

CAROLINA MAIA MENDES

**O PAPEL DOS RECEPTORES TAM NA MODULAÇÃO DA PNEUMONIA
PNEUMOCÓCICA APÓS EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO**



**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 / 2025**

CAROLINA MAIA MENDES

**O PAPEL DOS RECEPTORES TAM NA MODULAÇÃO DA PNEUMONIA
PNEUMOCÓCICA APÓS EXPOSIÇÃO À FUMAÇA CIGARRO**

Trabalho realizado no Departamento de Imunologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Alessandra Filardy e coorientação da Professora Kamila Guimarães e do Doutorando Jesuíno Rafael Machado.

Rio de Janeiro
Dezembro / 2025

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

M217p Maia Mendes, Carolina
O papel do receptor MerTk na modulação da pneumonia pneumocócica após exposição à fumaça de cigarro / Carolina Maia Mendes. -- Rio de Janeiro, 2025.
62 f.

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, 2025.

1. Inflamação. 2. Fumaça de cigarro. 3. Macrófagos.
4. Receptores TAM. 5. *Streptococcus pneumoniae*. I.
D'Almeida Filardy, Alessandra, orient. II.
Guimarães Pinto, Kamila, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

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

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

ALUNO(A): CAROLINA MAIA MENDES

DRE: 122072919

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Juliana Echevarria Lima (Presidente)
 Dr. Israel Diniz Lima
 Dra. Thais da Silva Rigoni
 Prof. Jefferson Antônio Leite (Suplente)

Título da Monografia: "O PAPEL DOS RECEPTORES TAM NA MODULAÇÃO DA PNEUMONIA PNEUMOCÓCICA APÓS EXPOSIÇÃO À FUMAÇA CIGARRO"

Local: Auditório Celuta Sales Alviano

Data e hora de início: 15 de DEZEMBRO de 2025, às 14:00 horas

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 10 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 coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 15. de dezembro de 2025.

NOTA:

10

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente
 JULIANA ECHEVARRIA NEVES DE LIMA
 Data: 16/12/2025 10:34:29-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Juliana Echevarria Lima (Presidente)

10



Documento assinado digitalmente
 THAIS DA SILVA RIGONI
 Data: 16/12/2025 13:17:11-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Israel Diniz Lima



Documento assinado digitalmente
 ISRAEL DINIZ LIMA
 Data: 16/12/2025 12:11:10-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

10



Documento assinado digitalmente
 DR. ISRAEL DINIZ LIMA
 Data: 16/12/2025 12:11:10-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Thais da Silva Rigoni

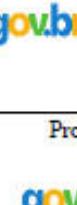
Prof. Jefferson Antônio Leite (Su)



Documento assinado digitalmente
 CAROLINA MAIA MENDES
 Data: 16/12/2025 21:38:13-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

(e coorientador):

Alessandra D'Almeida Fi



Carolina Maia Mendes



Documento assinado digitalmente
 JESÚSINO RAFAEL MACHADO FERREIRA
 Data: 16/12/2025 20:27:49-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Coordenadora de

TCC:

Profa. Marinella Silva Laport



Documento assinado digitalmente
 MARINELLA SILVA LAPORT
 Data: 17/12/2025 08:50:18-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria, aquela que está ao meu lado desde o princípio, sempre apoiando e lutando pelos meus sonhos como se fossem os dela. Muito obrigada por estar ao meu lado em cada um dos meus passos e a cada uma das minhas infinitas perguntas, apesar de todas as dificuldades. Quando eu era mais nova estava tão preocupada em aprender a formar as palavras e agora chegamos até aqui. Eu nada seria se não fosse você! Ao meu pai, Rodolfo, pelo apoio nas minhas decisões, imenso suporte e por me tranquilizar. Obrigada por sempre me incentivarem a buscar conhecimento, pelo esforço diário de vocês para me fornecer os meios de chegar até aqui e tornar esse sonho possível, sempre cultivando tamanho amor, amo vocês! Aos meus tios Marcelo, Márcia e Antônio por estarem de prontidão para me ajudar, pelos cafezinhos da tarde e conversas durante a rotina, especialmente meu tio Marcelo que me acompanhou final de semana no laboratório para eu conseguir fazer os experimentos. Ao meu primo, Victor, por perguntar sobre pesquisa mesmo sem entender nada e por, mesmo assim, sempre demonstrar admiração. Não poderia deixar de agradecer à companhia do Simba e Luffy, meus fiéis escudeiros que ficam do meu lado até em momentos de estudo trazendo leveza e fofura para os meus dias.

Ao meu namorado, Luis Eduardo, ouvinte assíduo dos meus desabafos acadêmicos desde o ensino médio. Te agradeço por ter ido comigo no laboratório durante um final de semana para eu conseguir fazer meus experimentos, por sempre demonstrar que confia no meu potencial e que é um porto seguro para mim! À minha amiga Marya Eduarda que vibra a cada conquista minha e por estar sempre presente, mesmo nos meus dias mais corridos.

Aos amigos que a graduação me trouxe: Lais, Duda, Eric, Marina, Izabel, Luiza, Rafael, Tayane e Larissa, obrigada por tornarem esses 4 anos mais leves e as aulas práticas mais divertidas.

À Professora Dirlei Nico agradeço ao conselho que moldou minha experiência durante a graduação, a indicação certeira de ir em busca de uma vaga de estágio no Laboratório de Imunologia Celular da Professora Alessandra.

Sou muito grata pelos 3 anos de estágio que realizei no Laboratório de Imunologia Celular (LIC). Aos ICS Júlia, Juliana, João Victor, Maria Clara, Juan e Anna obrigada por toda ajuda nos experimentos, risadas entre os intervalos que deixam tudo mais leve e pela aproximação que construímos. Ao André, que pode facilmente ser chamado de enciclopédia humana, obrigada por responder todas as milhões de perguntas que faço e pelas descontrações no laboratório. Ao Rafael, obrigada por aceitar ser meu coorientador no último ano de graduação e somar tanto aos meus conhecimentos, gostei muito de me aproximar mais de você e perceber seu humor único. À Kamila, também agradeço a coorientação desde o início do estágio, o que foi muito importante para o meu aperfeiçoamento na bancada e compreensão dos conteúdos. Todos vocês estimularam constantemente a minha aprendizagem e autonomia no laboratório, muito obrigada!

À Alessandra, por ter me acolhido de primeira no laboratório quando eu ainda estava aprendendo Imunologia, por ser uma orientadora sempre presente e carinhosa que cativa a união da equipe. O seu apoio foi fundamental para o meu desenvolvimento acadêmico e do presente trabalho.

Ao Sidney, técnico do laboratório que auxilia na preparação dos materiais de cada experimento.

Ao corpo docente do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes por todos os ensinamentos.

Aos funcionários da secretaria da graduação Microbiologia e Imunologia.

À banca examinadora, pelo tempo dedicado ao meu trabalho

Ao CNPq, FAPERJ e PIBIC pelo apoio financeiro

RESUMO

Carolina Maia Mendes

O papel dos receptores TAM na modulação da pneumonia pneumocócica após exposição à fumaça de cigarro

Orientadora: Alessandra D'Almeida Filardy

Coorientadores: Kamila Guimarães Pinto e Jesuíno Rafael Machado

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.

O tabagismo é uma das principais causas de morte no mundo e um fator de risco relevante para o desenvolvimento e agravamento de pneumonias pneumocócicas. A inflamação induzida pela inalação de fumaça de cigarro (CS) promove morte celular e defeitos na eferocitose, processo fundamental para o reestabelecimento de homeostase pulmonar. Os receptores de eferocitose da família TAM, Axl e MerTk, são cruciais para inibir respostas imunológicas inatas exacerbadas. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel desses receptores na modulação das populações de células do sistema imunológico inato nas vias aéreas durante a infecção por *Streptococcus pneumoniae* (*Sp*) em camundongos previamente expostos à CS (CSSP). Todos os grupos de camundongos infectados perderam peso, principalmente CSSP-MerTk^{-/-}. Além disso, o grupo CSSP-MerTk^{-/-} apresentou uma redução de 50% na sobrevivência em comparação aos grupos CSSP-WT e CSSP-Axl^{-/-}. Fluidos dos Lavados Broncoalveolares (BALFs) revelaram alta contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) no grupo CSSP-MerTk^{-/-} em comparação ao grupo controle, exposto ao ar atmosférico (ARSp) correspondente. BALFs do grupo CSSP-MerTk^{-/-} exibiram baixa concentração de nitritos em comparação ao grupo CSSP-Axl^{-/-}. Em relação às células totais das vias aéreas, BALFs do grupo CSSP-MerTk^{-/-} obtiveram diminuição no número total de células em comparação aos grupos CSSP-Axl^{-/-}. Camundongos do grupo CSSP-MerTk^{-/-}, apresentaram um baixo teor de recrutamento celular, visto que, em relação ao grupo CSSP-Axl^{-/-}, esses animais têm baixa quantidade de AMs derivados de monócitos (moAMs) e neutrófilos. Os BALFs dos grupos CSSP-Axl^{-/-} ou CSSP-MerTk^{-/-} apresentaram níveis elevados de IL-6 e IL-10, respectivamente, em comparação aos seus controles (ARSp). Finalmente, verificamos, *ex vivo*, que moAMs CS-MerTk^{-/-} detêm menor capacidade de fagocitose e atividade bactericida. Esses resultados sugerem que a exposição prévia dos camundongos à CS altera a dinâmica das populações de células imunes na mucosa pulmonar, tornando os animais MerTk^{-/-} mais suscetíveis à infecção por *Sp* e diminuindo a capacidade de fagocitose e atividade bactericida de moAMs de animais Axl^{-/-} e MerTk^{-/-}.

Palavras-chave: inflamação, eferocitose, fumaça de cigarro, macrófagos, receptores TAM, *S. pneumoniae*.

ABSTRACT

Carolina Maia Mendes

O papel dos receptores TAM na modulação da pneumonia pneumocócica após exposição à fumaça de cigarro

Orientadora: Alessandra D'Almeida Filardy

Coorientadores: Kamila Guimarães Pinto e Jesuíno Rafael Machado

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.

Smoking is one of the leading causes of death worldwide and a major risk factor for the development and worsening of pneumococcal pneumonia. Inflammation induced by cigarette smoke (CS) inhalation leads to cell death and defects in efferocytosis, making this process essential for the reestablishment of homeostasis in lung tissue. Signaling through the TAM family efferocytic receptors, Axl and MerTk, is crucial to suppress exacerbated innate immune responses. The aim of this study was to evaluate the role of these receptors in modulating innate immune cell populations in the airways during *Streptococcus pneumoniae* (*Sp*) infection in mice previously exposed to CS (CSSp). All infected mouse groups experienced weight loss, particularly the CSSp-MerTk^{-/-} group. In addition, the CSSp-MerTk^{-/-} group showed a 50% reduction in survival compared with the CSSp-WT and CSSp-Axl^{-/-} groups. Bronchoalveolar lavage fluids (BALFs) revealed a high colony-forming unit (CFU) count in the CSSp-MerTk^{-/-} group compared with the corresponding control group exposed to atmospheric air (ARSp). BALFs from the CSSp-MerTk^{-/-} group exhibited low nitrite concentrations compared with the CSSp-Axl^{-/-} group. Regarding total airway cells, BALFs from the CSSp-MerTk^{-/-} group showed a decrease in total cell number compared with the CSSp-Axl^{-/-} groups. Mice in the CSSp-MerTk^{-/-} group displayed reduced cellular recruitment, as they exhibited lower numbers of monocyte-derived alveolar macrophages (moAMs) and neutrophils compared with the CSSp-Axl^{-/-} group. BALFs from the CSSp-Axl^{-/-} and CSSp-MerTk^{-/-} groups exhibited elevated levels of IL-6 and IL-10, respectively, compared with their corresponding controls (ARSp). Finally, ex vivo analysis showed that CS-MerTk^{-/-} moAMs have reduced phagocytic capacity and bactericidal activity. These findings suggest that prior exposure to CS alters the dynamics of immune cell populations in the pulmonary mucosa, making MerTk^{-/-} mice more susceptible to *Sp* infection and reducing the phagocytic and bactericidal capacity of moAMs from Axl^{-/-} and MerTk^{-/-} animals.

Key-words: inflammation, efferocytosis, cigarette smoke, macrophages, TAM receptors, *S. pneumoniae*

RESUMO PARA LEIGOS

Carolina Maia Mendes

Como a fumaça de cigarro aumenta o risco de desenvolvimento de pneumonia?

Orientadora: Alessandra D'Almeida Filardy

Coorientadores: Kamila Guimarães Pinto e Jesuíno Rafael Machado

Resumo para leigos 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.

