

JULIA ECHARDT LUCAS RIBEIRO

CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DO PAPEL DO RECEPTOR  
DE EFEROCITOSE MerTk NA MODULAÇÃO FUNCIONAL  
DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES



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

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RIO DE JANEIRO

DEZEMBRO/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.**

ECHARDT LUCAS RIBEIRO, JULIA.  
CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DO PAPEL DO RECEPTOR DE  
EFEROCITOSE MERTK NA MODULAÇÃO FUNCIONAL DE MACRÓFAGOS  
ALVEOLARES/ Julia Echardt Lucas Ribeiro -- Rio de Janeiro: UFRJ, 2018.  
49f.

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.

Bibliografia: f.45-49

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

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

**ALUNO: Julia Echardt Lucas Ribeiro**

DRE: 115029117

**BANCA EXAMINADORA:** Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza (Presidente)  
MSc. Thaís da Silva Rigoni  
MSc. Luciana Conde Rodrigues Maia  
Prof. Leonardo Nimrichter (Suplente)

**Título da Monografia: "Caracterização in vitro do papel do receptor de eferocitose MerTk na modulação funcional de macrófagos alveolares"**

**Local: Sala D-27 / Instituto de Microbiologia Paulo de Góes / CCS / UFRJ**

**Data e hora de início: 10 de dezembro 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, 10 de dezembro de 2018.

NOTA

Banca Examinadora:

<u>9,0</u>	Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza
<u>9,5</u>	Thaís da Silva Rigoni MSc. Thaís da Silva Rigoni
<u>9,5</u>	Luciana Conde Rodrigues Maia MSc. Luciana Conde Rodrigues Maia
	Leonardo Nimrichter Prof. Leonardo Nimrichter

Aluno:

Julia Echardt Lucas Ribeiro  
Julia Echardt Lucas Ribeiro

Orientador:

Alessandra D'Almeida Filardy  
Profa. Alessandra D'Almeida Filardy

Coorientador:

Kamila Guimarães Pinto  
MSc. Kamila Guimarães Pinto

Coordenador  
de TCC

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho  
Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

**À minha avó Dalva Echardt, pelo amor incondicional que sempre demonstrou por mim,  
pelas palavras de encorajamento e por sempre acreditar em mim.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer qualquer tipo de força sobrenatural maior, por ter evitado que eu surtasse durante esses quatro anos de graduação, por ter permitido que eu mantivesse o foco e aguentasse firme em todos os momentos que quis desistir. Minha eterna gratidão, a quem quer que você seja.

Aos meus pais, Simone e Claudio, por todo o carinho e dedicação. Agradeço a vocês por todas as horas de sono perdidas para cuidar de mim. Por serem presentes em todos os momentos e por me darem suporte para continuar desde os meus primeiros passos. Agradeço por terem me alfabetizado em inglês, pela educação que me deram e por sempre terem sido firmes, mas sem impor a vontade de vocês (na maioria das vezes). Obrigada pelo apoio emocional e financeiro, por me aceitarem e permitirem que eu seja quem eu sou, por me respeitarem e por terem abdicado de muitos dos seus sonhos pessoais para que eu realize os meus. Gratidão eterna a vocês.

À minha família mais próxima: minhas avós Dalva e Ademarina, meus avôs Jorge e Cesar e minha madrinha Kátia. Obrigada aos meus avós maternos e madrinha pelo apoio emocional e amor incondicional e meus avós paternos pelo apoio logístico e financeiro. Fui muito sortuda por poder contar com meus quatro avós até quase o final da graduação. Meirelles Cabuloso, sei que você estará presente na minha formatura, onde quer que você esteja! Aos outros três avós, espero que vocês possam estar presentes na minha próxima formatura.

À Victoria Chaves, minha Vi Keys. Você foi a primeira pessoa com quem falei no primeiro dia de aula e, desde então, nossa conexão foi imediata. Mesmo com estilos de vida completamente diferentes em um primeiro momento, o destino trabalhou certinho pra manter nosso vínculo forte. Há dois anos você tem sido meu porto seguro e meu pontinho de paz. Obrigada por me ouvir sempre, por não me julgar, por me entender, por me manter nos eixos, por toda a compreensão em todos os momentos, por fazer parte da minha rotina e, principalmente, por me tirar completamente da rotina quando eu preciso esfriar a cabeça. Obrigada por marcar meus médicos, por levar almoço pra mim e por todas as surpresinhas ao longo desses anos. Você é de longe o maior presente que a UFRJ me deu, minha dupla dinâmica.

Aos amigos que fiz durante a graduação: Amanda, Carol, Matheus e Natalia. Meus mais sinceros agradecimentos por terem me aguentado durante meus surtos pessoais e acadêmicos. Obrigada por terem sido o maior apoio que eu poderia ter tido durante esses anos, tanto emocionalmente quanto na hora de colocar a mão na massa fazendo transcrições, trabalhos e seminários. Obrigada por sempre aceitarem minhas críticas durante os trabalhos e por falarem mal de mim na minha cara, amo vocês por isso. Obrigada pela coragem de terem andado de carro comigo assim que tirei a carteira, por todas as festas, as conversas, por me oferecerem consolo nas horas difíceis e pelas crises existenciais que passamos por cima juntos gritando e xingando muito no CA. Espero que nossa amizade dure para sempre e que um de vocês ganhe na loteria para me sustentar.

Às minhas amigas Mariana, Hellen, Thayane D'black, Thayane Lucas, Thais, Luiza e Angélica, obrigada por estarem ao meu lado há tanto tempo, por se esforçarem para lembrar o nome do meu curso, por torcerem para o meu sucesso e por me ensinarem que a amizade verdadeira permanece mesmo sem o contato frequente. Vocês foram peças fundamentais para minha sanidade mental antes e durante a graduação, muito obrigada!

À Shanty, minha filha de quatro patas. Obrigada por ter me escolhido como mãe, mesmo que você me troque facilmente por ar-condicionado e biscoitinho. Obrigada por me acompanhar desde a angústia do pré-vestibular e por ser a felicidade de todos os meus dias desde 2013. Espero que você ainda esteja por perto para me ver conquistar ainda mais coisas. A vida é muito mais feliz com você me esperando chegar em casa para jogar seu brinquedinho. Te amo, Piuzi!

À minha orientadora Alessandra Filardy, por todo o apoio durante a realização desse trabalho, pelos ensinamentos, pelas dicas, conselhos e por ter sido tão compreensiva comigo e com as minhas escolhas. À minha co-orientadora Kamila Guimarães, pela ajuda nos experimentos, pelos textões às 7h da manhã, pela amizade que desenvolvemos e pelas cervejas bebidas juntas. Às companheiras de laboratório e amigas Antônia, Ester, Monique, Natalia e Thais, por toda a ajuda nos experimentos, pelas zueiras, pelas piadas e por tornarem meus dias mais leves e engraçados. À professora Marcela, por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu desenvolvesse esse trabalho. Muito obrigada a todas vocês!

Ao professor Sérgio Fracalanza, por ter cedido a amostra de *K. pneumoniae* utilizada nos meus experimentos pilotos, por toda a ajuda na parte de microbiologia desse trabalho e por ter aberto as portas do seu laboratório (Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica – L IMM) para que eu pudesse usar o necessário.

À professora Lúcia Teixeira e sua aluna Ana Carolina, por terem cedido a amostra de *S. pneumoniae* por estarem sempre à disposição para preparar todos os inóculos necessários durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos membros da banca avaliadora, por terem aceitado o convite e serem parte desse dia tão importante. Obrigada por terem cedido o tempo de vocês e pela disponibilidade.

Às agências de fomento CNPq e FAPERJ, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

## RESUMO

**JULIA ECHARDT LUCAS RIBEIRO**

### CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DO PAPEL DO RECEPTOR DE EFEROCITOSE MERTK NA MODULAÇÃO FUNCIONAL DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES

**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**

Macrófagos alveolares (AMs) são células fundamentais no estabelecimento da homeostase pulmonar. Essas células estão localizadas no lúmen alveolar, em íntimo contato com antígenos inalados e com a microbiota residente. Além de seu papel na imunidade, AMs também são responsáveis por fagocitar células apoptóticas (eferocitose) e manter a tolerância à antígenos inócuos. Os receptores de eferocitose da família TAM (Tyro3, Axl e MerTk), expressos por fagócitos, reconhecem fosfatidilserina (PtdSer) nas células apoptóticas através das moléculas-pontes Gas6 e proteína S. Além de mediar a eferocitose, os receptores TAM bloqueiam vias pró-inflamatórias dos TLRs e de citocinas. O objetivo deste estudo é investigar o papel da eferocitose mediada pelo receptor MerTk na modulação funcional de AMs *in vitro*. Para isso, camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e MerTk<sup>-/-</sup> (6-8 semanas), foram utilizados de acordo com as normas estabelecidas pela CEUA CCS/UFRJ (Licença 041/17). Células totais do pulmão foram obtidas cirurgicamente a partir da extração do tecido e posterior maceramento mecânico. AMs foram obtidos através do lavado broncoalveolar (BAL) com 1 mL de PBS. As células do pulmão foram submetidas a um q-PCR. As células obtidas através do BAL também foram submetidas ao q-PCR e à cultura em placa de 48 poços. O RNA mensageiro foi extraído tanto do tecido pulmonar quanto dos AMs por TRIzol, seguido da síntese de cDNA e amplificação do mRNA por RT-PCR. Para dosagem de citocinas por ELISA, AMs foram estimulados com LPS (200 ng/mL) ou *S. pneumoniae* (MOI 1:100) por 24 horas. Além disso, o perfil morfológico de AMs recolhidos do BAL foram avaliados através de microscopia óptica após citospin. Resumidamente, nossos dados revelam que apesar de não haver diferenças morfológicas entre os AMs de animais WT e *knockout*, podemos notar que, condições homeostáticas os camundongos WT mostraram ter um perfil mais pró-inflamatório, apesar de não haver nenhuma mudança significativa durante a infecção por *S. pneumoniae*. Esse quadro, todavia, se inverte quando adicionamos à cultura ligantes dos receptores TAM, onde podemos ver a indução de um perfil funcional mais pró-inflamatório durante a infecção por *S. pneumoniae* em animais MerTk<sup>-/-</sup>. Surpreendentemente, observamos que ambos os receptores Axl e MerTk controlam negativamente a replicação intracelular dessa mesma bactéria, sugerindo que a deficiência de um receptor é compensada pela maior expressão do outro quando estimulados.



**ABSTRACT****JULIA ECHARDT LUCAS RIBEIRO****IN VITRO CHARACTERIZATION OF THE ROLE OF THE MERTK RECEPTOR IN THE FUNCTIONAL MODULATION OF ALVEOLAR MACROPHAGES****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**

Alveolar macrophages (AMs) are fundamental cells in the establishment of pulmonary homeostasis. These cells are located in the alveolar lumen, in close contact with inhaled antigens and with the resident microbiota. In addition to their role in immunity, AMs are also responsible for phagocytizing apoptotic cells (eferocytosis) and maintaining tolerance to innocuous antigens. TAM receptors (Tyro3, Axl and MerTk), expressed by phagocytes, recognize phosphatidylserine (PtdSer) in apoptotic cells through the gas6 and protein S bridging molecules. In addition to mediating eferocytosis, TAM receptors block pro-inflammatory effects of TLRs and cytokines. The aim of this study is to investigate the role of MerTk receptor-mediated eferocytosis in the functional modulation of AMs in vitro. For this, wild-type C57BL / 6 (WT) and MerTk<sup>-/-</sup> mice (6-8 weeks) were used according to the standards established by CEUA CCS / UFRJ (License 041/17). Total lung cells were obtained surgically from tissue extraction and mechanical maceration. AMs were obtained through the bronchoalveolar lavage (BAL) with 1 mL of PBS. Lung cells were submitted to a q-PCR. Cells obtained through BAL were also submitted to q-PCR and 48-well plate culture. The mRNA was extracted from both lung and AM tissue by TRIzol, followed by cDNA synthesis and mRNA amplification by RT-PCR. For cytokine dosing by ELISA, AMs were stimulated with LPS (200 ng / mL) or *S. pneumoniae* (MOI 1:100) for 24 hours. In addition, the morphological profile of AMs collected from BAL were evaluated by optical microscopy after cytospin. Briefly, our data reveal that although there are no morphological differences between the AMs of WT and knockout animals, we can see that, in homeostatic conditions, WT mice showed a more pro-inflammatory profile, although there was no significant change during the infection. *S. pneumoniae*. This picture, however, is reversed when we add to the culture ligands of the TAM receptors, where we can see the induction of a more proinflammatory profile during *S. pneumoniae* infection in MerTk<sup>-/-</sup> animals. Surprisingly, we observed that both Axl and MerTk receptors negatively control the intracellular replication of this same bacterium, suggesting that the deficiency of one receptor is compensated by the greater expression of the other when stimulated.

