

ANTONIA CORRÊA CASTRO FERREIRA

**O RECEPTOR DE EFEROCITOSE AXL CONTROLA O  
RECRUTAMENTO DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES PARA  
AS MUCOSAS PULMONARES DURANTE A HOMEOSTASE E  
REGULA A INFLAMAÇÃO PULMONAR**



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

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**RIO DE JANEIRO  
SETEMBRO DE 2018**

**Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Imunitária George dos Reis do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, sob a orientação da Professora Alessandra D'Almeida Filardy e co-orientação de Kamila Guimarães Pinto.**

Corrêa Castro Ferreira, Antonia

O RECEPTOR DE EFEROCITOSE AXL CONTROLA O  
RECRUTAMENTO DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES PARA AS MUCOSAS  
PULMONARES DURANTE A HOMEOSTASE, E REGULA A INFLAMAÇÃO  
PULMONAR / Antonia Corrêa Castro Ferreira -- Rio de Janeiro: UFRJ, 2018.  
71f.

Orientadora: Alessandra D'Almeida Filardy.

Coorientadora: Kamila Guimarães Pinto .

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2018.

Bilbiografia: f.64-69

1. Macrófagos alveolares. 2. Eferocitose. 3. Receptores TAM. 4. Mucosas pulmonares. I. D'Almeida Filardy, Alessandra, orient. II. Guimarães Pinto , Kamila, coorient. III. Título.

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

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

ALUNO: **Antonia Corrêa Castro Ferreira**  
 DRE: 115054900

BANCA EXAMINADORA: Profa. Lígia Maria Torres Peçanha (Presidente)  
 Profa. Ana Carolina de Siqueira Couto de Oliveira  
 MSc. Thais da Silva Rigoni  
 Prof. Walter Martin Roland Oelemann (Suplente)

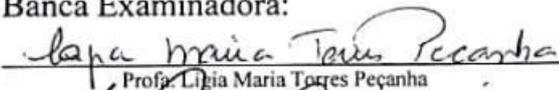
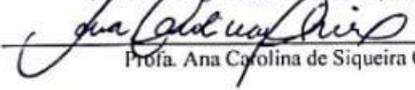
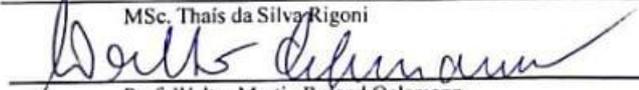
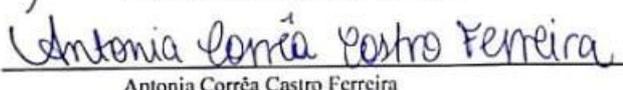
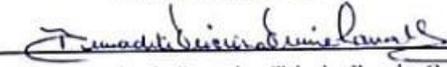
Título da Monografia: **“O receptor de eferocitose Axl controla o recrutamento de macrófagos alveolares para as mucosas pulmonares durante a homeostase e regula a inflamação pulmonar”**

Local: Sala da Pós-Graduação (E1-044), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/CCS/ UFRJ

Data e hora de início: 18 de setembro de 2018 às 10:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,3 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 18 de ...Set..... de 2018.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>9,5</u>	 Profa. Lígia Maria Torres Peçanha
<u>9,5</u>	 Profa. Ana Carolina de Siqueira Couto de Oliveira
<u>9,0</u>	MSc. Thais da Silva Rigoni  Prof. Walter Martin Roland Oelemann
Aluno:	 Antonia Corrêa Castro Ferreira
Orientador:	 Profa. Alessandra D'Almeida Filardy
Coorientador:	 Kamila Guimarães Pinto
Coordenador de TCC	 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

**Aos meus pais, por serem meu porto seguro.**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo a Deus por sempre me guiar e iluminar, principalmente nesses quase 4 anos de Rio de Janeiro. Ele esteve ao meu lado em todos os momentos que precisei e mesmo quando estava tudo bem comigo, sabia que Ele estava olhando por mim. Sei que Deus vai continuar ao meu lado nos meus próximos passos.

Agradeço imensamente também aos meus pais, Gisele e Miro. Tenho certeza que sem vocês ao meu lado eu nunca teria chegado até aqui, vocês tornaram meu sonho possível. Mãe, você me ensinou o quão forte uma mulher tem que ser para superar todos os obstáculos que existem nessa vida. Pai, você não me deixou desistir quando fraquejei e me deu o conselho que acalmou minha alma: “As portas se abrirão pra você quando tiverem que se abrir”. Por isso e por tantas outras coisas serei eternamente grata a vocês.

Obrigada também a minha melhor amiga, minha alma gêmea, minha irmã de coração, Victória. Você sempre esteve comigo, mesmo de longe, sei que posso contar com você pra tudo, sei que você sempre vai me ouvir e saber o que me falar e mesmo que não souber vai me abraçar forte e dizer que vai ficar tudo bem, porque realmente vai ficar tudo bem no final. Minha parceira de viagem, esse mundão vai ficar pequeno pra gente. Te amo!

Vovós, Bibiana e Ilma, e vovôs, Orestes e Francisco, obrigada pelo carinho único de sempre, pelo abraço quentinho e pelos mimos infinitos. Aos meus tios, tias primos e primas que me apoiam mesmo de longe. A minha querida amiga, Coca, que me recebeu no Rio com tanto amor e carinho. Meus eternos agradecimentos a todos vocês.

Em agosto de 2016 entrei no Laboratório de Biologia Imunitária George dos Reis como uma última tentativa de estágio. Queria uma experiência que realmente me fizesse feliz. Foi a melhor decisão que tomei durante toda a graduação. Fui recebida pela Alessandra de braços abertos, que sempre esteve disposta a me ensinar qualquer coisa que eu quisesse aprender. Depois de um período de adaptação no novo estágio fique mais próxima da minha co-orientadora, Kamila. Nós conduzimos todos os experimentos dessa monografia juntas e nossa parceria foi muito importante pra mim. Obrigada Alessandra e Kamila por todos os ensinamentos, paciência, apoio e dedicação a minha formação e aos nossos projetos.

Encontrei pessoas que com certeza vou levar comigo para o resto da minha vida. Posso dizer que são a minha família do Rio. Alê, a melhor orientadora que um aluno pode querer. Kamilinha, na ausência da Alê, é ela quem manda, e é melhor ter verificado todos os equipamentos do laboratório antes de sair se não, o “Bom dia” no grupo da equipe as 5:40 da manhã vai ser “bem amigável”. Moni, a mentora de todas, a cabeça de todas as peripécias do nossa equipe, obrigada por ser minha “homie”, por me divertir, me ensinar a como sustentar uma brincadeira até o final e por sempre me fazer companhia. Julia, a rainha da malandragem e das respostas rápidas quando o tema não envolve matemática. Thaís, a problematizadora mais maravilhosa que esse mundo já viu. Obrigada a todas vocês, durante esses 2 anos vocês

conseguiram extinguir a minha “inocência do interior” e me fizeram a mineira mais feliz de todas.

Agradeço também às amigas que fiz durante a graduação e sei que vou levar comigo pra sempre. Letícia, minha querida amiga, rainha das festas e de uma das personalidades mais fortes que já conheci. Sei que posso contar com você em todos os momentos. Obrigada por sempre estar ao meu lado, me apoiar, me incentivar e me fazer rir. Caroline, minha “amorinha”, obrigada por ter os melhores conselhos, as palavras certas nas horas certas e principalmente por ter as conversas mais “sem pé nem cabeça” comigo. Rafael, mais um mineiro na turma, obrigada pelos infinitos ensinamentos de Power Point e por sempre topa toda e qualquer parada. Kobayé, a beninense mais encantadora, obrigada pelos penteados lindos, pela parceria, pelos estudos e todos os trabalhos/provas que fizemos juntas ao longo desse tempo. Todos nós viemos de longe pra estudar no Rio, estivemos lado a lado em vários momentos e nos ajudamos muito nesses anos. Muito obrigada a todos vocês!

Agradeço aos membros da banca por disponibilizarem seu tempo para avaliar e contribuir com meus resultados e o projeto do laboratório.

Agradeço também as agências de fomento, CNPq e FAPERJ.

## RESUMO

ANTONIA CORREA CASTRO FERREIRA

### O RECEPTOR DE EFEROCITOSE AXL CONTROLA O RECRUTAMENTO DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES PARA AS MUCOSAS PULMONARES DURANTE A HOMEOSTASE, E REGULA A INFLAMAÇÃO PULMONAR

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

**ORIENTADOR: ALESSANDRA D'ALMEIDA FILARDY**

A mucosa pulmonar é um microambiente constantemente exposto à entrada de patógenos e devido a sua função fisiológica de trocas gasosas, é bastante sensível aos danos colaterais das respostas imunológicas. Desse modo, as respostas inflamatórias e tolerogênicas precisam ser finamente controladas nestes locais. Macrófagos alveolares (AMs) são constantemente estimulados por antígenos e sua ativação deve ser finamente regulada para evitar danos ao tecido pulmonar. Além de seu papel na fagocitose de microrganismos, AMs são as principais células que fagocitam células apoptóticas (eferocitose), contribuindo para a imunidade e homeostase nos pulmões. O receptor Axl, da família TAM, é expresso por células do sistema imunológico e além de mediar a eferocitose, bloqueia as vias de sinalização pró-inflamatórias dos TLRs e de citocinas. Nesse estudo, investigamos o papel do receptor Axl no recrutamento de AMs para as mucosas pulmonares, e na regulação de vias pró-inflamatórias durante a homeostase e silicose. Primeiramente a expressão do receptor Axl foi confirmada em células pulmonares totais e, especificamente em AMs. Analisando comparativamente os percentuais de AMs, caracterizados pela marcação duplo positiva para Siglec F<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup>, durante a homeostase, observamos que o BAL de camundongos selvagens possui em média 37% de AMs, enquanto que o BAL de camundongos Axl<sup>-/-</sup> possui em média, 65% de AMs. Além do aumento do recrutamento de AMs, observamos uma menor concentração de TGF-β e IL-10 nos BALs de camundongos Axl<sup>-/-</sup> se comparados aos selvagens, durante a homeostase. AMs de camundongos Axl<sup>-/-</sup> e selvagens quando estimulados *in vitro* com LPS, não apresentam diferenças entre si, no que diz respeito à produção de citocinas, porém o LPS em combinação com neutrófilos apoptóticos opsonizados com Gas6 provoca uma diminuição de TNF-α e aumento de IL-6 nos camundongos Axl<sup>-/-</sup> em relação aos selvagens. Durante a silicose, observamos um aumento no número total de células nos BALs de ambos os animais, porém existe uma diminuição de AMs em camundongos Axl<sup>-/-</sup> e selvagens. Investigando o perfil celular que se encontrava aumentado durante a silicose, observamos que o percentual de neutrófilos (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>) nos BALs de camundongos Axl<sup>-/-</sup> estava aumentado, se comparados aos selvagens. Também observamos diminuição nas concentrações de IL-10 nos BALs de camundongos silicóticos selvagens e deficientes em Axl, em relação aos BALs dos mesmos grupos instilados com PBS e nenhuma diferença nas concentrações de TGF-β nesses grupos. A instilação de sílica provocou aumento da concentração de TNF-α nos BALs de camundongos deficientes em Axl, mas não em camundongos selvagens e um aumento de IL-6

nos BALs de camundongos selvagens, mas não nos BALs de camundongos deficientes em Axl. Coletivamente, nossos dados indicam que o bloqueio da eferocitose mediada por Axl e deficiências na regulação negativa da sinalização pró-inflamatória intracelular pelo receptor Axl resulta no aumento do recrutamento de AMs durante a homeostase e, além disso essas células apresentam um potencial regulatório, devido ao perfil de citocinas secretadas durante a homeostase. Durante a silicose, existe um possível aumento de morte de AMs, sugerindo que há um controle menor do processo inflamatório em camundongos Axl<sup>-/-</sup>. O aumento maior no recrutamento de neutrófilos nos camundongos Axl<sup>-/-</sup> corrobora a hipótese de menor controle do processo inflamatório.

**Palavras chave:** macrófagos alveolares, eferocitose, receptores TAM.

**ABSTRACT****ANTONIA CORRÊA CASTRO FERREIRA****EFFEROCYTOSIS RECEPTOR AXL CONTROL AND RECRUIT ALVEOLAR  
MACROPHAGES TO THE PULMONARY MUCOSAL DURING HOMEOSTASIS  
AND REGULATE PULMONARY INFLAMMATION**

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

**ADVISOR: ALESSANDRA D'ALMEIDA FILARDY**

The pulmonary mucosa is a microenvironment constantly exposed to pathogens entrance, and due to its biological function is very sensitive to the collateral damage caused by immunological responses. In this way, inflammatory and tolerogenic responses need to be balanced in these sites. Alveolar macrophages (AMs) are continually stimulated by antigens and their activation needs to be tightly regulated to avoid tissue damage. Besides their role in the phagocytosis of microorganisms, AMs play an important role in the phagocytosis of apoptotic cells (efferocytosis), which contributes to the immunity and homeostasis in the lungs. The Axl receptor, from TAM family, is expressed by cells of the immune system and, in addition to mediating efferocytosis, blocks the TLRs and cytokines proinflammatory signaling pathways. In the current study we investigate the role of the Axl receptor in the recruitment of AMs to the pulmonary mucosae, and its role in the regulation of proinflammatory pathways during homeostasis and silicosis. Firstly, Axl receptor expression was confirmed in total lung cells, and specifically in AMs. Comparing the percentages of AMs, characterized by double positive labeling for SiglecF<sup>+</sup> and CD11c<sup>+</sup>, during homeostasis, we observed that the BAL of WT mice has about 37% of AMs, whereas BAL of Axl<sup>-/-</sup> mice has about 65% of AMs. We also observed a lower concentration of TGF- $\beta$  and IL-10 in the BALs of Axl<sup>-/-</sup> mice when compared to WT, during homeostasis. AMs from Axl<sup>-/-</sup> and WT mice when stimulated *in vitro* with LPS do not show any differences in relation to cytokine production, but LPS plus Gas6-opsonized-apoptotic neutrophils provokes a reduction in TNF- $\alpha$  production and enhances IL-6 in Axl<sup>-/-</sup> compared to WT mice. During silicosis, we observed an increase in the numbers of cells in the BALs of Axl<sup>-/-</sup> and WT mice, but also a decrease of AMs numbers in both animals. By investigating the cellular profile that was increased during silicosis, we found that the percentage of neutrophils (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>) was increased in the BALs of Axl<sup>-/-</sup> compared to WT mice. In addition, we observed a decrease in IL-10 concentration in the BALs of WT and Axl<sup>-/-</sup> silicotic mice, compared to the BALs of the PBS group; and we did not find differences in TGF- $\beta$  concentrations in BALs. Silica instillation provoked an increase in TNF- $\alpha$  concentration in the BALs of Axl<sup>-/-</sup> mice but not in the BALs of WT mice; and increased IL-6 in WT mice, but not in Axl<sup>-/-</sup> mice. Collectively, our data indicate that blockade of Axl-mediated efferocytosis and the deficiencies in the downregulation of intracellular proinflammatory signaling results in an

increased recruitment of AMs during homeostasis and, in addition, these cells could present a regulatory potential due to the cytokine profile secreted during homeostasis. During silicosis there is a possible increase in AMs cell death, suggesting that there is less control of the inflammatory process in *Axl*<sup>-/-</sup> mice. The increase in neutrophil recruitment in *Axl*<sup>-/-</sup> mice corroborates the hypothesis of a lower control of the inflammatory process.

**Key words:** alveolar macrophages, efferocytosis, TAM receptors.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACAMPs</b>	padrões moleculares associados à célula apoptótica
<b>AECs</b>	células epiteliais alveolares
<b>AKT</b>	proteína quinase B
<b>AMs</b>	do inglês, <i>alveolar macrophages</i>
<b>APCs</b>	células apresentadoras de antígenos
<b>CCL21</b>	ligante de CCR7
<b>CCR7</b>	receptor 7 de quimiocina CC
<b>CD</b>	do inglês, <i>cluster of differentiation</i>
<b>cDCs</b>	do inglês, células dendríticas convencionais
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CX3CR1</b>	receptor de quimiocina CX3CL1
<b>DAMPs</b>	padrões moleculares associados ao dano
<b>DCs</b>	do inglês, células dendríticas
<b>FOXP3</b>	do inglês, <i>forkhead box P3</i>
<b>FSC</b>	do inglês, Forward scatter
<b>FSC-A</b>	do inglês, Forward scatter area
<b>G2A</b>	receptor de proteína G acoplada
<b>GAPDH</b>	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<b>Gas6</b>	proteína de parada de crescimento 6
<b>G-CSF</b>	fator estimulante de colônias de granulócitos
<b>GM-CSF</b>	fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
<b>HMGB1</b>	proteínas nucleares
<b>HSPs</b>	proteínas induzidas por estresse
<b>IFN</b>	interferon
<b>IFNAR</b>	receptor de interferon
<b>IL</b>	interleucina
<b>IL-10R</b>	receptor de IL-10
<b>IMs</b>	do inglês, macrófagos intersticiais
<b>JAK1</b>	Janus kinase 1
<b>LPC</b>	lipofosfatidilcolina
<b>Ly6C</b>	do inglês, <i>lymphocyte antigen 6 complex, locus C1</i>
<b>Ly6G</b>	do inglês, <i>lymphocyte antigen 6 complex locus G6D</i>
<b>MHC-II</b>	complexo de histocompatibilidade de classe II
<b>MMP-9</b>	metaloproteinase da matriz 9
<b>moDCs</b>	do inglês, células dendríticas derivadas de monócitos
<b>NK</b>	do inglês, “ <i>natural killer</i> ”
<b>NLRP</b>	do inglês, <i>Nucleotide binding domain, Leucine rich repeat, Pyrin domain</i>
<i>containing</i>	
<b>P2Y2</b>	receptor de nucleotídeo no fagócito,
<b>PAMPs</b>	padrões moleculares associados a patógenos
<b>PCR</b>	reação em cadeia de polimerase
<b>pDCs</b>	do inglês, células dendríticas plasmocitóides
<b>PFA</b>	paraformoldeído
<b>PI3K</b>	fosfatidilinositol 3-quinase
<b>pMPs</b>	macrófagos peritoneais
<b>PROS</b>	proteína S
<b>PtdSer</b>	fosfatidilserina
<b>RLNs</b>	linfonodos drenantes regionais

<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>ROR<math>\gamma</math>t</b>	do inglês, <i>retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma</i>
<b>ROS</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>S<sub>1</sub>PR</b>	receptor da esfingosina-1- fosfato (S <sub>1</sub> P)
<b>SFB</b>	soro fetal bovino
<b>SOCS</b>	proteínas de sinalização supressora de citocinas
<b>SSC</b>	do inglês, side scatter
<b>SSC-A</b>	do inglês, side scatter area
<b>TAM</b>	<b>Ty</b> ro 3, <b>A</b> xl e <b>Mer</b> Tk
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor
<b>Th</b>	T <i>helper</i>
<b>TLRs</b>	<i>Toll-like</i> Receptor
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TNF</b>	fator de necrose tumoral
<b>Treg</b>	T regulatórias

## Sumário

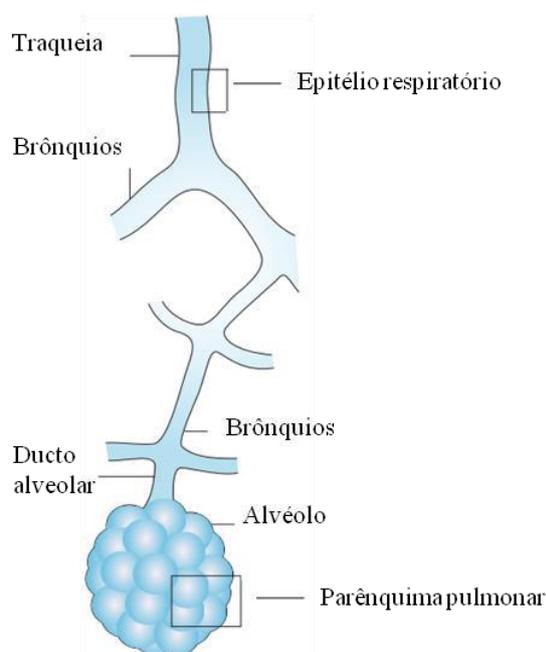
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Lista de Abreviaturas.....	xi
1. Introdução.....	12
1.1 Mucosas Pulmonares .....	12
1.2 Sistema imunológico associado à mucosa pulmonar.....	14
1.3 Eferocitose no estabelecimento da homeostase .....	23
1.4 Eferocitose mediada pelos receptores TAM.....	26
1.5 Inflamação pulmonar .....	31
1.5.1 Silicose .....	31
2. Justificativa.....	33
3. Objetivos .....	34
4. Material e Métodos.....	34
4.1 Animais.....	34
4.2 Lavado broncoalveolar (BAL).....	35
4.3 RT-PCR e qPCR.....	35
4.4 Citometria de fluxo para análise de populações celulares .....	36
4.5 Citospin.....	37
4.6 Cultura <i>in vitro</i> de AMs .....	37
4.7 Obtenção de neutrófilos apoptóticos.....	38
4.8 Obtenção de macrófagos peritoneais (pMPs) .....	38
4.9 Dosagem de citocinas por ELISA ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ) .....	39
4.10 Instalação de sílica.....	39
4.11 Avaliação da perda de massa corporal.....	40
4.12 Avaliação de peso pulmonar .....	40
4.13 Análise estatística .....	41
5. Resultados .....	41
5.1 Expressão dos mRNA para os receptores de eferocitose da família TAM e para molécula ponte Gas6 nas células pulmonares e em macrófagos alveolares .....	41
5.2 Contagem total de células pulmonares e porcentagem de AMs (SiglecF <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> ) no BAL de camundongos C57BL/6 e deficientes em Axl durante a homeostase .....	43

5.3	Análise do perfil morfológico de células presentes em BALs de animais selvagens e deficientes em Axl .....	46
5.4	Análise da produção de citocinas por células pulmonares de camundongos selvagens e deficientes em Axl .....	47
5.5	Análise funcional de AMs de camundongos selvagens e deficientes em Axl através da dosagem de citocinas <i>in vitro</i> .....	48
5.7	Contagem de células totais das vias aéreas, AMs e neutrófilos após instilação intratraqueal de sílica .....	52
5.8	Análise da produção de citocinas por células pulmonares totais de .....	55
6.	Discussão.....	57
7.	Conclusão.....	62
8.	Referências Bibliográficas.....	62

## 1. Introdução

### 1.1 Mucosas Pulmonares

O trato respiratório, que é responsável pelas trocas gasosas e oxigenação do sangue venoso é dividido em superior, composto pela cavidade nasal, faringe, laringe e parte superior da traqueia e em inferior (West, 2013), sendo a porção respiratória composta pelos bronquíolos respiratórios e ductos alveolares, que são completamente revestidos por alvéolos onde ocorrem as trocas gasosas (West, 2013 e Ovalle e Nahirney, 2014). Contendo uma superfície de aproximadamente 70 m<sup>2</sup>, em adultos (Holt *et al.*, 2008), o trato respiratório é considerado a segunda maior superfície de mucosa do corpo humano, sendo a mucosa intestinal a maior delas (Sato e Kiyono, 2012) (**Figura 1**).



**Figura 1. Divisão esquemática do trato respiratório.** Trato respiratório dividido em superior, representado pela traqueia, e inferior, sendo representado pelos brônquios, ductos alveolares e alvéolos. Adaptado de Holt *et al.*, 2008.

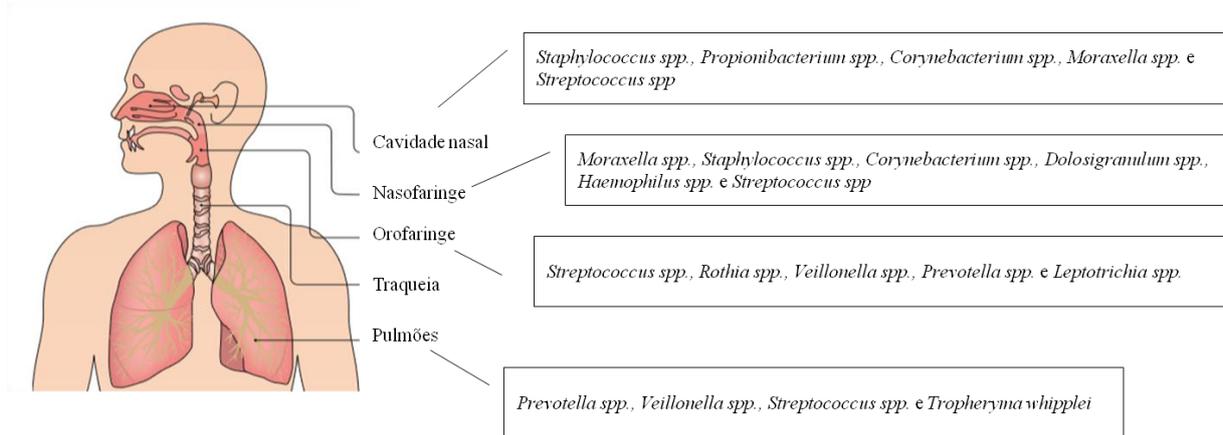
As mucosas exercem, no organismo, um papel de defesa muito importante. Por estarem em contato direto com o meio externo são as primeiras barreiras físicas de defesa encontradas por microrganismos comensais e patogênicos. Essa barreira é revestida por um epitélio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado com células secretoras de muco, e este, juntamente com os cílios das células, ajudam na remoção de partículas indesejadas que são

inaladas (Ovalle e Nahirney, 2014). Essas células, em homeostase, permanecem íntegras, porém dependem de complexos juncionais multiproteicos para promover a adesão entre as células adjacentes e, conseqüentemente, promover a integridade necessária dificultando, assim, a passagem de microrganismos (Georas e Rezaee, 2014; Merga, Campbell, e Rhodes, 2014).