A fumaça de cigarro ainda é uma das principais causas de morte no mundo. Isso porque seus componentes levam à morte de diferentes tipos de células, como os macrófagos, que são importantes para a manutenção da integridade dos tecidos que compõem os órgãos. Os macrófagos são responsáveis por capturar microrganismos e células que estão morrendo por meio de um processo chamado de eferocitose. Esse mecanismo é mediado, principalmente, pelos receptores TAM (Axl e MerTk) e auxilia na contenção da inflamação exagerada. A fumaça de cigarro gera defeitos na eferocitose, o que está associado com o aumento do risco de infecções, sendo a pneumonia a mais comum entre indivíduos fumantes. Então, o objetivo do presente estudo foi entender o papel dos receptores TAM durante a pneumonia após exposição à fumaça de cigarro. A partir dos dados coletados sugerimos que os receptores Axl e MerTk desempenham papéis diferentes apesar de pertencerem à mesma família, e o MerTk é importante para combater a bactéria que provoca a pneumonia no contexto de exposição à fumaça, visto que na ausência dele os macrófagos perdem a sua capacidade total de capturar e matar a bactéria.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK - *ammonium chloride potassium*

AECs - células epiteliais alveolares

AMs - macrófagos alveolares

ATP – adenosina trifosfato

Axl^{-/-} - deficiência no receptor Axl

BAI1 – inibidor 1 da angiogênese específica do cérebro

BAL - lavado broncoalveolar

BALF - fluído adquirido do lavado broncoalveolar

cDNA- DNA complementar

CS - *cigarette smoke* (fumaça de cigarro)

CXCL1 – ligante 1 da quimiocina do motivo CXC

CXCL2 - ligante 2 da quimiocina do motivo CXC

CX₃C1 – fractalquina

CX₃CR - receptor de quimiocina com motivo CX3C do tipo

DAMPs – padrões moleculares associados ao dano

DCs – células dendríticas

DNA – ácido desoxirribonucleico

DO - densidade óptica

DPOC - doença pulmonar obstrutiva crônica

EGF - fator de crescimento epidérmico

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ensaio imunoenzimático)

GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

Gas6 – proteína específica de parada de crescimento 6

GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos-Macrófagos

HPAs – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

IFNAR – receptor de interferon do tipo I
IL-1 β – interleucina-1 beta
IL-6 – interleucina-6
IL-8 – interleucina-8
IL-10 - interleucina-10
IL-25 - interleucina-25
IL-33 - interleucina-33
IMs – macrófagos intersticiais
LPS – lipopolissacarídeo
MAPK – proteína-quinase ativada por mitógenos
MFG-E8 – proteína do fator 8 do glóbulo de gordura do leite-EGF
MerTk $^{-/-}$ - deficiência no receptor MerTk
MHC I – complexo principal de histocompatibilidade do tipo I
MHC II - complexo principal de histocompatibilidade do tipo II
moAMs - macrófagos alveolares derivados de monócitos
MOI - multiplicidade de infecção
mRNA – RNA mensageiro
NaNO₂ – nitrito de sódio
NO - óxido nítrico
NO₂ – nitrito
PNECs – células neuroendócrinas
PtdSer – fosfatidilserina
PTK – proteínas tirosina quinases
ROS – espécies reativas de oxigênio
RPMI – meio *Roswell Park Memorial*
RPMI IM – *meio Roswell Park Memorial* suplementado

RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa)

SHBG-*like* – semelhante à globulina de ligação ao hormônio sexual

SOCS1 – supressor da sinalização de citocinas 1

SOCS3 – supressor da sinalização de citocinas 3

STAT1 - gene transdutor de sinal e ativador da transcrição 1

TGF- β – fator de crescimento transformador- beta

TIM – imunoglobulina de células T e mucina contendo

TIM4 - imunoglobulina de células T e mucina contendo 4

TLRs – receptores semelhantes ao Toll

TNF- α – fator de necrose tumoral-alfa

TSNAs – nitrosaminas específicas do tabaco

UFC - unidades formadoras de colônia

WT - *wild type* (selvagem)

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Tabagismo.....	1
1.2 Resposta imunológica à fumaça de cigarro	2
1.3 Eferocitose	8
1.4 Receptores de eferocitose	10
1.5 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	13
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4 METODOLOGIA.....	18
4.1 Camundongos	18
4.2 Protocolo agudo de exposição à fumaça de cigarro	18
4.3 Preparo do inóculo bacteriano	19
4.4 Infecção por <i>S. pneumoniae</i>	19
4.5 Avaliação do percentual de sobrevivência, temperatura, escore clínico e perda de peso corporal.....	19
4.6 Obtenção das células totais das vias aéreas do fluido do lavado broncoalveolar (BALF)	
20	
4.7 Infecção <i>ex vivo</i> de células das vias aéreas com <i>S. pneumoniae</i> e ensaios funcionais..	21
4.8 Dosagem de óxido nítrico.....	22
4.9 Análise e caracterização das células dos BALFs por citometria de fluxo.....	23
4.10 Dosagem de proteínas.....	23
4.11 Dosagem de citocinas	24
4.12 Análise estatística	24
5. RESULTADOS.....	25
5.1 Exposição aguda à fumaça de cigarro aumenta da suscetibilidade à infecção por <i>S. pneumoniae</i> em camundongos MerTk ^{-/-}	25
5.2 A fumaça de cigarro altera a permeabilidade do epitélio das vias aéreas em animais WT e MerTk ^{-/-} e aumenta a carga bacteriana em camundongos MerTk ^{-/-}	26

5.3	Prévia exposição à fumaça de cigarro induz remodelamento da dinâmica de populações de células imunes na mucosa pulmonar de animais Axl ^{-/-} e MerTk ^{-/-} com pneumonia.....	28
5.4	A exposição à fumaça de cigarro estimula a produção de IL-6 em camundongos Axl ^{-/-} e de IL-10 nos camundongos MerTk ^{-/-} infectados com <i>S. pneumoniae</i>	31
5.5	moAMs deficientes para os receptores Axl e MerTk possuem menor atividade fagocítica e <i>killling</i>	32
6.	DISCUSSÃO	34
7.	CONCLUSÃO	36
8.	REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tabagismo

A epidemia do tabaco é um problema enfrentado mundialmente, responsável não apenas por causar sérios prejuízos à saúde pública, mas também impactos significativos à economia. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o tabagismo é responsável por, aproximadamente, 8 milhões de óbitos por ano no mundo, sendo que grande parte dessas mortes está associada ao tabagismo ativo. Além disso, estima-se que a maioria dos indivíduos fumantes vivem em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos e que a toxicodependência auxilia na manutenção da pobreza, uma vez que os gastos básicos são negligenciados para que seja possível sustentar esse consumo (Organização Mundial da Saúde, 2023). De acordo com uma pesquisa desenvolvida pelo Instituto Nacional de Câncer, intitulada “A Conta que a Indústria do Tabaco Não Conta!”, o tabagismo representa um custo de cerca de R\$ 153 bilhões em despesas médicas diretas ou indiretas no Brasil (Figura 1) (Szklo et al., 2025).



Figura 1. Esquema representativo dos custos atribuíveis ao tabagismo no Brasil. O valor total de 153.5 bilhões de reais foi dividido em custos de assistência médica (44%) e de perda de produtividade e cuidados informais (56%). Figura de (Pinto M. & Bardach A, 2024)

A forte dependência ao tabaco é associada à nicotina, um dos componentes predominantes no cigarro (Instituto Nacional de Câncer, 2022). Isso porque, uma vez que a nicotina se encontra na corrente sanguínea, ela alcança rapidamente o cérebro, o que está atrelado ao alto potencial de vício e aos diversos impactos gerados pelo hábito de fumar (U.S. Department of Health and Human Services; Et al, 2010). Devido a isso, na Revisão da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID-11), o tabagismo se enquadra como um dos representantes do grupo de

"transtornos mentais, comportamentais ou do neurodesenvolvimento" (Organização Mundial da Saúde, 2022).

Apesar de ser considerado a principal causa evitável de doenças e morte (Drope et al., 2018), o cigarro é um dos produtos provenientes do tabaco mais consumido mundialmente. Indivíduos fumantes apresentam maiores probabilidades de apresentar doenças pulmonares, dado o contato íntimo da fumaça de cigarro com esse sítio, mas também são relatadas diversas enfermidades em outros locais. Algumas doenças fortemente associadas ao tabagismo são: doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), periodontite, doenças cardiovasculares (Yu et al., 2017); cânceres de pulmão, pâncreas, rins e colorretal (Bai et al., 2022a); infecções bacterianas por disbiose (P. Shen et al., 2017), além de interferir na taxa de fertilidade (Dechanet et al., 2011).

Essa alta interferência deletéria do cigarro na saúde dos fumantes está relacionada com a sua composição. A fumaça gerada a partir da queima do cigarro apresenta mais de 7.000 substâncias tóxicas, como nicotina, monóxido de carbono, amônia, formaldeído, acetona, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), óxidos de nitrogênio e nitrosaminas específicas do tabaco (TSNAs), os quais apresentam características mutagênicas, carcinogênicas e inflamatórias (Parmar et al., 2023).

A presença dessas partículas tóxicas que são inaladas compromete a hematose, processo vital que ocorre nos alvéolos pulmonares e garante a oxigenação dos tecidos. De forma resumida, essas substâncias rompem a integridade tecidual do trato respiratório e provocam instabilidades no sistema imunológico associado à mucosa das vias aéreas, o que impacta diretamente as respostas imunológicas inata e adaptativa desse sítio (Mohan Sopori, 2002), instaurando perda de função tecidual.

A homeostase previamente estabelecida na mucosa é rompida quando esse conjunto de eventos acontece de maneira exacerbada e recorrente em decorrência do tabagismo. Esse processo frequentemente evolui para danos e perda de função tecidual, impulsionado pela inflamação instaurada (Caliri et al., 2021). Dessa forma, a resposta imunológica aos danos provocados pela fumaça do cigarro desempenha um papel central nas consequências patológicas associadas ao tabagismo.

1.2 Resposta imunológica à fumaça de cigarro

O epitélio colunar ciliado pseudoestratificado que reveste o sistema respiratório realiza a comunicação dos meios externo e interno, então está constantemente exposto a diversas partículas, agentes inócuos e patógenos em potencial (Hiemstra et al., 2015). Seus representantes celulares são unidos entre si por junções de oclusão e desempenham diferentes funções. As células basais são conhecidas como progenitoras desse epitélio dada a sua capacidade de autorrenovação após lesões e diferenciação em outros tipos celulares, sendo essenciais para a regeneração e homeostase tecidual (Hong et al., 2004). Células claras podem se desdiferenciar em células basais e liberam proteínas anti-

inflamatórias como a uteroglobina (Rawlins et al., 2009; Tataet al., 2013) Em conjunto com as células ciliares, as células caliciformes são responsáveis pela remoção mucociliar de microrganismos e partículas e, além disso, o muco produzido pelas células caliciformes possui mucinas, eletrólitos e peptídeos antimicrobianos (Whitsett, 2018). As células M são encontradas em outras mucosas e preservam sua função de apresentação抗igenética por meio da transcitose feita do lúmen para a lámina própria (Kimura, 2018). Células tufo apresentam microvilosidades e secretam moléculas efetoras importantes, tais como IL-25 e eicosanoides (Schneider et al., 2019). Os ionócitos e as células de

Hillock são responsáveis pela difusão passiva de íons (Miah et al., 2019) e imunomodulação (Montoro et al., 2018), respectivamente, apesar de não disporem funções bem delineadas. Existem ainda as células neuroendócrinas (PNECs), reguladoras do sistema imunológico pela produção de neuropeptídeos (Sui et al., 2018) e serotonina, que induz a angiogênese e ativa fibroblastos (**Figura 2**). Dessa forma, esse epitélio constitui uma barreira física e química que confere uma defesa imunológica inata (Whitsett; Alenghat, 2015; Davis; Wypych, 2021).

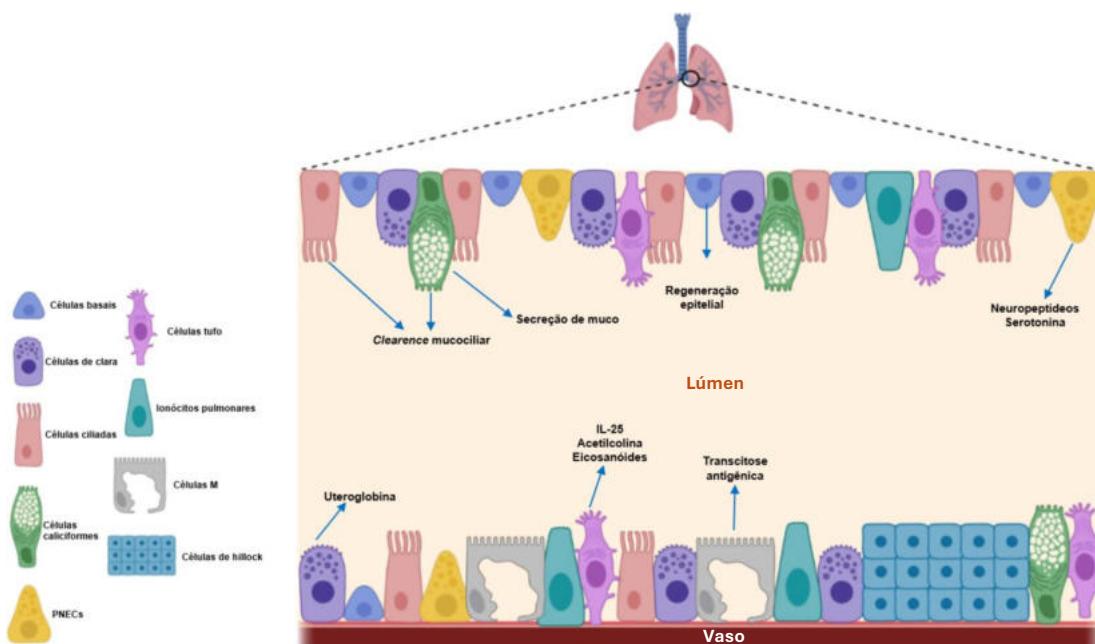


Figura 2. Componentes celulares do epitélio respiratório. As células basais são as principais células-tronco das vias aéreas, impulsionando a regeneração tecidual. Células de clara secretam uteroglobina enquanto as células ciliadas, juntamente com as células caliciformes, asseguram a remoção mucociliar. Imagem adaptada de (Davis & Wypych, 2021)

A deposição das partículas tóxicas presentes no cigarro está relacionada com o rompimento das junções de oclusão intercelulares, aumento da permeabilidade tecidual e liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). A presença de DAMPs ativa o epitélio de revestimento (Whitsett & Alenghat, 2015) bem como a produção e liberação de diversas quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias pelas células epiteliais alveolares (AECs) (Knight; Holgate, 2003). Somado a isso, indivíduos tabagistas