## 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>AS</b>	ágar sangue
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<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>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>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>MHC-II</b>	complexo de histocompatibilidade de classe II
<b>MMP-9</b>	metaloproteinase da matriz 9
<b>MPs</b>	do inglês, <i>macrophage</i>
<b>NK</b>	do inglês, " <i>natural killer</i> "
<b>PAMPs</b>	padrões moleculares associados a patógenos
<b>PCR</b>	reação em cadeia de polimerase
<b>PI3K</b>	fosfatidilinositol 3-quinase
<b>pMPs</b>	macrófagos peritoneais
<b>PRR</b>	receptor de reconhecimento de padrão
<b>PROS</b>	proteína S
<b>PtdSer</b>	fosfatidilserina
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>SFB</b>	soro fetal bovino
<b>SOCS</b>	proteínas de sinalização supressora de citocinas
<b>TAM</b>	Tyro 3, Axl e MerTk
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor
<b>TLRs</b>	<i>Toll-like</i> Receptor
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TNF</b>	fator de necrose tumoral
<b>Treg</b>	T regulatórias
<b>WT</b>	do inglês, <i>wild-type</i>

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Macrófagos Alveolares .....	1
1.2 Eferocitose.....	6
1.3 Eferocitose mediada por receptores da família TAM .....	10
1.4 Infecções Pulmonares.....	13
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>16</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
4.1 Animais .....	17
4.2 Cepa, condições de cultivo e padronização do inóculo bacteriano .....	17
4.3 Lavado broncoalveolar (BAL) .....	18
4.4 Obtenção de neutrófilos apoptóticos .....	18
4.5 Cultura <i>in vitro</i> de AMs .....	19
4.6 Dosagem de citocinas por ELISA ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ) .....	19
4.8 Ensaio de viabilidade intracelular .....	20
4.9 RT-PCR e qPCR .....	20
4.10 Análise estatística.....	21
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
5.1 Expressão dos receptores de eferocitose da família TAM e da molécula ponte Gas6 nas células pulmonares de camundongos WT. ....	22
5.2 Expressão dos mRNA para os receptores de eferocitose da família TAM em AMs de camundongos WT. ....	23
5.3 Análise funcional de AMs <i>in vitro</i> de animais WT e MerTk <sup>-/-</sup> através da dosagem de citocinas. ....	24
5.4 Análise funcional de AMs de animais WT e MerTk <sup>-/-</sup> co-cultivados com neutrófilos apoptóticos através da dosagem de citocinas <i>in vitro</i> .....	25
5.5 Expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias em AMs de animais WT e MerTk <sup>-/-</sup> co-cultivados com neutrófilos apoptóticos. ....	26
5.6 Viabilidade intracelular de <i>S. pneumoniae</i> em AMs de animais WT e MerTk <sup>-/-</sup> .....	27
5.7 Viabilidade intracelular de <i>S. pneumoniae</i> em AMs de animais WT e Axl <sup>-/-</sup> . ....	28
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>33</b>

## 1. INTRODUÇÃO

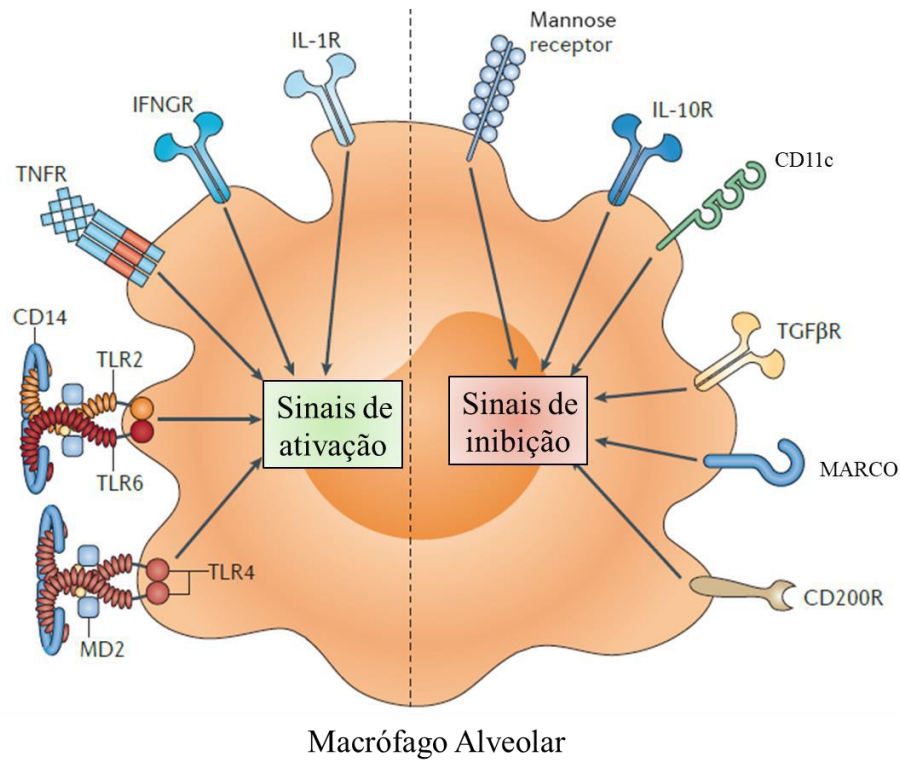
### 1.1 Macrófagos Alveolares

Macrófagos (MPs) são células amplamente distribuídas no corpo, sendo encontradas em todos os tecidos de mamíferos adultos. Essas células possuem papéis importantes em quase todos os aspectos biológicos de um organismo, atuando desde o desenvolvimento, mantendo a homeostase e o reparo tecidual, até respostas imunológicas contra patógenos (Wynn, Chawla e Pollard, 2013) sendo, desta forma, importantes componentes da primeira linha de defesa imunológica (Weiss e Schaible, 2015). Os MPs residentes agem como “células sentinelas” que atuam na imuno-vigilância, ou seja, têm a função de manter o estado homeostático dos tecidos em que se encontram através de respostas a mudanças fisiológicas do hospedeiro e/ou a fatores externos (Wynn, Chawla e Pollard, 2013). Como resultado dessas complexas respostas biológicas à estímulos endógenos e exógenos, diferentes MPs, que residem em diferentes tecidos, expressam marcadores fenotípicos de heterogeneidade e desempenham funções distintas (Gordon e Pluddemann, 2017), de acordo com os estímulos recebidos no microambiente do sítio em que se encontram (Haldar e Murphy, 2014). Como breves exemplos disso temos as células de Kupffer, no fígado, que atuam no *clearance* de partículas sanguíneas e microrganismos; os osteoclastos nos ossos, que atuam auxiliando no processo de reabsorção óssea e, por sua vez, os macrófagos alveolares (AMs), um dos tipos de MPs presente nos pulmões, que atuam na imuno-vigilância e eliminação de patógenos (Haldar e Murphy, 2014; Hussell e Bell, 2014).

Baseado em sua localização anatômica, estado de ativação e função especializada, pode-se afirmar que os MPs residentes do pulmão são extremamente heterogêneos (Laskin, Weinberger e Laskin, 2001; St-Laurent *et al.*, 2009; Schneberger, Aharonson-Raz e Singh, 2011). Dados da literatura demonstram que pelo menos 3 tipos de MPs pulmonares já foram identificados (Schneberger, Aharonson-Raz e Singh, 2011; Barletta *et al.*, 2012): 1) os macrófagos intersticiais (IMs), os quais acredita-se que atuem regulando o estado inflamatório e na apresentação de antígenos (Schneberger, Aharonson-Raz e Singh, 2011), 2) os intravasculares/vasculares periféricos, que parecem atuar na comunicação entre células apresentadoras de antígenos (APCs) no interstício do pulmão para recrutamento de neutrófilos e células mielóides (Barletta *et al.*, 2012), e 3) os AMs, que, como já citado, são amplamente reconhecidos por realizarem a remoção de partículas e microrganismo patogênicos nos alvéolos.

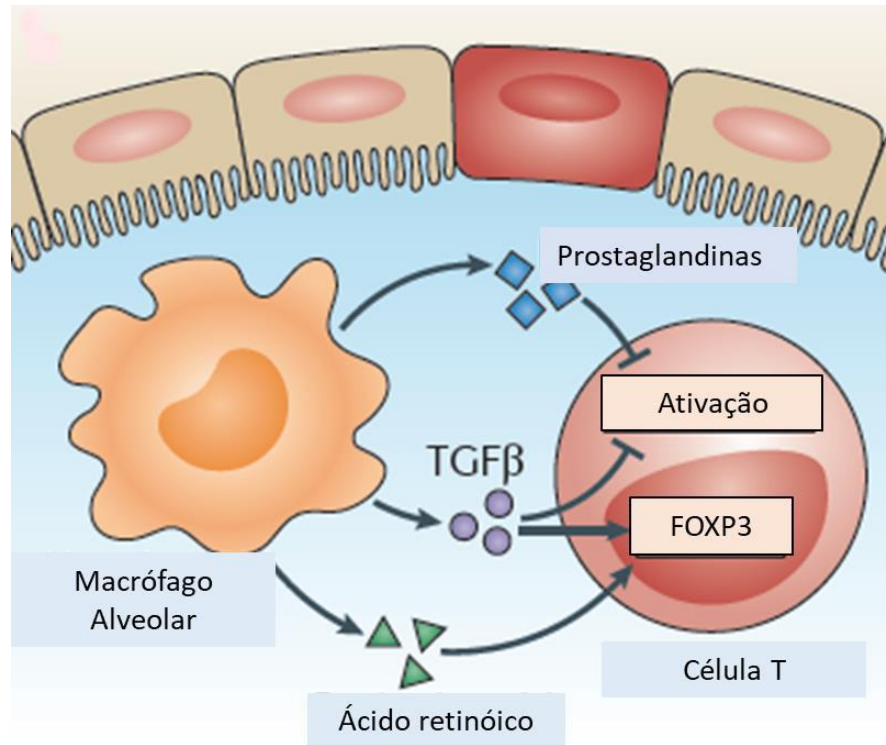
Os alvéolos são formados por uma fina camada de células epiteliais alveolares (AECs) do tipo I e algumas AECs mais cubóides do tipo II, que estão em contato com o ar inalado, sendo assim a parte funcional do pulmão, permitindo que a troca gasosa ocorra, além de produzirem surfactantes e possuírem potencial de autorrenovação e diferenciação (Lambrecht, 2006). Essas células, além de serem uma importante barreira física (Guillot *et al.*, 2013), também auxiliam os mecanismos de estabelecimento da imunidade inata, produzindo óxido nítrico (Kaur *et al.*, 2015), citocinas como o GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) e quimiocinas (Bilyk e Holt, 1993; Mayer *et al.*, 2007; Cakarova *et al.*, 2009). Além disso, secretam substâncias como mucina (Ali *et al.*, 2011) e peptídeos antimicrobianos que, por sua vez, estão relacionados com o controle de patógenos (Lu *et al.*, 2006).

É na superfície epitelial interna dos alvéolos, em contato com o lúmen alveolar, como o nome sugere, que residem os AMs (Morales-Nebreda *et al.*, 2015). Esses AMs possuem aspecto arredondado, propriedade aderente e, devido à sua localização única, apresentam um fenótipo que os diferencia de todos os outros MPs do pulmão e de outros tecidos (Gordon e Pluddemann, 2017). Devido ao fato do microambiente das vias respiratórias entrar o tempo todo em contato com partículas externas da atmosfera que são inaladas como, por exemplo, poluentes, patógenos (Lambrecht, 2006) e, além disso, a microbiota local (Segal e Blaser, 2014), as células que ali residem são moduladas para apresentar um fenótipo regulatório, expressando baixos níveis de MHC de classe II, tornando-se apresentadoras de antígenos menos eficientes; níveis bastante elevados de CD206, um receptor de manose que interage com glicoproteínas e glicolipídeos presentes na superfície bacteriana mas que, surpreendentemente, resulta na supressão dos AMs quando esse reconhecimento é feito em bactérias não opsonizadas. O receptor *scavenger* MARCO e vários outros receptores, que atuam no *clearance* de partículas e células apoptóticas. O receptor CD11c que, além dos AMs está presente em macrófagos intestinais e células dendríticas (DCs). O receptor de CD200 (CD200R) que ao se encontrar com seu ligante, inibe a ativação de células mielóides e células T, bem como o receptor SIGLEC-F, também expresso por eosinófilos (Hussell e Bell, 2014; Kaur *et al.*, 2015; Gordon e Pluddemann, 2017) (**Figura 1**).



**Figura 1. O balanço na ativação do macrófago alveolar.** A ativação de macrófagos alveolares e o início da inflamação envolvem um complexo balanço entre a ativação e a repressão de sinais. De um lado, receptores do tipo toll (TLRs), juntamente com seus correceptores MD2 e CD14, reconhecem padrões moleculares associados a patógenos e receptores para citocinas inflamatórias como, por exemplo, o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interferon- $\gamma$  (INF-  $\gamma$ ), os quais perpetuam a inflamação. Por outro lado, mediadores como IL-10 solúvel ou a integrina  $\alpha\text{v}\beta 6$  promovendo a formação de fator de crescimento transformador (TGF- $\beta$ ) bloqueiam vias que levam a inflamação. O contato célula-célula com as células epiteliais alveolares ou brônquicas também promovem sinais inibitórios para os AMs, por exemplo, através do receptor de CD200 (CD200R). O receptor de manose (CD206) interage com glicoproteínas e glicolípídeos presentes na superfície bacteriana mas, surpreendentemente, resulta na supressão dos AMs quando esse reconhecimento é feito em bactérias não opsonizadas. Os receptores CD11c e MARCO são receptores que atuam mediando a indução de sinais inibitórios para a ativação dos macrófagos. Adaptado de Hussel e Bell, 2014.

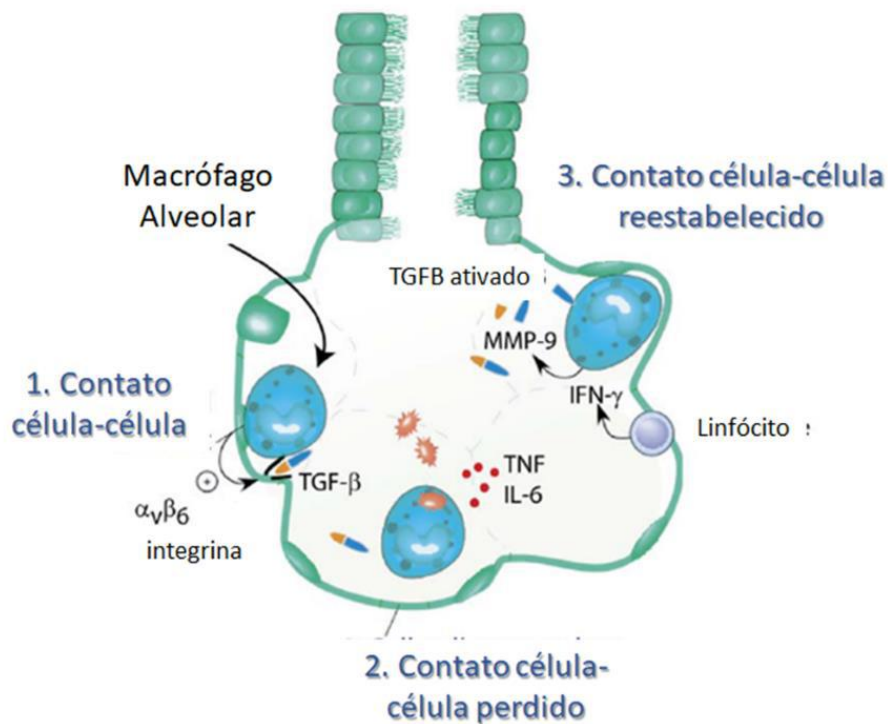
Para evitar danos às vias aéreas inferiores por respostas a antígenos inócuos, os AMs são mantidos em um estado quiescente, produzindo baixos níveis de citocinas inflamatórias, apesar de manterem sua atividade fagocítica (Holt, 1978), além de produzirem prostaglandinas imunossupressoras, TGF- $\beta$ , ácido retinóico e induzirem a expressão de FOXP3 em células T *naive* (Coleman *et al.*, 2013) (**Figura 2**).



**Figura 2. Interações leucocitárias nos pulmões saudáveis.** A secreção de TGF- $\beta$  e ácido retinóico por macrófagos alveolares pode induzir a expressão de FOXP3 em células T virgens ou ativadas (CD4+), que estão presentes no lúmen das vias aéreas. Em adição a isso, prostaglandinas e TGF- $\beta$  suprimem a ativação de células T. Adaptado de Hussell e Bell, 2014.