As células epiteliais do trato respiratório, que apresentam uma interface delicada com o meio externo e estão constantemente entrando em contato com um amplo repertório de antígenos durante a respiração (Holt *et al.*, 2008), precisam controlar a permeabilidade celular que, se aumentada, pode ser um importante facilitador de inflamação nas mucosas (Georas e Rezaee, 2014).

Durante muito tempo o pulmão foi considerado um sítio estéril, uma vez que o isolamento e identificação de microrganismos presentes nas vias aéreas inferiores não eram realizados, devido às dificuldades relacionadas às técnicas dependentes de cultura, a reprodução de condições ideais de crescimento de bactérias fastidiosas e a contaminação com bactérias das vias aéreas superiores (Monso *et al.*, 1995; Goldstein *et al.*, 2008). Com a utilização de técnicas independentes de cultura, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) da subunidade 16S do RNA ribossomal (RNAr), foram identificados produtos bacterianos nas vias aéreas inferiores e assim, descrita a presença de microrganismos nos pulmões, embora em menor quantidade são encontrados nas vias superiores (Charlson *et al.*, 2011; Segal *et al.*, 2013; Einarsson *et al.*, 2016;).

A microbiota pulmonar é muito semelhante à microbiota oral, e a maioria dos dados revela uma diversidade microbiana substancial em indivíduos saudáveis (Segal e Blaser, 2014). Assim como em outras regiões de mucosa, o uso de antibióticos pode alterar toda a dinâmica e composição da microbiota. Além disso, a aspiração de saliva, que é um fenômeno que ocorre frequentemente e explica a presença das bactérias *Prevotella* e *Veillonella* nas vias inferiores, exerce uma pressão seletiva nos microrganismos que irão colonizar mucosas pulmonares (**Figura 2**) (Gleeson, Egli, e Maxwell, 1997; Segal e Blaser, 2014).



**Figura 2. Distribuição microbiana no trato respiratório.** Distribuição espacial e esquemática de gêneros bacterianos encontrados no trato respiratório superior e inferior. Adaptado de Man, Piters e Bogaert, 2017.

A microbiota pulmonar, assim como a intestinal, desempenha um papel importante na estimulação das respostas imunes, mas provavelmente também é influenciada pelo sistema imunológico do hospedeiro (Segal e Blaser, 2014).

## 1.2 Sistema imunológico associado à mucosa pulmonar

Os alvéolos pulmonares, responsáveis pelas trocas gasosas, são constituídos por células epiteliais alveolares (AECs) do tipo I e II (Lambrecht, 2006). As AECs do tipo I constituem 98% de toda a área superficial dos pulmões, constituindo uma fina camada que permite as trocas gasosas entre os alvéolos e os vasos capilares (Hussel e Bell, 2014). As AECs do tipo II são responsáveis pela secreção/produção de moléculas, como mucinas (Galli *et al.*, 2005), peptídeos antimicrobianos (Lu *et al.*, 2006; Nakae *et al.*, 2006), óxido nítrico (NO) (Bilyk e Holt, 1993), citocinas e quimiocinas (Pichavant *et al.*, 2006; Mayer *et al.*, 2007) e fatores de crescimento, como GM-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos) e G-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos) (Cox, Gauldie e Jordana, 1992) que, por sua vez, contribuem para a defesa deste sítio contra patógenos. Além disso, as AECs do tipo II possuem sítios, em seu citoplasma, de armazenamento do surfactante, substância importante para a redução da tensão superficial entre ar aspirado e líquido da cavidade alveolar (Flecknoe *et al.*, 2000) Em conjunto, essas células são responsáveis pela formação de uma barreira física de proteção que, juntamente com moléculas

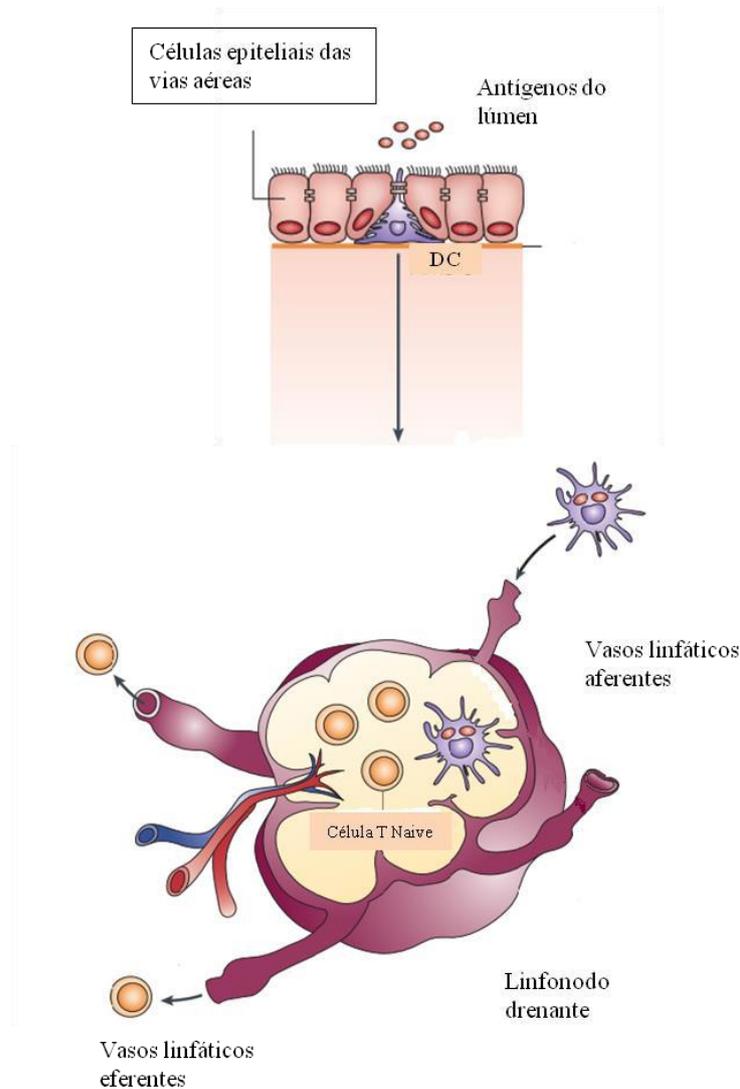
secretadas neste sítio, serão responsáveis pela manutenção da homeostase e controle da entrada de patógenos (Holt *et al.*, 2008).

Funcionalmente, os pulmões podem ser divididos em vias aéreas condutoras, que são revestidas pela mucosa, e parênquima pulmonar que, além de possuir o mesmo revestimento, é especializado em trocas gasosas (Holt *et al.*, 2008). Por se tratar de um sítio vulnerável à entrada de antígenos, as respostas imunológicas devem ser muito bem reguladas para evitar respostas inflamatórias com edema e recrutamento celular exacerbados, evitando o comprometimento da parede alveolar e conseqüentemente, da difusão de gases (Lambrecht, 2006).

O sistema imunológico associado às mucosas pulmonares é composto por uma densa população de células incluindo os neutrófilos, células dendríticas (DCs) e macrófagos (Jahnsen *et al.*, 2001). Os neutrófilos, as primeiras células a serem recrutadas para o sítio inflamatório, são liberados em grande quantidade da medula óssea para a corrente sanguínea, possuem meia vida curta e, durante infecções, através de um gradiente de quimiocinas, extravasam para os tecidos onde são necessários (Furze e Rankin, 2008). Os neutrófilos são capazes de eliminar microrganismos através de múltiplos mecanismos (Nathan, 2006), incluindo a fagocitose, com a conseqüente produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), dependente da enzima NADPH oxidase, e produção/secreção de proteínas antibacterianas, como as catepsinas, defensinas, lactoferrinas e lisozimas, presentes em seus grânulos, que, em conjunto com os ROS, promovem a morte de microrganismos (Kolaczowska e Kubes, 2013). Além do seu recrutamento para sítios inflamatórios, os neutrófilos também são encontrados como células residentes de alguns tecidos, como no caso dos pulmões. Uma pequena população de neutrófilos residentes pode ser encontrada na região alveolar dos mesmos, em condições fisiológicas. A produção de GM-CSF pelos neutrófilos residentes é ativada pela liberação de IL-23 pelos macrófagos alveolares (AMs). Esse eixo IL-23/GM-CSF regula e influencia no tamanho e função dos compartimentos de AMs e dos próprios AMs. (Tian *et al.*, 2016).

As DCs desempenham um papel importante na interface entre a imunidade inata e adaptativa (Worbs, Hammerschmidt, e Forster, 2017). Elas povoam a pele, a maioria dos órgãos sólidos e regiões de mucosa ainda durante o desenvolvimento embrionário e durante a vida pós-natal. Elas podem ser subdivididas em células dendríticas convencionais (cDCs), plasmocitóides (pDCs) e derivadas de monócitos (moDCs) (Kopf, Schneider, e Nobs, 2015).

As cDCs são as típicas apresentadoras de antígenos, que após sua ativação, geralmente, migram para os linfonodos drenantes regionais (RLNs), onde oferecem os sinais necessários para a completa ativação de linfócitos T virgens, induzindo, em última análise, memória imunológica contra antígenos inalados (Stumbles *et al.*, 1998). Quando imaturas essas células possuem pouca motilidade e elevada capacidade de macropinocitose ou endocitose dependente de receptor para adquirir seus antígenos, o que contribui para a ativação e amadurecimento dessas células (Merad *et al.*, 2013). A ativação de cDCs, após reconhecerem estímulos da microbiota ou de patógenos inalados, leva ao aumento de sua motilidade e expressão do receptor 7 de quimiocina CC (CCR7) (Ohl *et al.*, 2004; Tal *et al.*, 2011) que, através da sua ligação com seu ligante CCL21 (CCR7-CCL21), promove o recrutamento de DCs para o lúmen dos vasos linfáticos, e finalmente, para os RLNs (Weber *et al.*, 2013). Dentre a população de DCs, destaca-se o subtipo CX3CR1<sup>+</sup>, localizado estrategicamente dentro do epitélio, formando uma rede altamente desenvolvida na camada epitelial das vias aéreas condutoras, fazendo com que essas células sejam capazes de entrar em contato tanto com antígenos localizados no próprio epitélio, como os presentes no lúmen da mucosa pulmonar (Guilliams, Lambrecht, and Hammad, 2013). Devido a sua capacidade de emitir longos prolongamentos entre o espaço basolateral das células epiteliais, elas alcançam o lúmen aéreo, onde interagem e capturam antígenos do lúmen pulmonar (Jahnsen *et al.*, 2006) (**Figura 3**). Outro subtipo de cDC presente no microambiente pulmonar são as que expressam o marcador de superfície CD11b, sendo classificadas como cDCs CD11b<sup>+</sup>, localizadas abaixo da membrana basal (lamina própria) (Guilliams, Lambrecht e Hammad, 2013). Estudos sugerem que a população de cDCs CD11b<sup>+</sup> pulmonares são potentes produtoras de quimiocinas e citocinas sob condições fisiológicas, assim como sob condições de inflamação alérgica (Beaty *et al.*, 2007).



**Figura 3. Interação DCs-antígenos do lúmen aéreo e sua migração para linfonodos drenantes.** DCs emitem prolongamentos que permitem que a célula alcance antígenos presentes no lúmen aéreo. Após capturar o antígeno, a célula dendrítica migra para os linfonodos drenantes onde irão ativar células T virgens. Adaptado de Holt *et al.*, 2008. DC- célula dendrítica.

Durante a homeostase, a função da subpopulação de moDCs nos pulmões ainda não foi bem estabelecida, enquanto que a subpopulação de pDCs, aparentemente, contribui para a manutenção da tolerância a antígenos inócuos inalados (de Heer *et al.*, 2004; Oriss *et al.*, 2005). Estudos têm demonstrado que as subpopulações de DCs, moDCs e pDCs, possuem um papel antiviral importante (GeurtsvanKessel *et al.*, 2008; Kopf *et al.*, 2015).

Além das DCs, os macrófagos também são células centrais na homeostase pulmonar exercendo um papel fundamental no reparo tecidual e na defesa do hospedeiro contra moléculas externas. A maioria dos macrófagos são células de origem hematopoiética e estão distribuídos por vários tecidos, apresentando funções e fenótipos diferentes (Gordon e Taylor, 2005; Geissmann *et al.*, 2010). Devido à sua plasticidade e a fatores do microambiente a que

essas células são expostas, os macrófagos podem adquirir diferentes estados de ativação, assim como estabelecer respostas imunes que vão variar de acordo com os estímulos recebidos.

Existem pelo menos duas populações de macrófagos no ambiente pulmonar: os intersticiais (IMs) e os alveolares. Fenotipicamente, os AMs são caracterizados por expressar altos níveis das moléculas de superfície Siglec-F, CD11c e F4/80 e baixos níveis de CD11b, MHC de classe II (MHC-II) e Ly6C, enquanto que os IMs expressam altos níveis de MHC-II, níveis intermediários de F4/80 e não expressam CD11c ou Siglec-F (Kopf *et al.*, 2015) (**Tabela 1**).

Quanto a sua origem, os IMs representam uma população mista de células derivadas de precursores embrionários provenientes do fígado fetal, e de células derivadas da medula óssea que migram para os pulmões na homeostase e durante infecções. Os IMs estão localizados no parênquima pulmonar (entre os alvéolos) onde podem interagir com outras células, como por exemplo, DCs e linfócitos intersticiais, auxiliando na apresentação de antígenos (Cai *et al.*, 2014; Kapellos *et al.*, 2018). Em contrapartida, os AMs são células derivadas de monócitos do fígado fetal que colonizam o lúmen das vias aéreas de neonatos poucos dias após seu nascimento (Guilliams *et al.*, 2013). Devido à sua localização, os AMs entram em contato constantemente com antígenos inalados, porém na homeostase permanecem em um estado quiescente. Neste estado, os AMs secretam pequenas quantidades de citocinas inflamatórias, possuem pouca atividade fagocítica (Holt, 1978) e produzem moléculas imunossupressoras, incluindo a citocina TGF- $\beta$  e o ácido retinóico, que juntos, promovem a indução da expressão de FOXP3 em células T virgens (Roth e Golub, 1993; Coleman *et al.*, 2013), que contribuem para o estabelecimento da tolerância a antígenos inócuos, suprimindo a ativação de células T efetoras (**Figura 4**).

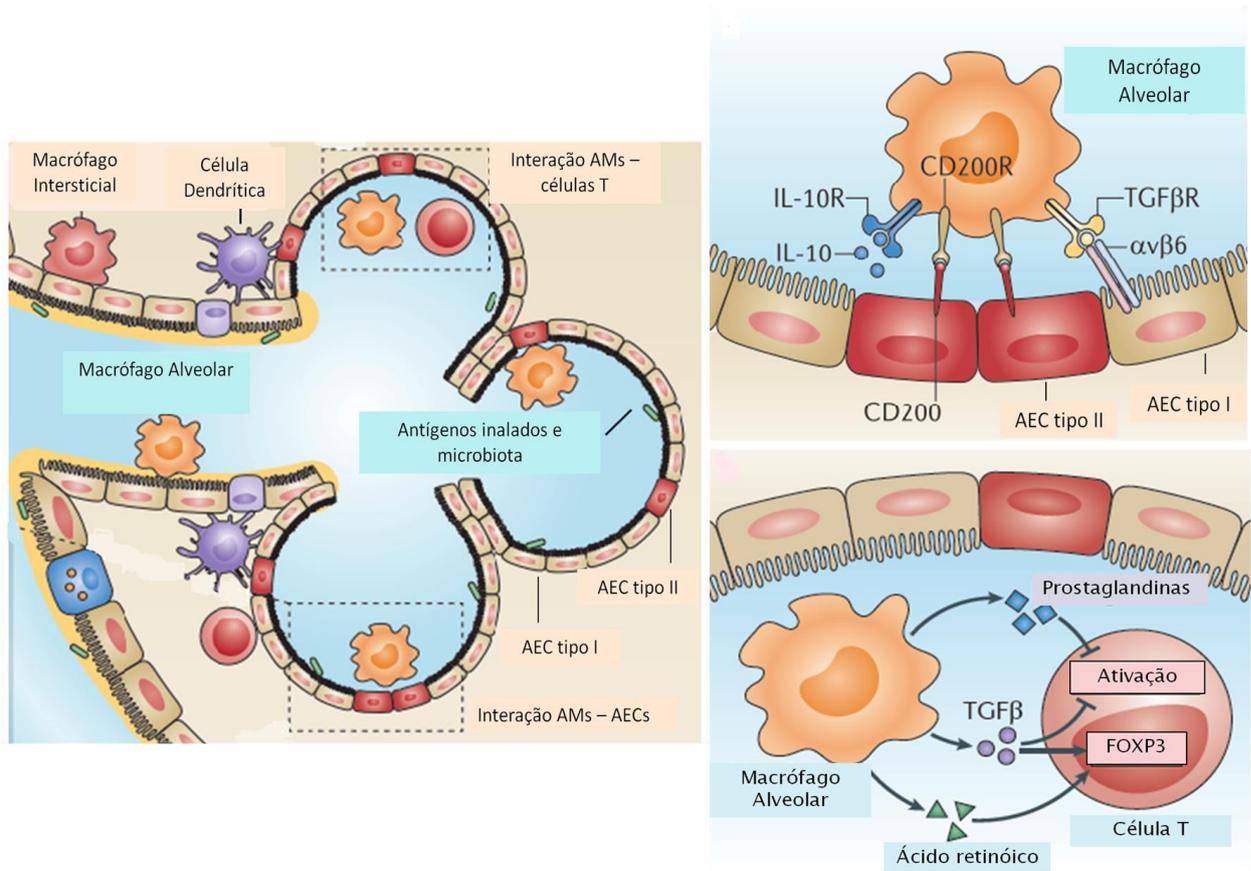
Tabela 1. Expressão de receptores de superfície de DCs e macrófagos.

	cDCs CD11b <sup>+</sup>	AMs	IMs
CD103	+	+	+
MerTk	+	++	-
SiglecF	-	+++	-
CD11c	+++	+++	-
Ly6C	-	+	+
F4/80	++	+++	++
MHC classe II	+++	+	+++
CD11b	+++	+	+

**Tabela 1. Distribuição de marcadores de superfície celular em diferentes tipos celulares presentes no ambiente pulmonar.** Expressão alta (+++), média (++) ,baixa (+) e ausente (-). Adaptado de Kopf, Schneider e Nobs, 2014. **cDCs**- células dendríticas convencionais, **AMs**- macrófagos alveolares, **IMs**- macrófagos intersticiais.

A regulação negativa dos AMs na mucosa pulmonar pode ser controlada através de interações célula-célula ou mediadores solúveis, criando um microambiente regulatório e plástico para essas células (Hussell e Bell, 2014). Interações célula-célula como as que ocorrem entre os AMs e as AECs do tipo I e II através de receptores e/ou moléculas e interações com citocinas podem regular a ativação dos AMs. Por exemplo, a interação entre o ligante CD200 expresso pelas AECs do tipo II com seu respectivo receptor nos AMs, CD200R, é capaz de inibir a ativação dos macrófagos e de células T nos alvéolos (Snelgrove *et al.*, 2008; Jiang-Shieh *et al.*, 2010). Além da interação CD200-CD200R, a interleucina-10 (IL-10) e o TGF- $\beta$  contribuem para a manutenção da tolerância nesse microambiente. A citocina IL-10, ao se ligar ao seu receptor IL-10R, expresso pelos AMs, envia um sinal inibitório via Janus kinase 1 (JAK1), que desencadeia uma via de sinalização intracelular, cujo o resultado final é a supressão da expressão de citocinas pró-inflamatórias (Murray, 2005; Murray, 2006). Já o TGF- $\beta$  pode exercer uma regulação parácrina nos AMs: a ligação entre a integrina  $\alpha\beta6$  (expressa pelas AECs do tipo I) e esse fator de crescimento permite que os AMs, que se encontravam em estado latente, sejam ativados de uma maneira dependente de contato celular (Munger *et al.*, 1999). Porém, em casos de estímulo via receptores do tipo *toll* (TLRs), ou seja, a partir do reconhecimento de padrões moleculares associados a

patógenos (PAMPs), o contato entre as AECs e os AMs é perdido e o TGF- $\beta$  não será mais encontrado em sua forma ativa. Uma maneira de restabelecer esse contato é a partir da secreção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) pelos linfócitos T no sítio de interação entre AECs e os AMs, levando ao estímulo da produção da metaloproteinase da matriz 9 (MMP-9) pelos AMs. A MMP-9, por sua vez, tem a capacidade de transformar a forma TGF- $\beta$  latente em ativa, fazendo com que os AMs voltem a estabelecer contato com as AECs assim como a expressão da integrina  $\alpha\beta6$  (Lambrecht, 2006). Diante deste cenário observa-se o potencial regulatório dessas células no epitélio respiratório (**Figura4**).



**Figura 4. Interações celulares nos alvéolos pulmonares.** Panorama geral dos tipos celulares presentes no alvéolo pulmonar e as diferentes interações entre eles (esquerda). Interação entre AMs e célula T através da ação de prostaglandinas, TGF- $\beta$  e ácido retinóico liberados pelos AMs (direita inferior). AMs interagindo com AECs do tipo I, através da expressão da molécula CD200, AECs do tipo II, através da expressão da integrina  $\alpha\beta6$  e interação da citocina IL-10, produzida pelas AECs, com seu respectivo receptor, IL-10R, expresso pelo AMs (direita superior). Adaptado de Tracy Hussell e Thomas J. Bell, 2014. AMs- macrófagos alveolares, DC- célula dendrítica, AECs- células epiteliais alveolares.

Macrófagos e DCs funcionam como “pontes” entre a imunidade inata e adaptativa (Lund *et al.*, 2002; Olmos, Stukes, e Ernst, 2010). Em situações de infecção ou traumas que levam à lesão estéril, ocorre a liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs)

por células necróticas e/ou danificadas. Esses DAMPs podem ser proteínas induzidas por estresse (HSPs) ou proteínas nucleares (HMGB1), por exemplo. Quando um patógeno (que possui PAMPs), ou quando um antígeno inócuo é reconhecido concomitante a um DAMP, os macrófagos e DCs passam a expressar moléculas co-estimulatórias da família B7 e também produzem diferentes citocinas que se ligam em receptores para citocinas em células T, promovendo a diferenciação de subpopulações diferentes (Chen e Kolls, 2013; Tajbakhsh *et al.*, 2018). Em resposta a determinadas citocinas, as células T CD4<sup>+</sup> dão início à transcrição de genes de linhagem específicos, assim como genes que codificam reguladores transcricionais o que, por fim, culmina na diferenciação de subpopulações distintas, sendo elas células T *helper* 1 (Th1), T *helper* 2 (Th2), T *helper* 17 (Th17) e T regulatórias induzidas (iTreg) (Amsen, Spilianakis e Flavell, 2009). Todas essas subpopulações são encontradas no tecido pulmonar e desempenham funções importantes nas respostas imunológicas do hospedeiro neste sítio.

As células Th1 são diferenciadas pela ação da citocina IL-12, o que leva a ativação do fator de transcrição T-bet. Essas células são caracterizadas pela secreção de IFN- $\gamma$ , IL-2 e GM-CSF. Indivíduos que possuem alguma mutação deletéria que afete a polarização Th1 podem ser suscetíveis a várias doenças respiratórias, como por exemplo, as causadas por micobactérias (Newport *et al.*, 1996; de Jong *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 2001). Ao contrário da subpopulação de células Th1, a polarização Th2 é dependente do fator de transcrição GATA3, assim como da ação da citocina IL-4. Uma vez diferenciadas, as células Th2 são caracterizadas pela produção de citocinas tais como IL-5, IL-10, IL-13 (Amsen, Spilianakis e Flavell, 2009), assim como de IL-4, esta que possui tanto funções parácrinas como autócrinas. As citocinas produzidas pelas células Th2 podem proteger o hospedeiro contra infecções parasitárias pulmonares, quadro este que pode estar presente em pessoas imunocomprometidas (Mosmann e Coffman, 1989; Vijayan, 2007). Os produtos das células Th1 e Th2 podem agir de maneira autócrina ou como fatores recíprocos inibitórios para o tipo celular oposto. Por exemplo, a IL-2, que promove a expansão clonal de Th2, irá por outro lado, inibir a proliferação de Th1. A diferenciação em Th1 e Th2 parte de um precursor comum, porém vários fatores influenciam essa polarização, como as citocinas presentes no microambiente e o *background* genético dos indivíduos (Liew, 2002).

As células Th1 e Th17 são frequentemente encontradas em tecidos danificados e por muito tempo considerou-se haver uma sobreposição entre as vias de desenvolvimento destas duas subpopulações celulares. De fato, essas células são originadas de um precursor comum,

porém, Wynn e colaboradores (2005) demonstraram que não existe uma sobreposição em suas vias de desenvolvimento, mostrando que elas divergem em algum momento (Wynn, 2005). A diferenciação de células Th17 depende das citocinas TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-23 e do fator de transcrição ROR $\gamma$ t. Goldsteins e colaboradores (2008) demonstraram que camundongos deficientes em IL-17, principal citocina produzida por essas células, são mais suscetíveis a bactérias gram negativas, como a *Klebsiella pneumoniae*. Modelos *in vivo* de animais deficientes em IL-17 ou seu receptor, IL-17RA, apresentam uma diminuição de G-CSF e do recrutamento de neutrófilos para os pulmões, colaborando com o aumento da carga bacteriana e disseminação da infecção para outros sítios (Goldstein *et al.*, 2008).