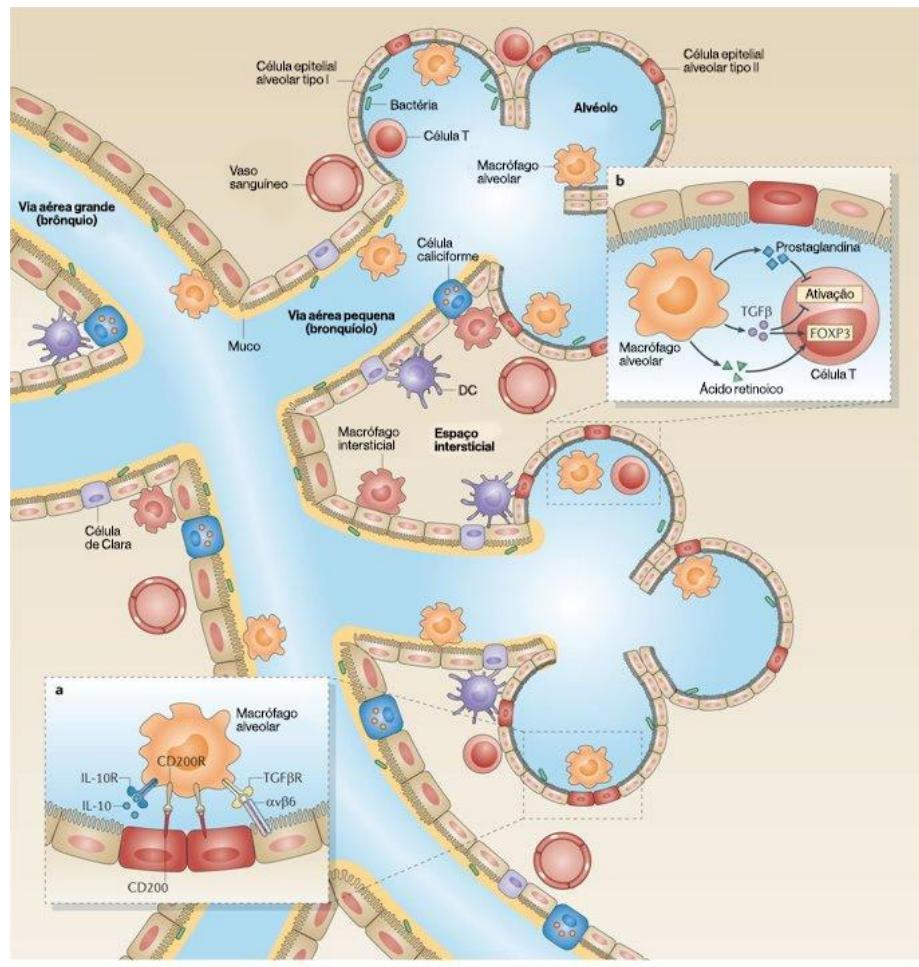
apresentam um remodelamento da microbiota das vias aéreas, caracterizado pelo aumento de patógenos como *Haemophilus spp* (Amatngalim & Hiemstra, 2018). Essas alterações ativam os receptores de reconhecimento de padrão (Leiva-Juárez et al., 2018), o que também induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, interferons e espécies reativas de oxigênio (ROS), tornando propício o desencadeamento da patogênese de diversas doenças inflamatórias pulmonares (Whitsett & Alenghat, 2015) (Rahman, 2003). Além disso, o tabagismo está relacionado com mutações genéticas nas células basais, levando a ausência de sua capacidade de regeneração e alta expressão de IL-1 β e IL-33 (pró-inflamatórias), hiperprodução de muco e comprometimento da liberação de peptídeos antimicrobianos pelas células caliciformes e prejuízos na motilidade ciliar (Davis & Wypych, 2021). Dessa forma, o tabagismo está relacionado com o remodelamento do epitélio das vias aéreas (Shaykhiev & Crystal, 2014).

Os macrófagos são células com elevada atividade fagocítica e são altamente plásticas, ou seja, suas características fenotípicas estão diretamente associadas ao tecido em que se encontram, onde são condicionadas a apresentarem atividades eficientes para atuar contra possíveis patógenos e, ao mesmo tempo, regular esse processo para que não ocorram injúrias (Laskin et al., 2001). Em pulmões saudáveis duas populações de macrófagos residentes podem ser encontradas: os macrófagos intersticiais (IMs) e os alveolares (AMs), diferenciados principalmente pelo nicho em que estão presentes, pelos receptores expressos por cada um deles e pelo *status* do microambiente (Blériot et al., 2020).

Os IMs possuem origem mista: uma parte é derivada de precursores embrionários, provenientes do saco vitelínico e pós-natal, e outra parte é derivada de precursores hematopoiéticos, provenientes da medula óssea (Schyns et al., 2018). Diferentemente dos AMs, os IMs estão dispersos em diversos sítios dos pulmões (Dick et al., 2022). Nos pulmões, tais células estão presentes majoritariamente no parênquima pulmonar, associadas a feixes ou terminações nervosas, nas proximidades de vasos sanguíneos e circundando os brônquios (Hume et al., 2020) e são caracterizadas pela expressão de CX₃CR1, MHC II, CD11b e ausência de autofluorescência e das moléculas SiglecF, Ly6C e Ly6G (Gibbings et al., 2017). Os IMs são essenciais para prevenir uma resposta inflamatória exacerbada, visto que realizam a fagocitose de potenciais patógenos e partículas (Schyns et al., 2019) e são produtores de IL-10 (citocina regulatória), o que está relacionado com a diminuição de neutrofilia durante um processo asmático, mecanismo relacionado com o controle da resposta inflamatória (Kawano et al., 2016).

Os AMs são células advindas de precursores embrionários do saco vitelínico e fígado fetal, com elevada taxa de autorrenovação (Yamane, 2018) e dependem da presença do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) expressas pelas células epiteliais para se desenvolverem (Guilliams et al., 2013). Esses macrófagos formam a primeira linha de defesa da mucosa pulmonar (Woo et al., 2021) dada sua localização estratégica no lúmen dos alvéolos pulmonares e representam mais de 90% da

população celular presente nos pulmões durante homeostase (Lugg et al., 2022). Fenotipicamente, os AMs apresentam a seguinte assinatura: SiglecF⁺CD11c⁺CD11b⁻CD64⁺ e são autofluorescentes (Schyns et al., 2018). Suas funções estão envolvidas em uma resposta ativa contra substâncias danosas por meio do patrulhamento pelos poros de Kohn (Neupane et al., 2020), fagocitose de patógenos por meio de receptores *scavengers* (Arredouani et al., 2004), *clearance* “silencioso” de células apoptóticas (eferocitose) (Roberts et al., 2017), remoção do excesso de surfactantes (Trapnell et al., 2009) e produzem ROS, óxidos nítricos, TNF e IFN (Franke-Ullmann, et al., 1996). Os AMs são importantes ainda na manutenção de tolerância por meio da expressão de C200R, visto que sua ligação ao CD200, presente nas células alveolares epiteliais, inabilita respostas imunológicas inatas inflamatórias (Snelgrove et al., 2008). Além disso, estimulam/expandem a população de células TCD4⁺FOXP3⁺ por secretarem TGF-β e ácido retinóico, levando à diferenciação de células T regulatórias (Coleman et al., 2013) e promovem tolerância a抗ígenos inócuos pela ausência de moléculas co-estimulatórias (**Figura 3**) (Blumenthal et al., 2001). Assim, tais células desempenham um papel dicotômico, ou seja, estão envolvidas em processos inflamatórios e regulatórios a depender do microambiente em que estão inseridas.



Nature Reviews | Immunology

Figura 3. Interações dos leucócitos em pulmões saudáveis. Os AMs residem nos espaços das vias aéreas justapostos com células alveolares do tipo I e II. Os macrófagos alveolares são encontrados nas vias aéreas maiores (bronquiolos). Macrófagos intersticiais podem ser encontrados no espaço intersticial entre os alvéolos e vasos sanguíneos, onde também residem células T, células dendríticas (DCs) e uma pequena população de células B. Bactérias comensais e patogênicas ficam na mucosa das vias aéreas e nos alvéolos. **A.** AMs são regulados pelo epitélio por meio de interações entre CD200, expressos pelas células alveolares do tipo II, assim como o TGF- β fixado na superfície da célula epitelial pela integrina $\alpha\beta 6$ e IL-10 secretada. **B.** A secreção de TGF- β e ácido retinóico por macrófagos alveolares induzem a expressão de FOXP3 em células CD4 $^{+}$ presentes no lúmen. Figura adaptada de (Hussell & Bell, 2014).

O contato inicial dos AMs com a fumaça de cigarro inalada é um indutor de diversas alterações celulares. Em relação à morfologia, os AMs dispõem um tamanho maior, com mais quantidades de vesículas provenientes do complexo de Golgi, retículo endoplasmático e ainda corpos residuais com inclusões fibrilares, sugerindo um aumento da taxa metabólica de repouso celular devido a maior carga de substâncias que devem ser removidas do microambiente (Harris et al., 1970). A exposição à fumaça de cigarro está associada com a indução de apoptose dos AMs (Aoshiba et al., 2001), supressão da capacidade eferocítica dos AMs devido injúrias às estruturas de actina (Minematsu et al., 2011), o que acarreta também a diminuição da capacidade fagocítica e microbicida (*clearance*), como demonstra os estudos de Phipps e colaboradores (2010) e Bewley et al., 2017) por meio da infecção por *Streptococcus pneumoniae* (Figura 4). A redução das propriedades fagocítica e microbicida dos AMs pode estar relacionada, respectivamente, com a supressão da atividade dos receptores *toll like* (TLRs) presentes nos macrófagos, visto que esses receptores induzem a produção de citocinas importantes na resposta contra patógenos, como TNF- α , IL-6 e IL-10 (Metcalfe et al., 2014) e baixa produção de ROS intracelular. Além disso, a desregulação da liberação de proteinase/anti-proteinase pelos AMs é muito comum durante o tabagismo, o que promove o desenvolvimento do enfisema pulmonar pela degradação de elastina (Hautamaki et al., 1997). Tantas mudanças advindas da presença da fumaça de cigarro têm origem em mudanças no genoma dessas células, visto que esse agente estressor ativa como o fator de transcrição NF- κ B e as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Hellermann et al., 2002; Lee et al., 2010), culminando na produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas.

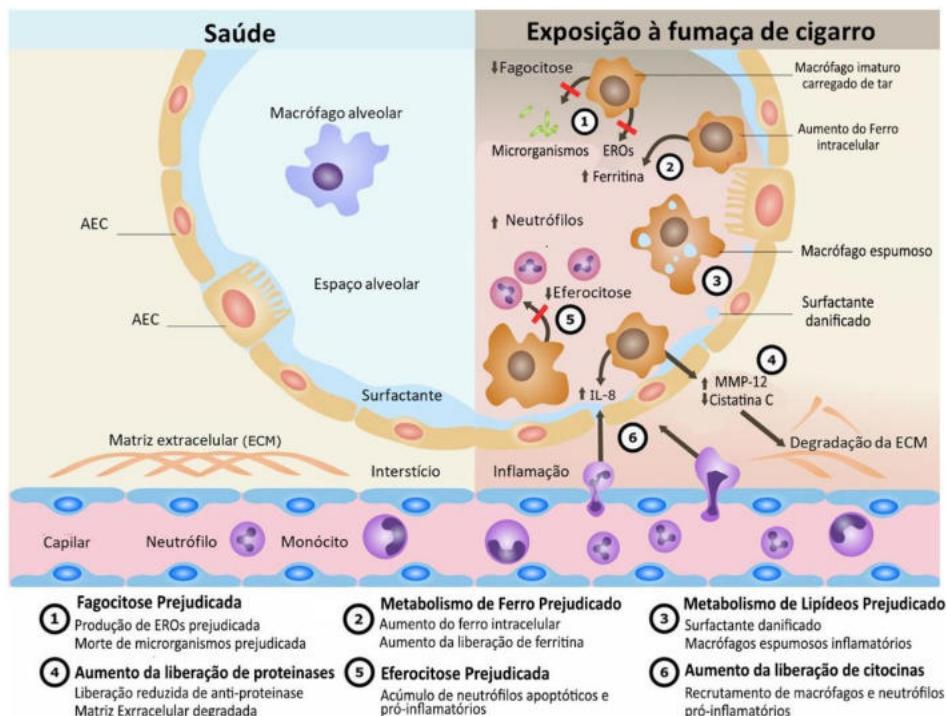


Figura 4. Falhas em mecanismos efetores nos macrófagos alveolares devido à exposição de fumaça de cigarro. Macrófagos alveolares expostos à fumaça de cigarro (à direita) apresentam diversas alterações, desencadeando processos relacionados com dano tecidual, perda de função celular e doença se comparados à macrófagos alveolares durante a homeostase. IL- interleucina, MMP- metaloproteinase de matriz, ROS- espécies reativas de oxigênio. Adaptada de (Lugg et al., 2022).

A quebra do estado de homeostase nos pulmões por devido ao tabagismo também afeta o funcionamento de outras células presentes na mucosa pulmonar. Durante esse processo inflamatório, os neutrófilos são prontamente recrutados por meio da citocina IL-8 previamente mencionada e CXCL1 pelas células epiteliais (Yoshida & Tuder, 2007). Devido às condições do microambiente, tais células são induzidas a produzirem as redes extracelulares de neutrófilos (NETs), levando a maturação e ativação de células dendríticas (DCs) que, nessas condições, garantem a polarização de células TCD4⁺ para respostas Th1 e Th17 (Qiu et al., 2017). Além disso, um estudo publicado por Bai e colaboradores (2022) demonstrou que esse cenário colabora para a produção de CXCL2, responsável pelo recrutamento de monócitos (Bai et al., 2022b). Ao chegarem nos pulmões, tais monócitos se diferenciam em macrófagos derivados de monócitos (moAMs) que são importantes para manter o *pool* de macrófagos em um nível basal (Aoshiba et al., 2001).