Para manter a homeostase nas mucosas pulmonares é necessário que se mantenha uma regulação muito fina das respostas imunes, de modo que não ocorra uma ativação exacerbada dos AMs, acarretando em formação edema, recrutamento celular e inflamação exacerbados, fatores que juntos levarão ao espessamento da parede alveolar e dificultarão os mecanismos de difusão e troca de gases (Lambrecht, 2006). Essa regulação pode ser feita tanto por fatores solúveis presentes no lúmen dos alvéolos quanto por interações célula-célula (Hussell e Bell, 2014). Os fatores humorais podem ser muitas vezes inespecíficos como, por exemplo, pela ação de lactoferrinas, lisozimas, proteínas surfactantes e defensinas. Já as interações célula-célula se dão de maneira mais orquestrada, uma vez que em condições homeostáticas os AMs ficam intimamente aderidos às AECs e essa interação induz a expressão da integrina  $\alpha v \beta 6$  nas mesmas de maneira dependente de TGF- $\beta$  levando, desta forma, à ativação do TGF- $\beta$  nas proximidades dos AMs. A ligação do TGF- $\beta$  ativado aos seus receptores expressos nos AMs induz a supressão da fagocitose e produção de citocinas pelos mesmos. Por outro lado, durante uma infecção, para que haja a ativação dos AMs é preciso que agentes infecciosos ativem os TLRs para que se tenha uma “janela de oportunidade” para a ativação dos MPs, uma vez que a estimulação dos mesmos pelos TLRs leva a uma rápida perda de contato

desses com as AECs o que, por sua vez, induz uma breve perda de expressão da integrina  $\alpha\beta6$  nas AECs. Sob essas circunstâncias, o TGF- $\beta$  não é mais ativado e os AMs podem, finalmente, secretar citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, o TNF- $\alpha$  e IL-6, além de fagocitar matéria particulada. No curso da resolução da infecção, linfócitos que foram ativados permanecem secretando INF- $\gamma$  e este estimula a produção da metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9), que tem o potencial de ativar TGF- $\beta$  latente. Uma vez reativado, o TGF- $\beta$  consegue voltar a suprimir as funções dos AMs e eles voltam a se aderir nas AECs, uma vez que a expressão da integrina  $\alpha\beta6$  é reestabelecida (Takabayshi *et al.*, 2006) (**Figura 3**).



**Figura 3. Macrófagos alveolares promovem e freiam a imunidade do pulmão.** Em condições homeostáticas (1), os AMs se aderem intimamente às células epiteliais alveolares, induzindo a expressão da integrina  $\alpha\beta6$ , uma integrina ativadora de TGF- $\beta$ . Quando há o reconhecimento de sinais de perigo por TLRs, os macrófagos se soltam das células epiteliais alveolares e a expressão da integrina  $\alpha\beta6$  é rapidamente perdida. Nesse sentido, os macrófagos escapam da inibição por TGF- $\beta$  e passam a exibir funções do sistema imunológico inato, como fagocitose e secreção de citocinas pró-inflamatórias (2). Após alguns dias, células T ativadas estimulam a produção de MMP-9, o que acarreta na ativação do TGF- $\beta$  latente e coloca, desta forma, o freio nos AMs novamente, sendo assim a homeostase eventualmente reestabelecida (3). Adaptado de Takabayshi *et al.*, 2006

Durante a homeostase, AMs são constantemente desafiados com ligantes de TLRs, provenientes de membros da microbiota e apesar disso, continuam quiescentes. Entender como e quais sinais são importantes para promover a regulação dessas células durante a



homeostase é importante para compreender como as doenças inflamatórias pulmonares crônicas são sustentadas.

## 1.2 Eferocitose

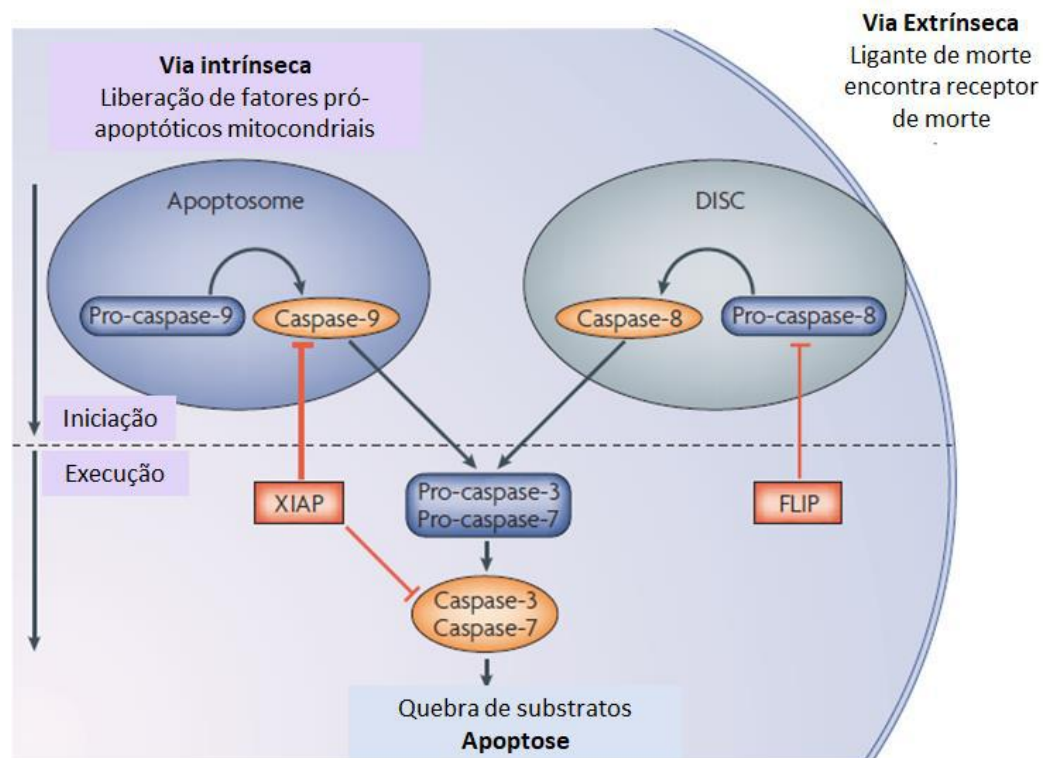
Os AMs estão localizados no lúmen alveolar em contato com as células epiteliais, que apresentam uma elevada taxa de renovação por apoptose. Assim, deve-se ressaltar que, tão importante quanto a sua participação em respostas imunológicas já citadas, é papel dos AMs realizar a fagocitose de células apoptóticas (ou eferocitose) e debris celulares na saúde e na doença, mantendo a homeostase dos tecidos (Lambrecht, 2006).

Bilhões de células morrem diariamente e são repostas por células recém-formadas. Nas vias aéreas, especificamente, é de extrema importância que a eferocitose seja feita de maneira rápida e eficiente, evitando a evolução da apoptose para a necrose secundária, com liberação de auto-antígenos e padrões moleculares associados ao dano celular (DAMPs) que, em última análise, levariam à uma inflamação tecidual. Além da apoptose, a necrose e a piroptose são mecanismos de morte celular comumente encontrados em sistemas biológicos (Nagata, 2018).

Na morte por necrose, as células incham, a membrana plasmática se rompe irreversivelmente e componentes celulares são lançados no ambiente em que aquela célula se encontra. Desta forma, o sistema imune é ativado e um processo inflamatório se inicia. Por esse motivo, esse é um tipo de morte celular considerada “suja”. A piroptose, bem como a apoptose, é uma morte programada. Na piroptose temos uma morte dependente de caspase-1, 4 e 5, onde 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). Na morte por apoptose, que é mediada pelas caspases humanas 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10, a célula encolhe, mas a membrana plasmática se mantém íntegra, porém toda enrugada e os núcleos são condensados e fragmentados. As células apoptóticas são rapidamente fagocitadas por macrófagos para prevenir o lançamento de componentes intracelulares no meio. Esse processo previne a liberação de fatores inflamatórios e, por isso, é chamado de “morte celular limpa”. (Agard, Maltby e Wells, 2010; Nagata, 2018).

A apoptose pode ocorrer por duas vias: a intrínseca e a extrínseca. A primeira dá início ao processo de morte celular após receber um sinal intracelular; sinais de estresse do interior

da célula levam à liberação de componentes das mitocôndrias, como o citocromo C. Essa liberação leva à formação do apoptossomo, culminando na ativação da caspase-9 e caspase-3 e na morte celular. Já na segunda via, o processo de morte celular se dá após um sinal extracelular recebido. Resumidamente, a ligação de um ligante ao seu “receptor de morte” leva a formação de um complexo de sinalização de morte induzida (DISC, do inglês *death-inducing signalling complex*). Este processo leva a ativação de caspase-8 ou caspase-10 e subsequente ativação de caspase-3 e morte celular. É importante ressaltar que ambas as vias compartilham formas de “perceber” sinais apoptóticos e executar a morte da célula em si. Além disso, reguladores negativos da cascata de caspases são encontrados nos dois níveis. Enquanto o inibidor FLIP bloqueia a ativação da caspase-8 no DISC, o XIAP (do inglês, *X-linked inhibitor of apoptosis protein*) pode bloquear a ativação da caspase-9, caspase-3 e caspase-7 na cascata, impedindo que a morte celular ocorra (Riedl e Salvesen, 2007) (**Figura 4**).



**Figura 4.** A cascata proteolítica de caspase na iniciação e execução da apoptose. Ambas as vias intrínseca e extrínseca usam princípios parecidos para perceber sinais apoptóticos e executar a apoptose. Na via intrínseca, um estímulo apoptótico na célula leva a construção de uma plataforma de sinalização, o apoptossomo, o qual ativa o caspase iniciadora 9. Em contraste, um sinal apoptótico extrínseco é mediado pela ligação de um ligante extracelular à um receptor transmembrana, levando a formação do complexo de sinalização de morte induzida (DISC), o qual é capaz de ativar o caspase iniciadora 8. Uma vez ativado, tanto a autoclivagem de caspase-9 quanto de caspase-8 leva a clivagem das caspases efetoras 3 e 7, o que acarreta na apoptose da célula condenada. Reguladores negativos da cascata de caspases podem ser encontrados em ambos os níveis. Enquanto FLIP bloqueia a ativação do iniciador caspase-8 no DISC, XIAP pode bloquear ambas as fases de iniciação a partir da inibição da caspase-9, bloqueando consequentemente a caspase-3 e caspase-7. Adaptado de Riedl e Salvesen, 2007.

Como parte rotineira da manutenção da homeostase, diferentes tecidos renovam e eliminam células velhas que não têm mais utilidade o tempo todo. A hematopoiese, por exemplo, produz bilhões de novas células diariamente e, muitas delas, possuem um tempo de vida curto (Arandjelovic e Ravichandran, 2015). No epitélio do trato respiratório que, como já foi dito, possui uma taxa de renovação celular elevada e entra em contato com partículas exógenas como, potenciais patógenos, e microbiota a todo instante, o número de células apoptóticas geradas também é enorme. Nesse contexto, as células apoptóticas precisam ser eliminadas rapidamente por fagócitos residentes ou recrutados, sem que haja a formação de um processo inflamatório no tecido em que se encontram (Nagata, 2007; Poon *et al.*, 2014). Esses fagócitos podem ser classificados em profissionais, como os MPs e DCs imaturas, ou não profissionais, como as células epiteliais e fibroblastos (Arandjelovic e Ravichandran, 2015).

O processo de identificação e posterior fagocitose das células apoptóticas precisa ocorrer de forma rápida e coordenada afim de evitar que a apoptose evolua para a “necrose secundária”, onde haverá o rompimento da membrana plasmática e a liberação do conteúdo intracelular, podendo ativar os receptores de DAMPs e contribuir para possíveis respostas imunes, incluindo à auto-antígenos, o que pode estabelecer um quadro grave de inflamação e romper a homeostase do tecido (Rodriguez-Manzanet *et al.*, 2010; Janko *et al.*, 2011; Poon *et al.*, 2014).

Para que a eferocitose ocorra de forma orquestrada, primeiramente a célula apoptótica deve liberar sinais chamados de “*find-me*”, para atrair os fagócitos. Os fagócitos, então, conseguem distinguir entre células em processo de morte e células saudáveis através de receptores específicos que, por sua vez, reconhecem e diferenciar entre os sinais “*eat-me*” que passam a ser expressados na célula apoptótica e os sinais “*don't eat me*” que são expressos por células saudáveis. Em seguida, o fagócito passa por um extenso rearranjo no citoesqueleto para que consiga internalizar os corpos apoptóticos. Por fim, ocorre o processamento de tudo que foi ingerido e inicia-se a elaboração de uma resposta imune, caracterizada principalmente pela secreção de mediadores anti-inflamatórios que ajudam a diminuir a resposta imune local (Brown *et al.*, 2002; Janko *et al.*, 2011; Simhadri *et al.*, 2012) (**Figura 5**).

