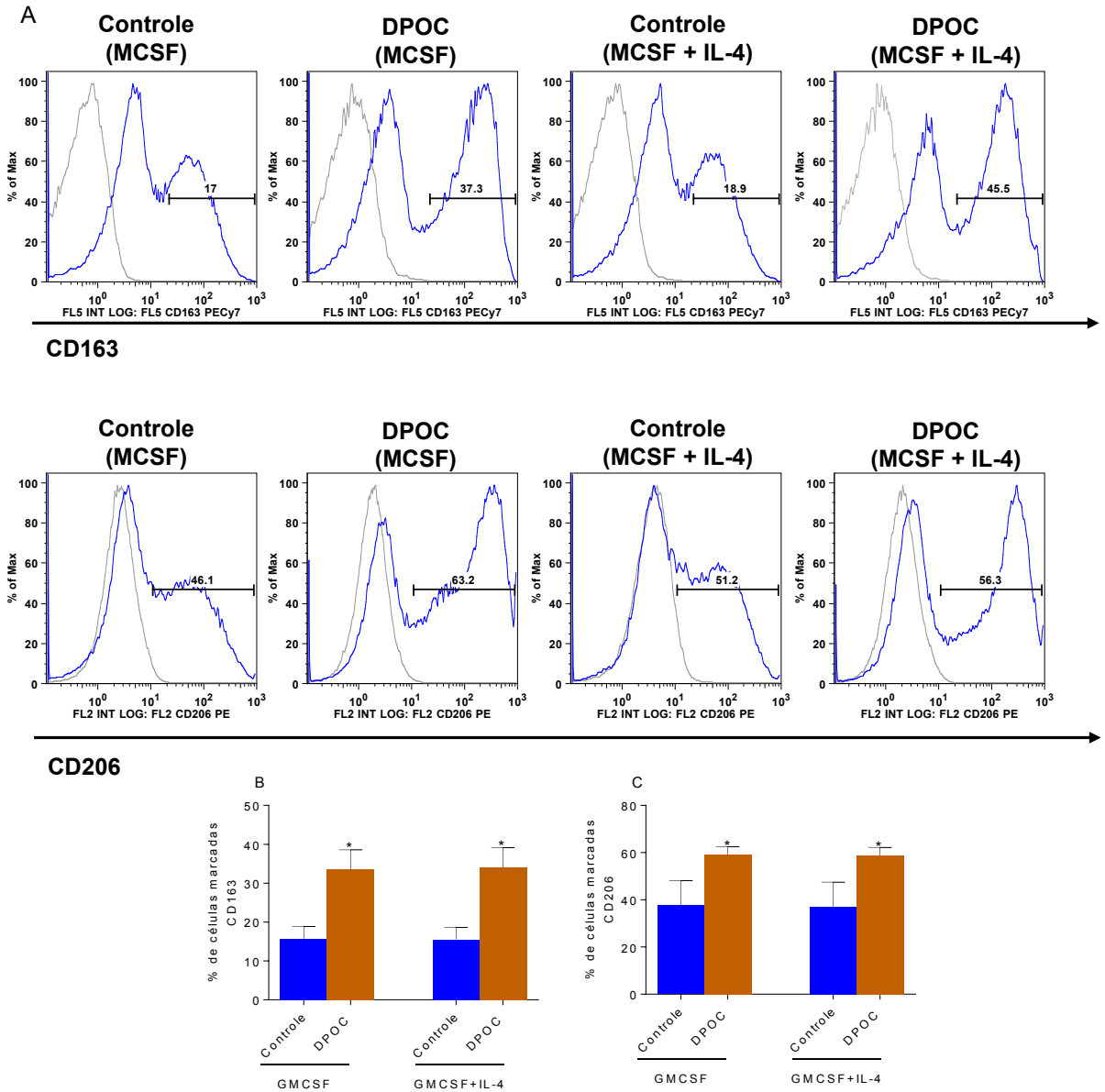
Figura 20 - Expressão de CD38 e CD86 nos macrófagos derivados do sangue periférico humano de pacientes DPOC



Legenda: Histogramas representativos e percentuais médio de células positivas para CD38 (A e B) e CD86 (A e C) em cultura de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico humano nos controles não fumantes (n=10) e pacientes DPOC (n=16) foram determinadas por citometria de fluxo. A estatística foi realizada através de uma análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida de um teste de Bonferroni. Os dados representam a média ± erro padrão da média. * p <0,05 comparado ao controle.

Posteriormente avaliamos a expressão dos marcadores CD163 e CD206, do perfil M2, em culturas de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico humano. No grupo DPOC houve predominância de CD163 (Figura 21A e B) e CD206 (Figura 21A e C) tanto nos macrófagos que receberam quanto nos que não receberam o estímulo de IL-14 (10ng/mL).

Figura 21 - Expressão de CD163 e CD206 nos macrófagos derivados do sangue periférico humano



Legenda: Histogramas representativos e percentuais médio de células positivas para CD163 (A e B) e CD206 (A e C) em cultura de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico humano nos controles não fumantes (n=10) e pacientes DPOC (n=16) foram determinadas por citometria de fluxo. A estatística foi realizada através de uma análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida de um teste de Bonferroni Os dados representam a média ± erro padrão da média. * p <0,05 comparado ao controle.

6 DISCUSSÃO

A DPOC é caracteriza por uma obstrução persistente, progressiva e irreversível das vias aéreas e está associada a uma resposta inflamatória intensa no pulmão devido principalmente à exposição a partículas e gases nocivos (GOLD, 2021). Mundialmente, o tabagismo é o principal causador dos distúrbios do sistema respiratório e de doenças pulmonares, como a DPOC e o câncer de pulmão (TAYLOR; DUMMER, 2010; WHO, 2019; YAO; RAHMAN, 2009). A DPOC é heterogênea em sua manifestação clínica, progressão e lesões pulmonares. Ela é classificada em quatro graus: leve, moderado, grave e muito-grave (GOLD, 2021). Além disso, são estabelecidos três fenótipos principais, baseados em achado simples ou uma combinação de características presentes nos pacientes, que são: DPOC-Asma, Exacerbador e Enfisema com hiperinsuflação.

O objetivo desse estudo foi investigar se os pacientes DPOC com diferentes fenótipos e gravidades e fumantes sem a doença apresentam alterações genéticas específicas na expressão gênica de HAT-HDAC e nos telômeros, assim como, alterações no perfil celular de monócitos e macrófagos diferenciados. Os voluntários recrutados para o estudo foram divididos nos seguintes grupos: pacientes com DPOC, controle hígido não fumante e indivíduos fumantes sem evidência de doença pulmonar à espirometria. Esse terceiro grupo de indivíduos fumantes foram recrutados com o objetivo de avaliar o quanto o tabagismo influência nos parâmetros estudados.

Os mecanismos moleculares e celulares que contribuem no processo inflamatório e patogênese da DPOC ainda não estão totalmente desvendados. A inflamação na DPOC é mediada por diversos mecanismos reguladores. A nível molecular, a sinalização celular na inflamação é regulada por modificações pós-traducionais (PTMs). As PTMs mais bem estudas são a acetilações em que um grupo acetil é adicionado a um resíduo de lisina por uma HAT ou removido por uma HDAC.

A HAT EP300 é amplamente estudada e é importante para a coativação de vários fatores de transcrição, incluindo NF-κB e a proteína ativadora-1 (AP-1). O aumento da acetilação de histonas (H3/H4) e NF-κB por CBP/Ep300 está associada à liberação de citocinas pró-inflamatórias mediadas pela fumaça do cigarro (RAHMAN, 2003; RAJENDRASOZHAN; YANG; EDIRISINGHE; YAO et al., 2008;

YANG; VALVO; YAO; KODE et al., 2008). A acetilação de lisina de histonas por CBP/Ep300 promove o desenrolamento do DNA e permite a acessibilidade do NF-κB para ligar os promotores de genes (CHEN; FISCHLE; VERDIN; GREENE, 2001). Assim, a acetilação de histonas via CBP/Ep300 tem um papel importante na ativação da expressão gênica pró-inflamatória mediada por NF-κB. Ao contrário do esperado, uma redução na expressão gênica de EP300 foi observada em especial nos pacientes com DPOC grave. Entretanto, quando separamos por fenótipos não houve diferença entre os grupos quando comparados aos fumantes e controles não fumantes. Acreditamos que provavelmente esta redução, nos casos graves, possa estar associada a mecanismos de controle de respostas exageradas que estejam ocorrendo especificamente nestes pacientes.

A expressão e atividade reduzida de HDAC2 em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com DPOC em comparação a indivíduos fumantes e não fumantes já está bem descrita (BARNES, 2009; TAN; XUAN; CAO; YU *et al.*, 2016). As HDAC2 têm um papel regulador na expressão gênica (KUO; ALLIS, 1998). Observamos que pacientes com DPOC têm uma diminuição na expressão de HDAC2, corroborando estudos prévios (ITO; ITO; ELLIOTT; COSIO *et al.*, 2005). Além disso, também observamos que em todas as gravidades da doença e nos fenótipos enfisema, exacerbador e entre os não classificados, a HDAC2 estava diminuída tanto em relação aos indivíduos fumantes e controles não fumantes, o que pode contribuir para uma inflamação crônica com subsequente remodelamento e obstrução das vias aéreas.

A HDAC3 é apontada como um regulador positivo da inflamação mediada por NF-κB. Os inibidores da HDAC3 foram propostos como terapêuticas para combater a inflamação na DPOC. (LEUS; ZWINDERMAN; DEKKER, 2016). Nossos resultados foram diferentes desses estudos, pois houve uma diminuição na expressão de HDAC3 somente nos pacientes com fenótipo enfisema e com gravidades moderada e grave. Um estudo mostrou que a inibição seletiva de HDAC3 em macrófagos estimulados por LPS/IFN-γ diminuiu a atividade transcricional de NF-kB e demonstrou ter efeitos anti-inflamatórios (LEUS; VAN DER WOUDEN; VAN DEN BOSCH; HOOGHIEMSTRA et al., 2016).

Níveis aumentados de HDAC4 são descritos no diafragma de pacientes DPOC em comparação com os controles (PUIG-VILANOVA; AGUILO; RODRIGUEZ-FUSTER; MARTINEZ-LLORENS et al., 2014). De acordo com os nossos resultados,

um aumento de HDAC4 também está presente em células do sangue periférico dos pacientes com DPOC com gravidade leve e entre os não classificados. Um estudo *in vivo* e *in vitro* em que foram utilizados inibidores de HDAC4, sugeriram um papel anti-inflamatório dessa enzima em pacientes com fenótipo enfisema. Além disso, as HDAC4 são importantes na fibrose pulmonar sendo capazes de modular a produção de matriz extracelular (MEC) em miofibroblastos pulmonares (KHALIL; XIA; BODEMPUDI; KAHM *et al.*, 2015; SAITO; ZHUANG; SHAN; DANCHUK *et al.*, 2017; SAITO; ZHUANG; SUZUKI; OTA *et al.*, 2019).