Assim, o tabagismo promove a quebra da tolerância que se configura como um dos principais pilares para a manutenção da homeostase pulmonar, garantindo a permanência das funções fisiológicas desse sítio. Tendo em vista o que foi descrito anteriormente, a presença desse agente estressor gera uma resposta imunológica exacerbada, configurando um quadro de intensa inflamação. Dessa forma, mecanismos regulatórios são essenciais para controlar essa resposta, dentre eles, a eferocitose realizada por macrófagos se destaca por ser um mecanismo presente na população celular mais numerosa dos pulmões.

1.3 Eferocitose

A morte celular programada consiste em um conjunto de mecanismos essenciais para a fisiologia humana (Lockshin & Zakeri, 2001). Existem diferentes classificações de morte celular, mas as mais caracterizadas são: autofagia, apoptose, piroptose e necroptose (S. Shen et al., 2023). Dentre elas, a apoptose possui uma ocorrência expressiva no corpo humano e, estima-se cerca de 300 bilhões de células são submetidas a esse processo por dia, eliminando células envelhecidas, senescentes, infectadas ou alteradas (Bianconi et al., 2013). A apoptose é dependente da ativação de caspases seguida da ação de DNases que fragmentam o material genético (ZHANG & XU, 2000), caracterizada por alterações bioquímicas, como alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação do citocromo C, exposição estável da fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática, mudanças morfológicas, com a formação de protuberâncias na membrana plasmática (*blebs*), condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (Krysko et al., 2008).

A fagocitose das células ou corpos apoptóticos ou eferocitose é um processo controlado realizado por fagócitos profissionais, especialmente por macrófagos e é essencial para a

manutenção da homeostase pulmonar. A eferocitose evita a evolução de células apoptóticas para o estágio de necrose, onde a células perdem a permeabilidade de sua membrana e passa a liberar o conteúdo intracelular, os DAMPs, que disparam a inflamação, e autoantígenos que podem iniciar a autoimunidade (Nikolopoulou et al., 2013). Dessa maneira, distúrbios na eferocitose colaboram para o desenvolvimento e/ou agravamento de diversas doenças inflamatórias crônicas, dentre elas, a DPOC (Figura 5) (Boada-Romero et al., 2020).

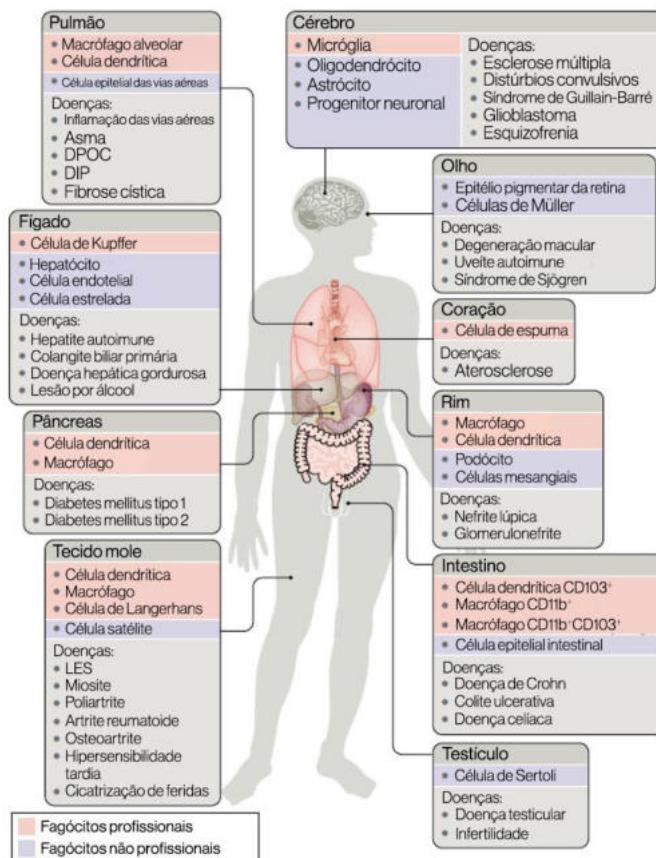


Figura 5. Representação dos fagócitos presentes em diferentes órgãos e possíveis doenças derivadas de problemas durante a eferocitose. A eferocitose é realizada tanto por fagócitos profissionais (boxes vermelhos), como macrófagos e DCs, quanto por fagócitos não profissionais (boxes roxos), mas em menores quantidades. Problemas durante esse processo contribuem para o desenvolvimento de diversas doenças (boxes cinzas) em diferentes tecidos. DPI- doença pulmonar intersticial idiopática, LES- Lúpus Eritematoso Sistémico. Adaptada de (Boada-Romero et al., 2020).

A eferocitose é um processo controlado, que ocorre em três etapas diferentes: recrutamento dos fagócitos, ligação fagócito-célula apoptótica e internalização seguida da degradação da célula em apoptose. Na primeira fase, a célula apoptótica produz e libera os sinais *find me*, como fractalquina (CX₃CL1), esfingosina-1-fosfato (S1P) e adenosina trifosfato (ATP), responsáveis por atrair o fagócito. A segunda etapa é regulada pelos sinais *eat me*, sendo a presença da fosfatidilserina (PtdSer) no folheto externo da membrana celular o principal delas, e *don't eat me*, que se caracterizam pela expressão de CD31, CD47, CD24 e MHC de classe I (Moon et al., 2023). A partir do reconhecimento dos sinais *eat me*, o

fagócyto estabelece uma ligação com a célula apoptótica e os receptores TAMs, TIMs, estabilinas e integrinas $\alpha V\beta 3/\alpha V\beta 5$ medeiam a eferocitose, via reconhecimento direto ou indireto da PtdSer. A ligação intercelular indireta se dá por moléculas-ponte como a proteína específica de parada de crescimento (Gas-6) proteína S e o fator 8 do glóbulo de gordura do leite-EGF (MFG-E8), que interagem, respectivamente, com os receptores TAM e as integrinas. Por fim, ocorre o “englobamento” e posterior internalização da célula apoptótica, aumentando a concentração de ROS que desencadeia na degradação da célula (**Figura 6**) (Doran et al., 2020).

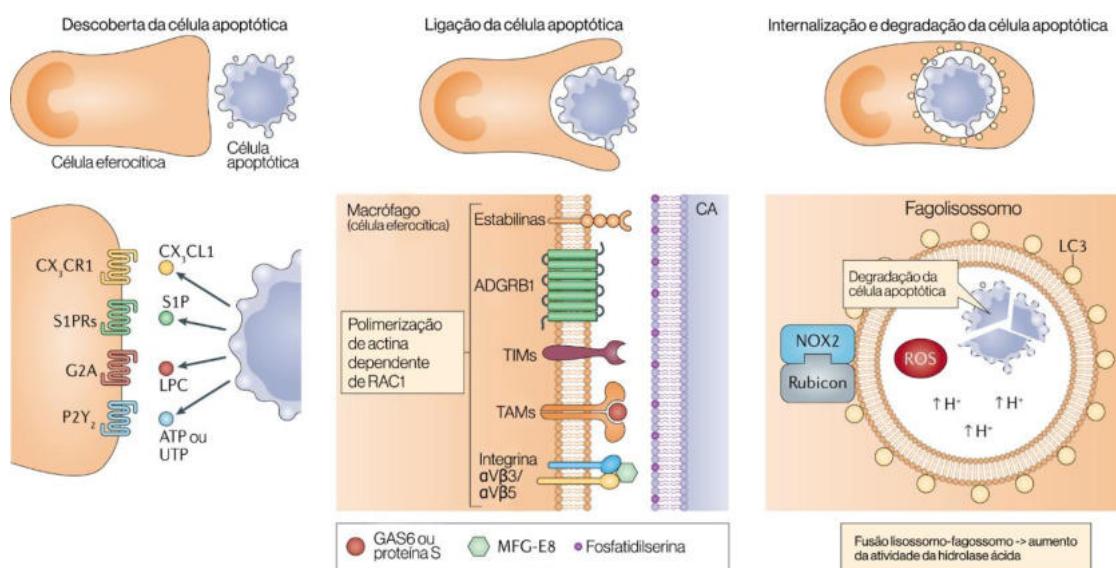


Figura 6. Esquema morfológico e molecular das etapas da eferocitose realizada por fagócitos. Na primeira etapa a célula apoptótica induz de células imunológicas eferocíticas por meio da liberação de quimiocinas (CX3CL1), lípideos (S1P), lisofosfatidicolina (LPC) e nucleotídeos (ATP e UTP). Depois os receptores de superfície do fagócito interagem com a célula apoptótica de forma direta (estabilinas, ADGRB1 e TIMs) ou indireta (TAMs e integrinas), sendo essa última dependente das moléculas ponte Gas-6, proteína S ou MFG-E8. Essa interação resulta na ativação de pequenas GTPases, como a RAC1, que medeiam a internalização da célula apoptótica. Por último, a degradação da célula apoptótica acontece a partir da fusão entre lisossomo e fagossomo, formando o fagolisossomo de pH baixo e alta atividade de hidrolases e concentrações ROS Adaptada de (Doran et al., 2020).

A eferocitose representa um mecanismo intrínseco à manutenção da homeostase da mucosa pulmonar, visto que esse sítio deve apresentar um perfil mais tolerogênico para garantir a plena função fisiológica exercida pelos pulmões. Como detalhado anteriormente, essa mucosa detém diversos tipos celulares com funções e expressão de receptores distintas, mas os macrófagos constituem a população mais representativa (Doran et al., 2020). Com isso, os receptores de eferocitose por eles expressos e seus mecanismos são relevantes.

1.4 Receptores de eferocitose

Os macrófagos dispõem destaque na eferocitose, pois possuem diferentes receptores em sua superfície celular capazes de reconhecer os sinais *eat me*. Algumas dessas proteínas

reconhecem esses sinais diretamente, incluindo CD300b, inibidor 1 da angiogênese específica do cérebro (BAI1), imunoglobulina de células T e molécula 4 contendo o domínio da mucina (TIM4) (Miyanishi et al., 2007) e estabilina 2. Outros receptores, como CR1, tirosina quinases da família TAM e as integrinas dependem, respectivamente, da presença de proteínas do complemento, Gas6 ou proteína S e MFG-E8, que são moléculas-ponte solúveis para o reconhecimento dos sinais *eat me* (Figura 7) (Lemke, 2019a).

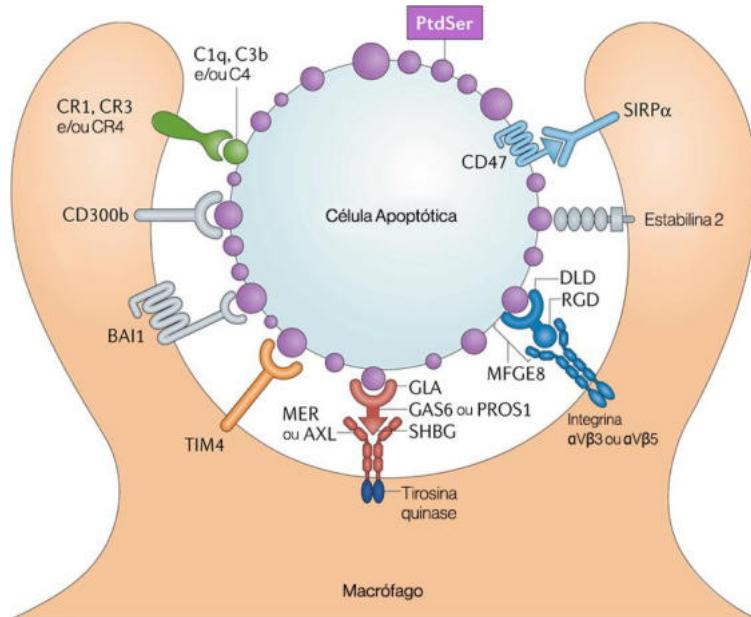


Figura 7. Receptores e moléculas-ponte que medeiam a eferocitose. Durante a apoptose, células exibem fosfatidilserina (PtdSer) na superfície como sinal *eat me*, reconhecido por receptores de macrófagos (CD300b, BAI1, TIM4, Stabilin-2) ou por moléculas ponte (Gas6/Pros1 e MFG-E8). Essas proteínas se ligam à PtdSer e a receptores fagocíticos (Mer, Axl, integrinas $\alpha V\beta 3/\alpha V\beta 5$). Proteínas do complemento (C1q, C3b, C4) também se depositam na superfície apoptótica, sendo reconhecidas por receptores CR1, CR3 e CR4. Algumas células apoptóticas expressam CD47, um sinal inibitório reconhecido por SIRP α . Adaptada de (Lemke, 2019b).

Dentre todos os receptores citados, aqueles pertencentes à família TAM se destacam pela capacidade de naturalmente desencadear vias de sinalização que ativam as GTPases da família RHO reguladoras da fagocitose das células apoptóticas (Nakaya et al., 2006) a partir do reconhecimento da PtdSer (Lemke, 2017). Os receptores TAM foram os últimos receptores tirosina quinase a serem descobertos e são específicos para cordados (Lapraz et al., 2006). Nomeados a partir da primeira letra de seus três representantes, Tyro3, Axl e MerTk (Prasad et al., 2006), os receptores TAM são compostos por porções extracelulares, dois domínios semelhantes à imunoglobulina e duas repetições de fibronectina tipo III, cada uma acoplada a um domínio e uma porção PTK transmembranar, de passagem única no citoplasma celular que é cataliticamente competente (Figura 8). As células podem expressar um ou mais dos receptores TAM, as quais estão dispersas em diferentes sistemas, como o nervoso, reprodutivo, vascular e imunológico (Lemke & Rothlin, 2008).