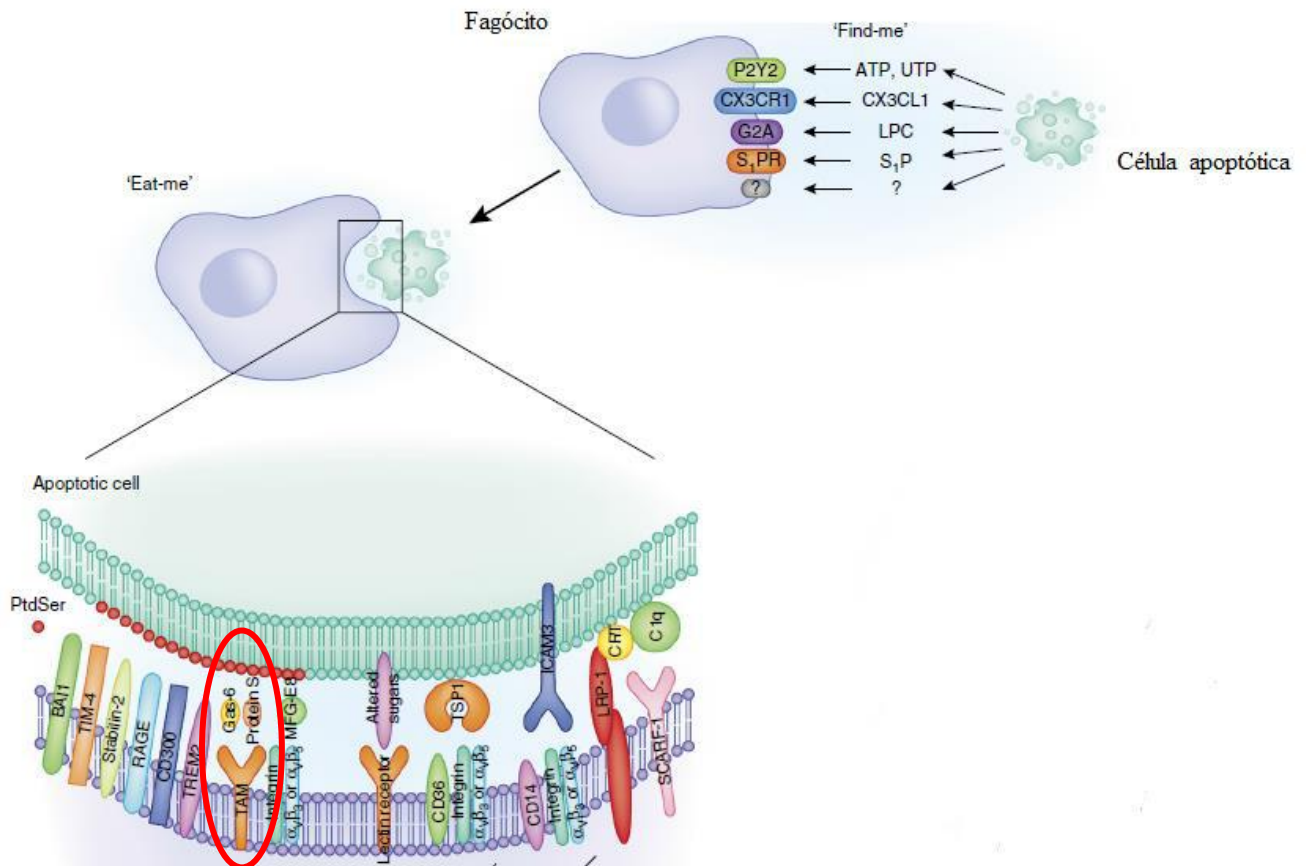


Figura 5. **Etapas durante a fagocitose de células apoptóticas.** Quando uma célula inicia o estado apoptótico, ela libera sinais “*find-me*” que atraem fagócitos. A célula apoptótica é distinguida de células vizinhas normais através da exposição de sinais “*eat-me*”, sendo a fosfatidilserina (PtdSer) o mais precoce e proeminente sinal. Esses sinais são reconhecidos por diferentes receptores de fagocitose nos fagócitos, o que resulta na sinalização de eventos que facilitam a absorção do corpo apoptótico. Receptores da família TAM reconhecem a PtdSer indiretamente através de moléculas ponte (Gas-6 e proteína S). Nesse processo, mediadores anti-inflamatórios são expressos e secretados, contribuindo para a homeostase no tecido e inibição de inflamação local. Adaptado de Arandjelovic e Ravichandran, 2015

A liberação dos sinais “*find-me*” é uma etapa crítica em muitos tecidos, pois abre a possibilidade de que haja recrutamento de potenciais fagócitos que se encontram distantes da célula apoptótica. Em alguns tecidos como, por exemplo, no timo em desenvolvimento, esse processo é extremamente importante, uma vez que timócitos que estão em processo de apoptose não serão fagocitados por suas células vizinhas, já que linfócitos não possuem capacidade fagocítica. Entre os sinais “*find-me*” que são liberados, podemos citar a quimiocina CX3CL1, nucleotídeos como ATP e UTP e, ainda, lipídios como a lisofosfatidilcolina e esfingosina-1-fosfatase (Gude *et al.*, 2008; Truman *et al.*, 2008; Elliott *et al.*, 2009). A célula apoptótica, então, passa a expressar em sua superfície uma grande variedade de moléculas (sinais “*eat-me*”) que podem ser reconhecidas por receptores de fagócitos. A composição dessas moléculas que serão expressas dependerá muito se a apoptose estará ocorrendo sob condições homeostáticas ou durante a inflamação e, além disso, é célula e tecido específico (Peter *et al.*, 2010; Arandjelovic e Ravichandran, 2015).

Por ser a mais precoce molécula expressa por células apoptóticas, o reconhecimento da fosfatidilserina (PtdSer) é o sinal “eat-me” mais bem descrito e estudado. A PtdSer é expressa, em situações normais, voltada para o interior da bicamada fosfolipídica da membrana plasmática. Quando há a indução de apoptose, essa molécula é translocada para a face externa da membrana, podendo ser reconhecida de maneira direta e específica por receptores ou indiretamente, através de moléculas-pontes que se ligam à PtdSer e à receptores de eferocitose, como é o caso dos receptores tirosina kinase da família TAM: Tyro3, Axl e MerTk (Stitt *et al.*, 1995; Leventis e Grinstein, 2010).

### **1.3 Eferocitose mediada por receptores da família TAM**

O nome dos receptores tirosina quinase (PTK) da família TAM é derivado das iniciais dos seus três constituintes: Tyro3, Axl e MerTk (Prasad *et al.*, 2006). O Tyro3 é mais comumente expresso em células do sistema nervoso central, dos rins, dos ovários e testículos (Dai *et al.*, 1994; Mark *et al.*, 1994). O MerTk tem expressão predominante nos ovários, testículos, próstata, pulmões, rins e, de forma bem menos intensa, no timo, baço, fígado, intestino delgado, cólon e placenta (Graham *et al.*, 1995). Já o Axl, é quase ubiquamente expresso na maioria das células humanas de origem hematopoiética, epitelial e mesenquimal (O'Bryan *et al.*, 1991). No sistema imunológico as principais células que apresentam receptores TAM ativos são as células apresentadoras de antígenos (APCs), monócitos e células *natural killer* (NK) (Graham *et al.*, 1994; Seitz *et al.*, 2007).

Esses três receptores compartilham algumas similaridades estruturais e, entre elas, o fato de apresentarem – do N-terminal extracelular para o C-terminal intracelular – dois domínios “imunoglobulina-like” que medeiam a ligação com seus agonistas, dois domínios fibronectina do tipo III (FNIII), um domínio transmembrana hidrofóbico e, como o nome da família sugere, um domínio tirosina quinase que atua como um sítio catalítico competente, fosforilando os resíduos de tirosina nas proteínas e, assim, iniciando uma cascata de sinalização intracelular (Sasaki *et al.*, 2006; Lemke e Burstyn-Cohen, 2010; Rothlin *et al.*, 2015) (**Figura 6**).

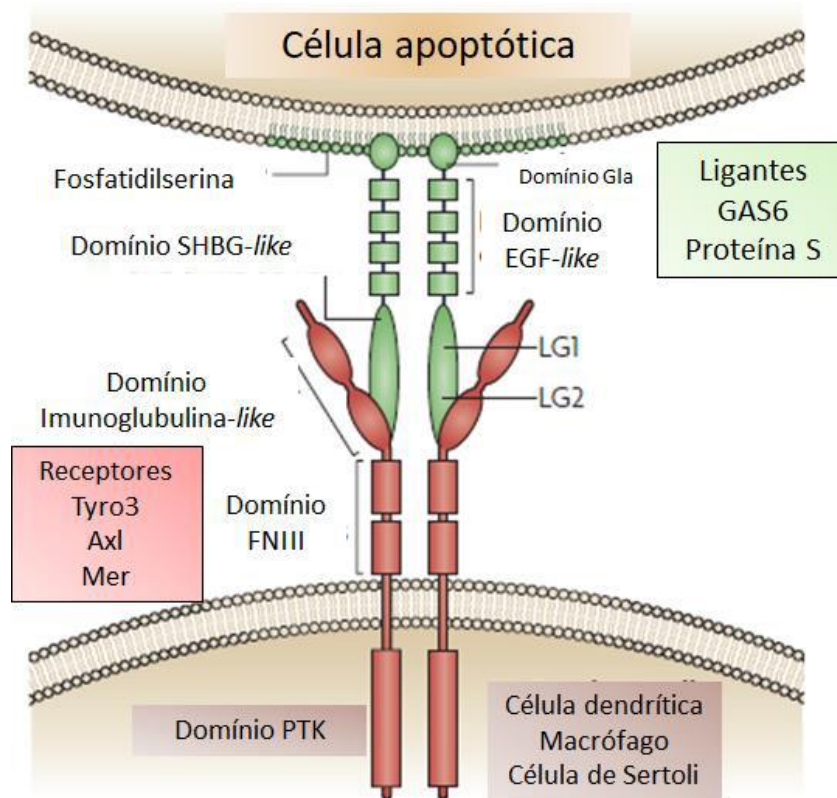


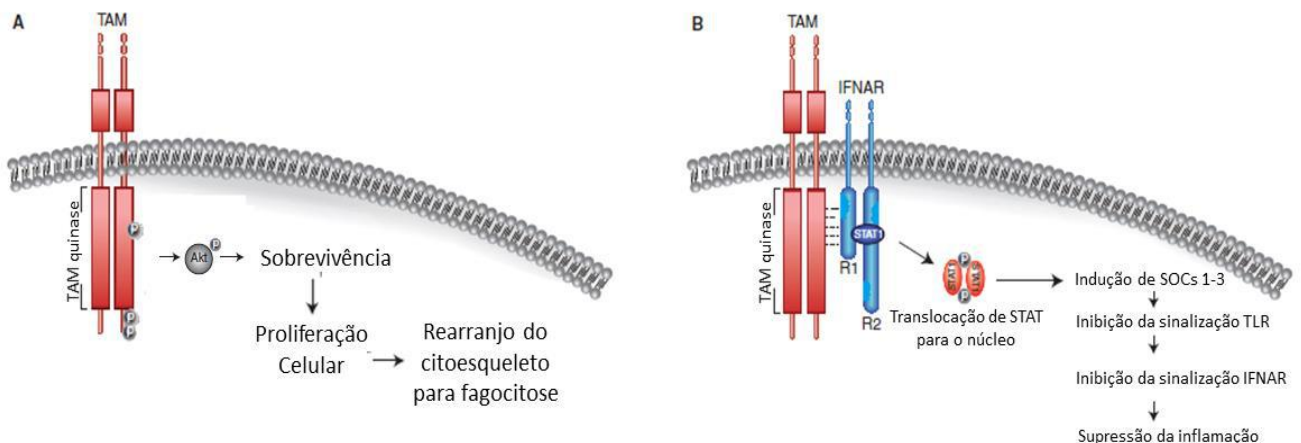
Figura 6. **Receptores TAM e seus ligantes.** TYRO3, Axl e MerTk são receptores de proteína tirosina quinase (PTK) que são expressos por células dendríticas, macrófagos e células *natural killer* imaturas do sistema imunológico, células de Sertoli e diversas outras células. Os dímeros dos receptores TAM ligam-se a seus dois ligantes *growth-arrest-specific* 6 (GAS6) e proteína S (PROS) através da interação entre o N-terminal dos dois domínios imunoglobulina-like e o C-terminal da região laminina G (LG), que juntos constituem o domínio SHBG dos ligantes. Via o domínio Gla N-terminal a GAS6 e PROS ligam-se a PtdSer que é exposta na face exterior da membrana da célula apoptótica. Adaptado de Lemke e Rothlin, 2008

A PtdSer é reconhecida indiretamente pelos receptores TAM, através das moléculas-pontes Gas6 (*growth arrest specific 6*) e PROS (proteína S). Nesse processo, Gas6 ou PROS ligam fisicamente o receptor TAM – geralmente MerTk ou Axl – expresso na superfície do fagócito à PtdSer (Wu, Tibrewal e Birge, 2006; Nagata, 2007), o que ativa a tirosina quinase do receptor para que o processo de fagocitose tenha continuidade (Lemke e Burstyn-Cohen, 2010). Na maioria das células, a ativação da tirosina quinase é associada a ativação *downstream* da via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/via da proteína quinase B (AKT). Na via de sinalização tirosina quinase convencional, há a fosforilação e ativação da AKT, permitindo que a célula prolifere, sobreviva e rearranje seu citoesqueleto, permitindo a eferocitose. Em células como MPs, células dendríticas (DCs) e outras células sentinelas do sistema imunológico, pode-se observar também a existência de receptores TAM acoplados à receptores de sinalização de citocinas como, por exemplo, o do interferon do tipo I (IFNAR), que interagem entre si, formando o complexo TAM-IFNAR (Lemke, 2013).



Nessas células, a via de ativação PI3K/AKT é secundária, e conseqüentemente, uma outra via de ativação é fortemente ativada: a ativação TAM pela via JAK/STAT (Zong *et al.*, 1996; Rothlin *et al.*, 2007; Lemke e Rothlin, 2008). Essa ativação diferencial dos receptores TAM PI3K/AKT *versus* JAK/STAT é importante para que ocorra diferentes bioatividades que são reguladas pelos receptores dessa família (Lemke, 2013).

Especificamente, quando há a ligação de um ligante de TAM ao seu receptor, acredita-se que a JAK1 (Janus kinase) 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 induz a síntese das proteínas de sinalização supressora de citocinas 1 e 3 (SOCS1 e SOCS3), que irão inibir da sinalização via TLR e dos receptores de citocinas, como o IFNAR, promovendo a supressão da inflamação (Rothlin *et al.*, 2007; Lemke e Rothlin, 2008) (**Figura 7**).



**Figura 7. Vias de sinalização dos receptores TAM.** (A) Receptor TAM livre, na forma de dímero. Proteínas TAM ativadas levam à sinalização convencional, que é dominada pela fosforilação e ativação de Akt. Essa via é necessária para a manutenção da sobrevivência celular e mobilização do citoesqueleto para o englobamento de células apoptóticas por fagócitos. (B) Receptores TAM complexados com o IFNAR. Ativação do híbrido TAM-IFNAR pela adição de GAS6 leva a uma rápida fosforilação do domínio tirosina quinase e ativação de STAT1. Ocorre a translocação de STAT para o núcleo, onde é induzida a expressão de inibidores citoplasmáticos de citocinas (SOCS1 e 3). Essa via é necessária para a inibição de respostas inflamatórias. Adaptado de Lemke, 2013.

A eferocitose deve ser fortemente regulada, uma vez que este processo é de suma importância para evitar a inflamação contínua e promover o balanço necessário entre a imunidade contra patógenos e a tolerância à antígenos inócuos, garantindo a homeostase dos tecidos do organismo. Após a eferocitose mediada por MerTk, a liberação de citocinas pró-inflamatórias como por exemplo, IL-12, IL-6 e TNF pelos MPs de perfil M1 é suprimida

enquanto, por outro lado, a produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como a IL-10 e TGF $\beta$  por MPs de perfil M2 é induzida (Wallet *et al.*, 2008; Alciato *et al.*, 2010; Zizzo *et al.*, 2012). Por outro lado, é a interação entre Axl e IFNAR, principalmente nas DCs, que permite a inibição da via pró-inflamatória mediada por TLRs (Rothlin *et al.*, 2007; Yoshimura, Naka e Kubo, 2007).

A falta ou deficiência nos receptores TAM em determinado tecido parece induzir uma resposta inflamatória contínua e elevada, de forma que pode-se associar a deficiência de receptores TAM com respostas imunes constantes e consequente quadro de inflamações crônicas (Lu e Lemke, 2001; Rothlin *et al.*, 2007).