As células Tregs, que são caracterizadas por expressarem o fator de transcrição Foxp3, podem ser divididas em dois grupos (Bilate e Lafaille, 2012). As Tregs naturais (nTregs), também conhecidas como Tregs tímicas, são geradas no timo e desempenham suas funções supressoras através do contato célula-célula utilizando receptores de superfície ou através da secreção de citocinas como IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35. As iTregs ou periféricas (pTregs), se desenvolvem a partir de células T CD4<sup>+</sup> convencionais na periferia após o contato com um antígeno e na presença de citocinas como TGF- $\beta$  e IL-2, e ácido retinóico (Dominguez-Villar e Hafler, 2018). As iTregs desempenham um papel crítico e importante em mediar tolerância a antígenos inalados (Chang *et al.*, 2011) e, além disso, assim como as nTregs, são importantes por estabelecer uma resposta supressora, principalmente à antígenos próprios ou auto-antígenos (Myers *et al.*, 2006).

O sistema imunológico, que é complexo e vital, se depara a todo momento com um vasto repertório de antígenos inócuos e potencialmente danosos ao hospedeiro. O estabelecimento de uma rede de comunicação intercelular complexa é essencial não só para permitir que o hospedeiro consiga conviver harmoniosamente com microrganismos presentes na microbiota e antígenos inalados; como também para permitir que o indivíduo esteja preparado para combater possíveis infecções. Além de proteger o organismo, outra importante função do sistema imunológico é promover a remoção de células mortas, função necessária para manutenção da homeostase dos tecidos. Essa atribuição é especialmente importante em tecidos que possuem elevada taxa de renovação celular, como as mucosas.

### 1.3 Eferocitose no estabelecimento da homeostase

O corpo humano é constituído por aproximadamente  $3,72 \times 10^{13}$  células de vários tipos (Bianconi *et al.*, 2013). Muitas dessas células morrem durante seus respectivos estágios de desenvolvimento, e devem ser rapidamente removidas por outras células; bilhões de células morrem diariamente e são repostas por novas. Dentre os mecanismos conhecidos de morte celular, três são mais bem descritos e estudados, são eles: necrose, piroptose e apoptose (Nagata, 2018).

A necrose é caracterizada pelo aumento da permeabilidade da membrana plasmática devido a lesões irreversíveis. Ela é considerada uma ‘morte suja’ uma vez que a célula extravasa seu conteúdo intracelular para o meio conseqüentemente, liberando auto antígenos e DAMPs, que são capazes de ativar o sistema imunológico (Nagata, 2018). Outros estudos revelam a existência de vias de necrose reguladas, como é o caso da necroptose. Este processo é controlado geneticamente e, eventualmente, pode gerar extravasamento do conteúdo intracelular, sendo caracterizado pela granulação citoplasmática (Tom Vanden Berghe *et al.*, 2014).

A piroptose e a apoptose são mortes celulares programadas. A piroptose é uma morte celular programada dependente das caspases-1, 4 e 5, ao passo que a morte celular por apoptose é dependente das caspases-2, 3, 6-10 (Hilbi *et al.*, 1998; Bergsbaken e Cookson, 2007; Agard, Maltby e Wells, 2010). O reconhecimento concomitante de sinais de perigo e estresse ativam o inflamassomo e este, uma vez ativado, gera uma cascata de sinalização que culmina na ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo intracelular, ou seja, a piroptose é resultado da ativação do inflamassomo (Fink e Cookson, 2006; Jorgensen, Rayamajhi e Miao, 2017). A morte celular por apoptose ocorre por duas vias: intrínseca, também conhecida como mitocondrial, e extrínseca, desencadeada a partir do engajamento de receptores de morte, como os da família do TNF (fator de necrose tumoral) (Krammer, 2000; Riedl e Salvesen 2007; Strasser, Jost e Nagata, 2009).

A apoptose é caracterizada pelo encolhimento celular, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (Poon *et al.*, 2014). Esse fenômeno é natural e fisiológico ajudando na eliminação de células velhas, defeituosas ou que não são mais necessárias, sem causar dano ao organismo ou ativar respostas imunológicas. Existem alguns tipos celulares que possuem alta taxa de renovação; no trato gastrointestinal, por exemplo, as células

epiteliais são repostas a cada 4-5 dias. A hematopoiese também é um fenômeno capaz de produzir bilhões de células diariamente e, no caso do cérebro, a neurogênese é responsável pela produção de milhares de neurônios diariamente. Todos esses processos são fisiológicos e, em algum momento, geram células apoptóticas (Arandjelovic e Ravichandran, 2015).

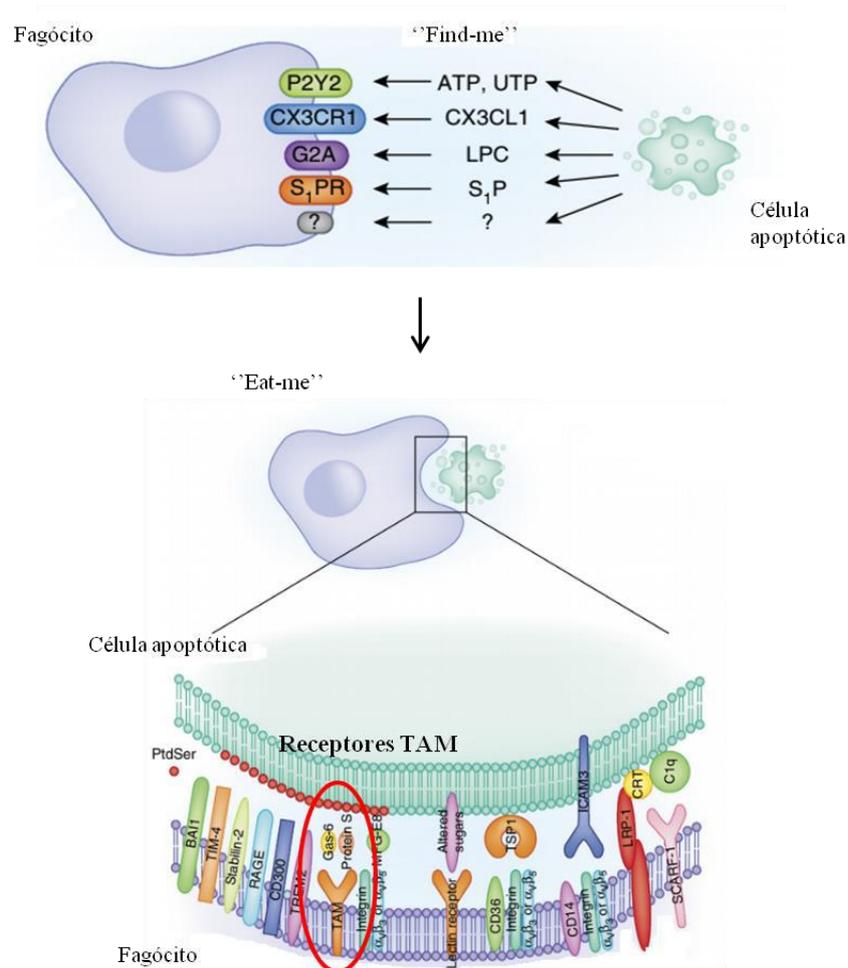
Uma vez formados, os corpos apoptóticos necessitam ser fagocitados rapidamente, processo esse conhecido como eferocitose. Durante a homeostase, os fagócitos residentes exercem a função de *clearance*, ou seja, remoção das células apoptóticas por eferocitose. Na presença de um quadro infeccioso ou dano tecidual, fenômenos em que há aumento da morte celular, fagócitos residentes e recrutados precisam realizar eferocitose rapidamente. Caso isso não ocorra, a apoptose pode evoluir para um processo de necrose secundária com consecutiva liberação do conteúdo intracelular levando à inflamação e rompimento do equilíbrio homeostático tecidual (Nagata, 2007; Poon *et al.*, 2014).

Os fagócitos responsáveis pela eferocitose podem ser classificados em profissionais, não profissionais, e especializados. Macrófagos e DCs são considerados fagócitos profissionais (van Furth *et al.*, 1972), sendo os macrófagos, os mais eficientes na eferocitose. Os fagócitos não profissionais são menos eficientes na fagocitose que os fagócitos profissionais, porém possuem função importante quando, por exemplo, os macrófagos não alcançam de imediato o sítio onde há o acúmulo de células apoptóticas. Dentre o grupo de fagócitos não profissionais, os tipos celulares mais comuns são as células epiteliais e fibroblastos (Arandjelovic e Ravichandran, 2015). Os fagócitos especializados são células multifuncionais. O melhor exemplo deste tipo de fagócito são as células de Sertoli, encontradas nos testículos, onde cada uma delas entra em contato direto com aproximadamente 30-40 células germinativas em diferentes estágios de maturação. Essas células, além de auxiliarem no processo de desenvolvimento dos espermatozoides, fagocitam células germinativas que apresentam alguma anormalidade ou meiose inapropriada, capaz de afetar a espermatogênese (Lysiak, Turner, e Turner, 2000; Elliott *et al.*, 2010).

Para que a eferocitose seja eficientemente realizada é necessário que: 1) sejam liberados sinais '*find me*' pelas células que estão entrando em apoptose para atrair fagócitos, 2) sinais '*eat me*' sejam expostos pelas células apoptóticas para diferenciá-las de células saudáveis, 3) haja rearranjo do citoesqueleto para internalização dos corpos apoptóticos pelos fagócitos e que 4) haja o processamento do conteúdo internalizado para estimular a liberação de citocinas anti-inflamatórias pelos fagócitos. Os sinais '*find me*' são importantes

principalmente em ocasiões onde os fagócitos estão distantes de células que estão em processo de morte. Esses sinais podem ser nucleotídeos (ATP e UTP), quimiocinas (CX3CL1), lipofosfatidilcolina e esfingosina-1-fosfato (Arandjelovic e Ravichandran, 2015). Sinais “*eat me*”, presentes nas células apoptóticas ou liberados por elas, precisam ser reconhecidos por receptores de eferocitose presentes nos fagócitos. Dentre os sinais “*eat me*”, também conhecidos como ACAMPs (padrões moleculares associados à célula apoptótica), podemos citar a calreticulina, anexina 1, proteína C1q do complemento, porém a fosfatidilserina (PtdSer) é o sinal mais precoce e mais bem estudado. Em condições normais, a PtdSer é restrita ao meio intracelular e está localizada na camada interna da membrana plasmática. Devido a um desarranjo da simetria da bicamada lipídica durante o processo de apoptose essa molécula é translocada da parte interna para a externa da membrana plasmática, tornando-se exposta aos fagócitos (Balasubramanian e Schroit, 2003; Tajbakhsh *et al.*, 2018) **(Figura 5)**.

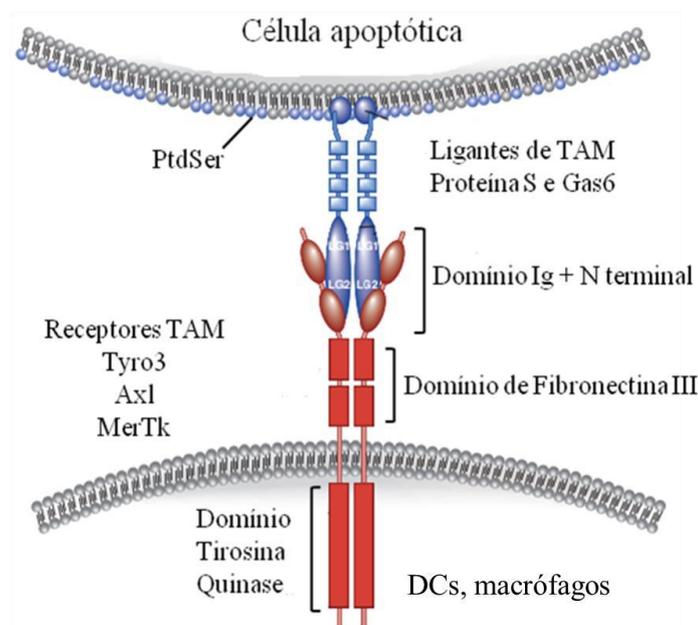
Como a PtdSer é um marcador que pode ser reconhecido por mais de um receptor de eferocitose, a eferocitose pode ser considerada um processo redundante. O reconhecimento da PtdSer pode ser realizado diretamente por diversos receptores como o TIM-4, por exemplo, e indiretamente pelos receptores da família TAM (Tyro 3, Axl e MerTk) que reconhecem a PtdSer através de moléculas ponte, e podem apresentar um papel fundamental na regulação das respostas imunológicas nas mucosas.



**Figura 5. Sinais necessários para eferocitose.** Distintos sinais “find me” liberados pelas células apoptóticas são sentidos por diferentes receptores presentes em células fagocíticas (superior). Sinais “eat me” expressos pelas células apoptóticas são reconhecidos direta ou indiretamente por receptores de eferocitose nos fagócitos (inferior). Adaptado de Sanja Arandjelovic e Kodi S Ravichandran, 2015. **P2Y2** – receptor de nucleotídeo no fagócito, **CX3CR1** – receptor de quimiocina **CX3CL1**, **G2A**- receptor de proteína G acoplada, **S<sub>1</sub>PR**-receptor da esfingosina-1- fosfato (**S<sub>1</sub>P**), **LPC**- lipofosfatidilcolina.

#### 1.4 Eferocitose mediada pelos receptores TAM

Os receptores da família TAM, **Tyro3**, **Axl** e **MerTk**, que dão o nome à família, são receptores do tipo tirosina quinase (Prasada *et al.*, 2006), compostos por: dois domínios “*imunoglobulina-like*” (responsáveis pela interação com seus ligantes), dois domínios de fibronectina do tipo III, um domínio transmembrana hidrofóbico e um sítio catalítico tirosina quinase. Uma vez ativo o sítio catalítico tirosina quinase é responsável pela fosforilação de resíduos de tirosina presentes em proteínas-alvo, alterando suas funções e levando a uma cascata de sinalização intracelular (Lemke, 2013; Rothlin *et al.*, 2015) (**Figura 6**).



**Figura 6. Receptores TAM.** Representação esquemática do receptor do tipo TAM. O receptor, ilustrado em vermelho, é composto por dois domínios “immunoglobulina-like”, dois domínios de fibronectina do tipo III, um domínio transmembrana hidrofóbico e um domínio intracelular tirosina quinase. Para o engajamento do receptor, é necessária a presença de moléculas ponte (azul) para intermediar o reconhecimento de ligantes expostos na superfície de células apoptóticas. Adaptado de Lemke, 2013.

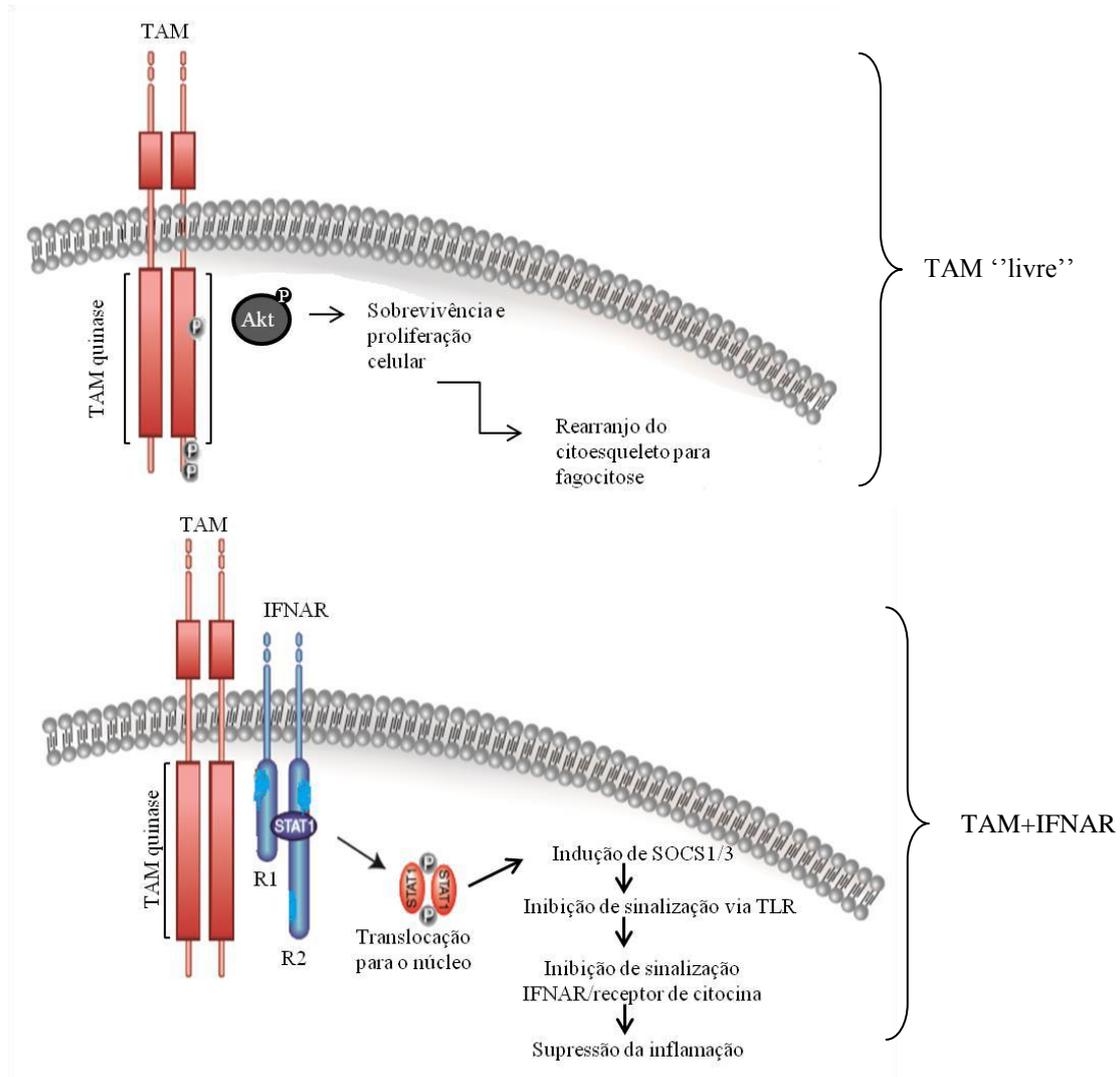
Como dito anteriormente, os receptores da família TAM são responsáveis pelo reconhecimento indireto da PtdSer exposta pelas células apoptóticas. Tal reconhecimento indireto se dá a partir de moléculas ponte, como Gas6 (proteína de parada de crescimento 6) e PROS (proteína S). Esses ligantes são proteínas  $\gamma$ -carboxiladas que se ligam aos receptores TAM pela porção carboxi-terminal e à PtdSer pela região amino-terminal (Varnum *et al.*, 1995; Nagata *et al.*, 1996), porém essas moléculas não se ligam a todos os receptores da família. A proteína Gas6 é capaz de se ligar aos três membros de receptores da família TAM, mas a PROS, se liga apenas ao Tyro3 e MerTk (Mayer *et al.*, 2007; Tsou *et al.*, 2014; Zagorska *et al.*, 2014).

A PROS é uma proteína dependente de vitamina K, codificada pelo gene PROS1 em humanos e, por si só, exerce um papel importante na manutenção da homeostase a partir de sua ação como anticoagulante, atuando na prevenção contra o desenvolvimento de trombose (Schwarz *et al.*, 1984; Engesser *et al.*, 1987). Ela pode ser expressa no fígado, rins, pulmões e gônadas e é produzida por uma grande variedade de células, como por exemplo: osteoblastos, hepatócitos, células endoteliais, entre outras (Maillard *et al.*, 1992).

A proteína Gas6, assim como a PROS, também é dependente de vitamina K, e compartilha sua composição molecular com a PROS. A Gas6 é produzida nos pulmões, rins e coração e é expressa principalmente por células endoteliais, musculares e da medula óssea (Manfioletti *et al.*, 1993; Avanzi *et al.*, 1997). Essa proteína é encontrada no plasma a uma concentração de 0,25 nmol/L (Balogh *et al.*, 2005), bem abaixo da quantidade de PROS (346 nmol/L) (Griffin, Gruber, e Fernandez, 1992). Porém, esse número pode se elevar em casos de pacientes com quadros graves de sepse, chegando a 110 ng/mL (Borgel *et al.*, 2006).

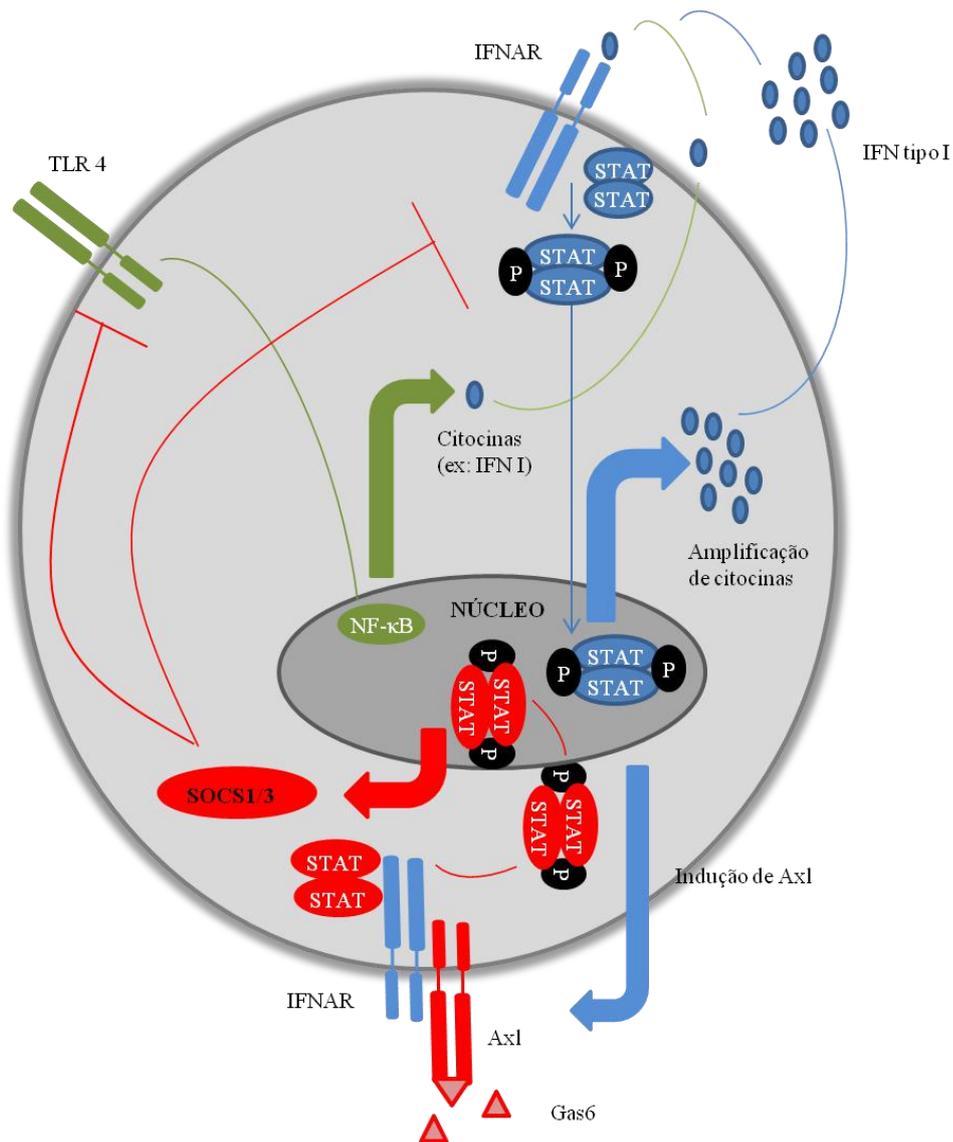
A distribuição dos receptores TAM pelo organismo é variável. O receptor Axl tem uma distribuição mais homogênea e é expresso pela maioria das células humanas de origem hematopoiética, mesenquimal ou epitelial (O'Bryan *et al.*, 1991). O receptor MerTk é um receptor mais expresso nas células dos ovários, testículos, próstata, rins, pulmões e, em menor prevalência, no timo, baço, fígado, cólon e placenta (O'Bryan *et al.*, 1991; Graham *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 1995). Já o receptor Tyro3 é encontrado majoritariamente nas células do sistema nervoso central, rins, ovários e testículos (Daí *et al.*, 1994; Mark *et al.*, 1994). No sistema imunológico, os mais importantes tipos celulares que apresentam receptores TAM MerTk e Axl, são as células apresentadoras de antígenos (APCs) (Seitz *et al.*, 2007), monócitos e células “*natural killer*” (NK) (Graham *et al.*, 1994). No entanto, esses receptores não são expressos em granulócitos e linfócitos (Lu e Lemke, 2001).