Diversos estudos constataram que duas proteínas similares, Gas6 e a proteína S, são agonistas dos receptores TAM (Stitt et al., 1995a) com graus de afinidade distintos, sendo o Gas6 mais fortemente associado ao Axl e Tyro3 e a proteína S ao Tyro3 e MerTk (Nagata et al., 1996) (Stitt et al., 1995b). Essas proteínas são compostas por um terminal amino com domínio Gla, o qual estabelece uma ligação com PtdSer (Huang et al., 2003), seguido por quatro unidades que se assemelham ao fator de crescimento epidérmico (EGF) conectados a dois domínios globulina de ligação ao hormônio sexual (SHBG)-like ligante dos receptores TAM, promovendo sua ativação (**Figura 8**). Para além dessa função, a proteína S também é conhecida por desempenhar um papel importante na coagulação sanguínea (Rezende et al., 2004).

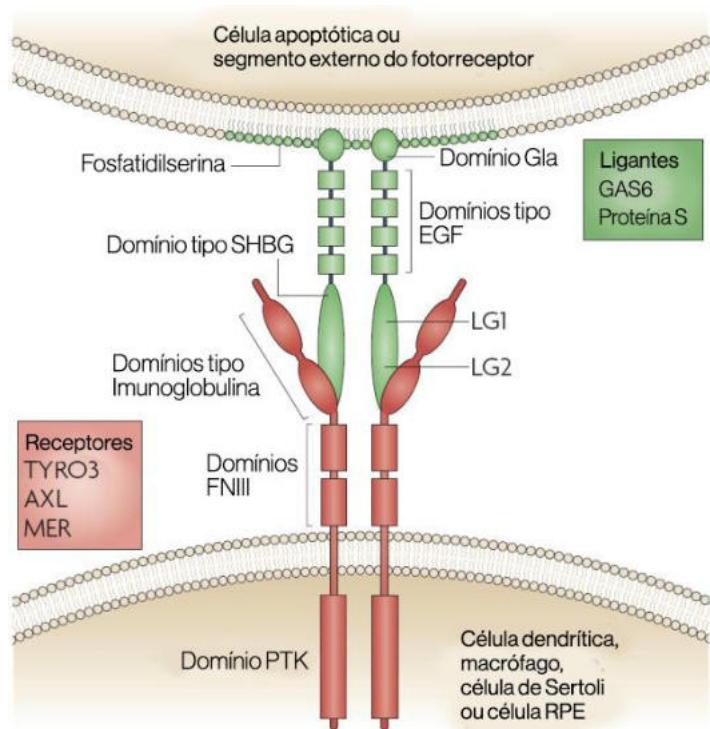


Figura 8. Receptores TAM e seus ligantes. Os receptores TAM (Tyro3, Axl e Mer) expressos por células do sistema imunológico formam dímeros e se ligam às moléculas-ponte (Gas6 e proteína S) pela interação de seus domínios imunoglobulina N-terminais e a região SHBG dos ligantes. Adaptada de (Lemke & Rothlin, 2008).

A cascata de sinalização disparada a partir da ativação dos receptores TAM é crucial para inibir respostas imunológicas inatas exacerbadas. Os TAM formam um complexo com o receptor de interferon do tipo I (IFNAR) mediado pela cadeia alfa desta última proteína (Rothlin et al., 2007). Em resposta a interferons e citocinas ocorre a fosforilação do domínio PTK, levando à translocação de dímeros STAT1 para o núcleo celular (Levy & Darnell, 2002) e indução da transcrição e expressão dos genes supressores da sinalização de citocinas 1 e 3 (SOCS1 e 3), fortes inibidores de TLRs e receptores de citocinas, o que interrompe a resposta inflamatória (**Figura 9**) (Lemke, 2013).

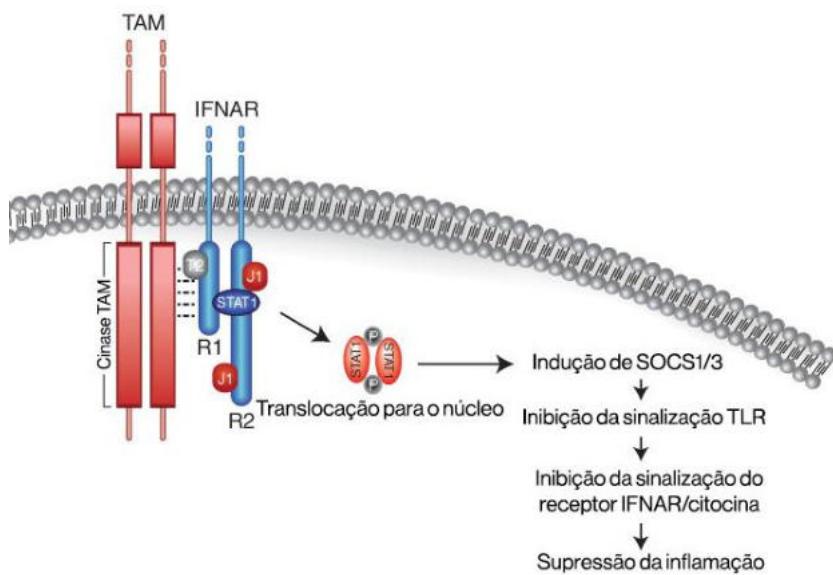


Figura 9. Cascata de sinalização disparada por meio da ativação do complexo de receptores TAM-IFNAR. Receptores da família TAM formam um complexo funcional com o receptor IFNAR por intermédio da cadeia R1 de IFNAR. Esse complexo ativa a tirosina quinase Jak1, ativando o fator de transcrição STAT1, que se transloca para o núcleo e induz SOCS1 e SOCS 3. Adaptada de (Lemke, 2013).

Wang e colaboradores (2021) demonstraram que os receptores TAM desempenham funções que impactam não somente a homeostase. Para isso, os pesquisadores utilizaram um modelo de infecção viral do sistema nervoso central que esses receptores não permitiram a evolução da doença para um quadro de encefalite por meio de diferentes mecanismos, dentre eles a atenuação da produção de citocinas pró inflamatórias (Wang et al., 2021). Assim, os receptores TAM têm um importante papel na regulação do sistema imunológico, na manutenção da homeostase e no contexto de doenças.

1.5 *Streptococcus pneumoniae*

Os estreptococos são bactérias que possuem formato de cocos encapsulados, Gram-positivas, não esporulantes tolerantes ao oxigênio e homofermentativas, ou seja, produzem ácido lático como principal produto oriundo da fermentação da glicose e sua transmissão ocorre por gotículas respiratórias ou fômites contaminados (T. Madigan et al., 2016). De maneira mais específica, a *S. pneumoniae* se configura como um patógeno oportunista, ou seja, pode se apresentar como um componente da microbiota ou um potencial patógeno do sistema respiratório (Weiser et al., 2018).

S. pneumoniae coloniza o trato respiratório superior, sobretudo nasofaringe (Nunes et al., 2005) e sua relação com o hospedeiro pode ser comensal. Bogaert e colaboradores realizaram um estudo que evidenciou a presença de *S. pneumoniae* em amostras da nasofaringe de crianças entre 1-19 assintomáticas e saudáveis (Bogaert et al., 2004). Os portadores dessa bactéria são, em sua maioria, crianças e esses indivíduos detêm os anticorpos IgG e IgA secretória específicos para proteínas associadas à superfície bacteriana e polissacarídeos da cápsula (Simell et al., 2001;2002). Contudo, em resposta a estímulos do microambiente o

perfil transcricional da bactéria altera, fato que está associado ao desenvolvimento dos quadros infecciosos (Ogunniyi et al., 2012).

Classificado como um dos principais causadores de pneumonia adquirida na comunidade, otite média, sinusite, bronquite, pneumonia e meningite, a *S. pneumoniae* possui virulência elevada (Engholm et al., 2017). De acordo com a Organização Mundial da Saúde a doença pneumocócica é uma das maiores causas de morte infantil por doenças prevenível com vacinas e internações de pessoas a partir dos 60 anos (Sociedade Brasileira de Imunizações, 2025). Além disso, o Ministério da Saúde divulgou em 2024 um estudo que aponta a meningite pneumocócica, um dos quadros mais invasivos de infecções por *S. pneumoniae*, sendo o tipo de meningite com maior incidência e óbitos no Brasil (**Figura 10**) (Ministério da Saúde, 2024).

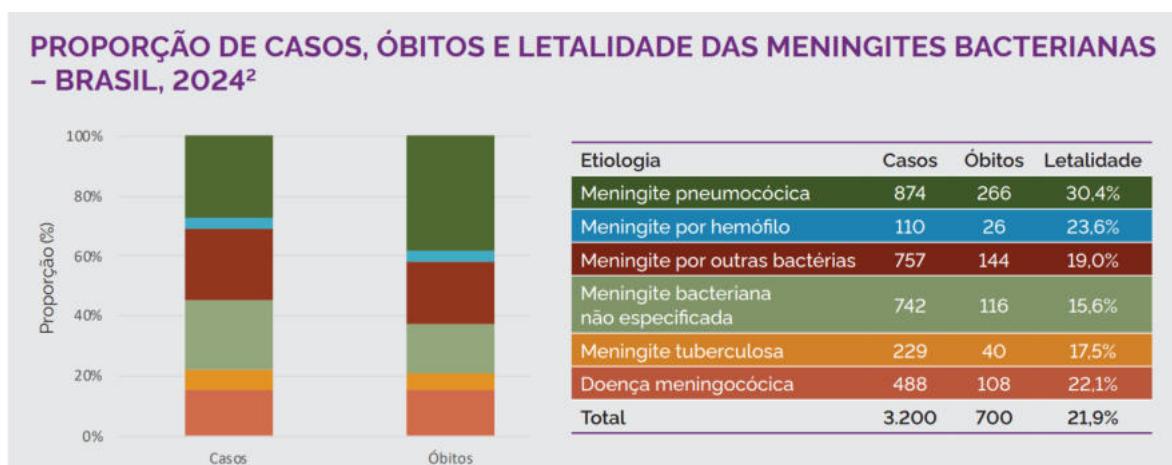


Figura 10. Esquema representativo da relação entre número de casos, óbitos e letalidade de meningites bacterianas no Brasil em 2024. A imagem ressalta a gravidade da meningite pneumocócica que obteve o maior número de casos (874), óbitos (266) e taxa de letalidade (30,4%) dentre as demais. Figura adaptada de (Ministério da Saúde, 2024).

Os quadros invasivos que detêm *S. pneumoniae* como agente etiológico são frequentes devido aos diversos fatores de virulência apresentados por tal bactéria. Dentre eles a cápsula polissacarídica presente na superfície bacteriana se destaca, uma estrutura protetora das defesas imunológicas humorais, mecanismo de fagocitose (Griffith, 1928), dessecção, antimicrobianos e promove a formação de biofilmes (Kadioglu et al., 2008). Além disso, a partir de 2024, a bactéria em questão foi incluída na categoria de prioridade média na Lista de patógenos bacterianos prioritários da OMS devido à sua resistência à classe de antimicrobianos dos macrolídeos, representando um grande impacto para a saúde pública, em especial às pessoas mais suscetíveis (World Health Organization, 2024).

Infecções por *S. pneumoniae* acometem diferentes grupos de risco, dentre eles, os fumantes ficam em evidência devido à gravidade dos casos. A fumaça de cigarro reduz a resposta imunológica na mucosa nasal, sítio primário de colonização bacteriana, aumentando assim a predisposição e desenvolvimento de quadros graves da doença (P. Shen et al., 2016).

John Phipps e colaboradores constataram que a fumaça de cigarro também está associada com a diminuição do *clearance* bacteriano e da fagocitose por macrófagos alveolares fagocitose mediada por complemento (Phipps et al., 2010). Além disso, já é bem descrito pela literatura que durante a interação hospedeiro-patógeno, *S. pneumoniae* induz uma taxa elevada de apoptose nas células presentes nas vias aéreas e morte por necrose (Schmeck et al., 2004).

Dessa forma, quadros de pneumonia pneumocócica são críticos em indivíduos tabagistas, com alta probabilidade de evolução para meningite. Isso porque, assim como a fumaça de cigarro, a bactéria em questão está associada com processos de inflamação severos que resultam em dificuldades respiratórias (Bardales et al., 1996). Nesse contexto, os receptores da família TAM são essenciais para conter a exacerbação da inflamação, visto que inibem os TLRs e receptores de citocinas e medeiam a eferocitose.

2 JUSTIFICATIVA

Investigar o papel dos receptores pertencentes à família TAM é fundamental para maior compreensão dos potenciais mecanismos reguladores que participam no processo de controle da exacerbação de processos inflamatórios e progressão de infecções.

Dados prévios não publicados do nosso grupo demonstraram que a exposição aguda à fumaça de cigarro provocou uma redução drástica na população de AMs residentes em camundongos selvagens (WT) e em camundongos deficientes para o receptor MerTk ($MerTk^{-/-}$). Por outro lado, nós observamos um aumento considerável na população de moAMs nas vias aéreas dos animais WT e camundongos deficientes para o receptor Axl ($Axl^{-/-}$) em relação aos $MerTk^{-/-}$. Além disso, camundongos $Axl^{-/-}$ apresentaram maior número de neutrófilos quando comparados com o seu respectivo controle (animais $Axl^{-/-}$ expostos apenas ao ar ambiente), caracterizando uma resposta imunológica de perfil mais inflamatória nos pulmões desses animais.

Com base nesses dados, notamos que os receptores Axl e MerTk desempenham funções distintas em resposta à fumaça de cigarro apesar de pertencerem à mesma família e possuírem características morfológicas similares. Dessa forma, objetivamos avaliar o impacto dessas diferentes respostas imunológicas à fumaça de cigarro em um modelo de pneumonia bacteriana, por *S. pneumoniae*, bem como investigar, *ex vivo*, o papel funcional de subpopulações de macrófagos alveolares. Nossa objetivo é aprofundar a compreensão sobre os mecanismos que tornam indivíduos fumantes mais suscetíveis ao desenvolvimento de infecções pulmonares.