#### **1.4 Infecções Pulmonares**

Pneumonias são um grupo de doenças inflamatórias de altíssima morbidade e mortalidade causada por micro-organismos (vírus, bactérias ou fungos) ou pela inalação de produtos tóxicos que comprometem os espaços aéreos dos pulmões. Quando a contaminação ocorre fora do ambiente hospitalar, ela é chamada “pneumonia comunitária”. Já quando a pneumonia acomete pessoas hospitalizadas ou que estiveram hospitalizadas por dois ou mais dias nos três meses precedentes, ela é chamada “pneumonia hospitalar”, que costuma ser mais grave, já que o agente etiológico (normalmente bactérias oportunistas), provavelmente é resistente aos antibióticos usuais (Johnson e Hirsch, 2003).

Os pulmões são expostos à uma grande quantidade de volume de ar contendo potenciais agentes infecciosos, mas infecções graves raramente ocorrem, evidenciando a importância de um sistema imunológico eficiente no trato respiratório. A microaspiração de bactérias potencialmente patogênicas que colonizam a nasofaringe é, provavelmente, a causa da maioria dos casos de pneumonia bacteriana. Se essa microaspiração irá, de fato, resultar em pneumonia irá depender da quantidade de bactérias que chegará até o pulmão, do quão virulentas essas bactérias são e da habilidade do hospedeiro de eliminar essas bactérias invasoras (Camberlein *et al.*, 2015). As causas mais comuns de infecções bacterianas pulmonares em indivíduos normais incluem *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis*. Em indivíduos imunocomprometidos, as causas de pneumonias bacterianas são muito mais amplas, incluindo espécies que não são usualmente consideradas de alta virulência em humanos como a *Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae*) (Marriott e Dockrell, 2007; Aberdein *et al.*, 2013; Camberlein *et al.*, 2015).



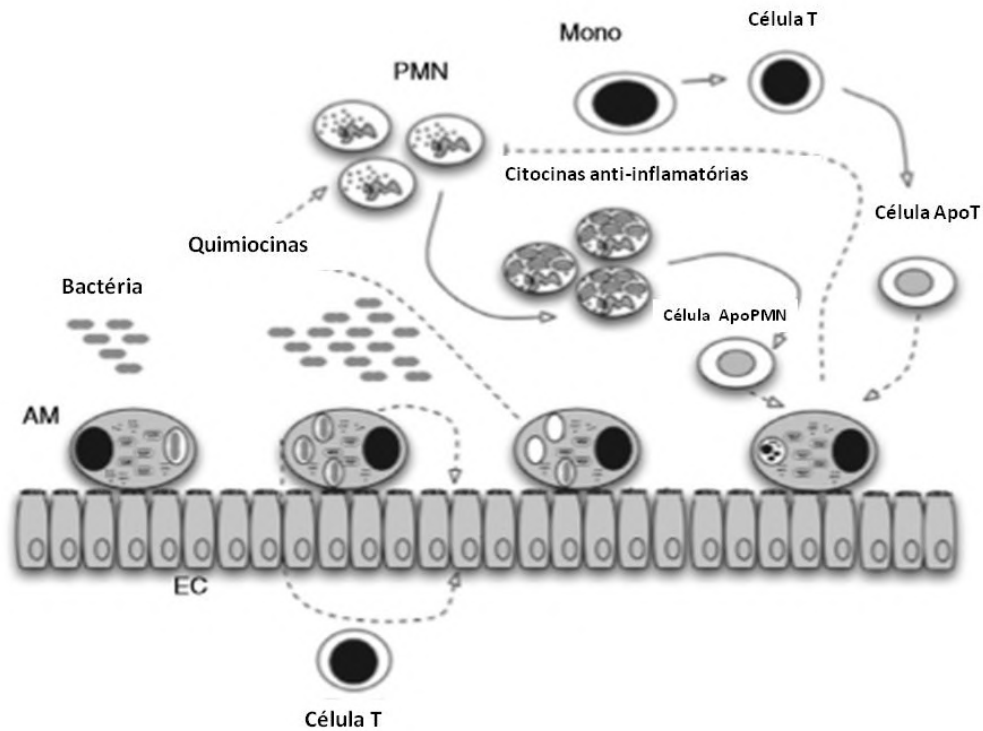
*S. pneumoniae* é uma bactéria gram-positiva encapsulada comumente encontrada na nasofaringe de indivíduos saudáveis como parte da composição normal da microbiota. No entanto, em algumas circunstâncias, essa bactéria pode causar doenças invasivas como, por exemplo, meningite, bacteremia e infecções de mucosas como a otite média e a própria pneumonia (Deng *et al.*, 2013).

A resposta imunológica às infecções pulmonárias agudas requer uma resposta orquestrada envolvendo tanto componentes celulares quanto humorais. As células do sistema imunológico residentes dos tecidos têm uma capacidade inerente de lidar com a grande maioria dos desafios a elas impostos, mas, uma vez que essa capacidade é superada, o recrutamento de células inflamatórias é essencial para controlar a infecção. A resposta inflamatória nos pulmões é única, de forma que deve ser bem regulada para que haja a eliminação de infecções com o mínimo de dano colateral aos tecidos (Marriott e Dockrell, 2007). Uma resposta imunológica inicial de suficiente intensidade para erradicar completamente o patógeno invasor, bem como a minimização de um potencial dano agudo ao pulmão, e a resolução da resposta inflamatória de modo que, após a eliminação do patógeno, não se tenham efeitos permanentes à fisiologia pulmonar são passos essenciais para uma resposta de sucesso no trato respiratório inferior (Haslett, 1999).

Respostas imunológicas específicas e não-específicas protegem os pulmões de patógenos ambientais. Tossir, espirrar e a camada mucociliar removem a maior parte das partículas do trato respiratório superior. Já nas partes mais profundas do pulmão, o sistema imunológico inato é muito bem desenvolvido. Parte dos seus componentes humorais são, por exemplo, lactoferrinas, lisozimas, proteínas surfactantes, lectina ligante de manose, lectina e defensinas. Há também componentes celulares como, por exemplo, AMs que expressam vários receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (Lambrecht, 2006).

Quando o inóculo bacteriano inicial se multiplica e supera a capacidade dos AMs de sustentar a resposta imunológica sozinhos, uma cooperação entre AMs residentes, AMs recrutados, células epiteliais (ECs) e células T resultam na liberação de quimiocinas e recrutamento de células inflamatórias, em particular leucócitos polimorfonucleares (PMN), como os neutrófilos. Os PMNs tornam-se críticos efetores do *clearance* bacteriano. Por fim, os PMNs entram em apoptose. Os neutrófilos desempenham um importante papel na regulação de células inflamatórias e podem, ainda, induzir apoptose em células T ativadas. A eferocitose de células T e PMNs ajuda a regular negativamente a resposta inflamatória a partir

de diversos fatores e, dentre eles, a liberação de citocinas anti-inflamatórias que ajudaram no reestabelecimento da homeostase e remodelamento dos tecidos possivelmente danificados (Aberdein *et al.*, 2013) (**Figura 8**).



**Figura 8. Macrófagos desempenham um importante papel na defesa contra bactérias.** Bactérias são normalmente ingeridas e mortas por AMs nas vias respiratórias distais. Quando um inóculo bacteriano cresce acima de um nível o qual os AMs conseguem conter essa infecção sem o recrutamento de outros fagócitos, uma cooperação entre AMs, ECs, e células T resulta na liberação de quimiocinas e recrutamento de outras células inflamatórias, em particular PMNs. Os PMNs tornam-se então críticos efetores do *clearance* bacteriano. Por fim, os PMNs sofrem apoptose. Monócitos, como os neutrófilos, possuem um importante papel de regular células inflamatórias e podem, até, induzir apoptose em células T ativadas. Ingestão de células apoptóticas (apoPMN e apoT) ajuda a regular negativamente a resposta inflamatória e resulta na liberação de citocinas anti-inflamatórias e outros fatores que ajudam a regular negativamente a inflamação. Adaptado de Aberdein, 2013.

Em essência, o sistema imunológico no microambiente alveolar deve ser finamente regulado para controlar o processo inflamatório causado pela infecção combatendo os patógenos e, ao mesmo tempo, garantindo que as funções fisiológicas dos pulmões não sejam alteradas por um longo período de tempo.

## 2. JUSTIFICATIVA

A regulação das respostas imunes inflamatórias e tolerogênicas nas mucosas pulmonares é essencial para que estas possam exercer suas funções fisiológicas de trocas gasosas e garantir a sobrevivência do indivíduo. Acreditamos que a eferocitose em ambientes constantemente desafiados por antígenos inócuos ou patogênicos, como as mucosas pulmonares, é um dos mecanismos-chave para o controle da homeostase. AMs possuem elevada capacidade de fagocitar células apoptóticas e acreditamos que os receptores/mecanismos que controlam a eferocitose participam na indução do fenótipo regulatório observado nestas células. Apesar do papel regulatório crítico da eferocitose na regulação das respostas imunes inatas, pouco se sabe sobre o papel dos receptores TAM ou seus ligantes nos pulmões saudáveis ou durante infecções.

## 3. OBJETIVO GERAL

Investigar o papel do receptor de eferocitose da família TAM, MerTk, na modulação funcional de AMs *in vitro*.

Para alcançar este objetivo maior, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

1. Investigar a expressão de mRNA para os receptores da família TAM e seu ligante Gas6 em células pulmonares e em AMs;
2. Investigar o perfil funcional de AMs isolados do BAL de camundongos MerTk<sup>-/-</sup> e WT, através da dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias antes e depois da estimulação com ligantes de TLRs e bactérias;
3. Investigar o perfil funcional de AMs isolados do BAL de camundongos MerTk<sup>-/-</sup> e WT co-cultivados com neutrófilos apoptóticos, através da dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias antes e depois da estimulação com ligantes de TLRs e bactérias;
4. Avaliar o potencial microbicida de AMs isolados do BAL de camundongos MerTk<sup>-/-</sup> e WT infectados com *S. pneumoniae*, através da análise do crescimento microbiano intracelular.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 selvagens e deficientes no receptor da família TAM, MerTk (MerTk<sup>-/-</sup>), do de ambos os sexos 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 Cepa, condições de cultivo e padronização do inóculo bacteriano

Foi utilizada a cepa bacteriana TIGR4 de *Streptococcus pneumoniae*. Esta cepa, que é um sorotipo encapsulado da bactéria e é extremamente virulenta, pertence à coleção de culturas de referência do Laboratório de Apoio Biotecnológico do Departamento de Microbiologia Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e foi gentilmente cedida pela professora Lúcia Teixeira. A bactéria foi mantida a -180°C em tanque contendo nitrogênio líquido, sob a forma de suspensão densa preparada em solução contendo *Skim-Milk* a 10 % (p/v) (Becton, Dickinson & Company, Sparks, MD, EUA) e glicerol (J.T. Baker, EUA) a 10% (v/v). Para a sua ativação, uma alíquota da suspensão foi retirada do respectivo tubo criogênico de estoque e semeada em placa de petri contendo meio de ágar sangue desfibrinado de carneiro na concentração de 5% (AS; Plast Labor, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), que foi incubada a 37°C por 18-24h em estufa com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A partir desse crescimento, a amostra foi novamente cultivada em meio de AS, incubada nas mesmas condições e, a partir desse crescimento, uma suspensão contendo aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/mL foi preparada em solução de RPMI sem gentamicina utilizando a escala McFarland para a padronização do inóculo

### 4.3 Lavado broncoalveolar (BAL)

Camundongos WT ou MerTk<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).

As células obtidas a partir do BAL foram centrifugadas por 6 minutos a 1600 rpm e ressuspendidas em 1 mL de meio RPMI (Sigma) completo (2 mM de L-glutamina, 50 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, 100 mM piruvato, 10  $\mu$ g/mL de gentamicina, aminoácidos não essenciais) suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino; Gibco BRL, EUA 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, Ax1, Tyro3, Gas6, IL-10 e TNF- $\alpha$  através de PCR em tempo real (RT-PCR). Todas as células coletadas nos lavados broncoalveolares foram contados utilizando câmara de Neubauer e azul de Trypan (Sigma; diluição de 1:10).

### 4.4 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 (75cm<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 ressuspendido 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*.

#### 4.5 Cultura *in vitro* de AMs

As células recuperadas através dos BALs de animais WT e MerTk<sup>-/-</sup> foram plaqueadas em placa de 48 poços (Costar) na concentração de 1x10<sup>5</sup> células/poço no volume final de 500 µL/poço de RPMI sem gentamicina 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, lipopolissacarídeo (LPS) ultrapuro derivado de *Escherichia coli* K12 (Invivogen) a uma concentração de 200ng/mL e a cepa TIGR4 de *Streptococcus pneumoniae* (MOI 1:100) foram adicionados para estimular os macrófagos durante 24 horas a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Antes da adição dos estímulos foram adicionados neutrófilos apoptóticos (5x10<sup>5</sup> células/poço) opsonizados por 1 hora com a molécula ponte Gas6 (R&D; 200ng/mL). As culturas 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.

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

A quantificação das citocinas (TNF-α e IL-10) nos sobrenadantes das culturas de AMs *in vitro* estimulados ou não com LPS e *S. pneumoniae* 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 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). 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 50µL do substrato 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina

(TMB) (eBioscience) para revelar a reação. A reação foi interrompida usando 25µL 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.

#### **4.8 Ensaio de viabilidade intracelular**

Após as etapas de cultura de AMs e adição de *S. pneumoniae*, os possos contendo a bactéria foram lavados 3 vezes com PBS 1X, afim de excluir as bactérias extracelulares. Após isso, o tapete de AMs foi lisado utilizando 250 µL uma solução a 0,1% Triton-X100 (Sigma) em PBS 1X, que foi adicionada aos poços e incubada por 3 minutos a 37°C. Depois da incubação, a suspensão foi homogeneizada utilizando uma P1000 e 100 µL de cada poço foram utilizados para fazer uma diluição 1:10 em PBS 1x. Após essa etapa, 10 µL da diluição foram plaqueados em ágar sangue fazendo spots em triplicata.

#### **4.9 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 12000g 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 12000g a 4°C por 10 minutos, e o conteúdo foi solubilizado em etanol a 75% seguido de uma nova etapa de centrifugação de 5000g 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 iScriptc DNA Synthesis Kit (BIORAD) e as análises do RT-PCR em tempo real foram realizadas no instrumento Quant Studio 3 e 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 threshold). 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 MerTk, bem como para a verificação do nível expressão das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10.