A redução na expressão e atividade enzimática da HDAC2 em pacientes com DPOC pode contribuir para o envelhecimento prematuro (CHUNG; ADCOCK, 2008). O comprimento telomérico é considerado um biomarcador do envelhecimento (ADENUGA; YAO; MARCH; SEAGRAVE *et al.*, 2009; HARLEY; FUTCHER; GREIDER, 1990; ZAKIAN, 1995) e o seu encurtamento também está associado a diversas doenças, como anemia aplástica, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, diabetes tipo 2, fibrose pulmonar idiopática, DPOC e entre outras doenças. (ROSSIELLO; JURK; PASSOS; D'ADDA DI FAGAGNA, 2022; SCHNEIDER; ROWE; GARCIA-DE-ALBA; KIM *et al.*, 2021).

Pacientes com DPOC apresentaram telômeros significativamente mais curtos do que os fumantes sem DPOC, mesmo após o ajuste para idade, sexo e maços por ano (CORDOBA-LANUS; CAZORLA-RIVERO; ESPINOZA-JIMENEZ; DE-TORRES *et al.*, 2017). Outros estudos que avaliaram a relação entre o comprimento dos telômeros e a DPOC mostraram telômeros mais curtos em indivíduos com DPOC em comparação com fumantes e indivíduos saudáveis (MUI; MAN; MCELHANEY; SANDFORD *et al.*, 2009; SAVALE; CHAOUAT; BASTUJI-GARIN; MARCOS *et al.*, 2009), indo de acordo com os nossos resultados, os quais telômeros mais curtos foram detectados nos pacientes com DPOC e controles fumantes em relação aos controles não fumantes. Em nosso estudo, os pacientes com DPOC apresentam idade acima de 40 anos, e mesmo após separação em duas faixas etárias distintas (42-60 anos e 61-84 anos), resultados semelhantes foram observados. Além disso, quando analisamos por grau da doença, verificamos que esse encurtamento se mantém para todas as gravidades exceto no muito grave que devido ao n amostral não foi possível confirmar totalmente este dado. Já em relação aos fenótipos, todos eles apresentaram telômeros reduzidos quando comparados ao grupo controle não fumante.

Como já mencionado o macrófago é uma das principais células atuantes na DPOC, e sua origem vem dos monócitos circulantes. Já foi descrito que pacientes com DPOC grave apresentam um aumento de monócitos não clássicos, sugerindo o desenvolvimento de uma população de monócitos com um fenótipo pré-M2, com maior probabilidade de se diferenciar em macrófagos M2 no tecido pulmonar após a análise de marcadores do tipo M2, como CD163 e CD206 (CORNWELL; KIM; FAN; VEGA *et al.*, 2018; KAKU; IMAOKA; MORIMATSU; KOMOHARA *et al.*, 2014; LIU; ZHANG; YANG; DI *et al.*, 2022).

Níveis mais elevados de citocinas M2 (TARC/CCL17 e MDC/CCL2) foram observados em monócitos estimulados com IL-4 de pacientes com DPOC comparado a células de doadores saudáveis em um estudo anterior do nosso grupo (DA SILVA; GICQUEL; DANIEL; BARTHOLO *et al.*, 2020). Nossos resultados demonstraram que os monócitos clássicos são os que estão em maior quantidade no sangue periférico tanto nos controles como nos pacientes DPOC. Verificamos um aumento significativo na frequência de monócitos intermediários nos pacientes DPOC em relação aos controles saudáveis. Em relação à gravidade da doença, encontramos um aumento dos monócitos intermediário nos pacientes DPOC leve, moderado, grave e muito grave. Os pacientes DPOC exacerbador foram os únicos que apresentaram um aumento dos monócitos intermediários e não clássicos.

Sabe-se que as proteínas CD38 e CD86 são reguladas positivamente em macrófagos do tipo M1 e são considerados marcadores M1. Nesse estudo escolhemos os marcadores CD38 e CD86 para a fenotipagem de M1. O marcador CD38 é uma glicoproteína de superfície celular e enzima extracelular, esse marcador é necessário para a ativação e proliferação de células imunes (LI; LI; JIN; LIAO et al., 2022). O marcador CD86 é uma glicoproteína integral de membrana que é expressa na superfície de linfócitos T ativados, linfócitos B e células apresentadoras de antígenos (APC) (SMYTH; LOGAN; BOADLE; ROWE et al., 2005). As proteínas CD163 e CD206 são consideradas marcadores M2 (GOERDT; ORFANOS, 1999; KAKU; IMAOKA; MORIMATSU; KOMOHARA et al., 2014). Para caracterizar o fenótipo dos macrófagos M2, usamos os marcadores CD163 e CD206. O marcador CD163 é um receptor do complexo hemoglobina/haptoglobina (AKILA; PRASHANT; SUMA; PRASHANT et al., 2012; ARESCHOUG; GORDON, 2009). O CD206 (receptor de manose) é um receptor envolvido na fagocitose de bactérias e fungos (MARTINEZ-POMARES, 2012).

Nossos resultados demonstram um aumento na expressão dos marcadores M2 CD163 e CD206 e diminuição do marcador M1 CD38 nos macrófagos derivados de monócito do sangue periférico humano de pacientes com DPOC. Além disso, resultados anteriores do nosso grupo mostraram uma diminuição de macrófagos $CD86^+$ e um número aumentado de células $CD206^+$ no LBA de camundongos expostos a fumaça do cigarro por 14 dias (OLIVEIRA DA SILVA; MONTE-ALTO-COSTA; RENOVATO-MARTINS; VIANA NASCIMENTO *et al.*, 2017).

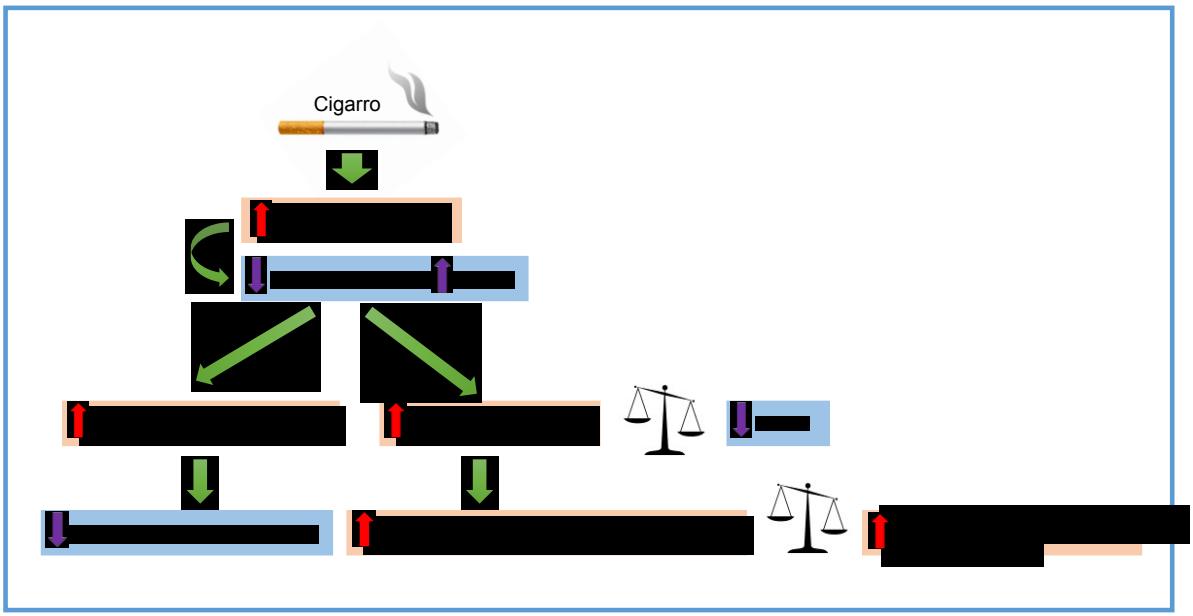
Outro estudo observou a diferenciação fenotípica das subpopulações de macrófagos na parede das pequenas vias aéreas e no lúmen das vias aéreas de pacientes com DPOC. Nas pequenas vias aéreas havia uma predominância dos macrófagos M1 enquanto no LBA houve uma mudança para o perfil M2. Além disso, foi observado um aumento de citocinas M2 no LBA dos pacientes e um aumento da enzima arginase na mucosa da parede das vias aéreas, incluindo o epitélio, subepitélio e septos alveolares, o que poderia sugerir a presença do macrófago M2 nessas regiões (EAPEN; HANSBRO; MCALINDEN; KIM *et al.*, 2017).

Dada à complexidade do microambiente na DPOC, uma simples classificação do macrófago em M1 ou M2 seria arbitrária.

Uma resposta não satisfatória ao tratamento da DPOC é comum. Nas últimas décadas, o diagnóstico da doença foi revisado para levar em conta a sua heterogeneidade e, assim, permitir um tratamento mais personalizado e individualizado (VOGELMEIER; CRINER; MARTINEZ; ANZUETO et al., 2017b). É necessário avançar na compreensão da complexa fisiopatologia da DPOC. Uma abordagem integrando fatores genéticos, biológicos e clínicos em modelos experimentais pode promover o tratamento personalizado da DPOC. Um projeto chamado “Systems Medicine-based clinical decision support for COPD patients” (SysMed-COPD) foi realizado por um consórcio internacional e interdisciplinar que combina médicos, cientistas clínicos, pesquisadores de biologia computacional e de sistemas e engenheiros de bioinformática para determinar uma abordagem mais personalizada para o gerenciamento da DPOC. (AGUSTI; SOBRADILLO; CELLI, 2011; FRANSSEN; ALTER; BAR; BENEDIKTER *et al.*, 2019). De fato, estudos sobre a gravidade e diferentes fenótipos da doença são de extrema relevância para o desenvolvimento de tratamentos que reflitam a heterogeneidade da doença, reforçando a importância desse estudo.

CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados aqui apresentados mostram que os pacientes com DPOC apresentaram uma redução da EP300, HDAC2, HDAC3 e um aumento de HDAC4. Uma redução constante em HDAC2 pode gerar danos ao DNA e promover um envelhecimento precoce. Verificamos que pacientes com DPOC apresentam uma redução no tamanho telomérico em comparação a indivíduos saudáveis de mesma faixa etária. A DPOC é altamente heterogênea em sua apresentação clínica e também na sua progressão. Os macrófagos não estão mais restritos a dois fenótipos extremos, mas podem ter diferentes fenótipos, que inclui um perfil pró-inflamatório, pró-fibrótico, pró-tumoral e anti-inflamatório. Observamos que pacientes DPOC apresentam um aumento significativo de monócitos intermediários e expressam mais marcadores do tipo M2 (CD163 e CD206) quando induzidos a diferenciação em cultura.



REFERÊNCIAS

ADENUGA, D.; YAO, H.; MARCH, T. H.; SEAGRAVE, J. *et al.* Histone deacetylase 2 is phosphorylated, ubiquitinated, and degraded by cigarette smoke. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 40, n. 4, p. 464-473, Apr 2009.

AGHASAFARI, P.; GEORGE, U.; PIDAPARTI, R. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. **Inflamm Res**, 68, n. 1, p. 59-74, Jan 2019. Review.

AGUSTI, A.; SOBRADILLO, P.; CELLI, B. Addressing the complexity of chronic obstructive pulmonary disease: from phenotypes and biomarkers to scale-free networks, systems biology, and P4 medicine. **Am J Respir Crit Care Med**, 183, n. 9, p. 1129-1137, May 1 2011.

AHMAD, T.; SUNDAR, I. K.; TORMOS, A. M.; LERNER, C. A. *et al.* Shelterin Telomere Protection Protein 1 Reduction Causes Telomere Attrition and Cellular Senescence via Sirtuin 1 Deacetylase in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 56, n. 1, p. 38-49, Jan 2017.