3 OBJETIVOS

Caracterizar o papel dos receptores Axl e MerTk na pneumonia causada por *S. pneumoniae* após o estabelecimento dos efeitos imunológicos da exposição aguda à fumaça de cigarro.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a susceptibilidade à pneumonia pneumocócica em camundongos WT, Axl^{-/-} e MerTk^{-/-} previamente expostos à fumaça de cigarro;
- Avaliar a carga bacteriana e alterações na permeabilidade tecidual induzidas pela exposição aguda à fumaça de cigarro em camundongos WT, Axl^{-/-} e MerTk^{-/-} desafiados com *S. pneumoniae*;
- Estabelecer as populações de células do sistema imunológico nas vias aéreas de camundongos WT, Axl^{-/-} e MerTk^{-/-} após exposição aguda à fumaça de cigarro desafiados com *S. pneumoniae*;
- Avaliar os níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias nos fluidos das vias aéreas de camundongos WT, Axl^{-/-} e MerTk^{-/-} após exposição aguda à fumaça de cigarro desafiados com *S. pneumoniae*;
- Verificar a capacidade fagocítica e microbicida de macrófagos alveolares recuperados de camundongos WT, Axl^{-/-} e MerTk^{-/-} expostos à fumaça de cigarro (*ex vivo*);

4 METODOLOGIA

4.1 Camundongos

Camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6J selvagens (WT) e transgênicos deficientes para os receptores Axl ($Axl^{-/-}$) e MerTk ($MerTk^{-/-}$) do sexo feminino, com idade entre 8-12 semanas foram utilizados no presente estudo. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Imunologia a 22°C, com água e ração à vontade, obedecendo o ciclo claro e escuro, padrões sanitários e de biossegurança, assim como as diretrizes bioéticas. Licença CEUA nº 057/22.

4.2 Protocolo agudo de exposição à fumaça de cigarro

Camundongos WT, $Axl^{-/-}$ e $MerTk^{-/-}$ foram submetidos a um modelo de exposição aguda à fumaça de cigarro (CS), mais especificamente à fumaça gerada com a queima do cigarro Marlboro Red (*Philip Morris, RS*) (10mg de alcatrão, 0,8mg de nicotina e 10mg de monóxido de carbono). Esse protocolo apresentou uma duração de 5 dias, sendo que em cada um desses dias estabelecemos 3 ciclos (manhã, tarde e noite) de exposição, com intervalo de 4 horas entre eles, utilizando 3 cigarros, com o total de 9 cigarros por dia (Protocolo adaptado de Valença et al., 2004).

Os grupos de camundongos foram dispostos em uma caixa metálica de inalação onde a fumaça de cigarro foi inserida com auxílio de uma seringa de 60ml, com a qual é possível resgatar a fumaça gerada com a queima do cigarro ao se puxar o êmbolo, visto que o cigarro é acoplado à seringa. Cada ciclo de inalação teve 20 minutos, com 3 momentos diferentes de 6 minutos corridos de exposição a fumaça, intercalados com uma pausa de 1 minutos entre cada um deles para exaustão da fumaça residual (**Figura 11**). Realizamos todas as exposições em uma capela de exaustão (Nalgon).

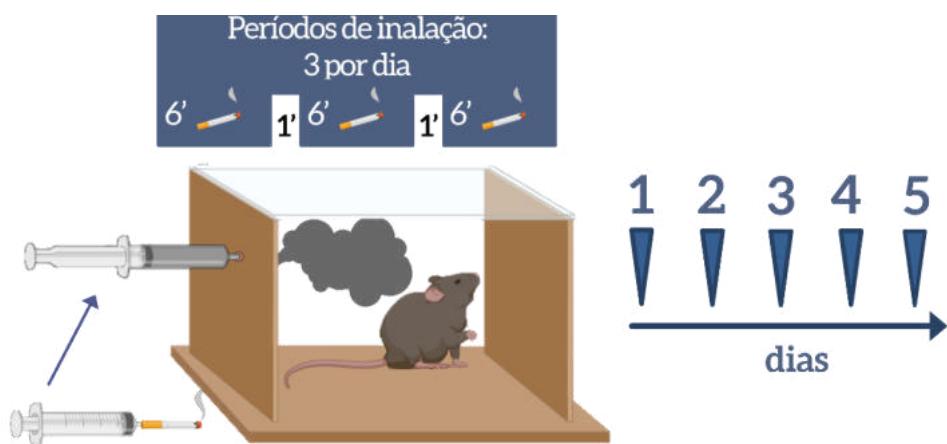


Figura 11: Esquema representativo do modelo de exposição aguda à fumaça de cigarro. Camundongos WT, $Axl^{-/-}$ e $MerTk^{-/-}$ foram expostos ao ar atmosférico (AR) ou à CS durante os 5 primeiros dias do experimento.

4.3 Preparo do inóculo bacteriano

Para o inóculo bacteriano utilizamos a cepa sorotipo 19F ATCC 49619 de *Streptococcus pneumoniae*. Dois dias antes da infecção, o estoque bacteriano mantido em um *freezer* com temperatura de -80°C em meio *milk* com 10% de glicerol foi plaqueado em ágar com 5% de sangue de carneiro desfibrinado (Plastlabor, Rio de Janeiro, Brasil) para realização da ativação bacteriana. No dia seguinte, foi feito um repique para permitir o crescimento do microrganismo por 18h a 37°C em outras duas placas de ágar sangue. Para a preparação do inóculo, o tapete bacteriano foi coletado com auxílio de alça bacteriológica e transferido para um tubo de 15 mL contendo 5ml de PBS 1X (Gibco, Life Technologies, Reino Unido).

Após essa etapa, separamos 1mL do inóculo e de solução padrão (PBS 1X) para quantificar, por espectrofotometria, a densidade óptica do inóculo e do PBS 1X (branco) utilizando o comprimento de onda de 600nm. A padronização do inóculo foi feita por meio de experimentos realizados anteriormente no laboratório, com os quais estabelecemos uma leitura de densidade óptica (DO) de 1,6 (*in vivo*) ou 1,8 (*ex vivo*) para alcançarmos um valor de Multiplicidade de Infecção (MOI) desejado de 1:100 (*in vivo*) ou 1:10.000 (*ex vivo*), que se refere à relação entre quantidade de células e bactérias. Ao final, realizamos o plaqueamento de 20 μ L do inóculo nas diluições de 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} e contamos as unidades formadoras de colônia (UFC) 24h depois para quantificar o valor da concentração do inóculo e a respectiva MOI dos experimentos.

4.4 Infecção por *S. pneumoniae*

No sexto dia, após o protocolo agudo de inalação de fumaça de cigarro, anestesiamos os camundongos dos grupos CS e AR com Fenobarbital sódico (2,0mg/kg). Após a certificação de que o animal não apresentava mais reflexos, fizemos uma pequena incisão na região do pescoço para que fosse possível alcançar a traqueia e introduzir o inóculo bacteriano na concentração de 5×10^6 - 1×10^7 diluído em 50 μ L de PBS 1X estéril, com o auxílio de uma seringa de 1ml. Ao final, o corte foi fechado com um ou dois pontos de sutura, acompanhado da adição de lidocaína na região para evitar que o animal sentisse dor.

4.5 Avaliação do percentual de sobrevivência, temperatura, escore clínico e perda de peso corporal

Durante o período da infecção (d0, d1, d2, d3), analisamos o percentual de sobrevivência, a temperatura corporal, score clínico e a perda de peso corporal de camundongos WT, Axl^{-/-} e MerTk^{-/-}, dos grupos CS e AR que foram infectados.

O parâmetro de sobrevivência teve como base a comparação entre o número inicial de camundongos utilizados para cada um dos grupos estabelecidos e o número de animais vivos nos dias 0, 1, 2 e 3 após a infecção. Para determinar a temperatura, utilizamos um termômetro infravermelho (G.Tech, Microlife Corporation, Taiwan) para captar a temperatura retal dos camundongos. Na avaliação do escore clínico, observamos o padrão comportamental em cada animal e adotamos uma pontuação para cada parâmetro a ser avaliado, onde foi atribuído

para piloereção, postura curvada, olhos parcialmente fechados, respiração difícil, redução dos movimentos e movimentos apenas na provocação a pontuação 1 ponto e para ausência do movimento na provocação a pontuação 2. Contabilizamos o score clínico ao longo de todos os dias de infecção. O resultado foi obtido a partir do somatório dos pontos de cada grupo. Acompanhamos o peso corporal por meio da pesagem individual dos animais e utilizamos a seguinte fórmula para calcular a porcentagem de perda de peso corporal:

$$X = \frac{\text{peso observado} \times 100}{\text{massa inicial (d0)}}, \text{ onde } x \text{ é a variação de peso corporal de acordo com o dia da pesagem (d0, d1, d2 e d3)}$$

Expressamos os resultados obtidos a partir da conta matemática como um valor percentual da variação entre o peso inicial e o peso mensurado durante os dias de pós-infecção.

4.6 Obtenção das células totais das vias aéreas do fluido do lavado broncoalveolar (BALF)

Para investigar todos os parâmetros requeridos, duas abordagens de experimentação: *in vivo* e *ex vivo* foram estabelecidas. Os camundongos submetidos ao primeiro protocolo (número de camundongos por grupo=6) foram expostos à fumaça de cigarro durante 5 dias, infectados por *S. pneumoniae* no 6º dia e coletamos as amostras no 8º dia de experimento. Já em relação ao método *ex vivo* (número de camundongos por grupo=3), nós expusemos os animais à fumaça de cigarro e no 6º dia realizamos a análise (**Figura 12**). Além disso, para o modelo *in vivo* estabelecemos grupos controles, ou seja, animais WT, Axl^{-/-} e MerTk^{-/-} expostos ao ar ambiente e infectados.

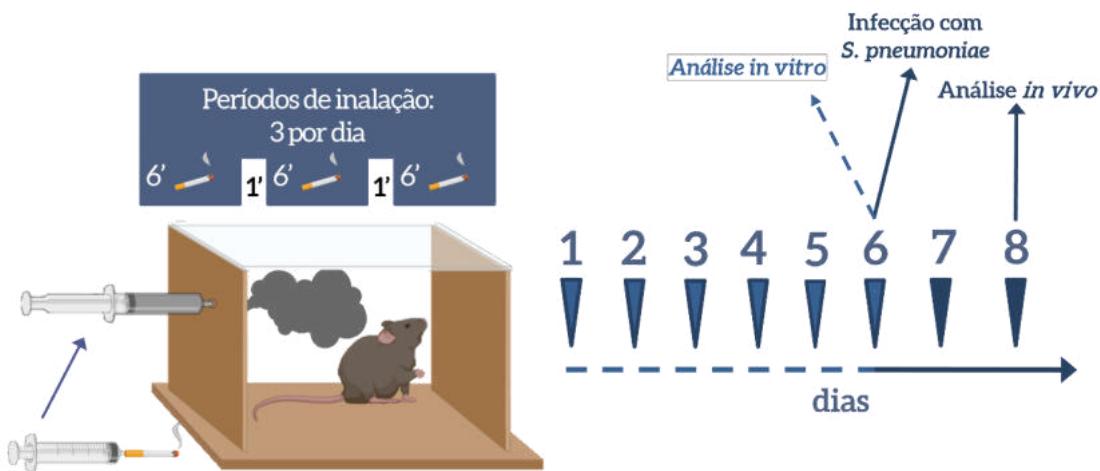


Figura 12: Esquema da cronologia estabelecida para a realização dos experimentos *in vivo* e *ex vivo*. Camundongos WT, Axl^{-/-} e MerTk^{-/-} foram expostos ao ar atmosférico (AR) ou à CS durante os 5 primeiros dias do experimento. No 6º dia ocorreu a eutanásia para a realização das análises *ex vivo* (seta pontilhada) ou a infecção com *S. pneumoniae* dos animais da experimentação *in vivo*. No 8º dia ocorreu a eutanásia dos animais infectados.

Realizamos a coleta das células totais das vias aéreas dos camundongos WT, Axl^{-/-} e MerTk^{-/-} dos modelos *in vivo* e *ex vivo*. Iniciamos esse processo administrando Fenobarbital sódico (2,0mg/kg) via intraperitoneal (i.p.) nos camundongos. Em seguida, os animais foram dispostos na mesa cirúrgica e exsanguinados por meio de uma incisão na veia cava inferior. A partir de um corte na região do pescoço, foi possível acessar a traqueia e, depois de desvincular os pulmões dos ossos que formam as costelas fizemos o lavado broncoalveolar (BAL) 5 vezes em cada camundongo através da injeção de 1 ml PBS 1X estéril gelado na traqueia com o auxílio de uma seringa de 1 ml, seguido da recuperação desses fluidos do BAL. Para os experimentos *ex vivo*, depositamos os BALFs de camundongos pertencentes ao mesmo grupo em tubos de 50 ml, formando um *pool* de células obtidas das vias aéreas e centrifugamos essa suspensão celular (1500 rpm por 5 minutos a 4°C). Os fluidos dos primeiros BALFs foram reservados e destinados para dosagem indireta de óxido nítrico, análise de turbidez e, em seguida, congelados a -80°C para posterior análise da concentração de proteínas totais e de citocinas. Nos experimentos *in vivo*, os BALFs de cada animal foram isolados individualmente e as células foram imediatamente marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos para avaliação por citometria de fluxo.

Durante o processamento dos BALFs, quando necessário, adicionamos o tampão de lise de hemácias (ACK – ammonium chloride potassium – 135 mM de NH4Cl, 10 mM de KHCO3 e 1 mM de EDTA) de acordo com a quantidade de sangue presente no *pellet* das amostras. Inativamos o ACK a partir da adição do meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI) completo (Gibco, Invotrogen Corporation, USA) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Invotrogen Corporation, USA) e realizamos mais uma centrifugação (1500 rpm a 5 minutos). Nos experimentos *ex vivo*, todas as etapas mencionadas anteriormente para coletar as células das vias aéreas foram efetuadas dentro de capelas de fluxo laminar para assegurar a esterilidade das amostras. Esse protocolo tem como base o método apresentado por Rhen e colaboradores (Rehn et al., 1992).