Após o engajamento dos receptores MerTk e Axl com seus respectivos ligantes via moléculas ponte, ocorre a ativação do domínio tirosina quinase dos mesmos, esta que é combinada à ativação “*downstream*” da via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/proteína quinase B (AKT) (Fridell *et al.*, 1996; Weinger *et al.*, 2008). Na via de sinalização tirosina quinase de receptores TAM “livres” ocorre a fosforilação e ativação da AKT permitindo que a célula prolifere, sobreviva e faça um rearranjo do citoesqueleto que permita a eferocitose (Lemke, 2013). Além dos receptores TAM “livres” as células do sistema imunológico como macrófagos e DCs podem apresentar também os receptores TAM acoplados aos de sinalização de citocinas – interferon do tipo I (IFNAR) – que interagem com esse receptor (Lemke, 2013). Em células que exibem as duas possibilidades de reconhecimento de células apoptóticas via TAM, a sinalização por receptores combinados (TAM-IFNAR) predomina (Lemke e Rothlin, 2008; Rothlin *et al.*, 2007) (**Figura7**).



**Figura 7. Modelo esquemático de configurações dos receptores TAM.** Receptores TAM “livres” (superior) e combinados ao receptor de citocinas IFNAR (inferior). A cascata de sinalização intracelular que ocorre nos fagócitos após o reconhecimento do complexo PtdeSer + molécula ponte pelo receptor TAM “livre” leva a sobrevivência e proliferação celular e rearranjo do citoesqueleto para fagocitose (superior). Uma vez que esse receptor está dimerizado com IFNAR a sinalização intracelular irá inibir a sinalização via TLR e de sinalização de citocinas levando a supressão da inflamação (inferior). Adaptado de Lemke, 2013.

Quando um ligante de TAM se liga indiretamente ao receptor acredita-se que a proteína JAK1 é ativada e induz a formação de um complexo entre o domínio quinase do receptor TAM e a cadeia R1 do IFNAR (Zong *et al.*, 1996), além disso, ocorre a fosforilação e ativação do fator de transcrição STAT1. Esse fator é então translocado para o núcleo da célula onde irá induzir a síntese das proteínas de sinalização supressora de citocinas 1 e 3 (SOCS1 e SOCS3), levando a inibição da sinalização via TLR e dos receptores de citocinas o que culmina na supressão da resposta inflamatória (Rothlin *et al.*, 2007; Lemke e Rothlin, 2008) (**Figura 8**).



**Figura 8. Via de sinalização regulada por TAM.** Verde – via de sinalização iniciada por TLRs que culmina na ativação do fator de transcrição NF-κB e consequente secreção de citocinas pró-inflamatórias, azul – sinalização e amplificação do sinal de citocinas e induzindo transcrição do gene Axl, vermelho – TAM + IFNAR ativados concomitantemente induzindo a transcrição dos genes que codificam SOCS1 e 3 que inibem TLRs e IFNAR, suprimindo a inflamação.

O sistema imunológico tem como função principal a manutenção da homeostase, ou seja, garantir o equilíbrio do organismo, mas também é responsável pela resolução de inflamações estéreis e não estéreis. Devido a maior expressão de MerTk e Axl em determinadas células do sistema imunológico, esses receptores ajudam no controle das respostas imunes. A eferocitose é um fator determinante, pois a partir desse mecanismo ocorre uma regulação do sistema imunológico. Após a fagocitose de células apoptóticas via MerTk a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos é suprimida, enquanto ocorre a indução da produção de citocinas anti-inflamatórias (Wallet *et al.*, 2008; Alciato *et al.*, 2010; Zizzo *et al.*, 2012). Enquanto isso é a cooperação entre Axl e IFNAR, que permite a

inibição da via pró-inflamatória mediada por TLRs (Rothlin *et al.*, 2007; Yoshimura, Naka, e Kubo, 2007).

Camundongos ou células deficientes em receptores TAM, principalmente MerTk e Axl, apresentam resposta inflamatória elevada (Lu e Lemke, 2001; Rothlin *et al.*, 2007). A deficiência nestes receptores está associada à sustentação de uma resposta imune inflamatória crônica, visto que animais mutantes para os genes dos receptores TAM podem desenvolver doenças autoimunes (Lu e Lemke, 2001; Scott *et al.*, 2001; Wallet *et al.*, 2008; Shao *et al.*, 2009; Rothlin e Lemke, 2010). Já foi demonstrado também o envolvimento da eferocitose ineficiente e da sinalização indiscriminada de IFN I no desenvolvimento de doenças autoimunes e doenças inflamatórias intestinais (Gaipl *et al.*, 2006; Ronnblom e Pascual, 2008; Nagata, Hanayama e Kawane, 2010).

## **1.5 Inflamação pulmonar**

### **1.5.1 Silicose**

A silicose é uma doença pulmonar ocupacional causada pela inalação de partículas de sílica ( $\text{SiO}_2$ ); é uma doença inflamatória estéril, persistente e progressiva que pode causar fibrose pulmonar com consequente perda de função respiratória e afeta principalmente mineiros, pessoas que trabalham em marmorarias e com obras (Yang *et al.*, 2016). A exposição às partículas de sílica em doses mais baixas pode gerar lesões inflamatórias reversíveis, caracterizadas por aglomerados de AMs com partículas de sílica em seu interior. Exposições mais intensas levam a proliferação celular excessiva nos pulmões com consequente deposição de colágeno e outros componentes de matriz extracelular (Mossman e Churg, 1998; Velan, Kumar, e Cohen, 1993).

Durante o processo de patogênese da silicose, células efectoras do sistema imunológico entram em contato com células lesionadas, como as células epiteliais bronquiolares, alveolares e fibroblastos que sofrem hiperplasia e hipertrofia (Mossman e Churg, 1998). A proliferação das AECs pode ajudar na regeneração tecidual inicial, porém leva a fibrogênese se descontrolada. Essa hiperproliferação das células epiteliais e fibroblastos pode levar à ativação e expressão precoce de genes pró-apoptóticos ligados a ativação do processo de

apoptose em vários tipos celulares, gerando um acúmulo de células apoptóticas (Angel e Karin, 1991)

Partículas de sílica são conhecidas indutoras da ativação do inflamassomo. A resposta inflamatória gerada a partir de sua interação com os AMs presentes na mucosa pulmonar levam a subsequente formação de fibrose pulmonar esta que é dependente da ativação do inflamassomo NLRP3 (Cassel *et al.*, 2008).

Os inflamassomos são complexos proteicos formados após estímulo microbiano/inflamatório associados ao dano celular. O principal resultado da montagem desse complexo é a ativação de caspase-1, uma protease envolvida na promoção de respostas pró-inflamatórias e protetoras no hospedeiro. A formação desse complexo macromolecular pode ocorrer em resposta a PAMPs e/ou DAMPs, sinais estes que informam sensores da imunidade inata do hospedeiro de uma infecção ou possível desvio nocivo da homeostase (Próchnicki e Latz, 2017). Como dito anteriormente, o resultado molecular final da montagem desse complexo se dá a partir da ativação auto catalítica de caspase-1, esta que é responsável pela ativação proteolítica de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e IL-18 (Latz *et al.*, 2013), assim como da proteína citosólica solúvel gasdermina D (He *et al.*, 2015, Shi *et al.*, 2015, Kagayaki *et al.*, 2015). Após proteólise dessas citocinas, fragmentos de gasdermina D se inserem na membrana plasmática da célula e medeiam a secreção de IL-1 $\beta$  e IL-18, ambas induzindo um tipo de morte inflamatória conhecido como piroptose (Ding *et al.*, 2016, Liu *et al.*, 2016). De maneira importante, nem todo estímulo que causa a formação do inflamassomo e ativação de caspase-1 leva a piroptose, mas o mecanismo de proteção celular contra a piroptose ainda é desconhecido (Próchnicki e Latz, 2017).

No ambiente pulmonar estão presentes antígenos microbianos que são responsáveis pelo primeiro sinal via TLR, e embora essa via não seja a única possibilidade envolvida no primeiro sinal é uma das mais descritas e conhecidas. O segundo sinal envolvido na inflamação estéril induzida por partículas de sílica são os produtos da desestabilização que essa partícula cristalina causa no fagolisossomo. Nesse caso, a inflamação iniciada seguinte à inalação de partículas de sílica se dá a partir de produtos provenientes da desestabilização que essa partícula cristalina causa no fagolisossomo após sua internalização pelos AMs. Uma vez rompida, essa estrutura é capaz de liberar sinais de perigo como NO e ROS que, por sua vez, são capazes de ativar a formação do inflamassomo. Esses sinais de perigo também podem

atuar de forma parácrina e sinalizar para a ativação desse complexo em células vizinhas (Liu *et al.*, 2017 e Cunha *et al.*, 2017).

A silicose é uma doença que não possui cura conhecida (Leung, Yu, e Chen, 2012), mas a lavagem total dos pulmões pode dar um alívio ao paciente (Idec-Sadkowska *et al.*, 2006), porém não são observadas melhorias funcionais no órgão em si (Wilt *et al.*, 1996). O risco de silicose deve ser avaliado antes do início de um trabalho, e o monitoramento constante de sílica inalável deve ser feito em indústrias ou minas que já apresentaram trabalhadores com casos de silicose (Kromhout, 2002).

A eferocitose é um processo muito importante não apenas para manter o equilíbrio do organismo durante a homeostase, mas também é responsável por impedir o início de respostas inflamatórias indevidas através do acúmulo de células apoptóticas no tecido.

## **2. Justificativa**

Nas mucosas pulmonares, onde a exposição a microrganismos comensais, antígenos exógenos e a quantidade de células apoptóticas são elevadas, é necessário que exista um equilíbrio muito bem regulado entre as respostas inflamatórias e tolerogênicas. Desta forma, acreditamos que a eferocitose mediada pelo receptor TAM, Axl, possa contribuir para a manutenção da homeostase neste local, uma vez que esse receptor, além de promover a eferocitose de células apoptóticas, também é responsável pela regulação negativa da sinalização pró-inflamatória disparada pelos receptores TLRs e citocinas. Com isso, acreditamos que estudar a fundo o papel desse receptor na mucosa pulmonar, principalmente o fenótipo e função dos AMs e de outras células residentes nos pulmões durante a homeostase, bem como durante processos inflamatórios seja importante para contribuir para o desenvolvimento de novos conhecimentos na área, assim como novas estratégias e alvos terapêuticos para o tratamento de doenças inflamatórias pulmonares. Para este fim, usaremos camundongos isogênicos da linhagem C57BL6 selvagens (WT) e/ou  $Axl^{-/-}$ .

### 3. Objetivos

Investigar o papel da eferocitose mediada pelo receptor da família TAM, Axl, na frequência, regulação da ativação e função dos AMs na homeostase e durante processos inflamatórios utilizando como modelo experimental, a silicose. Para isso foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1. Verificar a presença de RNA mensageiro para os receptores TAM e molécula ponte Gas6 em células totais pulmonares e em AMs.
2. Avaliar a quantidade de células totais pulmonares e AMs nos pulmões de camundongos selvagens e deficientes em Axl durante a homeostase.
3. Verificar o perfil celular presente nos BALs de camundongos WT e Axl<sup>-/-</sup> durante a homeostase.
4. Avaliar o perfil funcional de células pulmonares totais durante a homeostase e de AMs mediante a estimulação através da dosagem de citocinas.
5. Acompanhar a massa corporal e pulmonar de camundongos selvagens e deficientes em Axl após instilação intratraqueal de sílica.
6. Avaliar a quantidade de células totais pulmonares, AMs e neutrófilos nos pulmões de camundongos selvagens e deficientes em Axl durante a silicose.
7. Avaliar o perfil funcional de células pulmonares totais durante a silicose através da dosagem de citocinas.

### 4.0 Material e Métodos

#### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 selvagens e deficientes no receptore da família TAM, Axl (Axl<sup>-/-</sup>), do sexo masculino com idade entre 6 e 8 semanas. Os animais foram gentilmente cedidos por Brian Kelsall, *National Institutes of Health (NIH)*, Estados Unidos, e mantidos em microisoladores estéreis, em ambiente com temperatura e umidade controladas. Todos os experimentos seguiram as normas estabelecidas pela CEUA CCS/UFRJ (Licença 041/17- 25/04/2017).

## 4.2 Lavado broncoalveolar (BAL)

Camundongos WT ou *Axl*<sup>-/-</sup> foram anestesiados com fenobarbital sódico (2,0 mg/kg) via intraperitoneal (i.p.). Após a aplicação do anestésico os animais foram imobilizados na mesa cirúrgica para o início dos procedimentos. Primeiramente, a pele e o peritônio do animal foram incisados, a veia cava inferior foi exposta e cortada causando morte por hipovolemia. A traqueia dos camundongos foi exposta com o auxílio de pinças e tesouras cirúrgicas, o fluxo de ar foi interrompido a partir do uso de linha de sutura e o BAL foi feito através de injeções intratraqueais (i.t.) consecutivas de 1 mL de PBS 1X estéril totalizando, em média, um volume final de 3 mL. Para isso, foram utilizadas seringas de 1 mL (BD Plastik) e cânulas de 20G (Medcateter).

O volume recuperado a partir do primeiro BAL foi coletado, centrifugado por 8 minutos a 4500 rpm e 50 µL foi usado imediatamente para dosagem de óxido nítrico à fresco e o restante, armazenado para posterior dosagem de citocinas por ELISA. As células obtidas a partir do primeiro BAL foram acrescentadas aos BALs seguintes (segunda e terceira lavagem), centrifugadas por 6 minutos a 1600 rpm e ressuspensas em 1 mL de tampão PBS suplementado com 0,5% BSA (Sigma), 5 mM EDTA (Sigma) e 50% SFB (Gibco) para citometria de fluxo ou meio RPMI completo com 10% SFB para estudos de AMs *in vitro*. Em outros experimentos, as células obtidas através dos BALs foram utilizadas para análise da expressão dos mRNA para *MerTk*, *Axl*, *Tyro3*, *Gas6*, *TGF-β*, *IL-10*, *TNF-α*, *IL-6* e *KC* através de PCR em tempo real (RT-PCR). Todas as células coletadas nos lavados broncoalveolares foram contadas utilizando câmara de Neubauer e azul de Trypan (Sigma; diluição de 1:10).

## 4.3 RT-PCR e qPCR

Para as análises de expressão gênica por RT-PCR, AMs foram coletados, plaqueados, estimulados e por fim, tiveram seus RNA totais extraídos e isolados usando o reagente TRIzol de acordo com metodologia preconizada pelos fabricantes (Invitrogen; ThermoFischer). Para análise de células pulmonares totais uma parte de aproximadamente 1 cm do lobo direito do pulmão foi retirado e colocado em um tubo eppendorf para extração e isolamento de RNA

total utilizando o mesmo reagente anteriormente citado. Resumidamente, o reagente TRIzol foi adicionado às culturas de células e homogeneizado para a ruptura das membranas celulares. O tecido pulmonar, além da adição de TRIzol, foi macerado com a ajuda de um embolo de seringa. Em seguida, foi adicionado clorofórmio e realizada uma centrifugação de 12000 g a 4°C por 15 minutos. A fase aquosa superior, contendo o RNA, foi transferida para outro tubo para o prosseguimento do protocolo. Foi adicionado isopropanol, seguido de uma etapa de centrifugação de 12000 g a 4°C por 10 minutos, e o conteúdo foi solubilizado em etanol a 75% seguido de uma nova etapa de centrifugação de 5000 g a 4°C por 5 minutos. O pellet foi solubilizado em 20-50 µL de água livre de RNase. A partir dessa ressuspensão o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado usando iScript cDNA Synthesis Kit (BIORAD) e as análises do RT-PCR em tempo real foram realizadas no instrumento QuantStudio 3 and 5 Real-Time PCR (Applied Biosystems) usando sequências iniciadoras e sondas gene-específicas (Applied Biosystems). O nível de expressão do gene alvo foi calculado como  $2^{-\Delta Ct}$  onde  $\Delta Ct = Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{GAPDH}}$ , sendo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), um controle endógeno e CT um indicador de limiar de ciclo (ciclo treshhold). O RT-PCR e o qPCR foram realizados para verificação da expressão dos mRNA para receptores da família TAM no pulmão total de camundongos selvagens e em AMs de camundongos selvagens e deficientes em Axl.

#### 4.4 Citometria de fluxo para análise de populações celulares

Células obtidas a partir dos BALs de camundongos WT e Axl<sup>-/-</sup> foram transferidas para tubos de citometria, centrifugadas por 6 minutos a 1600 rpm e ressuspendidas em 10 µL de uma solução de 1:200 de anti-CD16/CD32 (Fc Block) (BD-Biosciences). Os tubos foram mantidos em gelo ao abrigo da luz por aproximadamente 10 minutos. Após incubação, foi adicionado 50 µL do coquetel contendo os seguintes anticorpos conjugados a fluorocromos aos tubos de citometria: PE-anti-SiglecF, APC-Cy7-anti-MHCII, PerCP-anti-CD11b, APC-anti-CD11c, PECy7-anti-Ly6G, PE-anti-CD103 e AmCyAn-live/dead. O corante utilizado para diferenciar as células vivas e mortas (live/dead; ThermoFischer) age como corante fluorescente de aminas. O live/dead reage e cora com maior intensidade as células mortas, ou seja, que possuem maior permeabilidade celular e conseqüentemente mais aminas expostas. São consideradas mortas as células com emissão de fluorescência acima de  $10^4$  tendo como comprimento de excitação, 405nm, e emissão, 525nm. As células foram mantidas no gelo ao

brigo da luz e incubadas por mais 30 minutos. Após incubação, as células foram lavadas com 2 mL de tampão PBS suplementado com 0,5% BSA, 5 mM EDTA e 50% SFB e, em alguns experimentos, foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 2% para posterior análise. As amostras foram adquiridas pelo citômetro CANTO II (BD) e os resultados analisados por softwares específicos FlowJo (TreeStar).

Molécula	Fluorocromo	Concentração	Marca	Excitação (nm)	Emissão (nm)
SiglecF	PE	0,33 µg/mL	BD Bioscience	496	578
CD11b	PerCP	0,26 µg/mL	BioLegend	482	678
CD11c	APC	0,26 µg/mL	eBioscience	650	660
Ly6G	PECy7	2 µg/mL	BioLegend	496	785

#### 4.5 Citospin

Após coleta dos BALs de camundongos selvagens e *knockouts*, a quantidade de células foi ajustada para  $1 \times 10^5$  cél/mL para realização do citospin. As lâminas de vidro (Bioslide) foram higienizadas com álcool 70% e filtros (Thermo Shandon) e amostras foram colocadas no aparato e, centrifugados na citocentrífuga CT-2000 (Cientec) a 900 rpm durante 6 minutos. Após a realização do citospin, as amostras foram fixadas com metanol e, após secagem, coradas com Panótico Rápido (Laborclin). As imagens foram obtidas e fotografadas utilizando múltiplos campos em microscópio óptico de campo claro e utilizando o software AxioVision versão 7.0.1.

#### 4.6 Cultura *in vitro* de AMs

As células recuperadas através dos BALs de animais WT e *Axl*<sup>-/-</sup> foram plaqueadas em placa de 48 poços (Costar) na concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço no volume final de 500 µL/poço de RPMI completo suplementado com 10% de SFB. Após 1 hora, a cultura foi lavada com Hank's (GIBCO) para a retirada de células não aderentes (consideradas não macrófagos) e, em algumas situações, o lipopolissacarídeo (LPS) ultrapuro derivado de

*Escherichia coli* K12 (Invivogen) a uma concentração de 200 ng/mL foi adicionado para estimular os macrófagos durante 4 horas a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Além do estímulo com LPS algumas culturas foram estimuladas ou não com ATP (5 µM; Cell Signalling) por 1 hora, nas mesmas condições de temperatura e umidade. Em outras situações foram adicionados neutrófilos apoptóticos (5x10<sup>5</sup> células/poço) opsonizados com a molécula ponte Gas6 (R&D; 200 ng/mL). As culturas com neutrófilos apoptóticos foram incubadas O.N. a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após os tratamentos, o sobrenadante das culturas foi coletado, centrifugado e congelado para posterior dosagem de citocinas.

#### 4.7 Obtenção de neutrófilos apoptóticos

Foi injetado 1 mL de tioglicolato a 3% no peritônio de camundongos C57BL/6 para indução de inflamação estéril e, após 7h, quando se considera o pico de recrutamento de neutrófilos, os animais foram sacrificados para realização de lavado peritoneal com meio RPMI completo sem adição de soro e recuperação de neutrófilos. Os lavados peritoneais foram colocados em garrafas de cultura (75 cm<sup>2</sup>/150 cm<sup>2</sup>) (Corning Inc.) por 1h a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> para aderência de células. Após 1h de incubação o líquido foi recolhido com uma pipeta de vidro e esta foi deixada na posição horizontal por cerca de 2 minutos para deposição de proteínas e outras substâncias. Com fluxo constante e lento o conteúdo da pipeta de vidro foi depositado em tubo Falcon de 50 mL, centrifugado a 1600 rpm por 6 minutos e o pellet foi ressuspenso em meio RPMI suplementado sem adição de SFB. As células foram contadas e deixadas *over-night* (O.N.) a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Com esse procedimento foram obtidos neutrófilos apoptóticos pelo método de *aging*.

#### 4.8 Obtenção de macrófagos peritoneais (pMPs)

Camundongos WT ou *Axl*<sup>-/-</sup> foram anestesiados com fenobarbital sódico (2,0 mg/kg) via intraperitoneal (i.p.). Após a aplicação do anestésico os animais foram imobilizados na mesa cirúrgica para o início dos procedimentos. Primeiramente, a pele dos animais foi incisada para a exposição do peritônio e, para a realização do lavado peritoneal, foram utilizadas seringas de 5 mL (BD Plastik) com meio RPMI completo sem adição de soro. Os

pMPs obtidos através dos lavados peritoneais foram utilizados como controle de produção de citocinas em experimentos *in vitro*.

#### **4.9 Dosagem de citocinas por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)**

A quantificação das citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  e KC) nos sobrenadantes dos BALs e das culturas de AMs *in vitro* estimulados com LPS ou não foi feita pela técnica de ELISA do tipo sanduíche, de acordo com metodologia preconizada pelos fabricantes (R&D; PeproTech; e-Bioscience). Resumidamente, placas de 96 poços com fundo chato foram cobertas com anticorpos monoclonais de captura diluídos em PBS 1X e incubadas a 4°C, por 18 horas. Após etapa de lavagem com PBS 1X contendo 0,05% Tween 20 (PBS-T) (Sigma), a placa foi bloqueada com PBS 1X contendo 10% de SFB ou 1% de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma) por 1 hora a T.A., seguida de nova etapa de lavagem com PBS-T. Os sobrenadantes, bem como as citocinas recombinantes (curva-padrão) foram adicionados e incubados a 4°C por 18 horas. Após lavagem com PBS-T, foram adicionados os anticorpos secundários de detecção, marcados com biotina, diluídos em PBS 1X contendo 10% de SFB ou 1% de BSA). A placa foi incubada por 2h30min a T.A. e lavada com PBS-T. A reação foi revelada com peroxidase conjugada à estreptoavidina (HRP) (eBioscience) diluída na proporção de 1:250 em PBS 1X contendo 10% de SFB ou 1% de BSA a T.A. durante 1 hora. Após etapa de lavagem, foi adicionado 50 $\mu$ L do substrato 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) (eBioscience) para revelar a reação. A reação foi interrompida usando 25 $\mu$ L de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (2N). A densidade óptica foi obtida através de leitura em espectrofotômetro de placa (SpectraMax M5, Molecular Devices), com filtro de 450 nm. As concentrações das citocinas foram calculadas a partir dos valores obtidos da curva padrão de citocinas recombinantes e os resultados expressos em pg/mL, representando a média e erro padrão (SEM) das leituras de absorbância das triplicatas de cultura.

#### **4.10 Instilação de sílica**

Camundongos WT ou Ax1<sup>-/-</sup> foram instilados via i.t. (dose única) com sílica em suspensão (SiO<sub>2</sub>; 20 mg/50  $\mu$ L em PBS 1X estéril, tamanho de partícula: 80% entre 1-5  $\mu$ M;

Sigma-Aldrich) ou 50 µL de PBS 1X estéril (controle). Para isto, partículas de sílica foram pesadas e ajustadas de acordo com a dose estipulada para instilação e, em seguida, foram esterilizadas por dois ciclos de 5 minutos no micro-ondas. Ao final, as partículas cristalinas foram ressuspensas em PBS 1X estéril e extensivamente homogeneizadas com pipeta e no vórtex. Para a instilação, os animais foram anestesiados com Sevocris (Sevofluorano 100% - Cristália; anestésico inalatório) e imobilizados sobre a mesa cirúrgica. Os animais foram traqueostomizados com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica. Após a exposição da traqueia as partículas de sílica em solução ou PBS 1X foram instilados utilizando uma seringa de insulina com agulha 27 ½ G no ângulo de 45°. Os animais foram suturados com fios agulhados (Fio USP 4/0, 45cm e agulha 20mm, 3/8 de círculo; NYLON PROCARE) e receberam aplicação de cloridrato de lidocaína local (2%; Cristália). Após a instilação os animais foram pesados para acompanhamento de perda ou ganho de massa corporal, durante o período do estabelecimento da resposta inflamatória induzida pelas partículas de sílica (silicose). Todos os experimentos foram realizados após 15 dias da instilação, considerado pico da resposta inflamatória aguda.

#### **4.11 Avaliação da perda de massa corporal**

A verificação da massa corporal dos animais foi realizada, no mínimo em 4 momentos após a instilação intratraqueal de sílica ou PBS. Os camundongos foram pesados individualmente e para o cálculo da porcentagem da perda de massa corporal foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Variação da massa} = \frac{\text{massa observada} \times 100}{\text{massa inicial (dia 0)}}$$

Os resultados foram expressos como percentual de variação de perda de peso corporal durante o período de silicose, em relação ao peso inicial.