#### **4.10 Análise estatística**

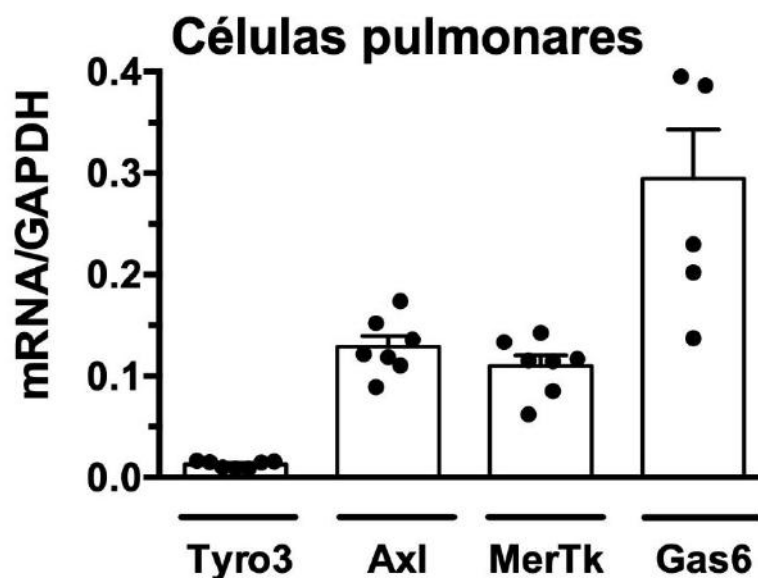
A análise estatística foi realizada no programa *GraphPad Prism* para Mac, empregando o teste *t* de *Student* para amostras independentes. Diferenças com um valor de  $p < 0,05$  ou  $p < 0,01$  foram consideradas significantes.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Expressão dos receptores de eferocitose da família TAM e da molécula ponte Gas6 nas células pulmonares de camundongos WT.

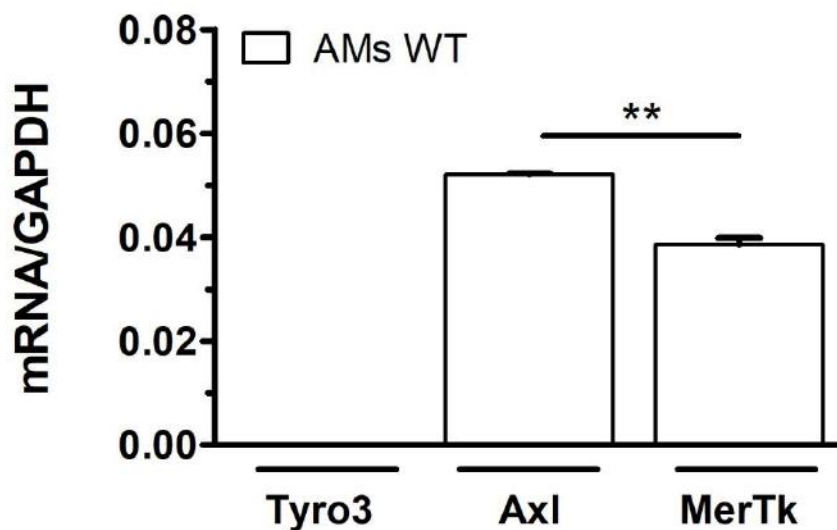
A expressão dos receptores de eferocitose da família TAM e da molécula ponte Gas6 nas células residentes nas mucosas pulmonares, onde a taxa de renovação celular é muito elevada (Nagata, 2018), deve ser essencial para a realização de processos como a eferocitose e a regulação negativa de vias pró-inflamatórias (Rothlin et al., 2007), nestes sítios constantemente desafiados por antígenos. Para avaliar a expressão dos receptores Tyro3, Axl e MerTk, bem como de Gas6 nas células pulmonares, realizamos um ensaio de RT-PCR para detectar os níveis de mRNA para cada uma dessas moléculas. Para tal, os mRNA de células totais dos pulmões foram isolados durante a homeostase e transformados em cDNA. Em seguida, utilizamos sequências iniciadoras específicas para Tyro3, Axl, MerTk e Gas6 para realizar o RT-PCR. Nós detectamos níveis equivalentes de expressão dos mRNA para os receptores MerTk e Axl e uma expressão mais elevada de mRNA para Gas6 nas células pulmonares. Por outro lado, baixos níveis de expressão de Tyro3 foram detectados nos pulmões.



**Figura 9.** Células pulmonares expressam altos níveis de mRNA para os receptores Axl, MerTk e para a molécula Gas6, mas não para Tyro3. Os mRNA das células totais do tecido pulmonar foram extraídos a partir de sua dissociação mecânica e enzimática e, em seguida, foram isolados para a realização da quantificação da expressão de mRNA para os receptores da família TAM por RT-PCR. Experimento feito em duplicata. O resultado é apresentado como média  $\pm$  desvio padrão de 5 a 7 camundongos por grupo.

## 5.2 Expressão dos mRNA para os receptores de eferocitose da família TAM em AMs de camundongos WT.

Com o intuito de avaliar a expressão dos receptores da família TAM nas nossas células alvo, ou seja, nos AMs, foram coletados e plaqueados os BALs de camundongos WT. Após etapa de lavagem, foram considerados AMs, apenas as células aderidas às placas de cultura. Em seguida, extraímos e isolamos o mRNA das células da monocamada, os transformamos em cDNA e realizamos um comparativo da expressão do mRNA para os receptores Axl, MerTk e Tyro3 em AMs por RT-PCR. Observamos níveis consideravelmente elevados de expressão de Axl e MerTk, sendo a expressão do Axl ligeiramente maior em relação ao MerTk nos AMs. Como sugerido pelo experimento anterior, não detectamos qualquer expressão de Tyro3 nessas células.

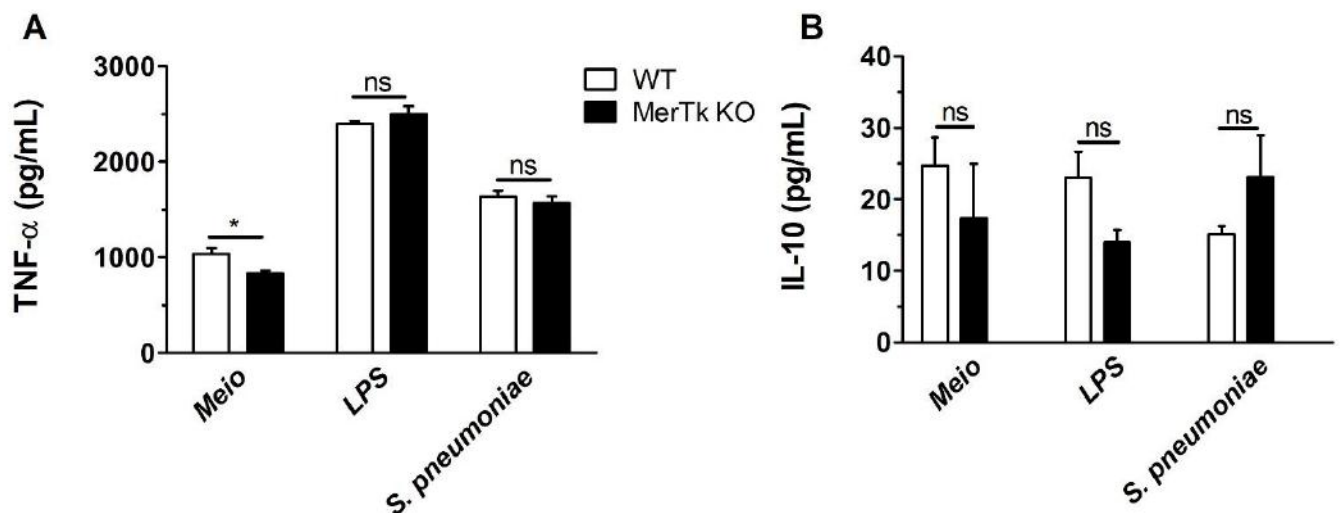


**Figura 10. AMs expressam elevados níveis de mRNA para os receptores Axl e MerTk, mas não para Tyro3.** AMs de camundongos WT foram coletados, plaqueados, mantidos *overnight* em estufa a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub> e tiveram seus respectivos mRNA extraídos e isolados para a síntese de cDNA e posterior quantificação da expressão de mRNA para os receptores da família TAM por RT-PCR. Experimento feito em duplicata. O resultado é apresentado como média ± desvio padrão de um *pool* contendo de 5-7 camundongos por grupo. A significância foi calculada utilizando-se teste t-Student. \*\*P<0,01.

### 5.3 Análise funcional de AMs *in vitro* de animais WT e MerTk<sup>-/-</sup> através da dosagem de citocinas.

Para investigar o papel do receptor MerTk na modulação funcional de AMs, avaliamos a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias na homeostase e frente à estímulos microbianos (LPS e *S. pneumoniae*). A obtenção dos AMs foi feita através do BAL desses camundongos em condições homeostáticas. Posteriormente, as células obtidas foram plaqueadas em placas de 48 poços e estimuladas, respectivamente, com LPS (200 ng/mL), *S. pneumoniae* (MOI 1:100) ou apenas meio (RPMI). Após 24 horas, o sobrenadante foi coletado para dosagem de TNF- $\alpha$  e IL-10 através da técnica ELISA.

Nós observamos que, em condições homeostáticas há uma maior produção de TNF- $\alpha$  nos AMs provenientes de animais selvagens em comparação aos AMs de animais MerTk<sup>-/-</sup> (**Fig. 11A**). Apesar ter sido observado um aumento da produção de TNF- $\alpha$  após os desafios (LPS ou *S. pneumoniae*), não observamos diferença na produção dessa citocina entre os AMs de animais WT e MerTk<sup>-/-</sup> (**Fig. 11A**). Por outro lado, nenhuma diferença em relação aos níveis de produção de IL-10 (**Fig. 11B**) foi notada em quaisquer das condições. Esses dados sugerem que a sinalização via receptor MerTk não alterou o perfil funcional de AMs nas mucosas pulmonares durante a infecção por *S. pneumoniae*. No entanto, acreditamos que a ausência de ligantes do receptor MerTk (células apoptóticas opsonizadas com Gas6, por exemplo) poderia justificar esses resultados.



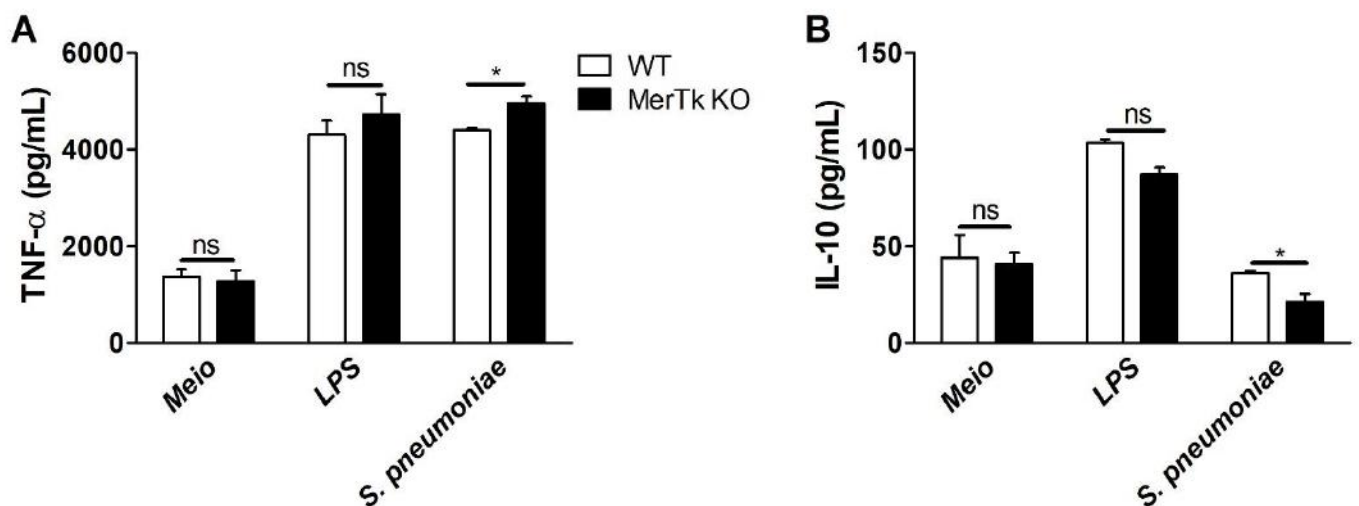
**Figura 11. Sinalização via receptor MerTk controla a produção de TNF- $\alpha$  em AMs.** AMs obtidos através dos BALs de camundongos WT e MerTk<sup>-/-</sup> foram plaqueados ( $1 \times 10^5$  células/mL) e desafiados ou não com LPS (200ng/mL) e *S. pneumoniae* (MOI 1:100) *overnight*. Os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação de (A) TNF- $\alpha$  e (B) IL-10 por ELISA. Os dados são representativos de 2 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. \* $P < 0,05$ .

#### 5.4 Análise funcional de AMs de animais WT e MerTk<sup>-/-</sup> co-cultivados com neutrófilos apoptóticos através da dosagem de citocinas *in vitro*

Para que os receptores TAM exerçam seu efeito regulador de vias pró-inflamatórias, eles precisam reconhecer a molécula ponte Gas6, que por sua vez, deve estar ligada à PtdSer expressa pela célula apoptótica. Para avaliar o efeito da ativação do receptor MerTk em conjunto com a estimulação de receptores TLRs, um novo ensaio *in vitro* foi realizado, onde AMs de animais WT e MerTk<sup>-/-</sup> foram co-cultivados com neutrófilos apoptóticos opsonizados com Gas6 por 1 hora e, em seguida, as co-culturas foram desafiadas ou não com LPS ou *S. pneumoniae*.

Nós observamos que, a adição de neutrófilos apoptóticos não alterou o perfil de produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 em AMs desafiados com LPS de ambos os genótipos (WT e MerTk<sup>-/-</sup>) (Fig. 12A e 12B, respectivamente). No entanto, observamos que a adição de neutrófilos apoptóticos opsonizados com Gas6 provocou um aumento produção de TNF- $\alpha$  e diminuição da produção de IL-10 em AMs de camundongos MerTk<sup>-/-</sup> infectados com *S. pneumoniae* (Fig. 11A versus 12A; Fig. 11B versus 12B). Nossos dados sugerem que a ausência da sinalização do receptor MerTk induz a diferenciação de AMs com perfil funcional pró-inflamatório nas mucosas pulmonares durante a infecção por *S. pneumoniae*.