AKILA, P.; PRASHANT, V.; SUMA, M. N.; PRASHANT, S. N. *et al.* CD163 and its expanding functional repertoire. **Clin Chim Acta**, 413, n. 7-8, p. 669-674, Apr 11 2012.

ALBERT, R. K.; CONNETT, J.; BAILEY, W. C.; CASABURI, R. *et al.* Azithromycin for prevention of exacerbations of COPD. **N Engl J Med**, 365, n. 8, p. 689-698, Aug 25 2011.

ALBRECHT, E.; SILLANPAA, E.; KARRASCH, S.; ALVES, A. C. *et al.* Telomere length in circulating leukocytes is associated with lung function and disease. **Eur Respir J**, 43, n. 4, p. 983-992, Apr 2014.

ALDER, J. K.; HANUMANTHU, V. S.; STRONG, M. A.; DEZERN, A. E. *et al.* Diagnostic utility of telomere length testing in a hospital-based setting. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 115, n. 10, p. E2358-E2365, Mar 6 2018.

ALLFREY, V. G.; FAULKNER, R.; MIRSKY, A. E. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 51, p. 786-794, May 1964.

ALSHABANAT, A.; ZAFARI, Z.; ALBANYAN, O.; DAIRI, M. *et al.* Asthma and COPD Overlap Syndrome (ACOS): A Systematic Review and Meta Analysis. **PLoS One**, 10, n. 9, p. e0136065, 2015.

AMSELLEM, V.; GARY-BOBO, G.; MARCOS, E.; MAITRE, B. *et al.* Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, 184, n. 12, p. 1358-1366, Dec 15 2011.

ANDERSON, C. F.; MOSSER, D. M. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. **J Leukoc Biol**, 72, n. 1, p. 101-106, Jul 2002. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

AOSHIBA, K.; ZHOU, F.; TSUJI, T.; NAGAI, A. DNA damage as a molecular link in the pathogenesis of COPD in smokers. **Eur Respir J**, 39, n. 6, p. 1368-1376, Jun 2012.

ARANGO DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Front Immunol**, 5, p. 491, 2014. Review.

ARESCHOUG, T.; GORDON, S. Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis. **Cell Microbiol**, 11, n. 8, p. 1160-1169, Aug 2009.

ARORA, S.; DEV, K.; AGARWAL, B.; DAS, P. *et al.* Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. **Immunobiology**, 223, n. 4-5, p. 383-396, Apr - May 2018. Review
Research Support, Non-U.S. Gov't.

AUFFRAY, C.; FOGG, D.; GARFA, M.; ELAIN, G. *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. **Science**, 317, n. 5838, p. 666-670, Aug 3 2007.

AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, 27, p. 669-692, 2009.

BALCAN, B.; AKAN, S.; UGURLU, A. O.; HANDEMIR, B. O. *et al.* Effects of biomass smoke on pulmonary functions: a case control study. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, 11, p. 1615-1622, 2016.

BARALDO, S.; BAZZAN, E.; ZANIN, M. E.; TURATO, G. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 protein in lung periphery is related to COPD progression. **Chest**, 132, n. 6, p. 1733-1740, Dec 2007. Research Support, Non-U.S. Gov't.

BARNES, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nat Rev Immunol**, 8, n. 3, p. 183-192, Mar 2008.

BARNES, P. J. Role of HDAC2 in the pathophysiology of COPD. **Annu Rev Physiol**, 71, p. 451-464, 2009.

BARNES, P. J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **J Allergy Clin Immunol**, 138, n. 1, p. 16-27, Jul 2016. Review
Research Support, Non-U.S. Gov't.

BARNES, P. J.; SHAPIRO, S. D.; PAUWELS, R. A. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. **Eur Respir J**, 22, n. 4, p. 672-688, Oct 2003.

BARTHOLO, T. P.; PORTO, L. C.; POZZAN, R.; NASCIMENTO, A. *et al.* Evaluation Of HHIP Polymorphisms And Their Relationship With Chronic Obstructive Pulmonary Disease Phenotypes. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, 14, p. 2267-2272, 2019.

BATEMAN, E. D.; HURD, S. S.; BARNES, P. J.; BOUSQUET, J. *et al.* Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. **Eur Respir J**, 31, n. 1, p. 143-178, Jan 2008.

BERGDAHL, I. A.; TOREN, K.; ERIKSSON, K.; HEDLUND, U. *et al.* Increased mortality in COPD among construction workers exposed to inorganic dust. **Eur Respir J**, 23, n. 3, p. 402-406, Mar 2004.

BERNARDES DE JESUS, B.; BLASCO, M. A. Aging by telomere loss can be reversed. **Cell Stem Cell**, 8, n. 1, p. 3-4, Jan 7 2011.

BERTOS, N. R.; WANG, A. H.; YANG, X. J. Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation. **Biochem Cell Biol**, 79, n. 3, p. 243-252, 2001.

BIRCH, J.; ANDERSON, R. K.; CORREIA-MELO, C.; JURK, D. *et al.* DNA damage response at telomeres contributes to lung aging and chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 309, n. 10, p. L1124-1137, Nov 15 2015.

BLACKBURN, E. H. The molecular structure of centromeres and telomeres. **Annu Rev Biochem**, 53, p. 163-194, 1984.

BLACKBURN, E. H.; EPEL, E. S.; LIN, J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. **Science**, 350, n. 6265, p. 1193-1198, Dec 4 2015.

BLASCO, M. A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. **Nat Rev Genet**, 6, n. 8, p. 611-622, Aug 2005.

BLASCO, M. A.; LEE, H. W.; HANDE, M. P.; SAMPER, E. *et al.* Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. **Cell**, 91, n. 1, p. 25-34, Oct 3 1997.

BLASI, F.; MANTERO, M.; ALIBERTI, S. Antibiotics as immunomodulant agents in COPD. **Curr Opin Pharmacol**, 12, n. 3, p. 293-299, Jun 2012.

BODNAR, A. G.; OUELLETTE, M.; FROLKIS, M.; HOLT, S. E. *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. **Science**, 279, n. 5349, p. 349-352, Jan 16 1998.

BOORSMA, C. E.; DRAIJER, C.; MELGERT, B. N. Macrophage heterogeneity in respiratory diseases. **Mediators Inflamm**, 2013, p. 769214, 2013.

BOOZ, G. W.; ALTARA, R.; EID, A. H.; WEHBE, Z. *et al.* Macrophage responses associated with COVID-19: A pharmacological perspective. **Eur J Pharmacol**, 887, p. 173547, Nov 15 2020.

BOYETTE, L. B.; MACEDO, C.; HADI, K.; ELINOFF, B. D. *et al.* Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. **PLoS One**, 12, n. 4, p. e0176460, 2017.

BOZINOVSKI, S.; CROSS, M.; VLAHOS, R.; JONES, J. E. *et al.* S100A8 chemotactic protein is abundantly increased, but only a minor contributor to LPS-induced, steroid resistant neutrophilic lung inflammation in vivo. **J Proteome Res**, 4, n. 1, p. 136-145, Jan-Feb 2005.

BRODE, S. K.; LING, S. C.; CHAPMAN, K. R. Alpha-1 antitrypsin deficiency: a commonly overlooked cause of lung disease. **CMAJ**, 184, n. 12, p. 1365-1371, Sep 4 2012.

BUCCHIONI, E.; KHARITONOV, S. A.; ALLEGRA, L.; BARNES, P. J. High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. **Respir Med**, 97, n. 12, p. 1299-1302, Dec 2003.

BURGE, S.; WEDZICHA, J. A. COPD exacerbations: definitions and classifications. **Eur Respir J Suppl**, 41, p. 46s-53s, Jun 2003.

BURGER, M.; CHORY, J. Structural and chemical biology of deacetylases for carbohydrates, proteins, small molecules and histones. **Commun Biol**, 1, p. 217, 2018.

BURGESS, R. J.; ZHOU, H.; HAN, J.; ZHANG, Z. A role for Gcn5 in replication-coupled nucleosome assembly. **Mol Cell**, 37, n. 4, p. 469-480, Feb 26 2010.

BUTTAR, B. S.; BERNSTEIN, M. The Importance of Early Identification of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. **Cureus**, 10, n. 10, p. e3494, Oct 25 2018.

CALLICOTT, R. J.; WOMACK, J. E. Real-time PCR assay for measurement of mouse telomeres. **Comp Med**, 56, n. 1, p. 17-22, Feb 2006.

CALVERLEY, P. M.; ANDERSON, J. A.; CELLI, B.; FERGUSON, G. T. *et al.* Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. **N Engl J Med**, 356, n. 8, p. 775-789, Feb 22 2007.

CALVERLEY, P. M.; RABE, K. F.; GOEHRING, U. M.; KRISTIANSEN, S. *et al.* Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials. **Lancet**, 374, n. 9691, p. 685-694, Aug 29 2009.

CASAS-RECASENS, S.; MENDOZA, N.; LOPEZ-GIRALDO, A.; GARCIA, T. *et al.* Telomere Length but Not Mitochondrial DNA Copy Number Is Altered in Both Young and Old COPD. **Front Med (Lausanne)**, 8, p. 761767, 2021.

CAWTHON, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. **Nucleic Acids Res**, 30, n. 10, p. e47, May 15 2002.

CELLI, B. R. Predictors of mortality in COPD. **Respir Med**, 104, n. 6, p. 773-779, Jun 2010.

CHAVEZ-SANCHEZ, L.; ESPINOSA-LUNA, J. E.; CHAVEZ-RUEDA, K.; LEGORRETA-HAQUET, M. V. *et al.* Innate immune system cells in atherosclerosis. **Arch Med Res**, 45, n. 1, p. 1-14, Jan 2014. Research Support, Non-U.S. Gov't Review.

CHEN, L.; FISCHLE, W.; VERDIN, E.; GREENE, W. C. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. **Science**, 293, n. 5535, p. 1653-1657, Aug 31 2001.

CHEN, W.; KIMURA, M.; KIM, S.; CAO, X. *et al.* Longitudinal versus cross-sectional evaluations of leukocyte telomere length dynamics: age-dependent telomere shortening is the rule. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 66, n. 3, p. 312-319, Mar 2011.

CHEN, X.; BAROZZI, I.; TERMANINI, A.; PROSPERINI, E. *et al.* Requirement for the histone deacetylase Hdac3 for the inflammatory gene expression program in macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 109, n. 42, p. E2865-2874, Oct 16 2012.

CHEN, X.; TANG, J.; SHUAI, W.; MENG, J. *et al.* Macrophage polarization and its role in the pathogenesis of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. **Inflamm Res**, 69, n. 9, p. 883-895, Sep 2020.

CHEN, X.; XU, X.; XIAO, F. Heterogeneity of chronic obstructive pulmonary disease: from phenotype to genotype. **Front Med**, 7, n. 4, p. 425-432, Dec 2013.

CHEN, Y.; HUANG, B.; ZHAO, Y.; QI, D. *et al.* Increased p300/CBP expression in acute respiratory distress syndrome is associated with interleukin-17 and prognosis. **Clin Respir J**, 14, n. 9, p. 791-799, Sep 2020.

CHENG, F.; ZHENG, B.; WANG, J.; ZHAO, G. *et al.* Histone deacetylase 10, a potential epigenetic target for therapy. **Biosci Rep**, 41, n. 6, Jun 25 2021.