#### **4.12 Avaliação de peso pulmonar**

A verificação da massa pulmonar dos animais instilados foi realizada após o lavado broncoalveolar e retirada dos pulmões. Ambos os pulmões de cada animal foram

retirados, pesados e os resultados foram expressos por grupo de tratamento (PBS x sílica) e *background* genético (selvagens x *Axl*<sup>-/-</sup>).

#### 4.13 Análise estatística

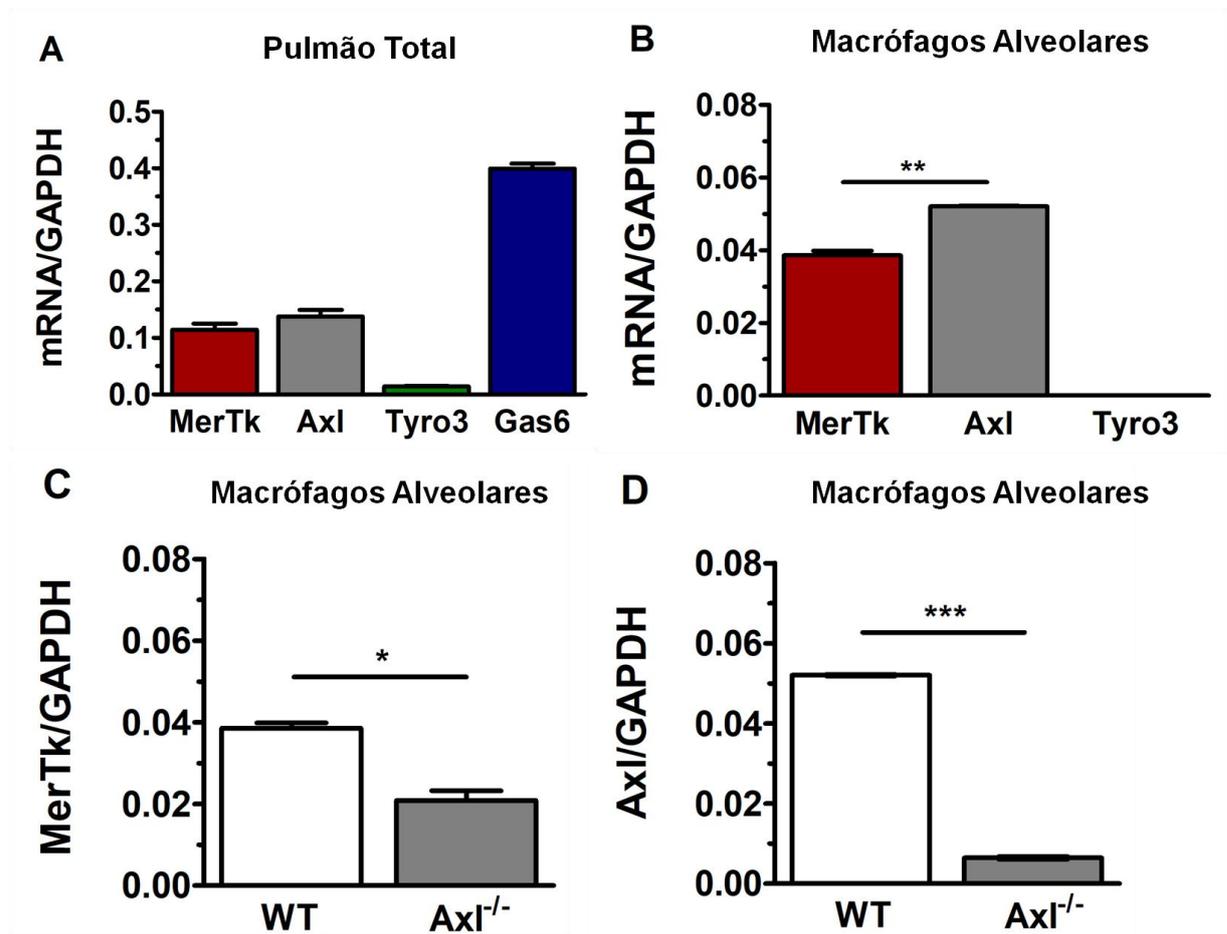
A análise estatística foi realizada no programa *GraphPad Prism* para Mac, empregando o teste *t* de *Student* para amostras independentes. Diferenças com um valor de  $p < 0,05$  ou  $p < 0,01$  foram consideradas significantes.

### 5. Resultados

#### 5.1 Expressão dos mRNA para os receptores de eferocitose da família TAM e para molécula ponte Gas6 nas células pulmonares e em macrófagos alveolares

A presença dos receptores de eferocitose da família TAM e da molécula ponte Gas6 nas células residentes de mucosas é muito importante devido ao seu papel dicotômico: realizar a eferocitose e regular negativamente as vias pró-inflamatórias (Rothlin *et al.*, 2007). Para confirmar a presença dos receptores Tyro3, Axl e MerTk e da molécula ponte Gas6 nas células pulmonares, foram realizados ensaios de RT-PCR para detectar os RNAm para as respectivas moléculas. Para isso, o mRNA de células totais dos pulmões foram isolados e transformados em cDNA. Em seguida, sequências iniciadoras específicas para Tyro3, Axl, MerTk e Gas6 foram utilizadas para realizar o RT-PCR. Nós detectamos níveis similares de expressão dos mRNA para os receptores MerTk e Axl e uma expressão elevada de mRNA para a molécula ponte Gas6, enquanto que baixos níveis de expressão de Tyro3 foram detectados nas células totais dos pulmões, durante a homeostase (**Figura 9 A**). Para avaliar a expressão dos receptores da família TAM em AMs, nós coletamos os BALs de camundongos selvagens e deficientes em Axl, plaqueamos as células e admitimos como AMs as células aderidas às placas de cultura. Extraímos e isolamos o RNA total das células da monocamada e realizamos um comparativo da expressão do mRNA para os receptores Axl, MerTk e Tyro3 em AMs. Observamos níveis mais elevados de expressão de Axl em relação a MerTk em AMs de camundongos selvagens e nenhuma expressão de Tyro3 foi detectada nessas células

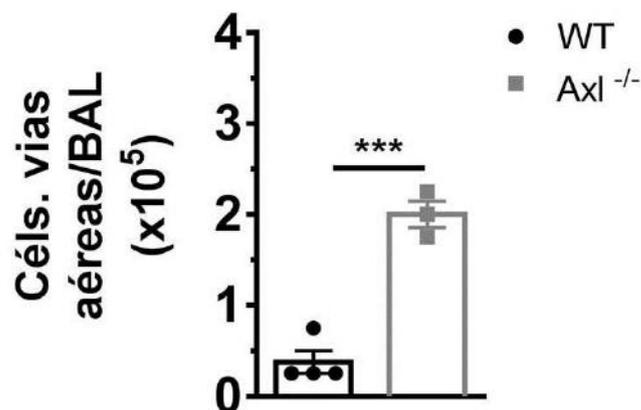
(Figura 9 B). Em AMs de camundongos deficientes em Axl foi detectada uma menor quantidade de MerTk e Axl em relação aos camundongos selvagens (Figura 9 C e 9 D, respectivamente).



**Figura 9.** O mRNA para os receptores de eferocitose da família TAM (Axl, MerTk e Tyro3) está presente em AMs e em células pulmonares e, para a molécula ponte Gas6, em células pulmonares. (A) As células totais pulmonares, a partir de tecido pulmonar dissociado mecanicamente, tiveram seus mRNA extraídos e isolados para a realização da quantificação da expressão de mRNA para os receptores da família TAM por RT-PCR. (B) AMs de camundongos selvagens foram coletados, plaqueados, mantidos *overnight* em estufa a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub> e tiveram seus respectivos mRNA extraídos e isolados para a quantificação da expressão de mRNA para os receptores da família TAM por RT-PCR. Já o mRNA para (C) MerTk e o (D) Axl também foram quantificados em AMs de animais selvagens e deficientes em Axl por RT-PCR. Experimento feito em duplicata. O resultado é apresentado como média ± desvio padrão de 5 a 8 camundongos por grupo. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes; a significância foi calculada utilizando-se teste t-Student. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 em comparação com animais WT e Axl<sup>-/-</sup>.

## 5.2 Contagem total de células pulmonares e porcentagem de AMs (SiglecF<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>) no BAL de camundongos C57BL/6 e deficientes em Axl durante a homeostase

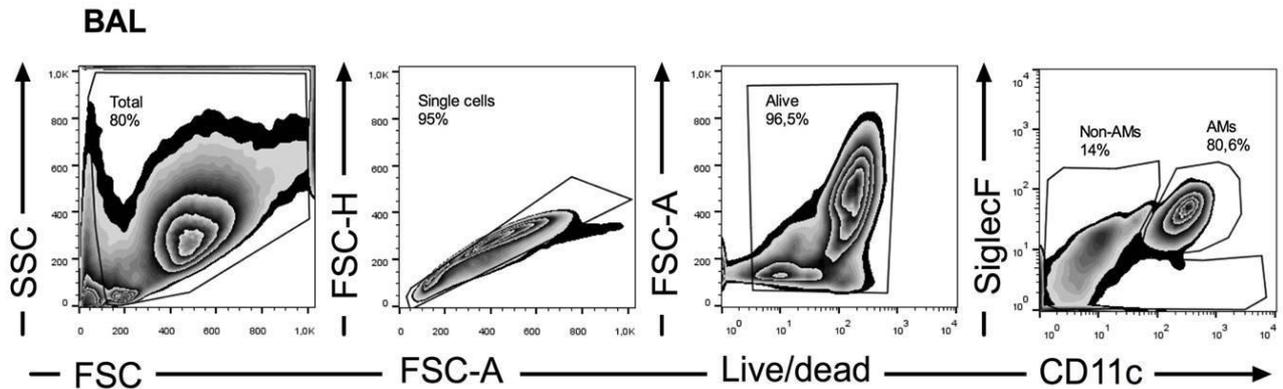
Já foi demonstrado que animais deficientes em receptores Axl e MerTk podem possuir maior inflamação e sustentação de respostas inflamatórias (Lu e Lemke, 2001; Scott *et al.*, 2001; Rothlin *et al.*, 2007; Wallet *et al.*, 2008;). Para verificar se camundongos deficientes apenas em Axl apresentam uma maior celularidade nos pulmões durante a homeostase, foi realizada a contagem de células obtidas dos BALs de camundongos selvagens e deficientes em Axl. Células totais foram coradas com azul de Trypan e contadas no microscópio óptico em câmara de Neubauer. Nós observamos que camundongos deficientes em Axl apresentaram um maior número de células pulmonares totais em relação aos camundongos selvagens (Figura 10).



**Figura 10. Contagem de células totais pulmonares é aumentada em camundongos deficientes em Axl.** As células obtidas a partir dos BALs de camundongos selvagens e deficientes em Axl foram ressuspensas para a contagem de células totais com Trypan (diluição 1:10) utilizando câmara de Neubauer. O resultado é apresentado como média  $\pm$  desvio padrão de 4 a 6 camundongos por grupo. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes; a significância foi calculada utilizando-se teste t-Student. \*\*\*P<0,001 em comparação com animais WT e Axl<sup>-/-</sup>.

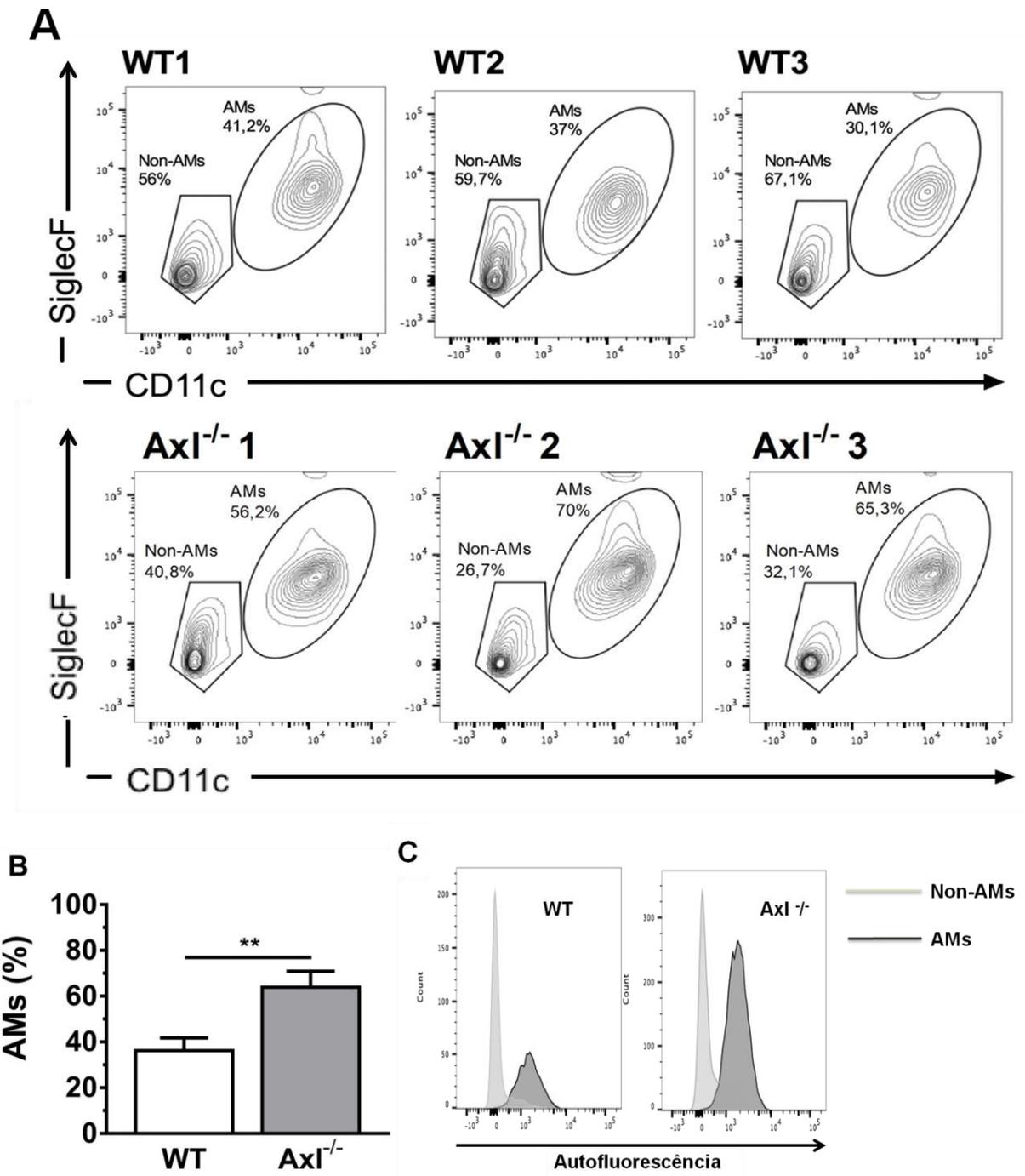
Em seguida, para avaliar a frequência de AMs nos BALs de camundongos selvagens e deficientes em Axl, nós inicialmente selecionamos um *gate* que chamamos de células totais, excluindo células mortas e debris celulares. A partir deste *gate*, excluímos as células aderidas umas às outras (*single cells*, células planctônicas). Nós então, selecionamos apenas as células vivas (através do corante *Live/dead; alive*) e finalmente avaliamos o percentual de AMs através da expressão concomitante das moléculas SiglecF e CD11c (Figura 11). Dentro do

*gate* de AMs, também verificamos a autofluorescência celular (**Figura 12 C**), característica de AMs (Hussel e Bell, 2014).



**Figura 11. Estratégia de *gate* para análise de AMs.** As células obtidas nos BALs para a identificação de AMs foram analisadas através da seguinte estratégia de *gate*: células vivas → *sigle-cells* (células planctônicas) → *alive* → SiglecF<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>. As células foram adquiridas no citômetro de fluxo Canto II. Os dados foram analisados no software FlowJo e as células duplo positivas para SiglecF<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> foram consideradas AMs. **SSC**- do inglês, *side scatter*, **FSC**- do inglês, *forward scatter*, **FSC-A** – do inglês, *forward scatter area*, **Live/dead**- corante de células vivas e mortas, **CD** – do inglês, *cluster of differentiation*. **Non-AMs** – não AMs.

Nós observamos um percentual maior de AMs (SiglecF<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>) em camundongos deficientes em *Axl* em relação aos selvagens (**Figura 12 A**). A mesma porcentagem de AMs obtida com a realização da citometria foi mostrada graficamente (**Figura 12 B**). Nós também confirmamos que os AMs apresentam elevada autofluorescência se comparados às demais células (não macrófagos; *Non-AMs*) (**Figura 12 C**). Esses dados sugerem que a deficiência no receptor *Axl* leva a um aumento no recrutamento de AMs para as mucosas pulmonares durante a homeostase, sugerindo uma quebra da homeostase do microambiente pulmonar.

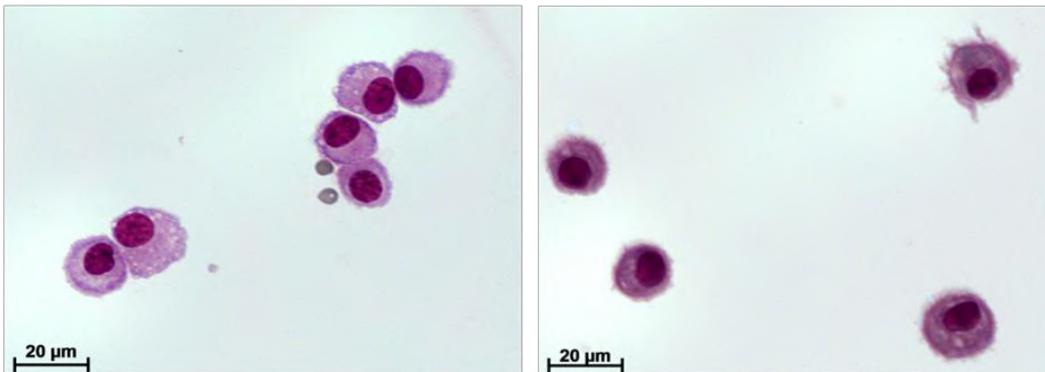


**Figura 12. Deficiência no receptor *Axl* aumenta a porcentagem de AMs ( $\text{SiglecF}^+ \text{CD11c}^+$ ) no BAL durante a homeostase.** As células obtidas nos BALs (A e B) foram marcadas com anticorpos anti-SiglecF e anti-CD11c e a análise quantitativa de AMs foi feita por citometria de fluxo. (C) Para confirmação do tipo celular foi realizada uma análise da expressão de autofluorescência nas populações de células obtidas dos BALs de camundongos selvagens e deficientes em *Axl* por citometria de fluxo. As células foram adquiridas no citômetro de fluxo Canto II e as células duplo positivas e autofluorescentes foram consideradas AMs. O resultado é apresentado como média  $\pm$  desvio padrão de 4 a 6 camundongos por grupo. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. A significância foi calculada utilizando-se teste t-Student. \*\* $P < 0,01$  em comparação com animais WT e *Axl*<sup>-/-</sup>.

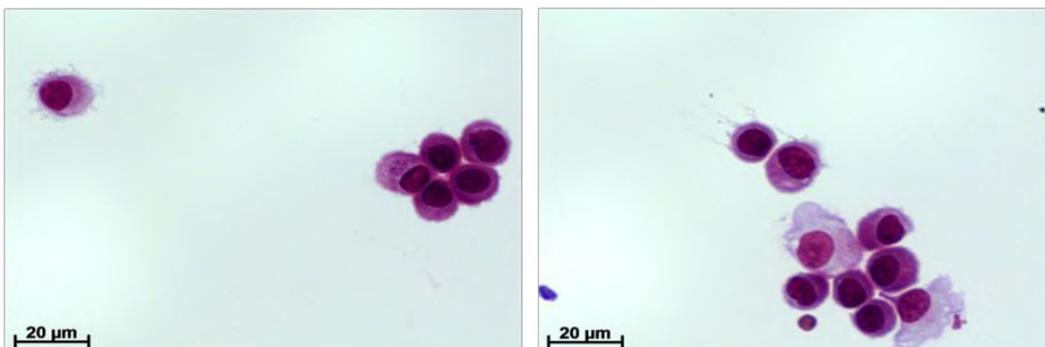
### 5.3 Análise do perfil morfológico de células presentes em BALs de animais selvagens e deficientes em Axl

Para avaliar morfológicamente as populações celulares nos BALs de camundongos selvagens e deficientes em Axl, realizamos um citospin seguido de coloração utilizando o kit Panótico. Nós observamos que a grande maioria das células dos BALs de ambas as linhagens de camundongos, selvagens e deficientes em Axl, são células mononucleares, provavelmente AMs (**Figura 13**). Nossos dados confirmam que há presença de AMs nos BALs de camundongos selvagens e deficientes em Axl, durante a homeostase.

#### BAL WT



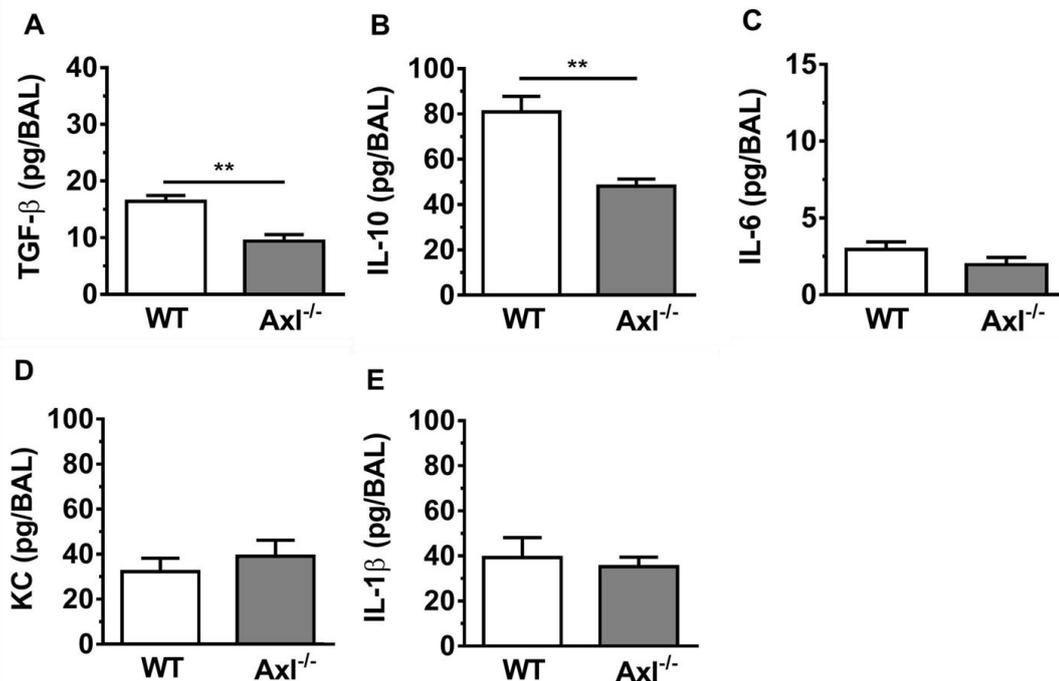
#### BAL Axl -/-



**Figura 13. Ausência de diferenças morfológicas no perfil celular coletado em lavados broncoalveolares de animais selvagens e deficientes em Axl.** O BAL de camundongos selvagens e deficientes em Axl foi realizado com PBS 1X estéril. O citospin ( $1 \times 10^5$  células/mL; 900 rpm por 6 minutos) foi realizado e corado com Panótico Rápido para posterior análise em microscópio óptico de campo claro (aumento de 40X). Barras de escala são iguais a 20µm. Os dados são representativos de 2 experimentos.