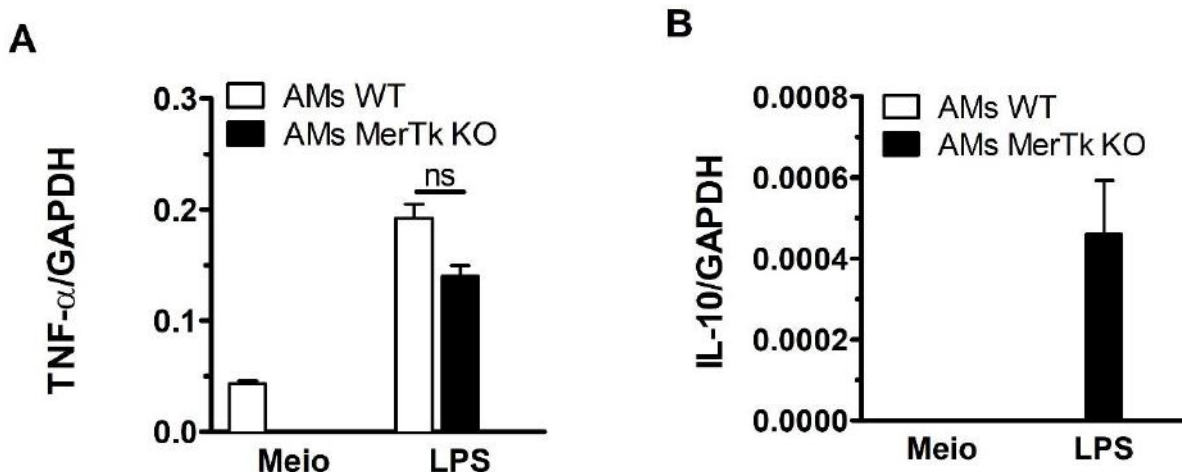


**Figura 12.** AMs de camundongos deficientes em MerTk possuem perfil funcional mais pró-inflamatório durante a infecção por *S. pneumoniae*. AMs de camundongos WT e MerTk<sup>-/-</sup> foram coletados através do BAL, plaqueados ( $10^5$ /mL), co-cultivados com neutrófilos apoptóticos opsonizados com Gas6 ( $5 \times 10^5$  células/mL; 200ng/mL) por 1 hora e estimulados com LPS (200ng/mL) e *S. pneumoniae* (MOI 1:100) por 24h. O sobrenadante foi posteriormente coletado e congelado para dosagem de (A) TNF- $\alpha$  e (B) IL-10 por ELISA. Resultado representativo de 2 experimentos com dados similares. 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 em comparação com animais WT.

### 5.5 Expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias em AMs de animais WT e MerTk<sup>-/-</sup> co-cultivados com neutrófilos apoptóticos.

Para avaliar a expressão das citocinas quantificadas anteriormente (TNF- $\alpha$  e IL-10), foi realizado um ensaio de qPCR para detectar os níveis de mRNA para cada uma dessas citocinas. Para tal, os mRNA de AMs previamente coletados por BAL e co-cultivados com neutrófilos apoptóticos foram estimulados ou não com LPS (200ng/mL) por 24 horas e, após isso, foram transformados em cDNA. Em seguida, sequências iniciadoras específicas para TNF- $\alpha$  e IL-10 foram utilizadas para realizar o RT-PCR. Nós observamos que, em concordância com o experimento anterior, há uma maior expressão de TNF- $\alpha$  (**Fig. 13A**) quando há a adição do LPS, mas não houve diferença entre os AMs de camundongos selvagens e deficientes para o receptor MerTk. Em contrapartida, surpreendentemente vemos que há uma maior expressão de IL-10 (**Fig. 13B**) nos AMs de animais deficientes para o receptor MerTk quando estimulados com LPS. Sendo assim, experimentos adicionais deverão ser feitos para elucidar melhor o papel do receptor MerTk na regulação diferencial das vias anti-inflamatórias.

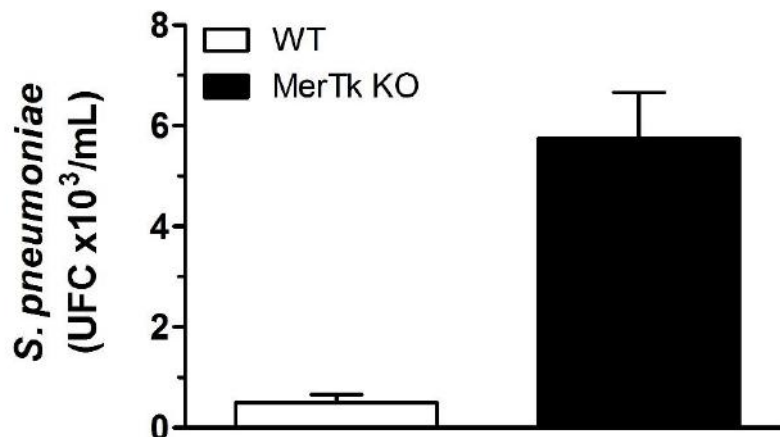


**Figura 13.** AMs de animais MerTk<sup>-/-</sup> expressam elevados níveis de mRNA para IL-10 quando estimulados com LPS. AMs de camundongos WT e MerTk<sup>-/-</sup> foram coletados, plaqueados, desafiados ou não com LPS e mantidos *overnight* em estufa a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após isso tiveram seus respectivos mRNA extraídos e isolados para a síntese de cDNA e posterior quantificação da expressão de mRNA para as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10. Experimento feito em duplicata. O resultado é apresentado como média  $\pm$  desvio padrão de um *pool* contendo de 5-7 camundongos por grupo. A significância foi calculada utilizando-se teste t-Student. \*P<0,05.

### 5.6 Viabilidade intracelular de *S. pneumoniae* em AMs de animais WT e MerTk<sup>-/-</sup>

A pneumonia é uma doença de grande mortalidade e morbidade (Johnson e Hirsch, 2003). A *S. pneumoniae*, por ser uma bactéria comumente encontrada na nasofaringe de indivíduos saudáveis como parte da composição normal da microbiota, é um dos grandes causadores de pneumonia (Chung, 2016). Sendo assim, os AMs, que são amplamente conhecidos por expressarem vários receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (Lambrecht, 2006), são responsáveis por realizarem a imuno-vigilância e eliminação de patógenos na mucosa pulmonar (Haldar e Murphy, 2014; Hussell e Bell, 2014).

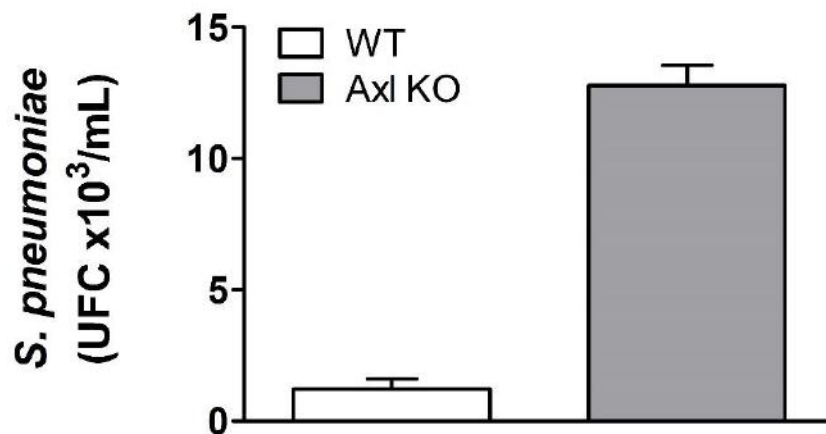
Desta forma, nós realizamos um ensaio de viabilidade intracelular de *S. pneumoniae*, onde os AMs foram recolhidos através do BAL de animais WT e MerTk<sup>-/-</sup>, plaqueados ( $1 \times 10^5/\text{mL}$ ) com co-cultura de neutrófilos apoptóticos ( $5 \times 10^5/\text{mL}$ ), desafiados com a *S. pneumoniae* (MOI 1:100) e deixados *overnight* na estufa (37°C; 5% CO<sub>2</sub>). Após período de incubação, o sobrenadante foi retirado, os poços foram lavados com PBS para excluir as bactérias extracelulares e o tapete de células foi lisado. A partir dessa suspensão, foi feita uma diluição seriada para posterior plaqueamento em ágar sangue e as colônias foram contadas 18-24h depois da semeadura. Observamos que os AMs de animais deficientes em MerTk são mais permissivos ao crescimento intracelular *S. pneumoniae*, se comparados aos AMs de camundongos selvagens (**Fig. 14**). De acordo com os dados demonstrados anteriormente, a ausência da sinalização mediada pelo receptor MerTk modula os AMs para um perfil mais pró-inflamatório. No entanto, nossos dados sugerem que a sinalização mediada por MerTk controla negativamente a replicação intracelular de *S. pneumoniae*. Esse dado surpreendente pode ser resultado da presença compensatória do receptor Axl em AMs derivados de camundongos MerTk<sup>-/-</sup>.



**Figura 14.** AMs de animais MerTk<sup>-/-</sup> são mais permissivos ao crescimento intracelular de *S. pneumoniae*. AMs de camundongos WT e MerTk<sup>-/-</sup> foram coletados, plaqueados, desafiados *S. pneumoniae* mantidos *overnight* em estufa a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após isso, o sobrenadante foi retirado, o tapete de células foi lisado e o conteúdo da suspensão foi plaqueado em ágar sangue após diluição seriada. O experimento foi feito em triplicata e esses dados são representativos de 2 experimentos com resultados semelhantes. O resultado é apresentado como média ± desvio padrão de um *pool* contendo de 4-5 camundongos por grupo.

### 5.7 Viabilidade intracelular de *S. pneumoniae* em AMs de animais WT e Axl<sup>-/-</sup>.

Para verificar se há uma relação de compensação de ausência de um dos receptores TAM pelo outro, repetimos o ensaio de viabilidade intracelular de *S. pneumoniae* em AMs de selvagens *versus* AMs de camundongos Axl<sup>-/-</sup>, utilizando o mesmo protocolo acima descrito. Nós observamos que, de fato, os AMs de animais deficientes em Axl são mais permissivos ao crescimento intracelular *S. pneumoniae*, se comparados aos AMs de camundongos selvagens (**Fig. 15**). Esse dado sugere que a sinalização via Axl também controla negativamente a replicação intracelular de *S. pneumoniae*, de modo que, provavelmente, há uma presença compensatória do receptor MerTk<sup>-/-</sup> atuando em AMs derivados de camundongos Axl e vice-versa.



**Figura 15.** AMs de animais Axl<sup>-/-</sup> são mais permissivos ao crescimento intracelular de *S. pneumoniae*. AMs de camundongos WT e Axl<sup>-/-</sup> foram coletados, plaqueados, desafiados *S. pneumoniae* mantidos *overnight* em estufa a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após isso, o sobrenadante foi retirado, o tapete de células foi lisado e o conteúdo da suspensão foi plaqueado em ágar sangue após diluição seriada. O experimento foi feito em triplicata e esses dados são representativos de 2 experimentos com resultados semelhantes. O resultado é apresentado como média ± desvio padrão de um *pool* contendo de 4-5 camundongos por grupo.

## 6. DISCUSSÃO

Os ambientes de mucosa possuem uma elevada taxa de renovação celular, mesmo durante a homeostase. Na mucosa pulmonar, por exemplo, as células epiteliais estão constantemente entrando em apoptose, portanto, os corpos apoptóticos resultantes desse processo necessitam ser fagocitados rapidamente para que a homeostase não seja quebrada como consequência do processo de necrose secundária (Nagata, 2018; Poonet *et al.*, 2014).

A eferocitose é um importante mecanismo de manutenção do equilíbrio do organismo, podendo ser mediado por diversos receptores expressos pelas células fagocíticas. O reconhecimento indireto da PtdSer expressa por células apoptóticas, pelos receptores TAM (Tyro3, Axl e MerTk) através das moléculas ponte Gas6 e/ou Proteína S é um importante processo que garante a homeostase, principalmente em sítios constantemente desafiados pela presença de antígenos, como as mucosas pulmonares (Poon *et al.*, 2014). Os receptores TAM, além de modularem a homeostase, também regulam vias pró-inflamatórias, de forma que, quando há a ligação de um ligante de TAM ao seu receptor, há a formação de um complexo entre o domínio quinase do receptor TAM e os receptores de citocinas pró-inflamatórias (Zong *et al.*, 1996). Além disso, o fator de transcrição STAT1 é translocado para o núcleo da célula, onde induz a síntese SOCS1 e SOCS3, que irão inibir a sinalização via TLR e dos receptores de citocinas, promovendo a supressão da inflamação (Rothlin *et al.*, 2007; Lemke e Rothlin, 2008).

Já foi descrito que células do sistema imunológico expressam mais os receptores Axl e MerTk do que outras células do organismo (Lemke e Rothlin, 2008). Sendo assim, investigamos se as células pulmonares expressam esses dois receptores e o ligante Gas6, por ser a molécula ponte universal (reconhecida pelos três receptores TAM). Nossos resultados mostraram que os AMs expressam elevados níveis de Axl, MerTk e Gas6, e baixos níveis de 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 AM que, além de realizar a eferocitose, entra em contato constante com a microbiota, por estar localizado no lúmen das vias aéreas. Esse duplo reconhecimento nas mucosas, quando realizado através dos PRRs e receptores Axl ou MerTk, pode ser um importante mecanismo de manutenção da homeostase. Desta forma, investigamos a presença desses receptores nos AMs e nossos dados



revelaram a presença de níveis consideravelmente elevados de expressão de Axl e MerTk, sendo a expressão do Axl ligeiramente maior em relação ao MerTk.

A eferocitose mediada por receptores TAM realizada por AMs de camundongos WT cria um ambiente mais regulatório, todavia, a deficiência ou falta desses receptores pode impactar negativamente na homeostase, gerando maiores níveis de inflamação. Foi descrito por van der Meer e colaboradores (2014) que camundongos MerTk<sup>-/-</sup> apresentam um excesso de produção de citocinas pró-inflamatórias devido a diminuição da capacidade de fagocitar células apoptóticas. Nossos dados iniciais mostraram que em condições homeostáticas (sem estímulos) há uma maior produção de TNF- $\alpha$  nos AMs provenientes de animais selvagens em comparação aos AMs de animais MerTk<sup>-/-</sup>. A adição de estímulos pró-inflamatórios *in vitro* não provocou diferenças na produção dessa citocina entre os AMs de animais WT e MerTk<sup>-/-</sup>. Além disso, nenhuma diferença em relação aos níveis de produção de IL-10 foi notada em quaisquer das nossas condições experimentais.

Feng Xu e colaboradores (2008) demonstraram que os AMs são as principais células residentes que desempenham uma resposta imunológica frente à infecção de *S. pneumoniae*. No entanto, nossos dados sugerem que a sinalização via receptor MerTk não alterou o perfil funcional de AMs nas mucosas pulmonares durante a infecção por essa mesma bactéria. Por acreditar que a ausência de ligantes do receptor MerTk poderia justificar os resultados obtidos, repetimos os ensaios *in vitro* na presença do ligante de MerTk, a molécula ponte Gas6, em conjunto com neutrófilos apoptóticos adicionados às culturas e observamos que, surpreendentemente, a adição de neutrófilos apoptóticos não alterou o perfil de produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 em AMs desafiados com LPS de ambos os genótipos (WT e MerTk). No entanto, observamos que a adição de neutrófilos apoptóticos opsonizados com Gas6 induziu um aumento na produção de TNF- $\alpha$  e diminuição da produção de IL-10 em AMs de camundongos MerTk<sup>-/-</sup> infectados com *S. pneumoniae*. Coletivamente esses dados sugerem que a ausência da sinalização do receptor MerTk induz a diferenciação de AMs com perfil funcional pró-inflamatório nas mucosas pulmonares durante a infecção por *S. pneumoniae*, dado que está de acordo com os achados de Knapp S. e colaboradores (2004), os quais demonstraram que macrófagos são as maiores e principais fontes de TNF- $\alpha$  em modelos murinos de infecção a pneumococo.