CHIMEN, M.; YATES, C. M.; MCGETTRICK, H. M.; WARD, L. S. *et al.* Monocyte Subsets Coregulate Inflammatory Responses by Integrated Signaling through TNF and IL-6 at the Endothelial Cell Interface. **J Immunol**, 198, n. 7, p. 2834-2843, Apr 1 2017. Research Support, Non-U.S. Gov't.

CHIZZOLINI, C.; REZZONICO, R.; DE LUCA, C.; BURGER, D. *et al.* Th2 cell membrane factors in association with IL-4 enhance matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) while decreasing MMP-9 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-differentiated human monocytes. **J Immunol**, 164, n. 11, p. 5952-5960, Jun 1 2000. Research Support, Non-U.S. Gov't.

CHOW, C. W.; HERRERA ABREU, M. T.; SUZUKI, T.; DOWNEY, G. P. Oxidative stress and acute lung injury. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 29, n. 4, p. 427-431, Oct 2003.

CHUNG, K. F. The role of airway smooth muscle in the pathogenesis of airway wall remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. **Proc Am Thorac Soc**, 2, n. 4, p. 347-354; discussion 371-342, 2005. Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
Review.

CHUNG, K. F.; ADCOCK, I. M. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. **Eur Respir J**, 31, n. 6, p. 1334-1356, Jun 2008.

CIPOLLINA, C.; BRUNO, A.; FASOLA, S.; CRISTALDI, M. *et al.* Cellular and Molecular Signatures of Oxidative Stress in Bronchial Epithelial Cell Models Injured by Cigarette Smoke Extract. **Int J Mol Sci**, 23, n. 3, Feb 4 2022.

CONG, Y. S.; WRIGHT, W. E.; SHAY, J. W. Human telomerase and its regulation. **Microbiol Mol Biol Rev**, 66, n. 3, p. 407-425, table of contents, Sep 2002.

CONSORTIUM, E. P. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. **Nature**, 489, n. 7414, p. 57-74, Sep 6 2012.

CORDOBA-LANUS, E.; CAZORLA-RIVERO, S.; ESPINOZA-JIMENEZ, A.; DE-TORRES, J. P. *et al.* Telomere shortening and accelerated aging in COPD: findings from the BODE cohort. **Respir Res**, 18, n. 1, p. 59, Apr 13 2017.

CORDOBA-LANUS, E.; CAZORLA-RIVERO, S.; GARCIA-BELLO, M. A.; MAYATO, D. *et al.* Telomere length dynamics over 10-years and related outcomes in patients with COPD. **Respir Res**, 22, n. 1, p. 56, Feb 15 2021.

CORHAY, J. L.; SCHLEICH, F.; LOUIS, R. [Phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease]. **Rev Med Liege**, 69, n. 7-8, p. 415-421, Jul-Aug 2014.

CORNWELL, W. D.; KIM, V.; FAN, X.; VEGA, M. E. *et al.* Activation and polarization of circulating monocytes in severe chronic obstructive pulmonary disease. **BMC Pulm Med**, 18, n. 1, p. 101, Jun 15 2018.

COTTAGE, C. T.; PETERSON, N.; KEARLEY, J.; BERLIN, A. *et al.* Targeting p16-induced senescence prevents cigarette smoke-induced emphysema by promoting IGF1/Akt1 signaling in mice. **Commun Biol**, 2, p. 307, 2019.

COVARRUBIAS, A. J.; KALE, A.; PERRONE, R.; LOPEZ-DOMINGUEZ, J. A. *et al.* Senescent cells promote tissue NAD(+) decline during ageing via the activation of CD38(+) macrophages. **Nat Metab**, 2, n. 11, p. 1265-1283, Nov 2020.

DA COSTA, C. H.; NORONHA FILHO, A. J.; MARQUES, E. S. R. M. F.; DA CRUZ, T. F. *et al.* Alpha 1-antitrypsin deficiency in patients with chronic obstructive pulmonary disease patients: is systematic screening necessary? **BMC Res Notes**, 12, n. 1, p. 10, Jan 10 2019.

DA SILVA, C. O.; GICQUEL, T.; DANIEL, Y.; BARTHOLO, T. *et al.* Alteration of immunophenotype of human macrophages and monocytes after exposure to cigarette smoke. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 12796, Jul 30 2020.

DALDEGAN, M. B.; TEIXEIRA, M. M.; TALVANI, A. Concentration of CCL11, CXCL8 and TNF-alpha in sputum and plasma of patients undergoing asthma or chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. **Braz J Med Biol Res**, 38, n. 9, p. 1359-1365, Sep 2005.

DEKKER, F. J.; HAISMA, H. J. Histone acetyl transferases as emerging drug targets. **Drug Discov Today**, 14, n. 19-20, p. 942-948, Oct 2009.

DI FRANCIA, M.; BARBIER, D.; MEGE, J. L.; OREHEK, J. Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, 150, n. 5 Pt 1, p. 1453-1455, Nov 1994.

DI GIORGIO, E.; BRANCOLINI, C. Regulation of class IIa HDAC activities: it is not only matter of subcellular localization. **Epigenomics**, 8, n. 2, p. 251-269, Feb 2016.

DIAZ-GUZMAN, E.; MANNINO, D. M. Epidemiology and prevalence of chronic obstructive pulmonary disease. **Clin Chest Med**, 35, n. 1, p. 7-16, Mar 2014.

DIEDE, S. J.; GOTTSCHLING, D. E. Telomerase-mediated telomere addition in vivo requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta. **Cell**, 99, n. 7, p. 723-733, Dec 23 1999.

DLOUHA, D.; MALUSKOVA, J.; KRALOVA LESNA, I.; LANSKA, V. *et al.* Comparison of the relative telomere length measured in leukocytes and eleven different human tissues. **Physiol Res**, 63, n. Suppl 3, p. S343-350, 2014.

DONALDSON, G. C.; SEEMUNGAL, T. A.; BHOWMIK, A.; WEDZICHA, J. A. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, 57, n. 10, p. 847-852, Oct 2002.

DURANTE, W.; JOHNSON, F. K.; JOHNSON, R. A. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 34, n. 9, p. 906-911, Sep 2007. Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't
Review.

EAPEN, M. S.; HANSBRO, P. M.; MCALINDEN, K.; KIM, R. Y. *et al.* Abnormal M1/M2 macrophage phenotype profiles in the small airway wall and lumen in smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 13392, Oct 17 2017.

EISNER, M. D.; ANTHONISEN, N.; COULTAS, D.; KUENZLI, N. *et al.* An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, 182, n. 5, p. 693-718, Sep 1 2010. Review.

FADINI, G. P.; SIMONI, F.; CAPPELLARI, R.; VITTURI, N. *et al.* Pro-inflammatory monocyte-macrophage polarization imbalance in human hypercholesterolemia and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 237, n. 2, p. 805-808, Dec 2014.

FELICE, C.; LEWIS, A.; ARMUZZI, A.; LINDSAY, J. O. *et al.* Review article: selective histone deacetylase isoforms as potential therapeutic targets in inflammatory bowel diseases. **Aliment Pharmacol Ther**, 41, n. 1, p. 26-38, Jan 2015.

FENG, J.; FUNK, W. D.; WANG, S. S.; WEINRICH, S. L. *et al.* The RNA component of human telomerase. **Science**, 269, n. 5228, p. 1236-1241, Sep 1 1995.

FRANSSEN, F. M.; ALTER, P.; BAR, N.; BENEDIKTER, B. J. *et al.* Personalized medicine for patients with COPD: where are we? **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, 14, p. 1465-1484, 2019.

GAO, L.; CUETO, M. A.; ASSELBERGS, F.; ATADJA, P. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. **J Biol Chem**, 277, n. 28, p. 25748-25755, Jul 12 2002.

GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, 19, n. 1, p. 71-82, Jul 2003.

GHARIB, S. A.; MANICONE, A. M.; PARKS, W. C. Matrix metalloproteinases in emphysema. **Matrix Biol**, 73, p. 34-51, Nov 2018.

GIBSON, P. G.; MCDONALD, V. M. Asthma-COPD overlap 2015: now we are six. **Thorax**, 70, n. 7, p. 683-691, Jul 2015.

GILSON, E.; GELI, V. How telomeres are replicated. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 8, n. 10, p. 825-838, Oct 2007.

GINHOUX, F.; JUNG, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. **Nat Rev Immunol**, 14, n. 6, p. 392-404, Jun 2014.

GOERDT, S.; ORFANOS, C. E. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. **Immunity**, 10, n. 2, p. 137-142, Feb 1999.

GOLD. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of COPD. 2018.

GOLD. Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (GOLD), Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (2021 report). Accessed May 2021. **Available online:** **https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2020/11/GOLD-REPORT-2021-v1.1-25Nov20_WMV.pdf**
2021.

GRATCHEV, A.; GUILLOT, P.; HAKIY, N.; POLITZ, O. *et al.* Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the

extracellular matrix protein betaIG-H3. **Scand J Immunol**, 53, n. 4, p. 386-392, Apr 2001. Research Support, Non-U.S. Gov't.

GREIDER, C. W.; BLACKBURN, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. **Cell**, 43, n. 2 Pt 1, p. 405-413, Dec 1985.

GU, B.; BESSLER, M.; MASON, P. J. Dyskerin, telomerase and the DNA damage response. **Cell Cycle**, 8, n. 1, p. 6-10, Jan 1 2009.

GUILLIAMS, M.; MILDNER, A.; YONA, S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. **Immunity**, 49, n. 4, p. 595-613, Oct 16 2018.

GUNDRA, U. M.; GIRGIS, N. M.; RUCKERL, D.; JENKINS, S. *et al.* Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. **Blood**, 123, n. 20, p. e110-122, May 15 2014.

HAGSTAD, S.; BACKMAN, H.; BJERG, A.; EKERLJUNG, L. *et al.* Prevalence and risk factors of COPD among never-smokers in two areas of Sweden - Occupational exposure to gas, dust or fumes is an important risk factor. **Respir Med**, 109, n. 11, p. 1439-1445, Nov 2015.

HALBERT, R. J.; NATOLI, J. L.; GANO, A.; BADAMGARAV, E. *et al.* Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. **Eur Respir J**, 28, n. 3, p. 523-532, Sep 2006.

HAMSANATHAN, S.; ALDER, J. K.; SELLARES, J.; ROJAS, M. *et al.* Cellular Senescence: The Trojan Horse in Chronic Lung Diseases. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 61, n. 1, p. 21-30, Jul 2019.

HAN, M. K.; AGUSTI, A.; CALVERLEY, P. M.; CELLI, B. R. *et al.* Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD. **Am J Respir Crit Care Med**, 182, n. 5, p. 598-604, Sep 1 2010.

HARLEY, C. B.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature**, 345, n. 6274, p. 458-460, May 31 1990.

HART, P. H.; BURGESS, D. R.; VITTI, G. F.; HAMILTON, J. A. Interleukin-4 stimulates human monocytes to produce tissue-type plasminogen activator. **Blood**, 74, n. 4, p. 1222-1225, Sep 1989. Research Support, Non-U.S. Gov't.

HAUTAMAKI, R. D.; KOBAYASHI, D. K.; SENIOR, R. M.; SHAPIRO, S. D. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. **Science**, 277, n. 5334, p. 2002-2004, Sep 26 1997.