4.7 Infecção *ex vivo* de células das vias aéreas com *S. pneumoniae* e ensaios funcionais

Após o término do protocolo de exposição aguda à fumaça de cigarro, foi realizado BAL nos camundongos WT, Axl^{-/-} e MerTk^{-/-} para obtenção de células totais das vias aéreas. A suspensão de células coletadas foi disposta em um *pool* por grupo de animais e foi contada com o auxílio da câmara de Neubauer, utilizando a diluição de 1:10. Plaqueamos as células totais das vias aéreas na concentração de 1×10^5 células em placa de 96 poços própria para cultura (Costar 3599, Corning Incorporated, NY, USA) com meio RPMI suplementado com 10% de SFB e com antibiótico (gentamicina) em um volume final de 200 µl.

Deixamos as células aderirem por 1:30h na placa de 96 poços dentro da estufa à 37°C e 5% de CO₂ e, após esse período, lavamos os poços com PBS 1X para remover as células não aderentes, ou seja, não são macrófagos. Em seguida, prosseguimos com a infecção e com os ensaios funcionais de fagocitose e *killing* bacteriano. Posteriormente, iniciamos a infecção das células com o inóculo de *S. pneumoniae* (MOI de 1:10.000), que foi feita a partir de uma

solução bacteriana preparada previamente (Item 4.4), na qual adicionamos meio RPMI sem gentamicina para infectar as células previamente plaqueadas. Após a adição da bactéria, a placa foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm para otimizar o contato da bactéria com as células e, em seguida, foi colocada na estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 2:30h. Depois desse período, cada poço foi submetido a 3 lavagens com PBS 1X, seguida de uma incubação de meia hora em meio RPMI com gentamicina para remover as bactérias que eventualmente não foram internalizadas pelos macrófagos.

A partir desta etapa, começamos os ensaios funcionais de fagocitose e *killing* bacteriano. No ensaio de fagocitose, realizamos uma lavagem após o período de incubação das células com meio RPMI IM com gentamicina, seguida de lise das células plaqueadas e infectadas utilizando 100 µL de água destilada gelada por poço. Posteriormente, colocamos a placa na estufa por 3 minutos, homogeneizamos bem os poços para garantir a lise dos macrófagos e plaqueamos 20 µL desse lisado em três diluições diferentes (1:10, 1:100 e 1:1000) em placas de ágar sangue. Vinte e quatro horas depois, nós realizamos a quantificação das bactérias intracelulares viáveis pela contagem das UFCs. No ensaio de *killing* os mesmos processos foram executados com exceção de uma etapa anterior à lise dos macrófagos, onde os mesmos foram incubados com RPMI IM com vancomicina, que permeia o citoplasma das células sem entrar nos fagossomos que detêm as bactérias (protocolo adaptado de Subramanian et al., 2022).

4.8 Dosagem de óxido nítrico

Executamos o Ensaio de Griess (Ding et al., 1988) para avaliar os níveis de óxido nítrico (NO). Essa técnica foi feita de maneira indireta, ou seja, por meio da quantificação de nitritos (NO₂) nos sobrenadantes obtidos a partir dos fluidos dos primeiros BALs de camundongos WT, Axl^{-/-} e MerTk^{-/-} previamente expostos à fumaça de cigarro e infectados.

Em uma placa de 96 poços (Greier bio-one) foram dispostos 50 µL de cada amostra nos poços. Fizemos a curva em duplicata, a partir de uma diluição de uma solução de NO₂ a 1 µM para 100 µM, que foi considerada o pico da curva. A partir dela foram realizadas diluições seriadas para obtenção dos outros pontos da curva com menor diluição. Ao final do ensaio, todos os poços receberam 50 µL da mistura na proporção de 1:1 dos reagentes de Griess (0,1% dihidrocloretonaftilelenodiamina, 1% sulfanilamida e 2,5% de ácido fosfórico; Sigma), inclusive aqueles estabelecidos como “branco”.

Posteriormente, a densidade óptica das amostras foi lida à 540 nm em espectrofotômetro de placa (Spectramax, M5, Molecular Devices). Para determinar a concentração de nitritos, fizemos uma comparação com os resultados obtidos a partir da leitura com uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂).

4.9 Análise e caracterização das células dos BALFs por citometria de fluxo

Quantificamos e caracterizamos as células totais presentes nas amostras de BALF dos camundongos WT, Axl^{-/-}, e MerTk^{-/-} submetidos ao modelo de experimentação *in vivo* e *ex vivo*. Para isso, células totais das vias aéreas foram, após isolamento, incubadas com 10 µL de Fc Block (BD- Biosciences, diluição de 1:400) por 10 minutos à 4°C ao abrigo da luz.

Em seguida, incubamos as amostras dos experimentos *in vivo* (camundongos infectados previamente expostos à fumaça de cigarro) com 15 µL do coquetel dos seguintes anticorpos conjugados a fluorocromos: PE-anti-SiglecF (BD Biosciences), PE-Cy7-anti-F4/80 (Biolegend), PerCP-Cy5.5-anti-CD11b (BD Biosciences), APC-anti-CD11c (BioLegend), APC-Cy7-anti-Ly6C (BD Pharmingen) e FITC-anti-Ly6G (BD Pharmingen). Para as amostras adquiridas durante os experimentos *ex vivo*, realizamos o mesmo protocolo de marcação com anticorpos conjugados a fluorocromos, contudo, para caracterizarmos o perfil de ativação de macrófagos presentes nas amostras, adicionamos os seguintes anticorpos conjugados a fluorocromos: Alexa Fluor 647-anti-CD206 (BD Pharmingen), BV421-anti-MHCII (BD Horizon).

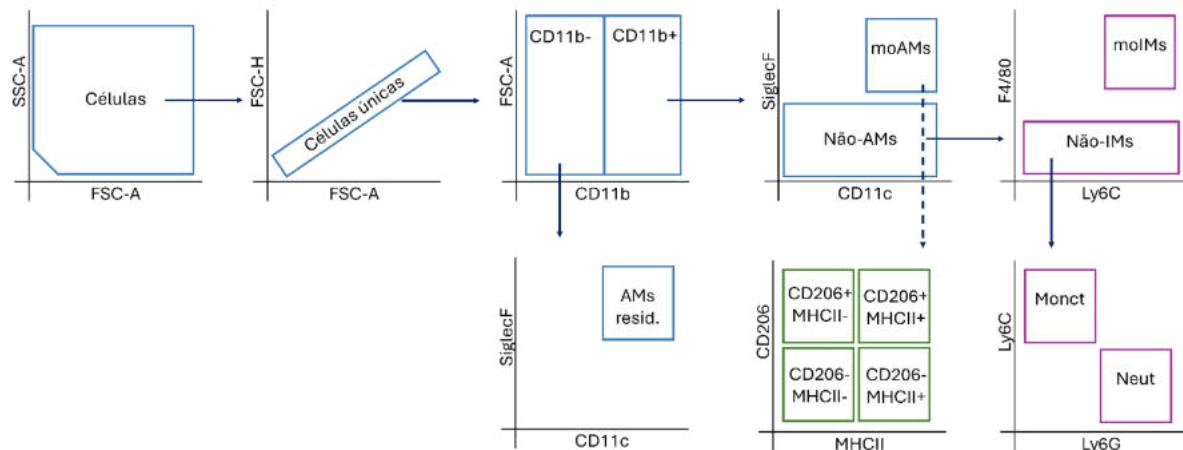


Figura 13: Esquema da estratégia de gate dos experimentos *in vivo* e *ex vivo*. Amostras dos BALs de camundongos WT, Axl^{-/-} e MerTk^{-/-} foram submetidas à diferentes estratégias de gate a depender do modelo de experimentação *in vivo* (roxo) ou *ex vivo* (verde). A cor azul representa a estratégia compartilhada entre os dois modelos.

Após a incubação com o coquetel de anticorpos, fizemos um ciclo de lavagem das amostras com 1 ml de Tampão de FACS (solução salina com 0,5% BSA (Sigma), 5 mM EDTA (Sigma) e 3% SFB) e prosseguimos com a utilização de paraformaldeído (PFA) 2% para fixar as células. As amostras foram adquiridas no citômetro LSRF-Fortessa (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Ao final, as análises foram realizadas a partir de um software específico, o FlowJo (TreeStar, Ashland, OR).

4.10 Dosagem de proteínas

Realizamos a dosagem de proteínas a partir do sobrenadante do fluido do primeiro BAL de camundongos WT, Axl^{-/-}, e MerTk^{-/-} que foram anteriormente expostos à fumaça de

cigarro e infectados. Para isso, utilizamos o *kit* de ensaio de proteínas Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) de acordo com as orientações do fabricante. Primeiro depositamos as amostras em uma placa de 96 poços, adicionamos o reagente presente no kit em cada uma delas e deixamos incubar ao abrigo da luz à 37°C por aproximadamente 2 minutos. Determinamos a absorbância para a leitura das amostras utilizando o comprimento de onda de 562nm em espectrofotômetro de placa.

4.11 Dosagem de citocinas

Os sobrenadantes recuperados do fluido do primeiro BAL de camundongos WT, Axl^{-/-}, e MerTk^{-/-} da experimentação *in vivo* foram utilizados para a realização da dosagem das citocinas IL-1 β , KC (CXCL1), IL-10, TNF e IL-6 por meio do ensaio de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) do tipo sanduíche de acordo com as diretrizes dos fabricantes (RD Systems, Minneapolis, MN; Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Viena, Austria).

Dividimos o protocolo desse ensaio em três dias. No primeiro deles, a placa de 96 poços própria para a técnica de ELISA (EIA/RIA) (Costar 3590, Corning Incorporated, NY, USA) foi sensibilizada com anticorpo captura por meio de uma incubação *overnight*. Durante o segundo dia realizamos sucessivas etapas de lavagem dos poços para remover o excesso de anticorpos de captura e evitar ligações inespecíficas. Além disso, fizemos a curva-padrão da proteína a ser dosada com o anticorpo recombinante, seguida da adição da amostra e da curva padrão. Vinte e quatro horas depois, colocamos 50 μ L do anticorpo de detecção biotinilado em cada poço, seguido da adição da enzima peroxidase conjugada à estreptavidina e seu substrato cromogénico, a Tetrametilbenzidina (TMB) (eBiosciences, San Diego, CA) para que a reação iniciada seja acompanhada. Com uma comparação realizada a partir da curva, adicionamos ácido sulfúrico (H_2SO_4) para interromper a reação.

A leitura foi feita em um espectrofotômetro de placa (Spectramax, M5, Molecular Devices) no comprimento de onda de 450nm.

4.12 Análise estatística

Utilizamos o programa *GraphPad Prism* para a análise estatística do estudo. Foi aplicado o teste T de *Student* não pareado para amostras independentes para a comparação entre dois grupos. A análise de variância *one-way* ANOVA foi realizada para comparação de mais de dois grupos ou tratamentos, seguida da remoção de *outliers* e pós-teste de Tukey. Diferenças com um valor de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****) foram consideradas significativas.

5. RESULTADOS

5.1 Exposição aguda à fumaça de cigarro aumenta da suscetibilidade à infecção por *S. pneumoniae* em camundongos MerTk^{-/-}

Durante o intervalo 0-3 dias a partir da infecção, avaliamos o percentual de sobrevivência, a perda de peso e temperatura corporal, e realizamos o score clínico de camundongos WT, Axl^{-/-}, e MerTk^{-/-} infectados com *S. pneumoniae* dos grupos CS (CSSp-WT, CSSp-Axl^{-/-} e CSSp-MerTk^{-/-}) ou AR (ARSp-WT, ARSp-Axl^{-/-} e ARSp-MerTk^{-/-}). Nós observamos que os camundongos MerTk^{-/-} expostos à fumaça de cigarro apresentaram uma redução de mais de 50% na taxa de sobrevivência quando comparados com os demais grupos submetidos ao mesmo protocolo (**Figura 14A-14B**). Todos os grupos infectados com a bactéria demonstraram uma diminuição do peso corporal inicial, sendo mais acentuada no grupo CSSp-MerTk^{-/-} (**Figura 14C-E**). A temperatura corporal dos grupos avaliados apresentou diferentes padrões durante o período descrito, enquanto camundongos CSSp-MerTk^{-/-} tiveram um aumento em relação ao seu controle, o grupo CSSp-WT obteve uma diminuição em relação ao grupo ARSP-WT e os grupos de camundongos Axl^{-/-} não apresentaram variações significativas entre si (**Figura 14F**). Além disso, por meio do escore clínico estabelecido para se avaliar a sintomatologia ocasionada pela infecção bacteriana, verificamos que os grupos CSSp-WT, CSSp-Axl^{-/-} e CSSp-MerTk^{-/-} obtiveram maior pontuação de severidade se comparado aos seus controles, ARSp-WT, ARSp-Axl^{-/-} e ARSp-MerTk^{-/-} respectivamente, ou seja, os grupos previamente expostos à fumaça de cigarro apresentaram mais complicações derivadas da infecção bacteriana. Dentre os grupos CSSp, as linhagens de camundongos WT e MerTk^{-/-} apresentaram maior escore clínico se comparadas com a linhagem Axl^{-/-} (**Figura 14G**). Dessa maneira, com uma avaliação conjunta de todos os parâmetros, nossos dados sugerem que os animais pertencentes ao grupo CSSp-MerTk^{-/-} são mais propensos ao agravamento da pneumonia do que os demais grupos nas mesmas situações (CSSp-WT e CSSp-Axl^{-/-}).