#### 5.4 Análise da produção de citocinas por células pulmonares de camundongos selvagens e deficientes em Axl

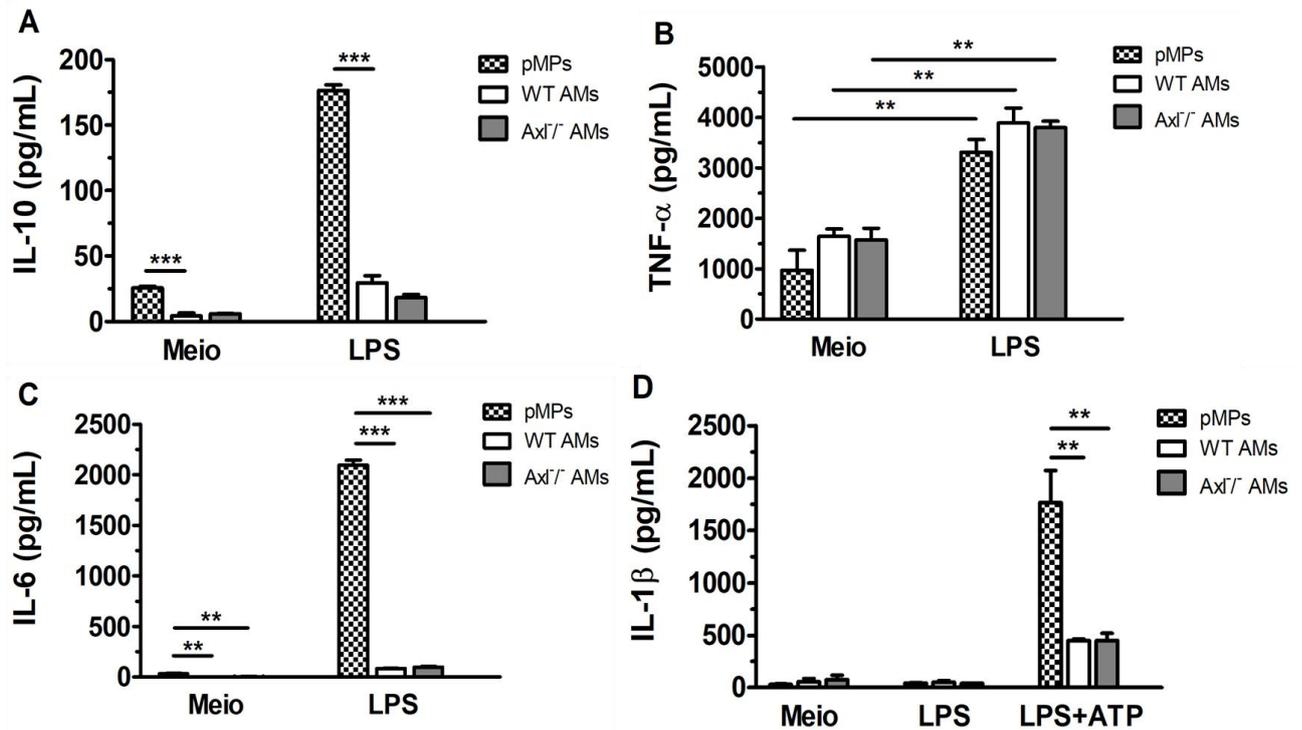
Devido ao maior recrutamento de células observado nos resultados anteriores e à deficiência dos camundongos  $Axl^{-/-}$  em regular vias pró-inflamatórias investigamos a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias por camundongos selvagens e deficientes em Axl. A dosagem de citocinas (TGF- $\beta$ , IL-10, IL-6, KC e IL-1 $\beta$ ) presentes no sobrenadante dos BALs de camundongos selvagens e deficientes em Axl foi realizada por ELISA. Nós observamos que os animais deficientes em Axl apresentaram níveis menores de produção de TGF- $\beta$  e IL-10 (**Figura 14A e B, respectivamente**), por outro lado, não houve diferença entre camundongos selvagens e deficientes em Axl em relação à produção de IL-6 (**Figura 14C**), KC (**Figura 14D**) e IL-1 $\beta$  (**Figura 14E**). Esses dados sugerem que AMs deficientes em Axl podem ter função regulatória diminuída na mucosa pulmonar, uma vez que sua deficiência, além de aumentar o recrutamento de células e diferenciação das mesmas em AMs, também reduz os níveis das citocinas regulatórias TGF- $\beta$  e IL-10.



**Figura 14. AMs de camundongos deficientes em Axl produzem menores quantidades de TGF- $\beta$  e IL-10 na homeostase.** O sobrenadante do BAL de camundongos selvagens e deficientes em Axl foi coletado e congelado para dosagem de (A) TGF- $\beta$ , (B) IL-10, (C) IL-6 e (D) KC e (E) IL-1 $\beta$  por ELISA. Os valores em pg/mL das citocinas avaliadas foram normalizados pelos volumes coletados dos BALs e representados como pg/BAL. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes. O resultado é apresentado como média  $\pm$  desvio padrão de 4 a 6 camundongos por grupo. A significância foi calculada utilizando-se teste t-Student. \*\*P < 0,01 em comparação com animais WT.

### 5.5 Análise funcional de AMs de camundongos selvagens e deficientes em Axl através da dosagem de citocinas *in vitro*

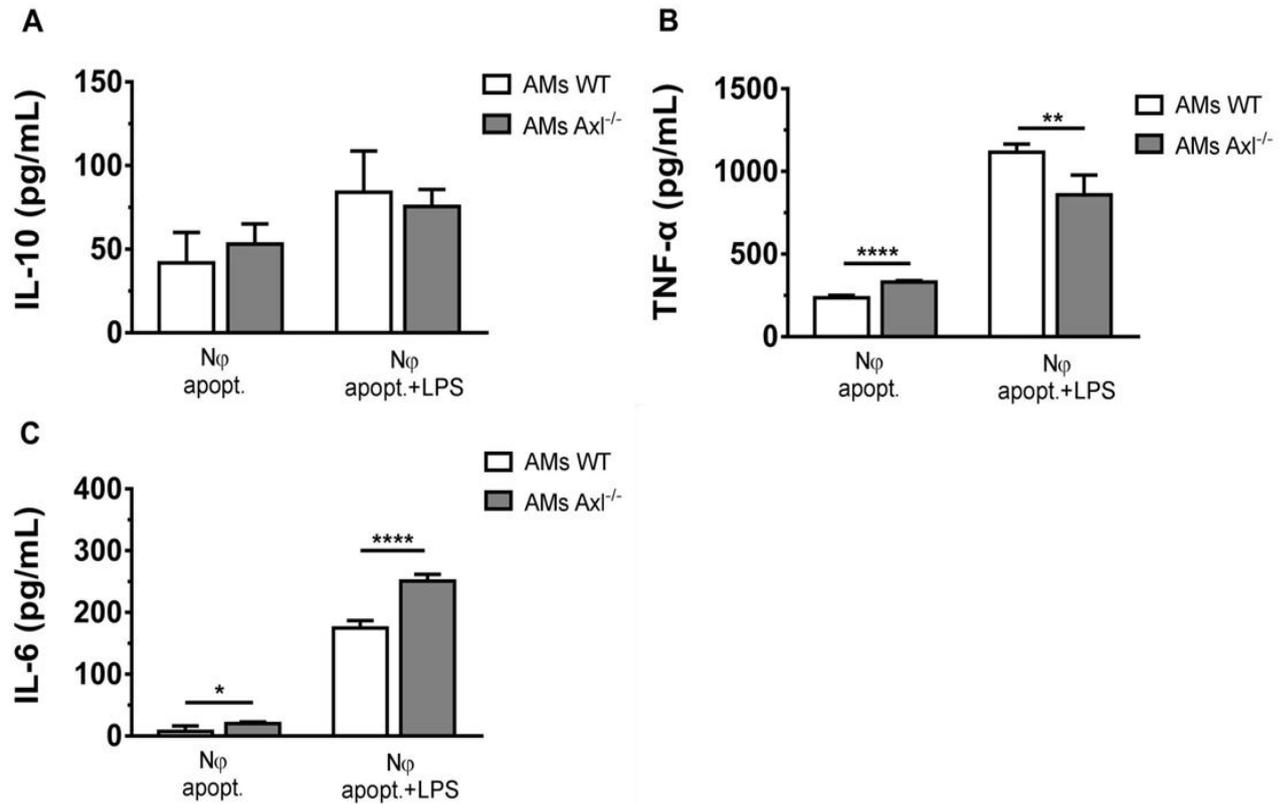
Após a dosagem de citocinas *ex vivo* (anterior), investigamos a função de AMs *in vitro* em comparação com macrófagos peritoneais (pMPs). Os AMs foram adquiridos com a realização do BAL de camundongos selvagens e deficientes em Axl e os pMPs foram adquiridos através de lavado peritoneal de camundongos selvagens. As células obtidas a partir dos dois lavados foram plaqueadas em placas de 48 poços, estimuladas com LPS (200 ng/mL) e, após 4 horas, o sobrenadante foi coletado para dosagem de IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL- $\beta$  por ELISA. Observamos que AMs secretaram níveis muito menores que os pMPs de IL-10 e IL-6 sem adição de estímulo e após a estimulação com LPS (**Figuras 15 A e C, respectivamente**). Por outro lado, AMs possuem uma tendência a produzirem níveis mais elevados de TNF- $\alpha$  sem estímulo e quando estimulados com LPS, se comparados aos pMPs (**Figura 15B**). A produção e liberação de IL-1 $\beta$  nos sobrenadantes de cultura só foi observada quando os macrófagos foram estimulados com LPS e então, desafiados com ATP. No entanto, os AMs secretaram níveis muito inferiores desta citocina quando comparados aos pMPs (**Figura 15D**). Surpreendentemente, não encontramos diferenças na produção das citocinas avaliadas entre AMs de camundongos selvagens e deficientes em Axl.



**Figura 15.** AMs de animais selvagens e deficientes em *Axl* não possuem produção diferencial de citocinas mediante a LPS *in vitro*. AMs e pMPs foram plaqueados ( $10^5$ /mL) e estimulados com LPS (200 ng/mL) ou LPS+ATP (5  $\mu$ M; 1 hora) por 4 horas. Os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação de (A) IL-10, (B) TNF- $\alpha$  e (C) IL-6 e (D) IL-1 $\beta$  por ELISA. Os dados são representativos de 1 experimento. O resultado é apresentado como média  $\pm$  desvio padrão de 4 a 6 camundongos por grupo. A significância foi calculada utilizando-se teste t-Student. \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001. LPS- lipopolissacarídeo, ATP- adenosina trifosfato.

Para que os receptores TAM possam exercer seu efeito regulador de vias pró-inflamatórias é necessário que haja o engajamento da molécula ponte Gas6 ligada à PtdSer da célula apoptótica ao receptor *Axl*, da família TAM. A partir disso, realizamos um novo ensaio *in vitro*, onde AMs de animais selvagens e deficientes em *Axl* foram co-cultivados com neutrófilos apoptóticos opsonizados com Gas6 por 1 hora, e em seguida as co-culturas foram desafiadas ou não com LPS (Figura 16). Nós observamos que AMs de camundongos deficientes em *Axl* secretaram maiores quantidades de TNF- $\alpha$  e IL-6 quando co-cultivados com neutrófilos apoptóticos opsonizados com Gas6, se comparados aos AMs de camundongos selvagens (Figura 16B e 16C). No entanto, quando foi adicionado o LPS à co-cultura, observamos que, surpreendentemente, AMs de camundongos deficientes em *Axl* secretaram menos TNF- $\alpha$  se comparados aos AMs selvagens (Figura 16B). Como esperado, quando desafiados com LPS, AMs de camundongos deficientes em *Axl* secretaram mais IL-6 se comparados aos AMs selvagens (Figura 16C). Finalmente, não observamos diferenças significativas na produção de IL-10 mediante aos estímulos fornecidos para os AMs (Figura 16A). Nossos dados sugerem que a sinalização via receptor *Axl* é um importante regulador negativo da secreção de IL-6, e regulador positivo da secreção de TNF- $\alpha$ . Experimentos

adicionais serão feitos para elucidar o papel dos receptores Axl na regulação diferencial das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$ .

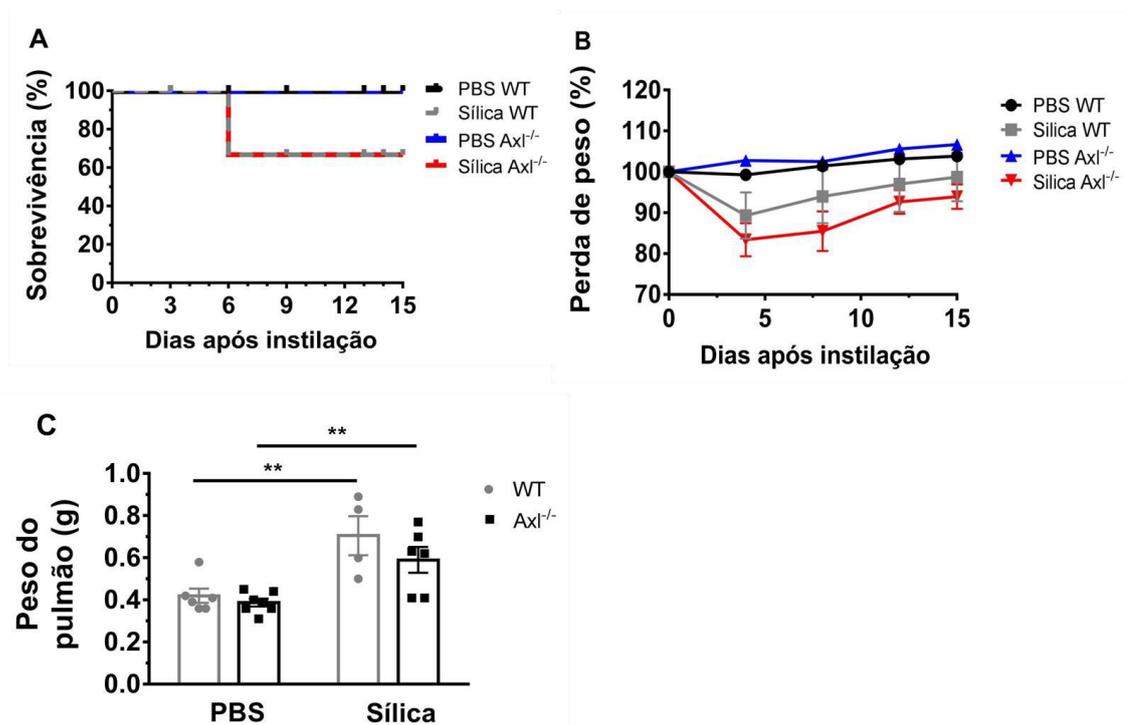


**Figura 16. Receptor Axl controla a produção de citocinas pró-inflamatórias em AMs.** AMs obtidos através dos BALs de camundongos selvagens e deficientes em Axl foram plaqueados ( $1 \times 10^5$  células/mL) e co-cultivados com neutrófilos apoptóticos opsonizados com Gas6 ( $5 \times 10^5$  células/mL; 200 ng/mL) por 1 hora. Após este período, as co-culturas foram desafiadas ou não com LPS (200 ng/mL; *over-night*). Os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação de (A) IL-10, (B) TNF- $\alpha$  e (C) IL-6 por ELISA. Os dados são representativos de 1 experimento. O resultado é apresentado como média  $\pm$  desvio padrão de 4 a 6 camundongos por grupo. A significância foi calculada utilizando-se teste t-Student. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*\*P<0,0001.

### 5.6 Controle de peso corporal e pulmonar de camundongos selvagens e deficientes em Axl após instilação intratraqueal de sílica

A silicose é uma doença inflamatória estéril, que pode levar a perda de função respiratória devido a persistente e progressiva formação de fibrose pulmonar (Yang *et al.*, 2016). Com a finalidade de estudar o papel do receptor Axl durante a inflamação pulmonar, utilizamos o modelo de inflamação estéril induzida pela instilação de partículas de sílica (silicose). Para tal, camundongos selvagens e deficientes em Axl foram instilados i.t. com

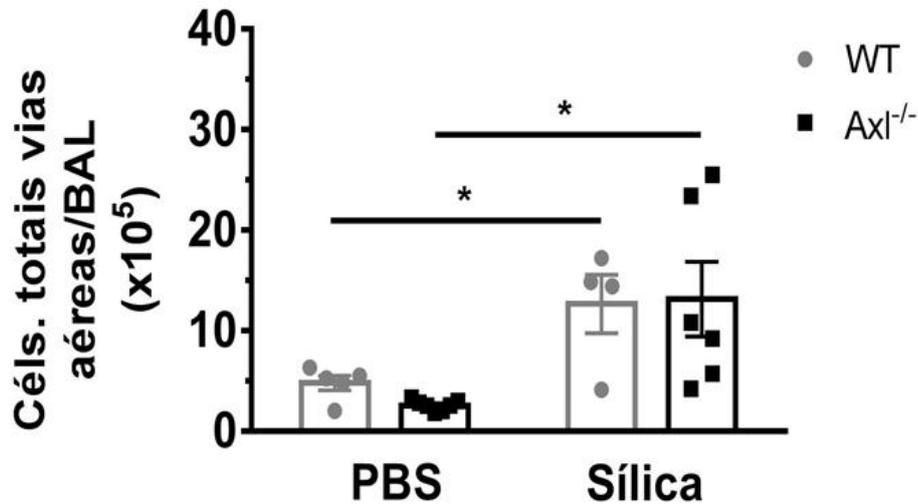
50 $\mu$ L de PBS (1X) ou 20 mg/50  $\mu$ L de sílica e o peso corporal foi medido durante duas semanas. Todos os experimentos foram iniciados com a mesma quantidade de camundongos (de 5 a 8 animais por grupo), e obtivemos uma taxa de mortalidade de 30% em ambos os grupos de animais (WT e  $Axl^{-/-}$ ) que receberam a instilação i.t. de sílica (silicóticos) (**Figura 17A**). Além disso, observamos que camundongos deficientes em  $Axl$  e silicóticos apresentaram: perda de peso mais acentuada e prolongada em relação aos selvagens e silicóticos (aproximadamente 20% *versus* 10%, respectivamente) e tempo de recuperação de peso corporal maior (por volta do 7<sup>o</sup> *versus* 4<sup>o</sup> dia após a instilação) (**Figura 17B**). Finalmente, avaliamos o peso dos pulmões dos camundongos nos diferentes grupos e observamos que os pulmões de camundongos silicóticos, selvagens e deficientes em  $Axl$  apresentaram maior peso total que os pulmões de camundongos instilados com PBS (**Figura 17C**). No entanto, não observamos diferenças nos pesos dos pulmões entre os grupos selvagens e deficientes em  $Axl$ . Juntos, nossos dados sugerem que camundongos deficientes em  $Axl$  são mais suscetíveis à silicose.



**Figura 17. Instilação intratraqueal de sílica leva a perda de peso corporal em camundongos selvagens e deficientes em  $Axl$ .** Camundongos selvagens e deficientes em  $Axl$  foram instilados com 50 $\mu$ L de PBS (1X) ou de 20 mg/50 $\mu$ L de sílica intratraquealmente. Todos os animais foram monitorados durante duas semanas para registrar (A) sobrevivência e (B) perda de peso corporal (g). Após duas semanas, quando se considera o pico da inflamação, os animais foram anestesiados e sacrificados para a realização do BAL e (C) retirada dos pulmões para serem pesados. Os dados são representativos de 2 experimentos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 4 a 8 camundongos por grupo. A significância foi calculada utilizando-se teste t-Student. \*\* $P < 0,01$ .

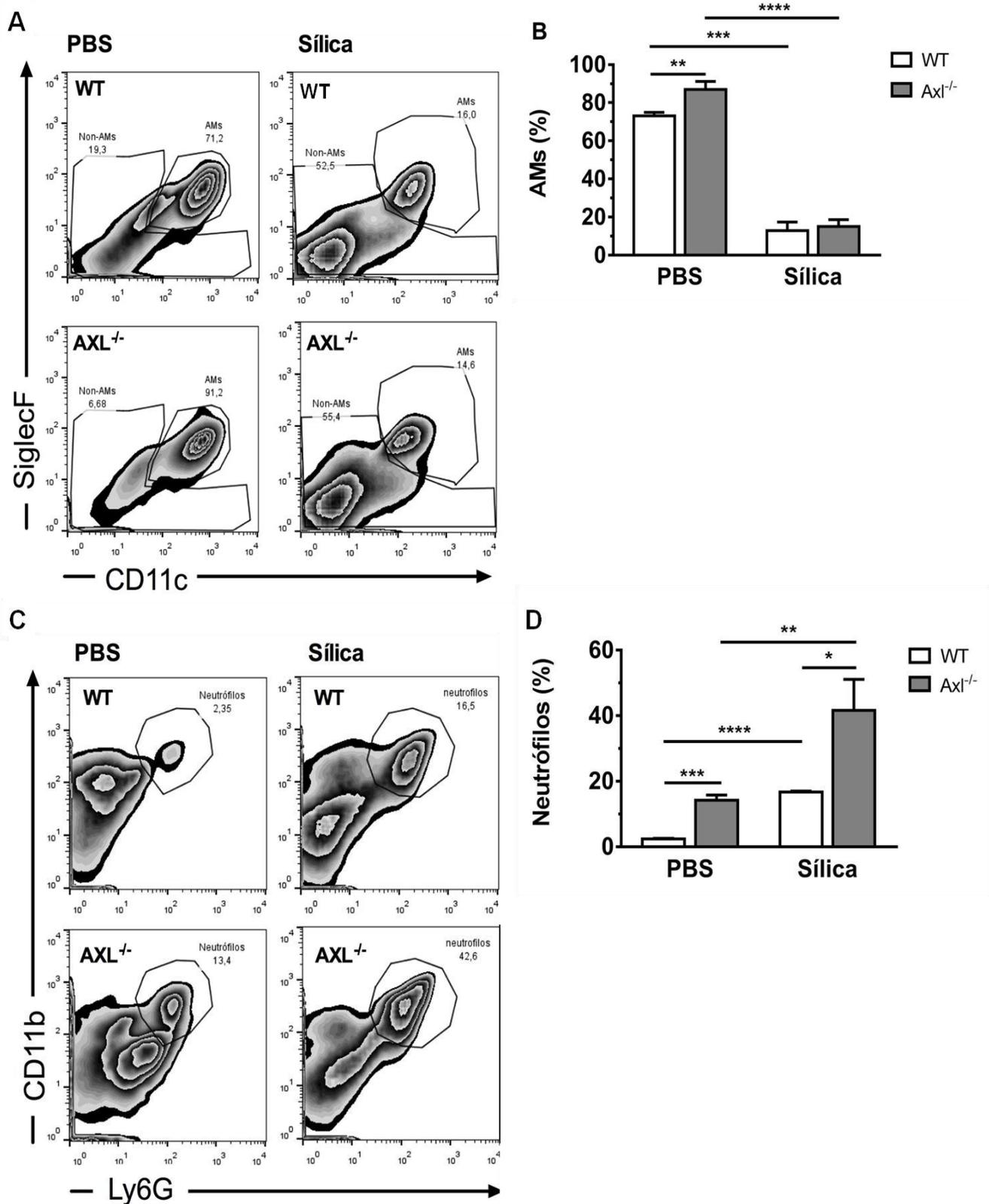
### 5.7 Contagem de células totais das vias aéreas, AMs e neutrófilos após instilação intratraqueal de sílica

O processo de patogênese da silicose leva a um aumento do número de células apoptóticas nos pulmões, o que pode aumentar o recrutamento de células do sistema imunológico para esses sítios (Mossman e Churg, 1998). A eferocitose realizada principalmente pelos AMs é um processo muito importante para o *clearance* de um microambiente rico em células apoptóticas. Como vimos anteriormente, a ausência do receptor Axl, por si só, é capaz de levar ao aumento do recrutamento de células para a mucosa pulmonar durante a homeostase, uma vez que a função de eferocitose dos AMs se encontra prejudicada, levando a um acúmulo de células apoptóticas neste sítio. Com isso, avaliamos se camundongos deficientes em Axl e silicóticos apresentariam maior recrutamento de células se comparados aos animais selvagens instilados. Após duas semanas da instilação de PBS 1X (50 µL) ou de sílica (20 mg/50 µL), os lavados broncoalveolares foram realizados nos quatro grupos de camundongos. Para realizar a contagem de células totais obtidas a partir dos BALs de camundongos selvagens e deficientes em Axl, foi realizada uma diluição de 1:10 com azul de Trypan e as células totais foram contadas no microscópio óptico com o auxílio da câmara de Neubauer. Nós observamos um aumento significativo de células nos BALs de camundongos silicóticos selvagens e deficientes em Axl quando comparados aos instilados com PBS (**Figura 18**).



**Figura 18. A instilação intratraqueal de sílica induz aumento de células totais nas vias aéreas pulmonares.** As células obtidas a partir dos BALs de camundongos selvagens e deficientes em Axl foram ressuspensas para contagem de células totais com azul de Trypan (diluição 1:10) utilizando câmara de Neubauer. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 4 a 8 camundongos por grupo. A significância foi calculada utilizando-se teste t-Student. \* $P < 0,05$ .