HE, S.; XIE, L.; LU, J.; SUN, S. Characteristics and potential role of M2 macrophages in COPD. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, 12, p. 3029-3039, 2017.

HELT, C. E.; CLIBY, W. A.; KENG, P. C.; BAMBARA, R. A. *et al.* Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. **J Biol Chem**, 280, n. 2, p. 1186-1192, Jan 14 2005.

HEY, C.; BOUCHER, J. L.; VADON-LE GOFF, S.; KETTERER, G. *et al.* Inhibition of arginase in rat and rabbit alveolar macrophages by N omega-hydroxy-D,L-indospicine, effects on L-arginine utilization by nitric oxide synthase. **Br J Pharmacol**, 121, n. 3, p. 395-400, Jun 1997.

HIYAMA, E.; HIYAMA, K. Telomere and telomerase in stem cells. **Br J Cancer**, 96, n. 7, p. 1020-1024, Apr 10 2007.

HOGG, J. C.; TIMENS, W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. **Annu Rev Pathol**, 4, p. 435-459, 2009. Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't
Review.

HUANG, B.; YANG, X. D.; ZHOU, M. M.; OZATO, K. *et al.* Brd4 coactivates transcriptional activation of NF-kappaB via specific binding to acetylated RelA. **Mol Cell Biol**, 29, n. 5, p. 1375-1387, Mar 2009.

HUMERFELT, S.; GULSVIK, A.; SKJAERVEN, R.; NILSSEN, S. *et al.* Decline in FEV1 and airflow limitation related to occupational exposures in men of an urban community. **Eur Respir J**, 6, n. 8, p. 1095-1103, Sep 1993.

ICHINOSE, M.; SUGIURA, H.; YAMAGATA, S.; KOARAI, A. *et al.* Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. **Am J Respir Crit Care Med**, 162, n. 2 Pt 1, p. 701-706, Aug 2000.

ITO, K.; ITO, M.; ELLIOTT, W. M.; COSIO, B. *et al.* Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. **N Engl J Med**, 352, n. 19, p. 1967-1976, May 12 2005.

JACKSON, D. G.; BELL, J. I. Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation. **J Immunol**, 144, n. 7, p. 2811-2815, Apr 1 1990.

JAKUBZICK, C. V.; RANDOLPH, G. J.; HENSON, P. M. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. **Nat Rev Immunol**, 17, n. 6, p. 349-362, Jun 2017. Review.

JIANG, Y.; ZHAO, Y.; WANG, Q.; CHEN, H. *et al.* Fine particulate matter exposure promotes M2 macrophage polarization through inhibiting histone deacetylase 2 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **Ann Transl Med**, 8, n. 20, p. 1303, Oct 2020.

JOHNSON, S. R. Untangling the protease web in COPD: metalloproteinases in the silent zone. **Thorax**, 71, n. 2, p. 105-106, Feb 2016. Editorial.

KAKU, Y.; IMAOKA, H.; MORIMATSU, Y.; KOMOHARA, Y. *et al.* Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on alveolar macrophages in the lungs of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. **PLoS One**, 9, n. 1, p. e87400, 2014.

KANOH, S.; RUBIN, B. K. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. **Clin Microbiol Rev**, 23, n. 3, p. 590-615, Jul 2010.

KATHERINE VERVERIS, T. C. K. Overview of the Classical Histone Deacetylase Enzymes and Histone Deacetylase Inhibitors. **ISRN Cell Biology** 2012.

KAUR, M.; BIRRELL, M. A.; DEKKAK, B.; REYNOLDS, S. *et al.* The role of CRAC channel in asthma. **Pulm Pharmacol Ther**, 35, p. 67-74, Dec 2015.

KCIUK, M.; KONTEK, R. Sirtuins in DNA repair. **Postepy Biochem**, 66, n. 2, p. 160-166, Jun 27 2020.

KHALIL, W.; XIA, H.; BODEMPUDI, V.; KAHM, J. *et al.* Pathologic Regulation of Collagen I by an Aberrant Protein Phosphatase 2A/Histone Deacetylase C4/MicroRNA-29 Signal Axis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Fibroblasts. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 53, n. 3, p. 391-399, Sep 2015.

KIERNAN, R.; BRES, V.; NG, R. W.; COUDART, M. P. *et al.* Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. **J Biol Chem**, 278, n. 4, p. 2758-2766, Jan 24 2003.

KIM, K. J.; WEN, X. Y.; YANG, H. K.; KIM, W. H. *et al.* Prognostic Implication of M2 Macrophages Are Determined by the Proportional Balance of Tumor Associated Macrophages and Tumor Infiltrating Lymphocytes in Microsatellite-Unstable Gastric Carcinoma. **PLoS One**, 10, n. 12, p. e0144192, 2015.

KIM, N. W.; PIATYSZEK, M. A.; PROWSE, K. R.; HARLEY, C. B. *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science**, 266, n. 5193, p. 2011-2015, Dec 23 1994.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, 128, n. 4, p. 693-705, Feb 23 2007.

KRISHNAN, V.; CHOW, M. Z.; WANG, Z.; ZHANG, L. *et al.* Histone H4 lysine 16 hypoacetylation is associated with defective DNA repair and premature senescence in Zmpste24-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 30, p. 12325-12330, Jul 26 2011.

KUMAR, R.; KHANDELWAL, N.; THACHAMVALLY, R.; TRIPATHI, B. N. *et al.* Role of MAPK/MNK1 signaling in virus replication. **Virus Res**, 253, p. 48-61, Jul 15 2018.

KUO, M. H.; ALLIS, C. D. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. **Bioessays**, 20, n. 8, p. 615-626, Aug 1998.

KURASHIMA, K.; TAKAKU, Y.; OHTA, C.; TAKAYANAGI, N. *et al.* COPD assessment test and severity of airflow limitation in patients with asthma, COPD, and asthma-COPD overlap syndrome. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, 11, p. 479-487, 2016.

LABAKI, W. W.; MARTINEZ, C. H.; MARTINEZ, F. J.; GALBAN, C. J. *et al.* The Role of Chest Computed Tomography in the Evaluation and Management of the Patient with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Am J Respir Crit Care Med**, 196, n. 11, p. 1372-1379, Dec 1 2017.

LANDSMAN, L.; BAR-ON, L.; ZERNECKE, A.; KIM, K. W. *et al.* CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. **Blood**, 113, n. 4, p. 963-972, Jan 22 2009.

LE QUEMENT, C.; GUENON, I.; GILLON, J. Y.; VALENCA, S. *et al.* The selective MMP-12 inhibitor, AS111793 reduces airway inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Br J Pharmacol**, 154, n. 6, p. 1206-1215, Jul 2008.

LEE, H. W.; BLASCO, M. A.; GOTTLIEB, G. J.; HORNER, J. W., 2nd *et al.* Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. **Nature**, 392, n. 6676, p. 569-574, Apr 9 1998.

LEMAN, A. R.; NOGUCHI, E. The replication fork: understanding the eukaryotic replication machinery and the challenges to genome duplication. **Genes (Basel)**, 4, n. 1, p. 1-32, Mar 1 2013.

LEUS, N. G.; VAN DER WOUDEN, P. E.; VAN DEN BOSCH, T.; HOOGHIEMSTRA, W. T. R. *et al.* HDAC 3-selective inhibitor RGFP966 demonstrates anti-inflammatory properties in RAW 264.7 macrophages and mouse precision-cut lung slices by attenuating NF-kappaB p65 transcriptional activity. **Biochem Pharmacol**, 108, p. 58-74, May 15 2016.

LEUS, N. G.; ZWINDERMAN, M. R.; DEKKER, F. J. Histone deacetylase 3 (HDAC 3) as emerging drug target in NF-kappaB-mediated inflammation. **Curr Opin Chem Biol**, 33, p. 160-168, Aug 2016.

LI, G.; TIAN, Y.; ZHU, W. G. The Roles of Histone Deacetylases and Their Inhibitors in Cancer Therapy. **Front Cell Dev Biol**, 8, p. 576946, 2020.

LI, T.; ZHANG, C.; HASSAN, S.; LIU, X. *et al.* Histone deacetylase 6 in cancer. **J Hematol Oncol**, 11, n. 1, p. 111, Sep 3 2018.

LI, W.; LI, Y.; JIN, X.; LIAO, Q. *et al.* CD38: A Significant Regulator of Macrophage Function. **Front Oncol**, 12, p. 775649, 2022.

LIU, A.; ZHANG, X.; LI, R.; ZHENG, M. *et al.* Overexpression of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 is induced by cigarette smoke in bronchial and alveolar epithelia. **J Pathol**, 253, n. 1, p. 17-30, Jan 2021.

LIU, J.; ZHANG, Z.; YANG, Y.; DI, T. *et al.* NCOA4-Mediated Ferroptosis in Bronchial Epithelial Cells Promotes Macrophage M2 Polarization in COPD Emphysema. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, 17, p. 667-681, 2022.

LIU, Y. C.; ZOU, X. B.; CHAI, Y. F.; YAO, Y. M. Macrophage polarization in inflammatory diseases. **Int J Biol Sci**, 10, n. 5, p. 520-529, 2014.

LOKKE, A.; LANGE, P.; SCHARLING, H.; FABRICIUS, P. *et al.* Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. **Thorax**, 61, n. 11, p. 935-939, Nov 2006.

LUGER, K.; DECHASSA, M. L.; TREMETHICK, D. J. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? **Nat Rev Mol Cell Biol**, 13, n. 7, p. 436-447, Jun 22 2012.

LUO, Y.; LI, H. Structure-Based Inhibitor Discovery of Class I Histone Deacetylases (HDACs). **Int J Mol Sci**, 21, n. 22, Nov 22 2020.

LUQUE-MARTIN, R.; MANDER, P. K.; LEENEN, P. J. M.; WINTHER, M. P. J. Classic and new mediators for in vitro modelling of human macrophages. **J Leukoc Biol**, 109, n. 3, p. 549-560, Mar 2021.

MAESTRELLI, P.; PASKA, C.; SAETTA, M.; TURATO, G. *et al.* Decreased haem oxygenase-1 and increased inducible nitric oxide synthase in the lung of severe COPD patients. **Eur Respir J**, 21, n. 6, p. 971-976, Jun 2003.

MANN, C. J.; PERDIGUERO, E.; KHARRAZ, Y.; AGUILAR, S. *et al.* Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. **Skelet Muscle**, 1, n. 1, p. 21, May 4 2011.

MARCH, S.; GRAUPERA, M.; ROSA SARRIAS, M.; LOZANO, F. *et al.* Identification and functional characterization of the hepatic stellate cell CD38 cell surface molecule. **Am J Pathol**, 170, n. 1, p. 176-187, Jan 2007.

MARKS, P. A. Histone deacetylase inhibitors: a chemical genetics approach to understanding cellular functions. **Biochim Biophys Acta**, 1799, n. 10-12, p. 717-725, Oct-Dec 2010.

MARTINEZ-POMARES, L. The mannose receptor. **J Leukoc Biol**, 92, n. 6, p. 1177-1186, Dec 2012.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Rep**, 6, p. 13, 2014.

MARTINEZ, F. O.; SICA, A.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Macrophage activation and polarization. **Front Biosci**, 13, p. 453-461, Jan 1 2008.

MARTIRE, S.; BANASZYNSKI, L. A. The roles of histone variants in fine-tuning chromatin organization and function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 21, n. 9, p. 522-541, Sep 2020.

MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **PLoS Med**, 3, n. 11, p. e442, Nov 2006.

MATJUSAITIS, M.; CHIN, G.; SARNOSKI, E. A.; STOLZING, A. Biomarkers to identify and isolate senescent cells. **Ageing Res Rev**, 29, p. 1-12, Aug 2016.

MAZIDI, M.; PENSON, P.; BANACH, M. Association between telomere length and complete blood count in US adults. **Arch Med Sci**, 13, n. 3, p. 601-605, Apr 1 2017.

MEYNE, J.; RATLIFF, R. L.; MOYZIS, R. K. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)n among vertebrates. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 86, n. 18, p. 7049-7053, Sep 1989.

MILLER, J.; EDWARDS, L. D.; AGUSTI, A.; BAKKE, P. *et al.* Comorbidity, systemic inflammation and outcomes in the ECLIPSE cohort. **Respir Med**, 107, n. 9, p. 1376-1384, Sep 2013. Observational Study
Research Support, Non-U.S. Gov't.

MILLS, C. D.; KINCAID, K.; ALT, J. M.; HEILMAN, M. J. *et al.* M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **J Immunol**, 164, n. 12, p. 6166-6173, Jun 15 2000. Comparative Study
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

MIRAVITLLES, M.; CALLE, M.; SOLER-CATALUNA, J. J. Clinical phenotypes of COPD: identification, definition and implications for guidelines. **Arch Bronconeumol**, 48, n. 3, p. 86-98, Mar 2012.

MIRAVITLLES, M.; SOLER-CATALUNA, J. J.; CALLE, M.; MOLINA, J. *et al.* Spanish COPD Guidelines (GesEPOC): pharmacological treatment of stable COPD. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery. **Arch Bronconeumol**, 48, n. 7, p. 247-257, Jul 2012.

MOHANTA, T. K.; SHARMA, N.; ARINA, P.; DEFILIPPI, P. Molecular Insights into the MAPK Cascade during Viral Infection: Potential Crosstalk between HCQ and HCQ Analogues. **Biomed Res Int**, 2020, p. 8827752, 2020.

MORLA, M.; BUSQUETS, X.; PONS, J.; SAULEDA, J. *et al.* Telomere shortening in smokers with and without COPD. **Eur Respir J**, 27, n. 3, p. 525-528, Mar 2006.

MORRIS, S. M., Jr. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. **J Nutr**, 137, n. 6 Suppl 2, p. 1602S-1609S, Jun 2007. Research Support, N.I.H., Extramural Review.

MUI, T. S.; MAN, J. M.; MCELHANEY, J. E.; SANDFORD, A. J. *et al.* Telomere length and chronic obstructive pulmonary disease: evidence of accelerated aging. **J Am Geriatr Soc**, 57, n. 12, p. 2372-2374, Dec 2009.

MUNOZ-ESPIN, D.; SERRANO, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 15, n. 7, p. 482-496, Jul 2014.

MURRAY, P. J.; ALLEN, J. E.; BISWAS, S. K.; FISHER, E. A. *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, 41, n. 1, p. 14-20, Jul 17 2014.

N, A. G.; QUINTANA, J. A.; GARCIA-SILVA, S.; MAZARIEGOS, M. *et al.* Phagocytosis imprints heterogeneity in tissue-resident macrophages. **J Exp Med**, 214, n. 5, p. 1281-1296, May 1 2017.

NOUREDDINE, H.; GARY-BOBO, G.; ALIFANO, M.; MARCOS, E. *et al.* Pulmonary artery smooth muscle cell senescence is a pathogenic mechanism for pulmonary hypertension in chronic lung disease. **Circ Res**, 109, n. 5, p. 543-553, Aug 19 2011.

O'CALLAGHAN, N.; DHILLON, V.; THOMAS, P.; FENECH, M. A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. **Biotechniques**, 44, n. 6, p. 807-809, May 2008.

OGIWARA, H.; UI, A.; OTSUKA, A.; SATOH, H. *et al.* Histone acetylation by CBP and p300 at double-strand break sites facilitates SWI/SNF chromatin remodeling and the recruitment of non-homologous end joining factors. **Oncogene**, 30, n. 18, p. 2135-2146, May 5 2011.

OLINGY, C. E.; DINH, H. Q.; HEDRICK, C. C. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. **J Leukoc Biol**, 106, n. 2, p. 309-322, Aug 2019.

OLIVEIRA DA SILVA, C.; MONTE-ALTO-COSTA, A.; RENOVATO-MARTINS, M.; VIANA NASCIMENTO, F. J. *et al.* Time Course of the Phenotype of Blood and Bone Marrow Monocytes and Macrophages in the Lung after Cigarette Smoke Exposure In Vivo. **Int J Mol Sci**, 18, n. 9, Sep 9 2017.

OLOVNIKOV, A. M. [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. **Dokl Akad Nauk SSSR**, 201, n. 6, p. 1496-1499, 1971.

OROZCO-LEVI, M.; GARCIA-AYMERICH, J.; VILLAR, J.; RAMIREZ-SARMIENTO, A. *et al.* Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. **Eur Respir J**, 27, n. 3, p. 542-546, Mar 2006. Research Support, Non-U.S. Gov't.

OSINSKA, I.; WOLOSZ, D.; DOMAGALA-KULAWIK, J. Association between M1 and M2 macrophages in bronchoalveolar lavage fluid and tobacco smoking in patients with sarcoidosis. **Pol Arch Med Wewn**, 124, n. 7-8, p. 359-364, 2014.

PALM, W.; DE LANGE, T. How shelterin protects mammalian telomeres. **Annu Rev Genet**, 42, p. 301-334, 2008.

PANZNER, P.; LAFITTE, J. J.; TSICOPOULOS, A.; HAMID, Q. *et al.* Marked up-regulation of T lymphocytes and expression of interleukin-9 in bronchial biopsies from patients With chronic bronchitis with obstruction. **Chest**, 124, n. 5, p. 1909-1915, Nov 2003.

PARR, D. G.; GUEST, P. G.; REYNOLDS, J. H.; DOWSON, L. J. *et al.* Prevalence and impact of bronchiectasis in alpha1-antitrypsin deficiency. **Am J Respir Crit Care Med**, 176, n. 12, p. 1215-1221, Dec 15 2007.

PARTHUN, M. R.; WIDOM, J.; GOTTSCHLING, D. E. The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. **Cell**, 87, n. 1, p. 85-94, Oct 4 1996.

PATEL, A. R.; PATEL, A. R.; SINGH, S.; SINGH, S. *et al.* Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease: The Changes Made. **Cureus**, 11, n. 6, p. e4985, Jun 24 2019.

PHILLIPS, D. M. The presence of acetyl groups of histones. **Biochem J**, 87, p. 258-263, May 1963.

PIRAS, B.; MIRAVITLLES, M. The overlap phenotype: the (missing) link between asthma and COPD. **Multidiscip Respir Med**, 7, n. 1, p. 8, Jun 20 2012.

PO, J. Y.; FITZGERALD, J. M.; CARLSTEN, C. Respiratory disease associated with solid biomass fuel exposure in rural women and children: systematic review and meta-analysis. **Thorax**, 66, n. 3, p. 232-239, Mar 2011.

POMARES, X.; MONTON, C.; ESPASA, M.; CASABON, J. *et al.* Long-term azithromycin therapy in patients with severe COPD and repeated exacerbations. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, 6, p. 449-456, 2011.

PUIG-VILANOVA, E.; AGUILO, R.; RODRIGUEZ-FUSTER, A.; MARTINEZ-LLORENS, J. *et al.* Epigenetic mechanisms in respiratory muscle dysfunction of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **PLoS One**, 9, n. 11, p. e111514, 2014.

RAGGI, F.; PELASSA, S.; PIEROBON, D.; PENCO, F. *et al.* Regulation of Human Macrophage M1-M2 Polarization Balance by Hypoxia and the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1. **Front Immunol**, 8, p. 1097, 2017.

RAHMAN, I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. **J Biochem Mol Biol**, 36, n. 1, p. 95-109, Jan 31 2003.

RAJENDRASOZHAN, S.; YANG, S. R.; EDIRISINGHE, I.; YAO, H. *et al.* Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. **Antioxid Redox Signal**, 10, n. 4, p. 799-811, Apr 2008.

RENNARD, S. I.; CALVERLEY, P. M.; GOEHRING, U. M.; BREDENBROKER, D. *et al.* Reduction of exacerbations by the PDE4 inhibitor roflumilast--the importance of defining different subsets of patients with COPD. **Respir Res**, 12, p. 18, Jan 27 2011.

RHEE, C. K. Phenotype of asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome. **Korean J Intern Med**, 30, n. 4, p. 443-449, Jul 2015.

RODE, L.; BOJESEN, S. E.; WEISCHER, M.; VESTBO, J. *et al.* Short telomere length, lung function and chronic obstructive pulmonary disease in 46,396 individuals. **Thorax**, 68, n. 5, p. 429-435, May 2013.

RODIER, F.; CAMPISI, J. Four faces of cellular senescence. **J Cell Biol**, 192, n. 4, p. 547-556, Feb 21 2011.

RODRIGUES, S. O.; CUNHA, C.; SOARES, G. M. V.; SILVA, P. L. *et al.* Mechanisms, Pathophysiology and Currently Proposed Treatments of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Pharmaceuticals (Basel)**, 14, n. 10, Sep 26 2021.

ROJAS, J.; SALAZAR, J.; MARTINEZ, M. S.; PALMAR, J. *et al.* Macrophage Heterogeneity and Plasticity: Impact of Macrophage Biomarkers on Atherosclerosis. **Scientifica (Cairo)**, 2015, p. 851252, 2015. Review.

ROSSIELLO, F.; JURK, D.; PASSOS, J. F.; D'ADDA DI FAGAGNA, F. Telomere dysfunction in ageing and age-related diseases. **Nat Cell Biol**, 24, n. 2, p. 135-147, Feb 2022.

ROTHGIESSER, K. M.; FEY, M.; HOTTIGER, M. O. Acetylation of p65 at lysine 314 is important for late NF-kappaB-dependent gene expression. **BMC Genomics**, 11, p. 22, Jan 11 2010.

RUBIO, K.; SINGH, I.; DOBERSCH, S.; SARVARI, P. *et al.* Inactivation of nuclear histone deacetylases by EP300 disrupts the MiCEE complex in idiopathic pulmonary fibrosis. **Nat Commun**, 10, n. 1, p. 2229, May 20 2019.

RUSSELL, R. E.; CULPITT, S. V.; DEMATOS, C.; DONNELLY, L. *et al.* Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 26, n. 5, p. 602-609, May 2002.

SADR, M.; NOORI MUGAHI, S. M.; HASSANZADEH, G.; NADJI, S. A. *et al.* Telomere Shortening in Blood Leukocytes of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Tanaffos**, 14, n. 1, p. 10-16, 2015.

SAITO, N.; ARAYA, J.; ITO, S.; TSUBOUCHI, K. *et al.* Involvement of Lamin B1 Reduction in Accelerated Cellular Senescence during Chronic Obstructive Pulmonary Disease Pathogenesis. **J Immunol**, 202, n. 5, p. 1428-1440, Mar 1 2019.

SAITO, S.; ZHUANG, Y.; SHAN, B.; DANCHUK, S. *et al.* Tubastatin ameliorates pulmonary fibrosis by targeting the TGFbeta-PI3K-Akt pathway. **PLoS One**, 12, n. 10, p. e0186615, 2017.