*S. pneumoniae* é a bactéria mais comumente isolada com casos de pneumonia comunitária adquirida, além de ser a causa mais comum de choque séptico, meningite

bacteriana e síndrome da angústia respiratória em adultos (Kadioglu A e Andrew PW, 2004). A importância dos AMs em prevenir infecções pulmonares causadas por *S. pneumoniae* já é muito bem estabelecida (Green e Kass, 1964; Arredouani *et al.*, 2004; Sun, Gan e Metzger, 2011). Sabe-se que o reconhecimento e a fagocitose de *S. pneumoniae* por MPs são essenciais para o controle do inóculo inicial durante as primeiras horas de infecção (Camberlein *et al.*, 2015). Os AMs eliminam o *S. pneumoniae* do pulmão em infecções recentes através da fagocitose, sendo este o principal mecanismo bactericida do ambiente pulmonar e, em infecções tardias, por apoptose (Green e Kass, 1964; Arredouani *et al.*, 2004; Sun e Metzger, 2008; Phipps *et al.*, 2010). Além disso, os AMs têm um importante papel em regular as respostas inflamatórias durante a infecção por *S. pneumoniae* (Knapp *et al.*, 2003; Marriott e Dockrell, 2007). Nossos dados indicam que, em camundongos WT, há uma menor replicação de *S. pneumoniae* em comparação com os animais deficientes em MerTk. Esse resultado sugere que o receptor MerTk controla negativamente a replicação intracelular de *S. pneumoniae*.

Nós acreditamos que o resultado anterior poderia ser justificado pela presença compensatória do receptor Axl em AMs derivados de camundongos MerTk<sup>-/-</sup>. No entanto, dados posteriores mostram que o receptor Axl também controla negativamente a replicação intracelular de *S. pneumoniae*, de modo que, provavelmente, há uma presença compensatória do receptor MerTk<sup>-/-</sup> atuando em AMs derivados de camundongos Axl e vice-versa. Em resumo, esse efeito surpreendente pode ser resultado da sinalização compensatória dos receptores da mesma família. Desta forma, o modelo ideal para a elucidação do papel dos receptores TAM em mucosa pulmonar seria um animal duplo *knockout* (Axl<sup>-/-</sup> MerTk<sup>-/-</sup>).

Em conjunto, nossos dados revelam que AMs expressam elevados níveis dos receptores Axl e MerTk, mas não de Tyro 3. Verificamos que a ausência do receptor MerTk induz um perfil mais pró-inflamatório em AMs estimulados com células apoptóticas opsonizadas com Gas6 em conjunto com a infecção por *S. pneumoniae*. Finalmente, de maneira surpreendente, observamos que ambos os receptores Axl e MerTk controlam negativamente a replicação intracelular de *S. pneumoniae*, sugerindo que a deficiência de um receptor é compensada pela maior expressão do outro quando estimulados.

## 7. CONCLUSÃO

A deficiência do receptor de eferocitose da família TAM, MerTk, promove a diferenciação de um perfil mais pró-inflamatório em AMs perante a infecção por *S. pneumoniae* quando na presença dos ligantes do receptor MerTk. Apesar do aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, animais deficientes para MerTk apresentam-se mais permissivos em relação à replicação de *S. pneumoniae*, devido à presença compensatória do receptor Axl.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aberdein, J.D., Cole, J., Bewley, M.A., Marriott, H.M. e Dockrell, D.H. (2013). Alveolar macrophages in pulmonary host defence the unrecognized role of apoptosis as a mechanism of intracellular bacterial killing. *Clin Exp Immunol*, 174, 193-202.
- Agard, N.J., Maltby, D. e Wells, J.A. (2010). Inflammatory stimuli regulate caspase substrate profiles. *Mol Cell Proteomics*, 9, 880-893.
- Alciato, F., Sainaghi, P.P., Sola, 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, 869-875.
- Ali, M., Lillehoj, E.P., Park, Y., Kyo, Y. e Kim, K.C. (2011). Analysis of the proteome of human airway epithelial secretions. *Proteome Sci*, 9, 4.
- Arandjelovic, S. e Ravichandran, K.S. (2015). Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat Immunol*, 16, 907-917.
- Arredouani, M., Yang, Z., Ning, Y., Qin, G., Soininen, R., Tryggvason, K. e Kobzik, L. (2004). The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *J Exp Med*, 200, 267-272.
- Barletta, K.E., Cagnina, R.E., Wallace, K.L., Ramos, S.I., Mehrad, B. e Linden, J. (2012). Leukocyte compartments in the mouse lung: distinguishing between marginated, interstitial, and alveolar cells in response to injury. *J Immunol Methods*, 375, 100-110.
- 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, 1773-1777.
- Brown, S., Heinisch, I., Ross, E., Shaw, K., Buckley, C.D. e Savill, J. (2002). Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature*, 418, 200-203.
- Cakarova, L., Marsh, L.M., Wilhelm, J., Mayer, K., Grimminger, F., Seeger, W., Lohmeyer, J. e Herold, S. (2009). Macrophage tumor necrosis factor-alpha induces epithelial expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: impact on alveolar epithelial repair. *Am J Respir Crit Care Med*, 180, 521-532.
- Camberlein, E., Cohen, J.M., Jose, R., Hyams, C.J., Callard, R., Chimalapati, S., Yuste, J., Edwards, L.A., Marshall, H., van Rooijen, N., Noursadeghi, M. e Brown, J.S. (2015). Importance of bacterial replication and alveolar macrophage-independent clearance mechanisms during early lung infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 83, 1181-1189.
- Chung, P.Y. (2016). The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*, 363.

- 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, 773-780.
- 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, 975-979.
- Deng, X., Church, D., Vanderkooi, O.G., Low, D.E. e Pillai, D.R. (2013). Streptococcus pneumoniae infection: a Canadian perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 11, 781-791.
- Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Tramont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J.J., Harden, T.K., Leitinger, N. e Ravichandran, K.S. (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*, 461, 282-286.
- 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, 1812-1825.
- Gordon, S. e Pluddemann, A. (2017). Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biol*, 15, 53.
- 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, 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, 647-657.
- Green, G.M. e Kass, E.H. (1964). The Role of the Alveolar Macrophage in the Clearance of Bacteria from the Lung. *J Exp Med*, 119, 167-176.
- Gude, D.R., Alvarez, S.E., Paugh, S.W., Mitra, P., Yu, J., Griffiths, R., Barbour, S.E., Milstien, S. e Spiegel, S. (2008). Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal. *FASEB J*, 22, 2629-2638.
- Guillot, L., Nathan, N., Tabary, O., Thouvenin, G., Le Rouzic, P., Corvol, H., Amselem, S. e Clement, A. (2013). Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol*, 45, 2568-2573.
- Haldar, M. e Murphy, K.M. (2014). Origin, development, and homeostasis of tissue-resident macrophages. *Immunol Rev*, 262, 25-35.
- Haslett, C. (1999). Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, 160, S5-11.
- Holt, P.G. (1978). Inhibitory activity of unstimulated alveolar macrophages on T-lymphocyte blastogenic response. *Am Rev Respir Dis*, 118, 791-793.
- Hussell, T. e Bell, T.J. (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol*, 14, 81-93.
- Janko, C., Franz, S., Munoz, L.E., Siebig, S., Winkler, S., Schett, G., Lauber, K., Sheriff, A., van der Vlag, J. e Herrmann, M. (2011). CRP/anti-CRP antibodies assembly on the surfaces

- of cell remnants switches their phagocytic clearance toward inflammation. *Front Immunol*, 2, 70.
- Johnson, J.L. e Hirsch, C.S. (2003). Aspiration pneumonia. Recognizing and managing a potentially growing disorder. *Postgrad Med*, 113, 99-102, 105-106, 111-102.
- Kaur, M., Bell, T., Salek-Ardakani, S. e Hussell, T. (2015). Macrophage adaptation in airway inflammatory resolution. *Eur Respir Rev*, 24, 510-515.
- Knapp, S., Leemans, J.C., Florquin, S., Branger, J., Maris, N.A., Pater, J., van Rooijen, N. e van der Poll, T. (2003). Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 167, 171-179.
- Lambrecht, B.N. (2006). Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity*, 24, 366-368.
- Laskin, D.L., Weinberger, B. e Laskin, J.D. (2001). Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. *J Leukoc Biol*, 70, 163-170.
- Lemke, G. (2013). Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a009076.
- Lemke, G. e Burstyn-Cohen, T. (2010). TAM receptors and the clearance of apoptotic cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1209, 23-29.
- Lemke, G. e Rothlin, C.V. (2008). Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol*, 8, 327-336.
- Leventis, P.A. e Grinstein, S. (2010). The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys*, 39, 407-427.
- Lu, L.F., Lind, E.F., Gondek, D.C., Bennett, K.A., Gleeson, M.W., Pino-Lagos, K., Scott, Z.A., Coyle, A.J., Reed, J.L., Van Snick, J., Strom, T.B., Zheng, X.X. e Noelle, R.J. (2006). Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature*, 442, 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, 306-311.
- 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, 10720-10728.
- Marriott, H.M. e Dockrell, D.H. (2007). The role of the macrophage in lung disease mediated by bacteria. *Exp Lung Res*, 33, 493-505.
- Mayer, A.K., Muehmer, M., Mages, J., Gueinzus, K., Hess, C., Heeg, K., Bals, R., Lang, R. e Dalpke, A.H. (2007). Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells. *J Immunol*, 178, 3134-3142.
- Morales-Nebreda, L., Misharin, A.V., Perlman, H. e Budinger, G.R. (2015). The heterogeneity of lung macrophages in the susceptibility to disease. *Eur Respir Rev*, 24, 505-509.
- 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*, 36, 489-517.
- O'Bryan, J.P., Frye, R.A., Cogswell, P.C., Neubauer, A., Kitch, B., Prokop, C., Espinosa, R., 3rd, Le Beau, M.M., Earp, H.S. e 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, 5016-5031.
- Peter, C., Wesselborg, S., Herrmann, M. e Lauber, K. (2010). Dangerous attraction: phagocyte recruitment and danger signals of apoptotic and necrotic cells. *Apoptosis*, 15, 1007-1028.
- Phipps, J.C., Aronoff, D.M., Curtis, J.L., Goel, D., O'Brien, E. e Mancuso, P. (2010). Cigarette smoke exposure impairs pulmonary bacterial clearance and alveolar macrophage complement-mediated phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 78, 1214-1220.
- 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, 166-180.
- Prasad, D., Rothlin, C.V., Burrola, P., Burstyn-Cohen, T., Lu, Q., Garcia de Frutos, P. e Lemke, G. (2006). TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol Cell Neurosci*, 33, 96-108.
- Riedl, S.J. e Salvesen, G.S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 405-413.
- Rodriguez-Manzanet, R., Sanjuan, M.A., Wu, H.Y., Quintana, F.J., Xiao, S., Anderson, A.C., Weiner, H.L., Green, D.R. e Kuchroo, V.K. (2010). T and B cell hyperactivity and autoimmunity associated with niche-specific defects in apoptotic body clearance in TIM-4-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 8706-8711.
- 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, 1124-1136.
- Sasaki, T., Knyazev, P.G., Clout, N.J., Cheburkin, Y., Gohring, W., Ullrich, A., Timpl, R. e Hohenester, E. (2006). Structural basis for Gas6-Axl signalling. *EMBO J*, 25, 80-87.
- Schneberger, D., Aharonson-Raz, K. e Singh, B. (2011). Monocyte and macrophage heterogeneity and Toll-like receptors in the lung. *Cell Tissue Res*, 343, 97-106.
- 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/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. *J Immunol*, 178, 5635-5642.
- Simhadri, V.R., Andersen, J.F., Calvo, E., Choi, S.C., Coligan, J.E. e Borrego, F. (2012). Human CD300a binds to phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine, and modulates the phagocytosis of dead cells. *Blood*, 119, 2799-2809.
- St-Laurent, J., Turmel, V., Boulet, L.P. e Bissonnette, E. (2009). Alveolar macrophage subpopulations in bronchoalveolar lavage and induced sputum of asthmatic and control subjects. *J Asthma*, 46, 1-8.
- Stitt, T.N., Conn, G., Gore, M., Lai, C., Bruno, J., Radziejewski, C., Mattsson, K., Fisher, J., Gies, D.R., Jones, P.F. e et al. (1995). The anticoagulation factor protein S and its

- relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*, **80**, 661-670.
- Sun, K., Gan, Y. e Metzger, D.W. (2011). Analysis of murine genetic predisposition to pneumococcal infection reveals a critical role of alveolar macrophages in maintaining the sterility of the lower respiratory tract. *Infect Immun*, **79**, 1842-1847.
- Sun, K. e Metzger, D.W. (2008). Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon-gamma during recovery from influenza infection. *Nat Med*, **14**, 558-564.
- Takabayshi, K., Corr, M., Hayashi, T., Redecke, V., Beck, L., Guiney, D., Sheppard, D. e Raz, E. (2006). Induction of a homeostatic circuit in lung tissue by microbial compounds. *Immunity*, **24**, 475-487.
- Truman, L.A., Ford, C.A., Pasikowska, M., Pound, J.D., Wilkinson, S.J., Dumitriu, I.E., Melville, L., Melrose, L.A., Ogden, C.A., Nibbs, R., Graham, G., Combadiere, C. e Gregory, C.D. (2008). CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood*, **112**, 5026-5036.
- Wallet, M.A., Sen, P., Flores, R.R., Wang, Y., Yi, Z., Huang, Y., Mathews, C.E., Earp, H.S., Matsushima, G., Wang, B. e Tisch, R. (2008). MerTK is required for apoptotic cell-induced T cell tolerance. *J Exp Med*, **205**, 219-232.
- Weiss, G. e Schaible, U.E. (2015). Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev*, **264**, 182-203.
- Wu, Y., Tibrewal, N. e Birge, R.B. (2006). Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends Cell Biol*, **16**, 189-197.
- Wynn, T.A., Chawla, A. e Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, **496**, 445-455.
- Yoshimura, A., Naka, T. e Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol*, **7**, 454-465.
- 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**, 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**, 4515-4525.