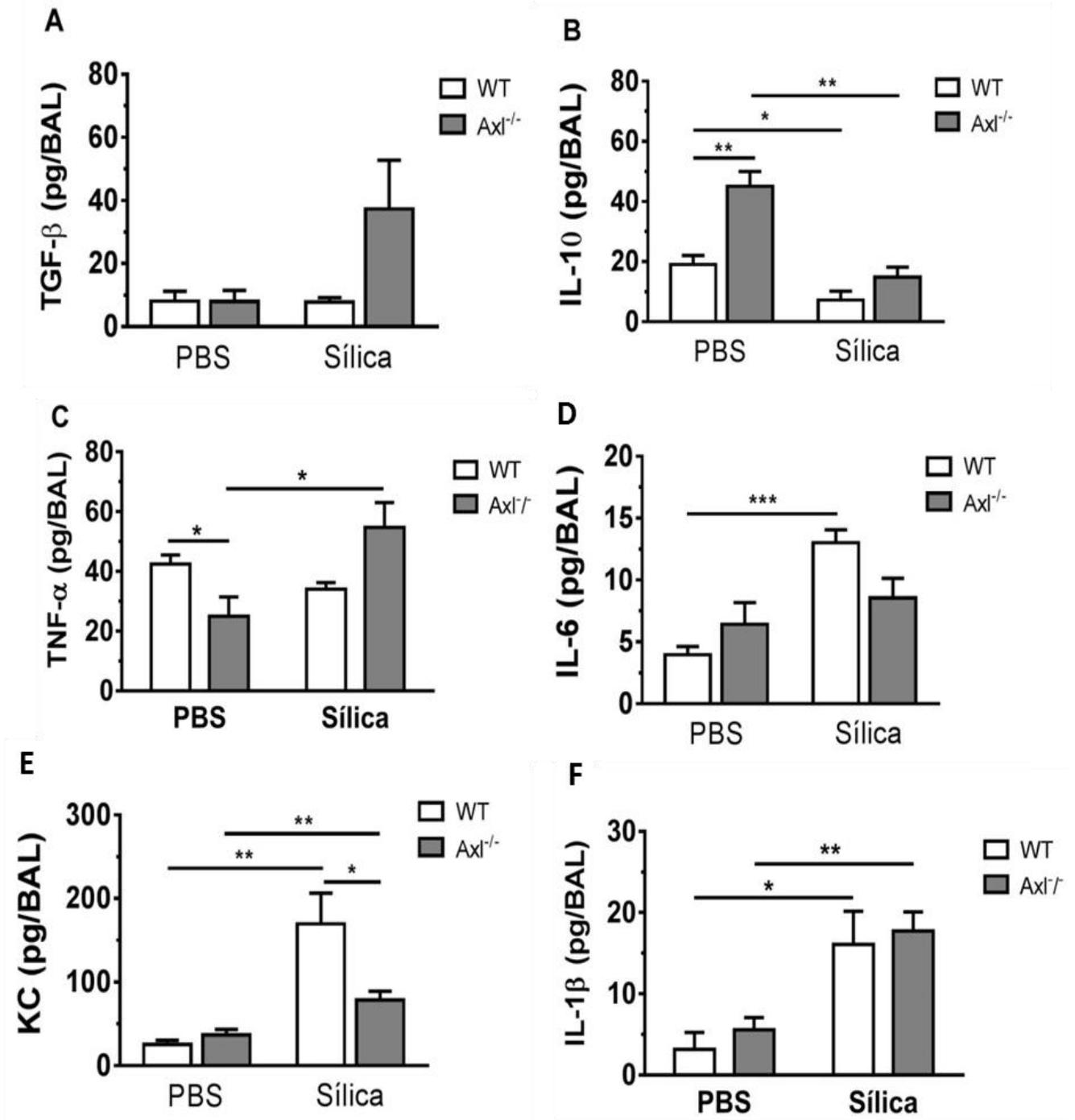
Em seguida, investigamos quais as populações celulares estariam sendo recrutadas em maior quantidade para a mucosa pulmonar durante a silicose. As porcentagens de AMs foram obtidas através de marcações com anticorpos anti-SiglecF, anti-CD11c, e as de neutrófilos, através de marcações anti-Ly6G e anti-CD11b por citometria de fluxo. Confirmamos que os BALs de camundongos deficientes em Axl instilados com PBS apresentaram um percentual maior de AMs, se comparados aos camundongos selvagens (**Figura 19A; painéis esquerdos e Figura 19B**). No entanto, durante a silicose, observamos uma diminuição drástica dos percentuais de AMs nos BALs de ambos os grupos de camundongos, com uma redução mais acentuada nos deficientes em Axl (**Figura 19A; painéis direitos e Figura 19B**). Por outro lado, observamos um maior aumento da porcentagem de neutrófilos nos BALs de camundongos deficientes em Axl instilados com PBS (**Figura 19C; painéis esquerdos e Figura 19D**). Após a instilação de sílica, o percentual de neutrófilos aumenta em ambos os grupos de animais (WT e Axl<sup>-/-</sup>), no entanto, esse aumento é mais pronunciado nos BALs de camundongos deficientes em Axl (**Figura 19D**). Em conjunto, nossos dados sugerem que a deficiência na sinalização do receptor Axl leva a diminuição de AMs durante a silicose, provavelmente por apoptose e/ou piroptose; e que o receptor Axl regula negativamente o recrutamento de neutrófilos durante a homeostase e silicose.



**Figura 19. A instilação intratraqueal de sílica induz diminuição de AMs e aumento de neutrófilos em mucosas pulmonares.** Foram realizadas, em células provenientes de BAL de camundongos selvagens e deficientes em Axl marcações com (A e B) anticorpos anti-SiglecF e anti-CD11c para análise de AMs e (C e D) com anticorpos anti-CD11b e anti-Ly6G para análise de neutrófilos por citometria de fluxo. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 4 a 8 camundongos por grupo. A significância foi calculada utilizando-se teste t-Student. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P > 0,0001$ .

### 5.8 Análise da produção de citocinas por células pulmonares totais de camundongos instilados intratraquealmente com sílica

Para verificar o perfil de citocinas nos BALs de camundongos silicóticos, realizamos os lavados broncoalveolares após duas semanas da instilação i.t. de sílica ou PBS nos animais selvagens e deficientes em Axl. O sobrenadante proveniente dos BALs foi congelado para posterior dosagem das seguintes citocinas: TGF- $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6, KC e IL-1 $\beta$  pelo método de ELISA. Nós observamos que houve um aumento da produção de IL-6, KC e IL-1 $\beta$  nos BALs de camundongos selvagens após a instilação de sílica (**Figura 20C, D e E, respectivamente**). Observamos também um aumento na secreção de IL-1 $\beta$  e KC nos BALs de camundongos silicóticos e deficientes em Axl em relação aos BALs dos mesmos grupos instilados com PBS, com uma diminuída concentração de KC nos BALs de camundongos silicóticos deficientes em Axl em relação aos selvagens (**Figura 20E e F**). Por outro lado, verificamos uma diminuição nas concentrações de IL-10 nos BALs de camundongos silicóticos selvagens e deficientes em Axl em relação aos BALs dos mesmos grupos instilados com PBS (**Figura 20B**); e nenhuma diferença nas concentrações de TGF- $\beta$  nesses mesmos grupos (**Figura 20A**). Finalmente, a instilação de sílica provocou um aumento da concentração de TNF- $\alpha$  nos BALs de camundongos deficientes em Axl, mas não em camundongos selvagens (**Figura 20C**), e um aumento de IL-6 nos BALs de camundongos selvagens, mas não nos BALs de camundongos deficientes em Axl (**Figura 20D**). Nossos dados sugerem que o receptor Axl controla a produção e secreção das citocinas TNF- $\alpha$  e KC durante a silicose.



**Figura 20. Camundongos deficientes em Axl produzem maiores níveis de TNF- $\alpha$  e menores de KC durante a silicose.** O sobrenadante dos BALs de camundongos selvagens e deficientes em Axl foi coletado e congelado para dosagem de (A) TGF- $\beta$ , (B) IL-10, (C) TNF- $\alpha$  (D) IL-6, (E) KC e (F) IL-1 $\beta$  por ELISA. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 4 a 8 camundongos por grupo. A significância foi calculada utilizando-se teste t-Student. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 em comparação com animais WT e Axl<sup>-/-</sup>.

## 6. Discussão

Em condições homeostáticas existe uma alta taxa de renovação tecidual principalmente em ambientes de mucosa. As células da mucosa pulmonar entram em apoptose constantemente e seus corpos apoptóticos necessitam ser fagocitados para que, não haja necrose secundária com consequente quebra da homeostase e possibilidade de desenvolvimento de autoimunidade (Muñoz *et al.*, 2010). A eferocitose, importante mecanismo de manutenção do equilíbrio do organismo, é realizada por fagócitos através de diversos receptores, dentre eles, os que são capazes de reconhecer a PtdSer indiretamente através das moléculas ponte Gas6 e/ou Proteína S (Poon *et al.*, 2014). Esses receptores pertencem à família TAM, que realizam a eferocitose e regulam vias pró-inflamatórias (ex.: vias de TLR) simultaneamente. Já foi descrito por Lemke e Rothlin (2008) que células diferenciadas do sistema imunológico expressam mais os receptores Axl e MerTk do que outras células do organismo. Visto isso, investigamos a presença desses receptores e de Gas6, por ser a molécula ponte universal (reconhecida pelos três receptores TAM), no ambiente de mucosa pulmonar. Nossos dados mostraram que AMs expressam mais Axl, MerTk e Gas6 do que Tyro3, o que é condizente com dados já publicados, uma vez que esse último receptor é mais expresso por células do sistema nervoso central, ovários e testículos (Lemke e Rothlin, 2008). O principal fagócito de células apoptóticas nas mucosas pulmonares é o macrófago alveolar que, além de realizar a eferocitose, entra em contato constante com a microbiota, por estar localizado no lúmen aéreo. Esse duplo reconhecimento, em ambientes de mucosa, quando realizado através dos receptores Axl ou MerTk, pode ser um importante mecanismo de manutenção da homeostase.

Dados da literatura indicam que a distribuição dos receptores Axl e MerTk não é homogênea entre as células do sistema imunológico. Zagórska e colaboradores (2014) mostraram que macrófagos de medula óssea (BMDMs) expressam menos mRNA para Axl do que para MerTk, enquanto que MerTk é expresso em maiores quantidades por células dendríticas derivadas de medula (BMDCs) do que por BMDMs. Nós também observamos níveis similares de expressão de mRNA para Axl e MerTk em células pulmonares totais e em AMs durante a homeostase. Mais especificamente, Zagórska e colaboradores (2014) demonstraram que BMDMs de animais deficientes em Axl na presença de Gas6, mas que expressam MerTk, realizam a fagocitose de células apoptóticas. Porém, BMDMs de camundongos deficientes em MerTk na presença de Gas6, mas que expressam Axl, realizam

a eferocitose em menores níveis. Quando ligantes de TLR são adicionados às culturas de BMDMs de camundongos deficientes em MerTk na presença de Gas6, mas que expressam Axl, os níveis de eferocitose aumentam consideravelmente. Isso sugere que a expressão de Axl pode ser dependente de estímulo, como por exemplo, um ligante de TLR. Nós realizamos a quantificação de mRNA para Axl e MerTk durante a homeostase sem adição de estímulos, e observamos que AMs de camundongos selvagens expressam mais Axl em relação a MerTk, porém esses níveis podem ser maiores mediante a estimulação dessas células. A heterogeneidade da distribuição desses receptores pelas células do sistema imunológico pode ocorrer mediante a presença de estímulos e a necessidade de compensar a ausência de um receptor em casos de depleção genética. Além disso, esse fator pode afetar a quantidade de eferocitose realizada pelas células do sistema imunológico. Para nossa surpresa, nós também observamos uma pequena expressão de mRNA para Axl em animais que possuem deleção genética desse receptor. Futuramente, iremos avaliar a expressão da proteína Axl nos AMs de camundongos Axl<sup>-/-</sup>, para confirmar que são realmente deficientes.

A deficiência do receptor Axl em células do sistema imunológico de camundongos pode levar a ativação desse sistema, aumentando o recrutamento de células para as mucosas pulmonares e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Rothlin *et al.*, 2007; van der Meer, van der Poll e van't Veer, 2014). Nossos dados mostraram que camundongos deficientes em Axl tem maior recrutamento de células em condições homeostáticas e também maiores porcentagens de AMs nas mucosas pulmonares, se comparados aos camundongos selvagens. Esse aumento de células nas vias aéreas pode ocorrer devido a um estado inflamatório basal causado pela falta e/ou diminuição de regulação da resposta imunológica, que pode acontecer nesses sítios em decorrência da ausência do receptor Axl. Além do aumento da porcentagem de AMs nas mucosas pulmonares, uma pequena população de neutrófilos em camundongos deficientes em Axl pode estar presente e/ou aumentada durante a homeostase. A presença de neutrófilos residentes nas mucosas pulmonares já foi descrita por Feng Tian e colaboradores em 2016 (Tian *et al.*, 2016).

Macrófagos são células essencialmente plásticas, dependentes das variações do microambiente onde estão inseridas. Devido à heterogeneidade fenotípica e funcional, macrófagos são divididos em dois grandes grupos: M1 ou classicamente ativados e M2 ou alternativamente ativados. Os M1 já estão mais bem estabelecidos na literatura, possuem características fenotípicas e funcionais que permaneceram quase inalteradas desde suas descrições iniciais. Essas células M1 são ativadas através de sinalização via TLR ou IFN- $\gamma$ ,

possuem atividades antimicrobianas aumentadas e secretam citocinas como IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- $\alpha$ . Já o conjunto de M2 abrange macrófagos com variadas funções. Macrófagos M2 são ativados majoritariamente por IL-4 e/ou IL-13, contribuem para a cicatrização tecidual, são anti-inflamatórios e secretam citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$ . Os AMs, células predominantes nos pulmões de adultos saudáveis (95-98%), desempenham papéis homeostáticos, inflamatórios e patogênicos simultaneamente, porém ainda não se encaixam perfeitamente nessa classificação (M1-M2) de macrófagos (Duan *et al.*, 2012; Hussel e Bell, 2014). Quando submetidos a diferentes estímulos de polarização podem expressar genes para TLR2 e TLR4, por exemplo, mas também podem passar a expressar genes para MMP-9 e arginase (Hussel e Bell, 2014). A eferocitose mediada por receptores TAM de AMs de camundongos selvagens cria um ambiente mais regulatório, porém a deficiência nesses receptores pode ter implicações negativas na homeostase e na inflamação. Foi descrito por van der Meer e colaboradores (2014) que camundongos deficientes em MerTk apresentam um excesso de produção de citocinas pró-inflamatórias devido a diminuição da capacidade de fagocitar células apoptóticas, e que os deficientes em Axl possuem respostas inflamatórias mais elevadas no sistema nervoso central, devido a redução da remoção de debris celulares. Nós demonstramos que AMs de camundongos deficientes em Axl expressam níveis mais baixos de TGF- $\beta$  e IL-10 em relação aos AMs de animais selvagens, porém citocinas pró-inflamatórias como IL-6, KC e IL-1 $\beta$  não se alteram ou alteram pouco, em experimentos *ex vivo*. O não aumento de produção de citocinas pró-inflamatórias em nossos experimentos *ex vivo* pode ser decorrente a presença de MerTk em animais Axl<sup>-/-</sup>, ou seja, a presença de um receptor pode compensar a ausência do outro.

Já em experimentos *in vitro*, onde é adicionado LPS ou LPS+ATP à cultura de AMs de camundongos selvagens e deficientes em Axl, não observamos diferenças significativas na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias entre os AMs de ambos os grupos. Porém, quando o ligante de Axl, Gas6 em conjunto com neutrófilos apoptóticos, é adicionado às culturas, contendo LPS, observamos redução nos níveis de produção TNF- $\alpha$  e aumento de IL-6 pelos AMs de animais deficientes em TAM. Esses resultados são similares aos encontrados por Rothlin e colaboradores em 2007, que demonstraram que BMDCs, na presença de LPS e Gas6, apresentavam redução dos níveis tanto de TNF- $\alpha$  quanto de IL-6, além de apresentarem níveis maiores do receptor Axl que macrófagos. A distribuição diferencial dos receptores Axl e MerTk entre as diferentes células do sistema imunológico pode explicar os resultados

obtidos pelo nosso grupo. Desta forma, o modelo ideal para a elucidação do papel dos receptores TAM em mucosa pulmonar seria um animal duplo *knockout* ( $Axl^{-/-} MerTk^{-/-}$ ).

A sinalização mediada por receptores TAM, realizada através da eferocitose, é essencial para a manutenção da homeostase do organismo (Lemke e Rothlin, 2008). Inúmeras doenças podem gerar acúmulo de células apoptóticas e agravar o processo patológico. Uma dessas doenças é a silicose, que afeta principalmente trabalhadores de minas, pedreiras e fábricas de vidro (Leung, Yu, e Chen, 2012). A silicose é uma doença causada pela inalação prolongada de partículas de sílica, é progressiva e irreversível e causa fibrose pulmonar com consequente perda de função respiratória (Mossman e Churg, 1998; Velan, Kumar, e Cohen, 1993). Nós instilamos partículas de sílica ou PBS via i.t. em camundongos selvagens e deficientes em *Axl*, e acompanhamos a perda de peso corporal por 15 dias. Observamos que ambos camundongos, selvagens e deficientes em *Axl*, instilados com sílica apresentaram uma perda de peso corporal de aproximadamente 20%. Por outro lado, observamos um aumento nos pesos dos pulmões de ambos os grupos instilados com sílica, o que sugere aumento do infiltrado celular e fibrose pulmonar.

Foi demonstrado por Yang e colaboradores (2016) que o BAL de camundongos C57BL/6 apresentava contagem de leucócitos totais mais elevada em animais que foram tratados com sílica intratraqueal em relação aos animais *sham*. Além de apresentarem contagem total de leucócitos mais elevada, apresentaram também números absolutos de macrófagos e neutrófilos mais altos (Yang *et al.*, 2016). Em nosso modelo experimental, tanto os camundongos deficientes em *Axl* quanto os selvagens apresentam maior número de células totais das vias aéreas após o tratamento com sílica. Para nossa surpresa, ambos os grupos de camundongos ( $Axl^{-/-}$  e selvagens) instilados com sílica tiveram uma drástica redução da porcentagem de AMs em seus BALs, sugerindo um aumento da apoptose ou piroptose de AMs nesses casos. Por outro lado, observamos uma maior porcentagem de neutrófilos nos camundongos (selvagens e  $Axl^{-/-}$ ) instilados com sílica, com um aumento mais pronunciado em camundongos  $Axl^{-/-}$ , sugerindo um papel importante de *Axl* em controlar o aumento de respostas inflamatórias pulmonares.

Durante o processo patológico da silicose existe acúmulo de células mortas que podem ser geradas através de diferentes tipos de morte celular. Já foi descrito por Borges e colaboradores (2002) que durante a silicose, existe morte por apoptose através do ligante de receptor de morte celular (FasL) e, além disso, existe a ativação de inflamassomo, gerando morte celular

inflamatória por piroptose (Cassel *et al.*, 2008). Foi demonstrado em 2008 por Cassel e colaboradores que, em experimentos *in vitro*, macrófagos estimulados apenas com sílica produziam baixos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6, porém, mediante a estímulo prévio com LPS (ativação de inflamassomo) altos níveis de IL-1 $\beta$  eram produzidos. Tais citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) foram dosadas pelo nosso grupo em ensaios *ex vivo* nos BALs de camundongos selvagens e deficientes em Axl, instilados intratraquealmente com sílica ou PBS. Nós mostramos que as células pulmonares de camundongos silicóticos deficientes em Axl possuem uma tendência a produzirem maiores níveis de TNF- $\alpha$ , menores de IL-6 e equivalentes de IL-1 $\beta$  em relação aos silicóticos selvagens. Além disso, observamos o aumento da produção de KC pelas células pulmonares de animais selvagens e deficientes em Axl após instilação de sílica. A quantificação de KC é condizente com o aumento de neutrófilos presentes nos pulmões mediante a instilação de sílica em ambos os animais (selvagens e Axl<sup>-/-</sup>), porém não corresponde ao aumento pronunciado de neutrófilos em camundongos silicóticos deficientes em Axl encontrados na citometria de fluxo. Além de citocinas pró-inflamatórias, nós também investigamos a produção de citocinas anti-inflamatórias. Nós verificamos que durante a homeostase, os animais deficientes em Axl produziram níveis mais baixos de TGF- $\beta$  e IL-10, porém mediante a um estímulo inflamatório como a silicose, os níveis dessas citocinas foram mais elevados ou possuíram uma tendência a serem mais elevados. Uma possível explicação para esse acontecimento é que durante processos inflamatórios, animais deficientes em Axl, passem a expressar quantidades muito mais elevadas de MerTk o que poderá compensar a regulação das vias pró-inflamatórias.

Em resumo, nossos dados mostraram que a falta do receptor de eferocitose Axl, por si só, é capaz de aumentar o recrutamento celular para as mucosas pulmonares e diminuir a produção de citocinas anti-inflamatórias. Esses fatores, em conjunto, favorecem um perfil mais inflamatório nos pulmões de animais deficientes em Axl, durante a homeostase. Durante a silicose, doença em que há acúmulo de células apoptóticas, existe aumento de recrutamento celular em animais selvagens e deficientes em Axl em proporções equivalentes, diminuição da porcentagem de AMs devido à alta taxa de morte celular, provavelmente por apoptose e piroptose, e aumento da quantidade de neutrófilos em ambos os grupos de animais instilados com sílica, porém com uma tendência a maior recrutamento de neutrófilos em animais deficientes em Axl devido ao maior potencial inflamatório. O não aumento de citocinas pró-inflamatórias por animais deficientes em Axl durante a homeostase e a heterogeneidade na dosagem de citocinas durante a silicose pode ser explicada pela realização de experimentos

utilizando animais *single knockouts*, onde a presença de um receptor pode compensar a falta do outro. Nossos resultados fornecem novos dados sobre a regulação de AMs através de receptores específicos, dados esses que podem fornecer novas descobertas nos estudos de imunologia das mucosas e manutenção da homeostase nesses sítios. Além disso, subsequentes experimentos envolvendo esses receptores e suas vias de regulação podem ser empregados em futuros estudos para novos alvos terapêuticos, tanto para a silicose quanto para outras doenças inflamatórias pulmonares.

## 7. Conclusão

A deficiência do receptor de eferocitose da família TAM, Axl, é capaz de aumentar o recrutamento de células para as mucosas pulmonares e diminuir a produção de citocinas anti-inflamatórias e, além disso, mediante a estimulação, AMs de camundongos deficientes em Axl produzem maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias. Esses fatores, em conjunto, favorecem um perfil mais inflamatório em animais deficientes em Axl durante a homeostase, e sugerem que esse receptor, quando presente, regula as vias de produção de citocinas. Em situações inflamatórias, como a silicose, existe redução de AMs em animais selvagens e deficientes em Axl, provavelmente decorrente da morte celular provocada pela fagocitose frustrada de partículas de sílica. No entanto, existe aumento de neutrófilos, principalmente em animais deficientes em Axl silicóticos. Juntos, nossos dados sugerem que camundongos deficientes em Axl são mais suscetíveis à silicose e que, o receptor de eferocitose Axl, além de ser um fator regulador do ambiente de mucosa pulmonar durante a homeostase, também contribui na regulação de processos inflamatórios.

## 8. Referências Bibliográficas

- Agard, N. J., Maltby, D., e Wells, J. A. (2010) Inflammatory stimuli regulate caspase substrate profiles. *Mol cell proteomics*, 9(5), 880-893.
- Alciato, F., Sainaghi, P. P., Pola, D., Castello, L., e Avanzi, G. C. (2010) Tnf-alpha, il-6, and il-1 expression is inhibited by gas6 in monocytes/macrophages. *J leukoc biol*, 87(5), 869-875.
- Amsen, D., Spilianakis, C. G. e Flavell, R. A. (2009) How are TH1 and TH2 effector cells made? *Curr Opin Immunol.*, 21(2): 153-160.
- Angel, P., e Karin, M. (1991) The role of jun, fos and the ap-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim biophys acta*, 1072(2-3), 129-157.

- Arandjelovic, S., e Savichandran, K. S. (2015) Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat immunol*, 16(9), 907-917.
- Avanzi, G. C., Gallicchio, M., Cavalloni, G., Gammaitoni, L., Leone, F., Rosina, A., Aglietta, M. (1997) Gas6, the ligand of axl and rse receptors, is expressed in hematopoietic tissue but lacks mitogenic activity. *Exp hematol*, 25(12), 1219-1226.
- Balasubramanian, K., e Schroit, A. J. (2003) Aminophospholipid asymmetry: a matter of life and death. *Annu rev physiol*, 65, 701-734.
- Balogh, I., Hafizi, S., Stenhoff, J., Hansson, K., e Dahlback, B. (2005) Analysis of gas6 in human platelets and plasma. *Arterioscler thromb vasc biol*, 25(6), 1280-1286.
- Bar-On, L., Birnberg, T., Lewis, K. L., Edelson, B. T., Bruder, D., Hildner, K., Buer, J., Murphy, K. M., Reizis, B. e Jung, S. (2010) CX3CR1+ CD8alpha+ dendritic cells are a steady-state population related to plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(33):14745-50.
- Berghe, T. V., Linkermann, A., Jouan-Lanhuet, S., Walczak, H., Vandenabeele, P. (2014) Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15(2):135-47.
- Bergsbaken, T., e Cookson, B. T. (2007) Macrophage activation redirects yersinia-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. *Plos pathog*, 3(11), e161.
- Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Canaider, S. (2013) An estimation of the number of cells in the human body. *Ann hum biol*, 40(6), 463-471.
- Bilate, A. M., e Lafaille, J. J. (2012) Induced cd4+foxp3+ regulatory t cells in immune tolerance. *Annu rev immunol*, 30, 733-758.
- Bilyk, N., e Holt, P. G. (1993) Inhibition of the immunosuppressive activity of resident pulmonary alveolar macrophages by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J exp med*, 177(6), 1773-1777.
- Borgel, D., Clauser, S., Bomstain, C., Bieche, I., Bissery, A., Remones, V., Diehl, J. L. (2006) Elevated growth-arrest-specific protein 6 plasma levels in patients with severe sepsis. *Crit care med*, 34(1), 219-222.
- Borges, V. M., Lopes, M.F., Falcão, H., Leite-Júnior, J.H., Rocco, P.R., Davidson, W.F., Linden, R., Zin, W. A., DosReis, G. A. (2002) *Am J Respir Cell Mol Biol*. Jul;27(1):78-84.
- Bush, R. K. (2012) Parasites and allergic disease: another piece of the puzzle. *J allergy clin immunol*, 130(1), 257-258.
- Cai, Y., Sugimoto, C., Arainga, M., Alvarez-Hernandez, X., Didier, e. S., e Kuroda, M. J. (2014) In vivo characterization of alveolar and interstitial lung macrophages in rhesus macaques: implications for understanding lung disease in humans. *J immuno*, 192(6), 2821-2829.
- Cassel, S. L., Eisenbarth, S. C., Iyer, S. S., Sadler, J. J., Colegio, O. R., Tephly, L. A., . . . Sutterwala, F. S. (2008) The nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc natl acad sci u s a*, 105(26), 9035-9040.
- Chang, Y. J., Kim, H. Y., Albacker, L. A., Baumgarth, N., Mckenzie, A. N., Smith, D. E., . . . Umetsu, D. T. (2011) Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. *Nat immunol*, 12(7), 631-638.
- Charlson, E., S., Bittinger, K., Haas, A. R., Fitzgerald, A. S., Frank, I., Yadav, A., . . . Collman, R. G. (2011) Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am j respir crit care med*, 184(8), 957-963.
- Chen, K., e Kolls, J. K. (2013) T cell-mediated host immune defenses in the lung. *Annu rev immunol*, 31, 605-633.
- Coleman, M. M., Ruane, D., Moran, B., Dunne, P. J., Keane, J., e Mills, K. H. (2013) Alveolar macrophages contribute to respiratory tolerance by inducing foxp3 expression in naive t cells. *Am j respir cell mol biol*, 48(6), 773-780.
- Cox, G., Guldie, J., e Jordana, M. (1992) Bronchial epithelial cell-derived cytokines (g-csf and gm-csf) promote the survival of peripheral blood neutrophils in vitro. *Am j respir cell mol biol*, 7(5), 507-513.
- Cunha, L. D., Silva, A. L. N., Ribeiro, J. M., . . . Santos, L. L., Flavell, R. A. e Zamboni, D. S. (2017) . AIM2 Engages Active but Unprocessed Caspase-1 to Induce Noncanonical Activation of the NLRP3 Inflammasome. *Cell Rep*, 20(4):794-805.