SAITO, S.; ZHUANG, Y.; SUZUKI, T.; OTA, Y. *et al.* HDAC8 inhibition ameliorates pulmonary fibrosis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 316, n. 1, p. L175-L186, Jan 1 2019.

SALVI, S. S.; BARNES, P. J. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. **Lancet**, 374, n. 9691, p. 733-743, Aug 29 2009.

SANDERS, J. L.; NEWMAN, A. B. Telomere length in epidemiology: a biomarker of aging, age-related disease, both, or neither? **Epidemiol Rev**, 35, p. 112-131, 2013.

SARADNA, A.; DO, D. C.; KUMAR, S.; FU, Q. L. *et al.* Macrophage polarization and allergic asthma. **Transl Res**, 191, p. 1-14, Jan 2018.

SARG, B.; KOUTZAMANI, E.; HELLIGER, W.; RUNDQUIST, I. *et al.* Postsynthetic trimethylation of histone H4 at lysine 20 in mammalian tissues is associated with aging. **J Biol Chem**, 277, n. 42, p. 39195-39201, Oct 18 2002.

SAVALE, L.; CHAOUAT, A.; BASTUJI-GARIN, S.; MARCOS, E. *et al.* Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, 179, n. 7, p. 566-571, Apr 1 2009.

SCHNEIDER, J. L.; ROWE, J. H.; GARCIA-DE-ALBA, C.; KIM, C. F. *et al.* The aging lung: Physiology, disease, and immunity. **Cell**, 184, n. 8, p. 1990-2019, Apr 15 2021.

SCHRUMPFOVA, P. P.; FAJKUS, J. Composition and Function of Telomerase-A Polymerase Associated with the Origin of Eukaryotes. **Biomolecules**, 10, n. 10, Oct 8 2020.

SEEMUNGAL, T. A.; WILKINSON, T. M.; HURST, J. R.; PERERA, W. R. *et al.* Long-term erythromycin therapy is associated with decreased chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. **Am J Respir Crit Care Med**, 178, n. 11, p. 1139-1147, Dec 1 2008.

SHAMMAS, M. A. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 14, n. 1, p. 28-34, Jan 2011.

SHANMUGAM, G.; RAKSHIT, S.; SARKAR, K. HDAC inhibitors: Targets for tumor therapy, immune modulation and lung diseases. **Transl Oncol**, 16, p. 101312, Feb 2022.

SHAYKHIEV, R.; KRAUSE, A.; SALIT, J.; STRULOVICI-BAREL, Y. *et al.* Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **J Immunol**, 183, n. 4, p. 2867-2883, Aug 15 2009.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **J Clin Invest**, 122, n. 3, p. 787-795, Mar 2012.

SIDOROV, I.; KIMURA, M.; YASHIN, A.; AVIV, A. Leukocyte telomere dynamics and human hematopoietic stem cell kinetics during somatic growth. **Exp Hematol**, 37, n. 4, p. 514-524, Apr 2009.

SILVERMAN, E. K. Progress in chronic obstructive pulmonary disease genetics. **Proc Am Thorac Soc**, 3, n. 5, p. 405-408, Jul 2006.

SKLENAR, A. R.; PARTHUN, M. R. Characterization of yeast histone H3-specific type B histone acetyltransferases identifies an ADA2-independent Gcn5p activity. **BMC Biochem**, 5, p. 11, Jul 26 2004.

SMITH, B. M.; AUSTIN, J. H.; NEWELL, J. D., Jr.; D'SOUZA, B. M. *et al.* Pulmonary emphysema subtypes on computed tomography: the MESA COPD study. **Am J Med**, 127, n. 1, p. 94 e97-23, Jan 2014.

SMYTH, C. M.; LOGAN, G.; BOADLE, R.; ROWE, P. B. *et al.* Differential subcellular localization of CD86 in human PBMC-derived macrophages and DCs, and ultrastructural characterization by immuno-electron microscopy. **Int Immunol**, 17, n. 2, p. 123-132, Feb 2005.

SOLER, N.; ESPERATTI, M.; EWIG, S.; HUERTA, A. *et al.* Sputum purulence-guided antibiotic use in hospitalised patients with exacerbations of COPD. **Eur Respir J**, 40, n. 6, p. 1344-1353, Dec 2012. Research Support, Non-U.S. Gov't.

STEDMAN, R. L. The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. **Chem Rev**, 68, n. 2, p. 153-207, Apr 1968.

STEIN, M.; KESHAV, S.; HARRIS, N.; GORDON, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **J Exp Med**, 176, n. 1, p. 287-292, Jul 1 1992.

STOCKLEY, R. A.; O'BRIEN, C.; PYE, A.; HILL, S. L. Relationship of sputum color to nature and outpatient management of acute exacerbations of COPD. **Chest**, 117, n. 6, p. 1638-1645, Jun 2000. Research Support, Non-U.S. Gov't.

STOLLER, J. K. Designing Clinical Trials in "Regular" COPD Versus Alpha-1 Antitrypsin Deficiency-Associated COPD: "More Alike Than Unalike?". **Chronic Obstr Pulm Dis**, 9, n. 1, p. 95-102, Jan 27 2022.

SUNDAR, I. K.; RASHID, K.; GERLOFF, J.; LI, D. *et al.* Genetic Ablation of p16(INK4a) Does Not Protect against Cellular Senescence in Mouse Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease/Emphysema. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 59, n. 2, p. 189-199, Aug 2018.

SUNDAR, I. K.; RASHID, K.; GERLOFF, J.; RANGEL-MORENO, J. *et al.* Genetic ablation of histone deacetylase 2 leads to lung cellular senescence and lymphoid follicle formation in COPD/emphysema. **FASEB J**, 32, n. 9, p. 4955-4971, Sep 2018.

SUNDERKOTTER, C.; NIKOLIC, T.; DILLON, M. J.; VAN ROOIJEN, N. *et al.* Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. **J Immunol**, 172, n. 7, p. 4410-4417, Apr 1 2004.
Comparative Study
Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.

Validation Studies.

SUZUKI, T.; TADA, Y.; KAWATA, N.; MATSUURA, Y. *et al.* Clinical, physiological, and radiological features of asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, 10, p. 947-954, 2015.

SUZUKI, T.; YANAI, M.; YAMAYA, M.; SATOH-NAKAGAWA, T. *et al.* Erythromycin and common cold in COPD. **Chest**, 120, n. 3, p. 730-733, Sep 2001.

TAN, C.; XUAN, L.; CAO, S.; YU, G. *et al.* Decreased Histone Deacetylase 2 (HDAC2) in Peripheral Blood Monocytes (PBMCs) of COPD Patients. **PLoS One**, 11, n. 1, p. e0147380, 2016.

TAO, J.; ZHANG, M.; WEN, Z.; WANG, B. *et al.* Inhibition of EP300 and DDR1 synergistically alleviates pulmonary fibrosis in vitro and in vivo. **Biomed Pharmacother**, 106, p. 1727-1733, Oct 2018.

TAYLOR, D. R.; DUMMER, J. Exhaled nitric oxide and COPD. **Eur Respir J**, 36, n. 3, p. 692; author reply 692, Sep 2010.

THOMAS, G.; TACKE, R.; HEDRICK, C. C.; HANNA, R. N. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 35, n. 6, p. 1306-1316, Jun 2015. Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't
Review.

THOMSON, N. C. Asthma and smoking-induced airway disease without spirometric COPD. **Eur Respir J**, 2017.

TOMAS-LOBA, A.; FLORES, I.; FERNANDEZ-MARCOS, P. J.; CAYUELA, M. L. *et al.* Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. **Cell**, 135, n. 4, p. 609-622, Nov 14 2008.

TOROCSIK, D.; BARDOS, H.; NAGY, L.; ADANY, R. Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. **Cell Mol Life Sci**, 62, n. 18, p. 2132-2139, Sep 2005. Research Support, Non-U.S. Gov't.

TSUJI, T.; AOSHIBA, K.; NAGAI, A. Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 31, n. 6, p. 643-649, Dec 2004.

TSUJI, T.; AOSHIBA, K.; NAGAI, A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. **Am J Respir Crit Care Med**, 174, n. 8, p. 886-893, Oct 15 2006.

TURATO, G.; DI STEFANO, A.; MAESTRELLI, P.; MAPP, C. E. *et al.* Effect of smoking cessation on airway inflammation in chronic bronchitis. **Am J Respir Crit Care Med**, 152, n. 4 Pt 1, p. 1262-1267, Oct 1995.

VAISERMAN, A.; KRASNIENKOV, D. Telomere Length as a Marker of Biological Age: State-of-the-Art, Open Issues, and Future Perspectives. **Front Genet**, 11, p. 630186, 2020.

VAN BEEK, A. A.; VAN DEN BOSSCHE, J.; MASTROBERARDINO, P. G.; DE WINTHER, M. P. J. *et al.* Metabolic Alterations in Aging Macrophages: Ingredients for Inflammaging? **Trends Immunol**, 40, n. 2, p. 113-127, Feb 2019.

VAN DER VEEN, T. A.; DE GROOT, L. E. S.; MELGERT, B. N. The different faces of the macrophage in asthma. **Curr Opin Pulm Med**, 26, n. 1, p. 62-68, Jan 2020.

VAN STRAATEN, J. F.; POSTMA, D. S.; COERS, W.; NOORDHOEK, J. A. *et al.* Macrophages in lung tissue from patients with pulmonary emphysema express both inducible and endothelial nitric oxide synthase. **Mod Pathol**, 11, n. 7, p. 648-655, Jul 1998.

VEMPATI, R. K.; JAYANI, R. S.; NOTANI, D.; SENGUPTA, A. *et al.* p300-mediated acetylation of histone H3 lysine 56 functions in DNA damage response in mammals. **J Biol Chem**, 285, n. 37, p. 28553-28564, Sep 10 2010.

VESTBO, J.; HURD, S. S.; AGUSTI, A. G.; JONES, P. W. *et al.* Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. **Am J Respir Crit Care Med**, 187, n. 4, p. 347-365, Feb 15 2013.

VIEGI, G.; PISTELLI, F.; SHERRILL, D. L.; MAIO, S. *et al.* Definition, epidemiology and natural history of COPD. **Eur Respir J**, 30, n. 5, p. 993-1013, Nov 2007.

VLAHOS, R.; BOZINOVSKI, S. Role of alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. **Front Immunol**, 5, p. 435, 2014.

VOGELMEIER, C. F.; CRINER, G. J.; MARTINEZ, F. J.; ANZUETO, A. *et al.* Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report: GOLD Executive Summary. **Respirology**, 22, n. 3, p. 575-601, Apr 2017a.

VOGELMEIER, C. F.; CRINER, G. J.; MARTINEZ, F. J.; ANZUETO, A. *et al.* Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. **Am J Respir Crit Care Med**, 195, n. 5, p. 557-582, Mar 1 2017b.

VON ZGLINICKI, T. Oxidative stress shortens telomeres. **Trends Biochem Sci**, 27, n. 7, p. 339-344, Jul 2002.

VON ZGLINICKI, T.; MARTIN-RUIZ, C. M. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. **Curr Mol Med**, 5, n. 2, p. 197-203, Mar 2005.

WANG, M.; AARON, C. P.; MADRIGANO, J.; HOFFMAN, E. A. *et al.* Association Between Long-term Exposure to Ambient Air Pollution and Change in Quantitatively

Assessed Emphysema and Lung Function. **JAMA**, 322, n. 6, p. 546-556, Aug 13 2019.

WANG, Y.; MIAO, X.; LIU, Y.; LI, F. *et al.* Dysregulation of histone acetyltransferases and deacetylases in cardiovascular diseases. **Oxid Med Cell Longev**, 2014, p. 641979, 2014.

WANG, Y.; XU, J.; MENG, Y.; ADCOCK, I. M. *et al.* Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, 13, p. 3341-3348, 2018.

WEDZICHA, J. A.; BRILL, S. E.; ALLINSON, J. P.; DONALDSON, G. C. Mechanisms and impact of the frequent exacerbator phenotype in chronic obstructive pulmonary disease. **BMC Med**, 11, p. 181, Aug 14 2013.

WEDZICHA, J. A.; RABE, K. F.; MARTINEZ, F. J.; BREDENBROKER, D. *et al.* Efficacy of roflumilast in the COPD frequent exacerbator phenotype. **Chest**, 143, n. 5, p. 1302-1311, May 2013.

WHO. WHO highlights huge scale of tobacco-related lung disease deaths. **World Health Organization**, 2019.

WHO. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **World Health Organization**, 2021.

WISE, J. L.; CROUT, R. J.; MCNEIL, D. W.; WEYANT, R. J. *et al.* Human telomere length correlates to the size of the associated chromosome arm. **PLoS One**, 4, n. 6, p. e6013, Jun 23 2009.

WOODRUFF, P. G.; KOTH, L. L.; YANG, Y. H.; RODRIGUEZ, M. W. *et al.* A distinctive alveolar macrophage activation state induced by cigarette smoking. **Am J Respir Crit Care Med**, 172, n. 11, p. 1383-1392, Dec 1 2005.

XIE, M.; LIU, X.; CAO, X.; GUO, M. *et al.* Trends in prevalence and incidence of chronic respiratory diseases from 1990 to 2017. **Respir Res**, 21, n. 1, p. 49, Feb 11 2020.

XUE, J.; SCHMIDT, S. V.; SANDER, J.; DRAFFEHN, A. *et al.* Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. **Immunity**, 40, n. 2, p. 274-288, Feb 20 2014.

YAMAMOTO, C.; YONEDA, T.; YOSHIKAWA, M.; FU, A. *et al.* Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. **Chest**, 112, n. 2, p. 505-510, Aug 1997.

YAMASAKI, K.; EEDEN, S. F. V. Lung Macrophage Phenotypes and Functional Responses: Role in the Pathogenesis of COPD. **Int J Mol Sci**, 19, n. 2, Feb 15 2018. Review.

YANG, J.; ZHANG, L.; YU, C.; YANG, X. F. *et al.* Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomark Res**, 2, n. 1, p. 1, Jan 7 2014.

YANG, S. R.; VALVO, S.; YAO, H.; KODE, A. *et al.* IKK alpha causes chromatin modification on pro-inflammatory genes by cigarette smoke in mouse lung. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 38, n. 6, p. 689-698, Jun 2008.

YANG, X.; YU, W.; SHI, L.; SUN, L. *et al.* HAT4, a Golgi apparatus-anchored B-type histone acetyltransferase, acetylates free histone H4 and facilitates chromatin assembly. **Mol Cell**, 44, n. 1, p. 39-50, Oct 7 2011.

YAO, H.; RAHMAN, I. Current concepts on the role of inflammation in COPD and lung cancer. **Curr Opin Pharmacol**, 9, n. 4, p. 375-383, Aug 2009.

YUAN, F.; DONG, P.; WANG, X.; FU, X. *et al.* Toxicological effects of cigarette smoke on Ana-1 macrophages in vitro. **Exp Toxicol Pathol**, 65, n. 7-8, p. 1011-1018, Nov 2013. Research Support, Non-U.S. Gov't.

YUAN, J.; PU, M.; ZHANG, Z.; LOU, Z. Histone H3-K56 acetylation is important for genomic stability in mammals. **Cell Cycle**, 8, n. 11, p. 1747-1753, Jun 1 2009.

ZAKIAN, V. A. Telomeres: beginning to understand the end. **Science**, 270, n. 5242, p. 1601-1607, Dec 8 1995.

ZHANG, H. Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. **J Cell Physiol**, 210, n. 3, p. 567-574, Mar 2007.

ZIEGLER-HEITBROCK, L.; ANCUTA, P.; CROWE, S.; DALOD, M. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, 116, n. 16, p. e74-80, Oct 21 2010.

ZIESCHE, E.; KETTNER-BUHROW, D.; WEBER, A.; WITTWER, T. *et al.* The coactivator role of histone deacetylase 3 in IL-1-signaling involves deacetylation of p65 NF-kappaB. **Nucleic Acids Res**, 41, n. 1, p. 90-109, Jan 7 2013.

ANEXO – Aprovação do comitê de ética

UERJ - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO/ UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Papel dos monócitos do sangue periférico na geração de macrófagos M1 e M2 e do equilíbrio das histonas acetiltransferases e desacetilases (HAT/HDAC) nos diferentes fenótipos de pacientes com DPOC.

Pesquisador: Camila Oliveira da Silva Meira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 18267619.7.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Pedro Hernesto

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.655.838

Apresentação do Projeto:

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é um grupo de patologias caracterizadas pelo bloqueio do fluxo de ar nos pulmões e dificuldade
respiratória. Atualmente, apresentam um impacto socioeconômico significativo, correspondendo uma das principais causas de morbidade e
mortalidade e, segundo dado da organização mundial da saúde, é considerada a terceira causa de mortalidade mundial. A DPOC está associada a
uma resposta inflamatória intensa do pulmão devido à exposição de partículas e gases nocivos, que culminam em uma obstrução persistente e
progressiva das vias aéreas. Diversos fatores de risco são implicados no desenvolvimento da DPOC, o principal deles é o tabagismo, em mais de
90% dos casos. Entretanto, apenas uma minoria, em torno de 25% dos fumantes, desenvolve DPOC. Este fato e a maior susceptibilidade familiar à
DPOC sugerem um componente genético importante na gênese da doença. Por ser heterogênea em suas manifestações clínicas e progressão,
Miravitlles e colaboradores estabeleceram três fenótipos centrais: DPOC-Asma, Exacerbador e

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **E-mail:** cep.hupe.interno@gmail.com

Enfisema com hiperinsuflação. A inflamação crônica
na DPOC está associada ao aumento na liberação de vários mediadores pró-inflamatórios como lipídios, citocinas e quimiocinas, que são regulados
por fatores de transcrição genética. As células atuantes na inflamação da DPOC são os macrófagos, células epiteliais, neutrófilos, linfócitos T CD8 e
nos períodos de exacerbação os eosinófilos. Os macrófagos possuem um papel de destaque no desenvolvimento da DPOC, e estão aumentados
em 5-10 vezes no lavado bronco alveolar, parênquima pulmonar e nas vias aéreas dos pacientes. Estas células são derivadas de monócitos
circulantes, os quais podem ser encontrados em três subpopulações:clássicos, envolvidos nos processos inflamatórios; intermediários e não
clássicos envolvidos nos processos de remodelamento tecidual. Estes subtipos podem favorecer a diferenciação de macrófagos teciduais em um
perfil M1, classicamente ativados ou M2, alternativamente ativados. Os macrófagos M1 são células efetoras, altamente competentes na produção de
citocinas pró-inflamatória, com atividades microbicidas e citotóxicas. Já os macrófagos M2, estão associados à reposta Th2, resolução da
inflamação, reparo tecidual e redução de citocinas pró-inflamatórias. A base molecular da amplificação da inflamação na DPOC ainda não foi
completamente elucidada, porém o balanço das enzimas HAT/HDAC (histonas acetiltransferases /histonas desacetilases) e suas atividades têm sido
reportados como elementos influentes na transcrição de genes pró-inflamatórios. Este estudo tem como objetivo investigar o perfil dos monócitos e
macrófagos e avaliar a expressão de HAT e HDAC no sanguede diferentes grupos de pacientes DPOC. A população do estudo será composta por
pacientes dos Ambulatórios de DPOC e Tabagismo do Serviço de Pneumologia e Tisiologia – UERJ, com idade igual ou superior a 40 anos e com
carga tabágica superior a 20 maços e DPOC diagnosticada e comprovada por teste de espirometria. Haverá um grupo de indivíduos hígidos
fumantes (n=30) e não fumantes (n=30) três grupos de pacientes DPOC (n=30 de cada fenótipo: DPOC-Asma, DPOC-Exacerbador e DPOCEnfisema). Células mononucleares do sangue periférico serão cultivadas por 7 dias com GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitosmacrófagos) ou M-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos). O

sobrenadante será recolhido para dosagem das citocinas e as células da
cultura serão recuperadas para análise do perfil dos macrófagos através de citometria de fluxo. Sangue total também serão obtidos para extração de
RNA, com o intuito de verificar a expressão gênica de HAT e HDAC através de PCR em tempo real. Este estudo poderá contribuir no entendimento
da fisiopatologia da DPOC e trazer conhecimentos importantes que auxiliem no desenvolvimento de estratégia terapêuticas específicas para os

UERJ - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO/ UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Continuação do Parecer: 3.655.838

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Foram analisados os seguintes documentos de apresentação obrigatória:
1) Folha de Rosto para pesquisa envolvendo seres humanos: Documento devidamente preenchido, datado e assinado
2) Projeto de Pesquisa: Adequado
3) Orçamento financeiro e fontes de financiamento: adequado/apresentado
4) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Adequado
5) Cronograma: Adequado
6) Documentos pertinentes à inclusão do HUPE: Adequado
7) Currículo do pesquisador principal e demais colaboradores: anexados e conforme as normas.

Os documentos de apresentação obrigatória foram enviados a este Comitê, estando dentro das boas práticas e apresentando todos dados necessários para apreciação ética e tendo sido avaliadas as informações contidas na Plataforma Brasil e as mesmas se encontram dentro das normas vigentes e sem riscos iminentes aos participantes envolvidos de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
O projeto pode ser realizado da forma como está apresentado. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:
Em consonância com a resolução CNS 466/12 e a Norma Operacional CNS 001/13, o CEP recomenda ao Pesquisador: Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e no termo de consentimento livre e esclarecido, para análise das mudanças; Informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa; O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que encaminhe relatórios parciais de andamento a cada 06 (seis) Meses da pesquisa e ao término, encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto; Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

UERJ - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO/ UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Continuação do Parecer: 3.655.838

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1395700.pdf	19/07/2019 16:59:57		Aceito
Declaração de Pesquisadores	V.pdf	19/07/2019 16:56:08	Camila Oliveira da Silva Meira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	P.pdf	19/07/2019 16:54:30	Camila Oliveira da Silva Meira	Aceito
Outros	Q.docx	11/07/2019 15:43:33	Camila Oliveira da Silva Meira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	T.docx	11/07/2019 15:42:53	Camila Oliveira da Silva Meira	Aceito
Folha de Rosto	F.pdf	11/07/2019 15:40:10	Camila Oliveira da Silva Meira	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	11/07/2019 15:26:07	Camila Oliveira da Silva Meira	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIO DE JANEIRO, 22 de Outubro de 2019

Assinado por:
WILLE OIGMAN
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **E-mail:** cep.hupe.interno@gmail.com