- Dai, W., Pan, H., Hassanain, H., Gupta, S. L., e Murphy, M. J., Jr. (1994) Molecular cloning of a novel receptor tyrosine kinase, tif, highly expressed in human ovary and testis. *Oncogene*, 9(3), 975-979.
- De heer, H. J., Hammad, H., Soullie, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M. A., . . . Lambrecht, B. N. (2004) Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J exp med*, 200(1), 89-98.
- De Jong, R., Altare, F., Haagen, I. A., Elferink, D. G., Boer, T., Van Breda Vriesman, P. J., . . . Ottenhoff, T. H. (1998) Severe mycobacterial and salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science*, 280(5368), 1435-1438.
- Ding, J., Wang, K., Liu, W., . . . e Shao, F. (2016) Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*, 535 (11-116).
- Dominguez-Villar, M. e A. Hafler, D. (2018) Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol*, 19, 665–673.
- Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B. T., e Tschopp, J. (2008) Innate immune activation through nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*, 320(5876), 674-677.
- Duan, M., Li, W. C., Vlahos, R., Maxwell, M. J., Anderson, G. P. e Hibbs, M. L. (2012) Distinct macrophage subpopulations characterize acute infection and chronic inflammatory lung disease. *J Immunol*, 189(2), 946-55.
- Einarsson, G. G., Comer, D. M., McIlrevey, L., Parkhill, J., Ennis, M., Tunney, M. M., e Elbom, J. S. (2016) Community dynamics and the lower airway microbiota in stable chronic obstructive pulmonary disease, smokers and healthy non-smokers. *Thorax*, 71(9), 795-803.
- Elliott, M. R., Zheng, S., Park, D., Woodson, R. I., Reardon, M. A., Juncadella, I. J., . . . Ravichandran, K. S. (2010) Unexpected requirement for elmo1 in clearance of apoptotic germ cells in vivo. *Nature*, 467(7313), 333-337.
- Engesser, L., Broefmans, A. W., Briet, E., Brommer, E. J., e Bertina, R. M. (1987) Hereditary protein s deficiency: clinical manifestations. *Ann intern med*, 106(5), 677-682.
- Fink, S. L., e Cookson, B. T. (2006) Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell microbiol*, 8(11), 1812-1825.
- Flecknoe, S., Harding, R., Maritz, G., e Hooper, S. B. (2000) Increased lung expansion alters the proportions of type I and type II alveolar epithelial cells in fetal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L1180–L1185.
- Fridell, Y. W., Jin, Y., Quilliam, L. A., Burchert, A., McCloskey, P., Spizz, G., . . . Liu, E. T. (1996) Differential activation of the ras/extracellular-signal-regulated protein kinase pathway is responsible for the biological consequences induced by the axl receptor tyrosine kinase. *Mol cell biol*, 16(1), 135-145.
- Fujimori, T., Grabiec, A. M., Kaur, M., Bell, T. J., . . . , and Hussell, T. (2015) The Axl receptor tyrosine kinase is a discriminator macrophage function in the inflamed lung. *Mucosal Immunol*, 8(5): 1021–1030.
- Furze, R. C., e Rankin, S. M. (2008) Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*, 125(3), 281-288.
- Gaipl, U. S., Kuhn, A., Sheriff, A., Munoz, L. E., Franz, S., Voll, R. E., . . . Hermann, M. (2006) Clearance of apoptotic cells in human sle. *Curr dir autoimmun*, 9, 173-187.
- Galli, S. J., Kalesnikoff, J., Grimbaldston, M. A., Piliponsky, A. M., Williams, C. M., e Tsai, M. (2005) Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu rev immunol*, 23, 749-786.
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., e Ley, K. (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327(5966), 656-661.
- Georas, S. N., e Rezaee, F. (2014) Epithelial barrier function: at the front line of asthma immunology and allergic airway inflammation. *J allergy clin immunol*, 134(3), 509-520.
- Geurtsvankessel, C. H., Willart, M. A., Van Rijt, L. S., Muskens, F., Kool, M., Baas, C., . . . Lambrecht, B. N. (2008) Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+cd11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *J exp med*, 205(7), 1621-1634.
- Gleeson, K., Eggli, D. F., e Maxwell, S. L. (1997) Quantitative aspiration during sleep in normal subjects. *Chest*, 111(5), 1266-1272.

- Goldstein, E. J., Citron, D. M., Goldman, P. J., e Goldman, R. J. (2008) National hospital survey of anaerobic culture and susceptibility methods: iii. *Anaerobe*, 14(2), 68-72.
- Gordon, S., e Taylor, P. R. (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat rev immunol*, 5(12), 953-964.
- Graham, D. K., Bowman, G. W., Dawson, T. L., Stanford, W. L., Earp, H. S., e Snodgrass, H. R. (1995) Cloning and developmental expression analysis of the murine c-mer tyrosine kinase. *Oncogene*, 10(12), 2349-2359.
- Graham, D. K., Dawson, T. L., Mullaney, D. L., Snodgrass, H. R., e Earp, H. S. (1994) Cloning and mrna expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell growth differ*, 5(6), 647-657.
- Griffin, J. H., Gruber, A., e Fernandez, J. A. (1992) Reevaluation of total, free, and bound protein s and c4b-binding protein levels in plasma anticoagulated with citrate or hirudin. *Blood*, 79(12), 3203-3211.
- Guilliams, M., de Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., de Prijck, S., . . . Lambrecht, B. N. (2013) Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via gm-csf. *J exp med*, 210(10), 1977-1992.
- Guilliams, M., Lambrecht, B. N. e Hammad, H. (2013) Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections. *Mucosal Immunol.*, 6(3):464-73.
- Hager, M., Cowland, J. B., e Borregaard, N. (2010) Neutrophil granules in health and disease. *J intern med*, 268(1), 25-34.
- He, W., Wan, H., Hu, L., Chen, P., . . . e Han, J. (2015) Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 $\beta$  secretion. *Nature*, 25 (1258-1298).
- Hilbi, H., Moss, J. E., Hersh, D., Chen, Y., Arondel, J., Banerjee, S., . . . Zychlinsky, A. (1998) Shigella-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to ipab. *J biol chem*, 273(49), 32895-32900.
- Holt, P. G. (1978) Inhibitory activity of unstimulated alveolar macrophages on t-lymphocyte blastogenic response. *Am rev respir dis*, 118(4), 791-793.
- Holt, P. G., Strickland, D. H., Wikstrom, M. E., e Jahnsen, F. L. (2008) Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat rev immunol*, 8(2), 142-152.
- Homung, V., Bauemfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., . . . Latz, E. (2008) Silica crystals and aluminum salts activate the nalp3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat immunol*, 9(8), 847-856.
- Hussel, T., e Bell, T. J. (2014) Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat rev immunol*, 14(2), 81-93.
- Idec-Sadkowska, I., Andrzejak, R., Antonowicz-Juchniewicz, J., e Kaczmarek-Wdowiak, B. (2006) [Trials of casual treatment of silicosis]. *Med pr*, 57(3), 271-280.
- Jahnsen, F. L., Moloney, E. D., Hogan, T., Upham, J. W., Burke, C. M., e Holt, P. G. (2001) Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge. *Thorax*, 56(11), 823-826.
- Jahnsen, F. L., Strickland, D. H., Thomas, J. A., Tobagus, I. T., Napoli, S., Zosky, G. R., . . . Holt, P. G. (2006) Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. *J immunol*, 177(9), 5861-5867.
- Jiang-Shieh, Y. F., Chien, H. F., Chang, C. Y., Wei, T. S., Chiu, M. M., Chen, H. M., e Wu, C. H. (2010) Distribution and expression of cd200 in the rat respiratory system under normal and endotoxin-induced pathological conditions. *J anat*, 216(3), 407-416.
- Jorgensen, I., Rayamajhi, M. e Miao, E. A. (2017) Programmed cell death as a defence against infection. *Nat Rev Immunol*. (3):151-164.
- Kagayaki, N., Stowe, I. B., Lee, B. L., O'Rourke, K., . . . Dixit, V. M. (2015) Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 526(666-671).
- Kapellos, T. S., Bassler, K., Aschenbrenner, A. C., Fujii, W., e Schultze, J. L. (2018) Dysregulated functions of lung macrophage populations in copd. *J immunol res*.
- Kopf, M., Schneider, C., e Nobs, S. P. (2015) The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nat immunol*, 16(1), 36-44.

- Kolaczowska, E. e Kubes, P.(2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.*, 13(3):159-75.
- Krammer, P. H. (2000) Cd95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407(6805), 789-795.
- Kromhout, H. (2002) Design of measurement strategies for workplace exposures. *Occup environ med*, 59(5), 349-354.
- Kurowska-Stolarska, M., Alivernini, S., Melchor, E. G., Elmesmari, A., Tolusso, B., ... e McInnes, I. B. (2017) MicroRNA-34a dependent regulation of AXL controls the activation of dendritic cells in inflammatory arthritis. *Nat Commun.*, 8:15877.
- Lambrecht, B. N. (2006) Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity*, 24(4), 366-368.
- Latz, E., Xiao, S., e Stutz, A. (2013) Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*, 13(397-411)
- Lemke, G. (2013) Biology of the tam receptors. *Cold spring harb perspect biol*, 5(11), a009076.
- Lemke, G., e Rothlin, C. V. (2008) Immunobiology of the tam receptors. *Nat rev immunol*, 8(5), 327-336.
- Leung, C. C., Yu, I. T., e Chen, W. (2012) Silicosis. *Lancet*, 379(9830), 2008-2018.
- Liew, F. Y. (2001) TH1 and TH2 cells:a historical perspective. *Nat Rev Immunol*, 2(1):55-60.
- Liu, H., Cheng, Y., Yang, J., Wang, W., Fang, S., Zhang, W., . . . Liao, H. (2017) Bbc3 in macrophages promoted pulmonary fibrosis development through inducing autophagy during silicosis. *Cell death dis*, 8(3), e2657.
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V. G., Wu, H. e Lieberman J. (2016) Inflmasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, 535(153-158).
- Lu, L. F., Lind, E. F., Gondek, D. C., Bennett, K. A., Gleeson, M. W., Pino-Lagos, K., . . . Noelle, R. J. (2006) Mast cells are essential intermediaries in regulatory t-cell tolerance. *Nature*, 442(7106), 997-1002.
- Lu, Q., e Lemke, G. (2001) Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the tyro 3 family. *Science*, 293(5528), 306-311.
- Lund, F. E., Partida-Sanchez, S., Lee, B. O., Kusser, K. L., Hartson, L., Hogan, R. J., . . . Randall, T. D. (2002) Lymphotoxin-alpha-deficient mice make delayed, but effective, t and b cell responses to influenza. *J immunol*, 169(9), 5236-5243.
- Lysiak, J. J., Turner, S. D., e Turner, T. T. (2000) Molecular pathway of germ cell apoptosis following ischemia/reperfusion of the rat testis. *Biol reprod*, 63(5), 1465-1472.
- Maillard, C., Berruyer, M., Serre, C. M., Dechavanne, M., e Delmas, P. D. (1992) Protein-s, a vitamin k-dependent protein, is a bone matrix component synthesized and secreted by osteoblasts. *Endocrinology*, 130(3), 1599-1604.
- Manfioletti, G., Brancolini, C., Avanzi, G., e Schneider, C. (1993) The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin k-dependent proteins related to protein s, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol cell biol*, 13(8), 4976-4985.
- Mark, M. R., Scadden, D. T., Wang, Z., Gu, Q., Goddard, A., e Godowski, P. J. (1994) Rse, a novel receptor-type tyrosine kinase with homology to axl/ufo, is expressed at high levels in the brain. *J biol chem*, 269(14), 10720-10728.
- Margarita, D. V., e Hafler, D. A. (2018) Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol.*, 41590(018), 0120-4.
- Mayer, A. K., Muehmer, M., Mages, J., Gueinzus, K., Hess, C., Heeg, K., . . . Dalpke, A. H. (2007) Differential recognition of tlr-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells. *J immunol*, 178(5), 3134-3142.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., e Mortha, A. (2013) The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu rev immunol*, 31, 563-604.
- Merga, Y., Campbell, B. J., e Rhodes, J. M. (2014) Mucosal barrier, bacteria and inflammatory bowel disease: possibilities for therapy. *Dig dis*, 32(4), 475-483.

- Monso, E., Ruiz, J., Rosell, A., Manterola, J., Fiz, J., Morera, J., e Ausina, V. (1995) Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush. *Am j respir crit care med*, 152(4 pt 1), 1316-1320.
- Mosmann, T. R. e Coffman, R. L. (1989). TH1 AND TH2 CELLS: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Ann Rev Immunol*, 7, 145-73.
- Mossman, B. T., e Churg, A. (1998) Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am j respir crit care med*, 157(5 pt 1), 1666-1680.
- Munger, J. S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M. J., Dalton, S. L., Wu, J., . . . Sheppard, D. (1999) The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent tgf beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*, 96(3), 319-328.
- Muñoz, L. E., Lauber, K., Schiller, M., Manfredi, A. A. e Hermann M. (2010) The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol.*, 6(5):280-9.
- Murray, P. J. (2005) The primary mechanism of the il-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. *Proc natl acad sci u s a*, 102(24), 8686-8691.
- Murray, P. J. (2006) Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/stat3-mediated anti-inflammatory response. *Curr opin pharmacol*, 6(4), 379-386.
- Myers, a. K., perroni, l., costigan, c., e reardon, w. (2006) clinical and molecular findings in ipex syndrome. *Arch dis child*, 91(1), 63-64.
- Nagata, K., Ohashi, K., Nakano, T., Arita, H., Zong, C., Hanafusa, H., e Mizuno, K. (1996) Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for axl, sky, and mer receptor tyrosine kinases. *J biol chem*, 271(47), 30022-30027.
- Nagata, S. (2007) Autoimmune diseases caused by defects in clearing dead cells and nuclei expelled from erythroid precursors. *Immunol rev*, 220, 237-250.
- Nagata, S. (2018) Apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Annu rev immunol*.
- Nagata, S., Hanayama, R., e Kawane, K. (2010) Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell*, 140(5), 619-630.
- Nakae, S., Suto, H., Iikura, M., Kakurai, M., Sedgwick, J. D., Tsai, M., e Galli, S. J. (2006) Mast cells enhance t cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted tnf. *J immunol*, 176(4), 2238-2248.
- Nathan, C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat rev immunol*, 6(3), 173-182.
- Newport, M. J., Huxley, C. M., Huston, S., Hawrylowicz, C. M., Oostra, B. A., Williamson, R., e Levin, M. (1996) A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N engl j med*, 335(26), 1941-1949.
- O'bryan, J. P., Frye, R. A., Cogswell, P. C., Neubauer, A., Kitch, B., Prokop, C., . . . Liu, E. T. (1991) Axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol cell biol*, 11(10), 5016-5031.
- Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwimer, J., . . . Forster, R. (2004) Ccr7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*, 21(2), 279-288.
- Olmos, S., Stukes, S., e Ernst, J. D. (2010) Ectopic activation of mycobacterium tuberculosis-specific cd4+ t cells in lungs of ccr7-/- mice. *J immunol*, 184(2), 895-901.
- Oriss, T. B., Ostroukhova, M., Seguin-Devaux, C., Dixon-McCarthy, B., Stolz, D. B., Watkins, S. C., . . . Ray, A. (2005) Dynamics of dendritic cell phenotype and interactions with cd4+ t cells in airway inflammation and tolerance. *J immunol*, 174(2), 854-863.
- Ovalle, W. K., e Nahirney, P. C. (2014) Netter bases da histologia. Em: sistema respiratório. 2. Ed. (rio de janeiro: elsevier), pp. 336-340.
- Pichavant, M., Taront, S., Jeannin, P., Breuilh, L., Charbonnier, A. S., Spriet, C., . . . Gosset, P. (2006) Impact of bronchial epithelium on dendritic cell migration and function: modulation by the bacterial motif kpompa. *J immunol*, 177(9), 5912-5919.
- Poon, I. K., Lucas, C. D., Rossi, A. G., e Ravichandran, K. S. (2014) Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat rev immunol*, 14(3), 166-180.

- Riedl, S. J., e Salvesen, G. S. (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat rev mol cell biol*, 8(5), 405-413.
- Próchnicki, T. e Latz, E. (2017) Inflammasomes on the Crossroads of Innate Immune Recognition and Metabolic Control. *Cell Metab.*, 5;26(1):71-93.
- Ronnblom, L., e Pascual, V. (2008) The innate immune system in sle: type i interferons and dendritic cells. *Lupus*, 17(5), 394-399.
- Roth, M. D., e Golub, S. H. (1993) Human pulmonary macrophages utilize prostaglandins and transforming growth factor beta 1 to suppress lymphocyte activation. *J leukoc biol*, 53(4), 366-371.
- Rothlin, C. V., Carrera-Silva, E. A., Bosurgi, L., e Ghosh, S. (2015) Tam receptor signaling in immune homeostasis. *Annu rev immunol*, 33, 355-391.
- Rothlin, C. V., Ghosh, S., Zuniga, E. I., Oldstone, M. B., e Lemke, G. (2007) Tam receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell*, 131(6), 1124-1136.
- Rothlin, C. V., e Lemke, G. (2010) Tam receptor signaling and autoimmune disease. *Curr opin immunol*, 22(6), 740-746.
- Sakai, T., Matsuoka, M., Aoki, M., Nosaka, K., e Mitsuya, H. (2001) Missense mutation of the interleukin-12 receptor beta1 chain-encoding gene is associated with impaired immunity against mycobacterium avium complex infection. *Blood*, 97(9), 2688-2694.
- Sato, S., e Kiyono, H. (2012) The mucosal immune system of the respiratory tract. *Curr opin virol*, 2(3), 225-232.
- Schwarz, H. P., Fischer, M., Hopmeier, P., Batard, M. A., e Griffin, J. H. (1984) Plasma protein s deficiency in familial thrombotic disease. *Blood*, 64(6), 1297-1300.
- Scott, R. S., McMahon, E. J., Pop, S. M., Reap, E. A., Caricchio, R., Cohen, P. L., . . . Matsushima, G. K. (2001) Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by mer. *Nature*, 411(6834), 207-211.
- Segal, L. N., Alekseyenko, A. V., Clemente, J. C., Kulkarni, R., Wu, B., Gao, Z., . . . Weiden, M. D. (2013) Enrichment of lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. *Microbiome*, 1(1), 19.
- Segal, L. N., e Blaser, M. J. (2014) A brave new world: the lung microbiota in an era of change. *Ann am thorac soc*, 11 suppl 1, s21-27.
- Seitz, H. M., Camenisch, T. D., Lemke, G., Earp, H. S., e Matsushima, G. K. (2007). Macrophages and dendritic cells use different axl/merck/tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. *J immunol*, 178(9), 5635-5642.
- Shao, W. H., Zhen, Y., Eisenberg, R. A., e Cohen, P. L. (2009) The mer receptor tyrosine kinase is expressed on discrete macrophage subpopulations and mainly uses gas6 as its ligand for uptake of apoptotic cells. *Clin immunol*, 133(1), 138-144.
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., . . . e Shao, F. (2015) Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 526 (660-665).
- Snelgrove, R. J., Goulding, J., Didierlaurent, A. M., Lyonga, D., Vekaria, S., Edwards, L., . . . Hussell, T. (2008) A critical function for cd200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. *Nat immunol*, 9(9), 1074-1083.
- Strasser, A., Jost, P. J., e Nagata, S. (2009) The many roles of fas receptor signaling in the immune system. *Immunity*, 30(2), 180-192.
- Stumbles, P. A., Thomas, J. A., Pimm, C. L., Lee, P. T., Venaille, T. J., Proksch, S., e Holt, P. G. (1998) Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate t helper cell type 2 (th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of th1 immunity. *J exp med*, 188(11), 2019-2031.
- Tajbakhsh, a., rezaee, m., kovanen, p. T., e sahebkar, a. (2018) efferocytosis in atherosclerotic lesions: malfunctioning regulatory pathways and control mechanisms. *Pharmacol ther.*
- Tal, O., Lim, H. Y., Gurevich, I., Milo, I., Shipony, Z., Ng, L. G., . . . Shakhar, G. (2011) Dc mobilization from the skin requires docking to immobilized ccl21 on lymphatic endothelium and intralymphatic crawling. *J exp med*, 208(10), 2141-2153.

- Tian, F., Han, Y., Song, J., ..., Wang, X. e Li, X., (2016) Pulmonary resident neutrophils regulate the production of GM-CSF and alveolar macrophages. *FEBS J*, 283(8):1465-74.
- Tsou, W. I., Nguyen, K. Q., Calarese, D. A., Garforth, S. J., Antes, A. L., Smirnov, S. V., . . . Kotenko, S. V. (2014) Receptor tyrosine kinases, tyro3, axl, and mer, demonstrate distinct patterns and complex regulation of ligand-induced activation. *J biol chem*, 289(37), 25750-25763.
- Van de Meer, J. H., van der Poll, T. e van 't Veer, C. TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and homeostasis. *Blood*, 123(16), 2406-9.
- Van Furth, R., Cohn, Z. A., Hirsch, J. G., Humphrey, J. H., Spector, W. G., e Langevoort, H. L. (1972) The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull world health organ*, 46(6), 845-852.
- Varnum, B. C., Young, C., Elliott, G., Garcia, A., Bartley, T. D., Fridell, Y. W., . . . Et al. (1995) Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin k-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature*, 373(6515), 623-626.
- Velan, G. M., Kumar, R. K., e Cohen, D. D. (1993) Pulmonary inflammation and fibrosis following subacute inhalational exposure to silica: determinants of progression. *Pathology*, 25(3), 282-290.
- Vijayan, V. K. (2007) How to diagnose and manage common parasitic pneumonias. *Curr opin pulm med*, 13(3), 218-224.
- Wallet, M. A., Sen, P., Flores, R. R., Wang, Y., Yi, Z., Huang, Y., . . . Tisch, R. (2008) MERTK is required for apoptotic cell-induced T cell tolerance. *J exp med*, 205(1), 219-232.
- Weber, M., Hauschild, R., Schwarz, J., Moussion, C., de Vries, I., Legler, D. F., . . . Sixt, M. (2013) Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients. *Science*, 339(6117), 328-332.
- Weinger, J. G., Gohari, P., Yan, Y., Backer, J. M., Varnum, B., e Shafit-Zagardo, B. (2008) In brain, axl recruits grb2 and the p85 regulatory subunit of pi3 kinase; in vitro mutagenesis defines the requisite binding sites for downstream akt activation. *J neurochem*, 106(1), 134-146.
- West, J. B. (2013) Fisiologia respiratória: princípios básicos. Em: estrutura e função: como a arquitetura pulmonar garante a sua função. Ed 9. (artmed), pp. 2-6.
- Wilt, J. L., Banks, D. E., Weissman, D. N., Parker, J. E., Vallyathan, V., Castranova, V., . . . Lapp, N. L. (1996) Reduction of lung dust burden in pneumoconiosis by whole-lung lavage. *J occup environ med*, 38(6), 619-624.
- Worbs, T., Hammerschmidt, S. I., e Forster, R. (2017) Dendritic cell migration in health and disease. *Nat rev immunol*, 17(1), 30-48.
- Wynn, T. A. (2005) TH-17: a giant step from TH1 and TH2. *Nat Immunol*, 6(11):1069-70.
- Yang, J., Wang, T., Li, Y., Yao, W., Ji, X., Wu, Q., . . . Ni, C. (2016) Earthworm extract attenuates silica-induced pulmonary fibrosis through nrf2-dependent mechanisms. *Lab invest*, 96(12), 1279-1300.
- Yoshimura, A., Naka, T., e Kubo, M. (2007) Socs proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat rev immunol*, 7(6), 454-465.
- Zagorska, A., Traves, P. G., Lew, E. D., Dransfield, I., e Lemke, G. (2014) Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. *Nat immunol*, 15(10), 920-928.
- Zizzo, G., Hilliard, B. A., Monestier, M., e Cohen, P. L. (2012) Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires m2c polarization and MERTK induction. *J immunol*, 189(7), 3508-3520.
- Zong, C., Yan, R., August, A., Darnell, J. E., Jr., e Hanafusa, H. (1996) Unique signal transduction of EYK: constitutive stimulation of the JAK-STAT pathway by an oncogenic receptor-type tyrosine kinase. *Embo j*, 15(17), 4515-4525.