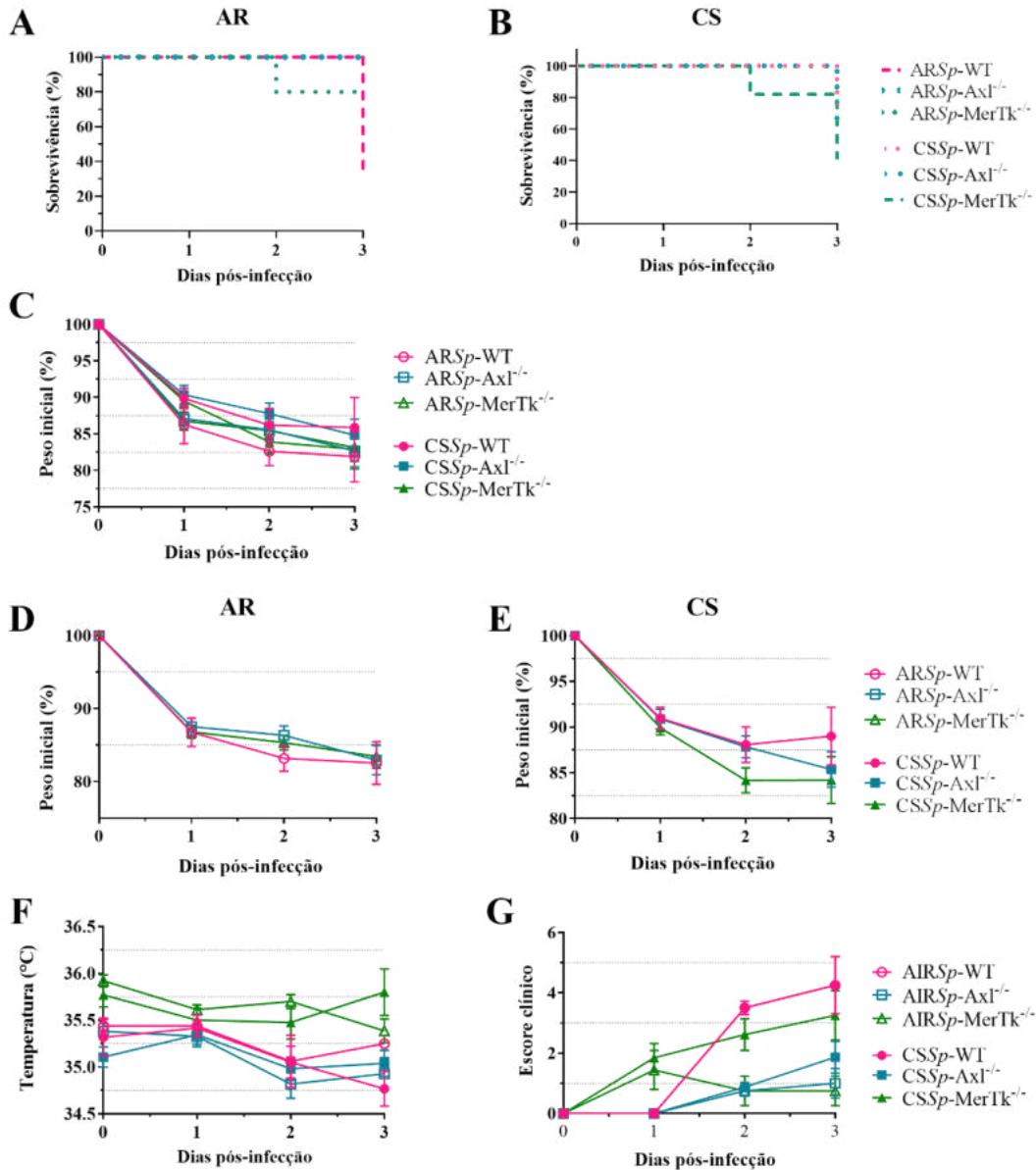


Figura 14: Avaliação do percentual de sobrevivência, da perda de peso e temperatura corporal e do score clínico durante o período de pós-infecção. Todos os grupos estabelecidos, ou seja, camundongos WT, Axl^{-/-} e MerTk^{-/-} expostos ao AR ou à CS foram monitorados nos dias 0, 1, 2 e 3 pós-infecção. Os camundongos foram avaliados em relação ao seu percentual de sobrevivência (A, B), perda de peso corporal (C, D, E), temperatura corporal (F) e score clínico (G). Os dados representam três experimentos independentes com resultados semelhantes. WT: camundongos selvagens

5.2 A fumaça de cigarro altera a permeabilidade do epitélio das vias aéreas em animais WT e MerTk^{-/-} e aumenta a carga bacteriana em camundongos MerTk^{-/-}

No terceiro dia após a infecção, realizamos a eutanásia dos animais WT, Axl^{-/-} e MerTk^{-/-} pertencentes ao grupo AR ou CS e recuperamos os fluidos dos lavados broncoalveolares para possibilitar a avaliação dos efeitos desses desafios. Para isso, avaliamos a turbidez, a

produção de nitritos, a concentração de proteínas totais presentes e contabilizamos as unidades formadoras de colônia (UFC) nos BALFs.

Observamos uma elevada turbidez nos BALFs dos animais WT expostos ou não à fumaça de cigarro (*ARSp*-WT e *CSSp*-WT; **Figura 15A**). No entanto, apenas o grupo *CSSp*-MerTk^{-/-} apresentou aumento na turbidez se comparados aos seus controles, *ARSp*-MerTk^{-/-} (**Figura 15A**). Em relação às proteínas, apenas os BALFs de WT expostos à fumaça de cigarro (*CSSp*-WT) apresentaram elevados níveis de proteínas totais em relação aos demais grupos CS (*CSSp*-Axl^{-/-} e *CSSp*-MerTk^{-/-}; **Figura 15C**). A produção de nitritos foi mais expressiva nos animais *CSSp*-Axl^{-/-} em relação ao seu controle *ARSp* e aos camundongos *CSSp*-WT e *CSSp*-MerTk^{-/-} (**Figura 15B**). Além disso, apenas o grupo *CSSp*-MerTk^{-/-} apresentou maior carga bacteriana se comparado ao seu respectivo controle (*ARSp*-MerTk^{-/-}) e ao grupo *CSSp*-Axl^{-/-}. Assim, nossos dados sugerem que a elevada concentração de nitritos nos BALFs de camundongos do grupo *CSSp*-Axl^{-/-} pode ter um efeito antimicrobiano que reflete em uma menor carga microbiana e sobrevivência nesse grupo, enquanto a maior turbidez encontrada no grupo *CSSp*-MerTk^{-/-} pode sugerir maior permeabilidade tecidual e consequente maior suscetibilidade à infecção e seus efeitos sistêmicos.

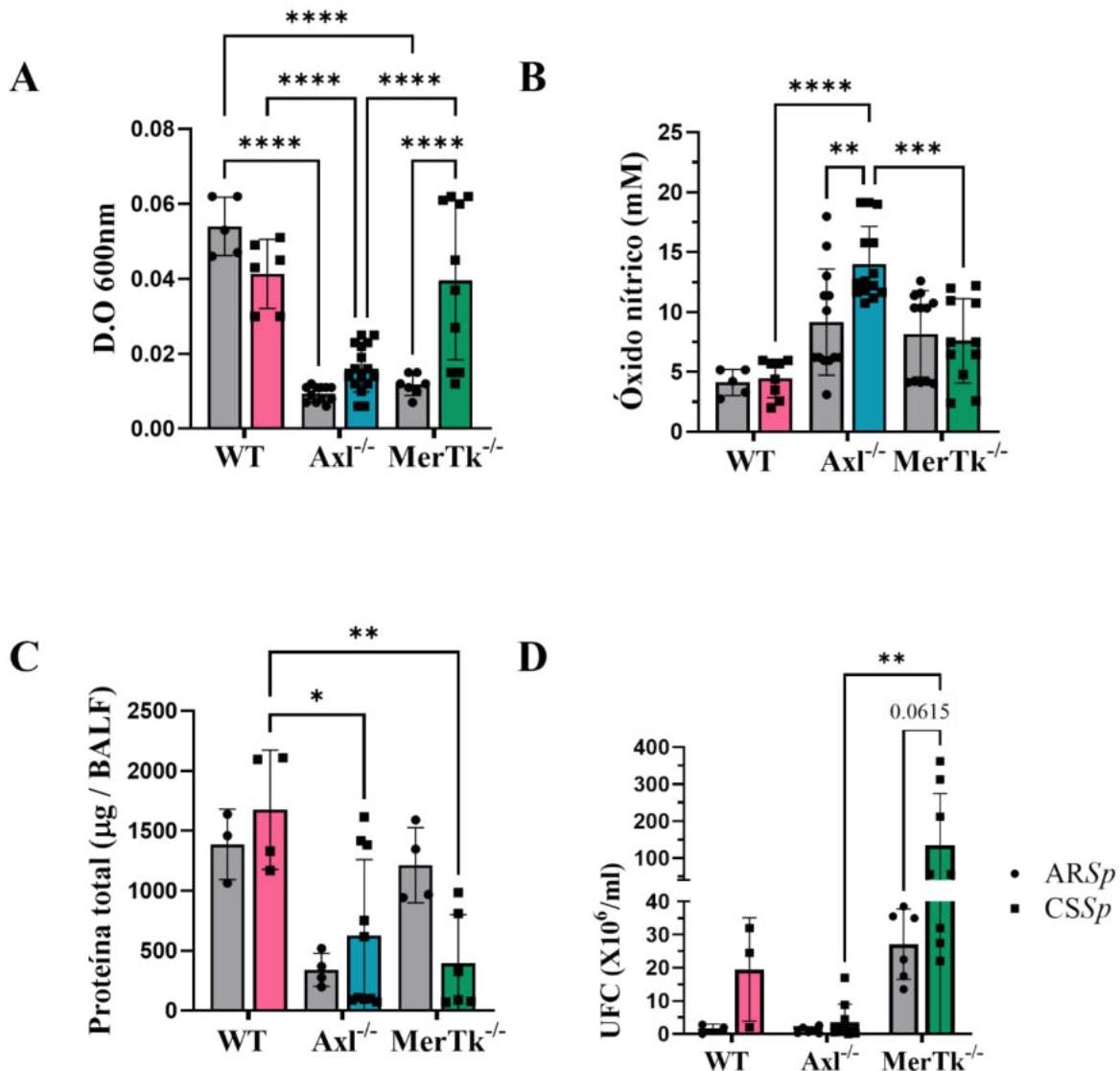


Figura 13: Análise da turbidez, produção de nitritos, concentração de proteínas totais e unidades formadoras de colônia (UFC) presentes nos BALFs após o protocolo agudo de exposição a fumaça de cigarro seguido de infecção bacteriana. No 3º dia pós-infecção, camundongos WT, Axl^{-/-} e MerTk^{-/-} expostos ao AR ou à CS foram eutanasiados e submetidos a 5 lavados broncoalveolares. Com o material coletado foi feita a análise da turbidez (A), produção de nitritos (B), concentração de proteínas totais (C) e UFC (D). Os dados representam três experimentos independentes com resultados semelhantes. Diferenças significativas entre os grupos foram indicadas por **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 e foram analisadas por ANOVA seguido de pós-teste Tukey. WT: selvagens; BALF: fluidos dos lavados broncoalveolares.

5.3 Prévia exposição à fumaça de cigarro induz remodelamento da dinâmica de populações de células imune na mucosa pulmonar de animais Axl^{-/-} e MerTk^{-/-} com pneumonia

Os BALFs também foram empregados para a quantificação e caracterização das populações de células do sistema imunológico presentes nas vias aéreas, mais especificamente de macrófagos alveolares residentes (AMs), macrófagos alveolares

derivados de monócitos (moAMs), macrófagos intersticiais derivados de monócitos (moIMs) e os neutrófilos. Tal análise foi feita utilizando citometria de fluxo a partir da marcação das amostras com anticorpos para permitir a distinção entre as populações de células. Para isso, utilizamos os anticorpos anti-SiglecF, anti-F4/80, anti-CD11b, anti-Ly6G e anti-Ly6C para caracterizar os AMs residentes ($\text{SiglecF}^+ \text{CD11c}^+ \text{CD11b}^-$), moAMs ($\text{SiglecF}^+ \text{CD11c}^+ \text{CD11b}^+$), IMs residentes ($\text{SiglecF}^- \text{CD11c}^{+/-} \text{CD11b}^+ \text{F4/80}^+ \text{Ly6C}^-$), moIMs ($\text{SiglecF}^- \text{CD11c}^{+/-} \text{CD11b}^+ \text{F4/80}^+ \text{Ly6C}^+$) e os neutrófilos ($\text{SiglecF}^- \text{CD11c}^- \text{CD11b}^+ \text{Ly6G}^+$).

Ao avaliarmos a quantidade de células totais nos BALFs dos camundongos, constatamos um número elevado de células totais nos camundongos $\text{Axl}^{/-}$ expostos à fumaça e infectados quando comparados com seu respectivo controle e com os camundongos WT e $\text{MerTk}^{/-}$ que foram submetidos aos mesmos processos (**Figura 16A**). Além disso, encontramos uma menor quantidade de AMs residentes nos BALFs de todos os grupos de camundongos infectados com *S.pneumoniae* (CS*Sp*) quando comparados aos seus grupos expostos ao AR que foram infectados com a bactéria (AR*Sp*) (**Figura 16B**). No entanto, o grupo CS*Sp*- $\text{Axl}^{/-}$ obteve um aumento de moAMs e neutrófilos, enquanto houve uma redução significativa dessas populações no grupo CS*Sp*- $\text{MerTk}^{/-}$ (**Figura 16C e 16E**). Finalmente, não observamos nenhuma diferença no número de moIMs nos grupos avaliados (**Figura 16D**). Dessa maneira, o quadro de pneumonia estabelecido após a exposição à fumaça de cigarro induziu maior recrutamento de células fagocíticas e potencialmente microbicidas em animais $\text{Axl}^{/-}$ e WT em relação aos $\text{MerTk}^{/-}$ submetidos ao mesmo protocolo, o que poderia explicar a maior suscetibilidade à pneumonia pneumocócica neste grupo.

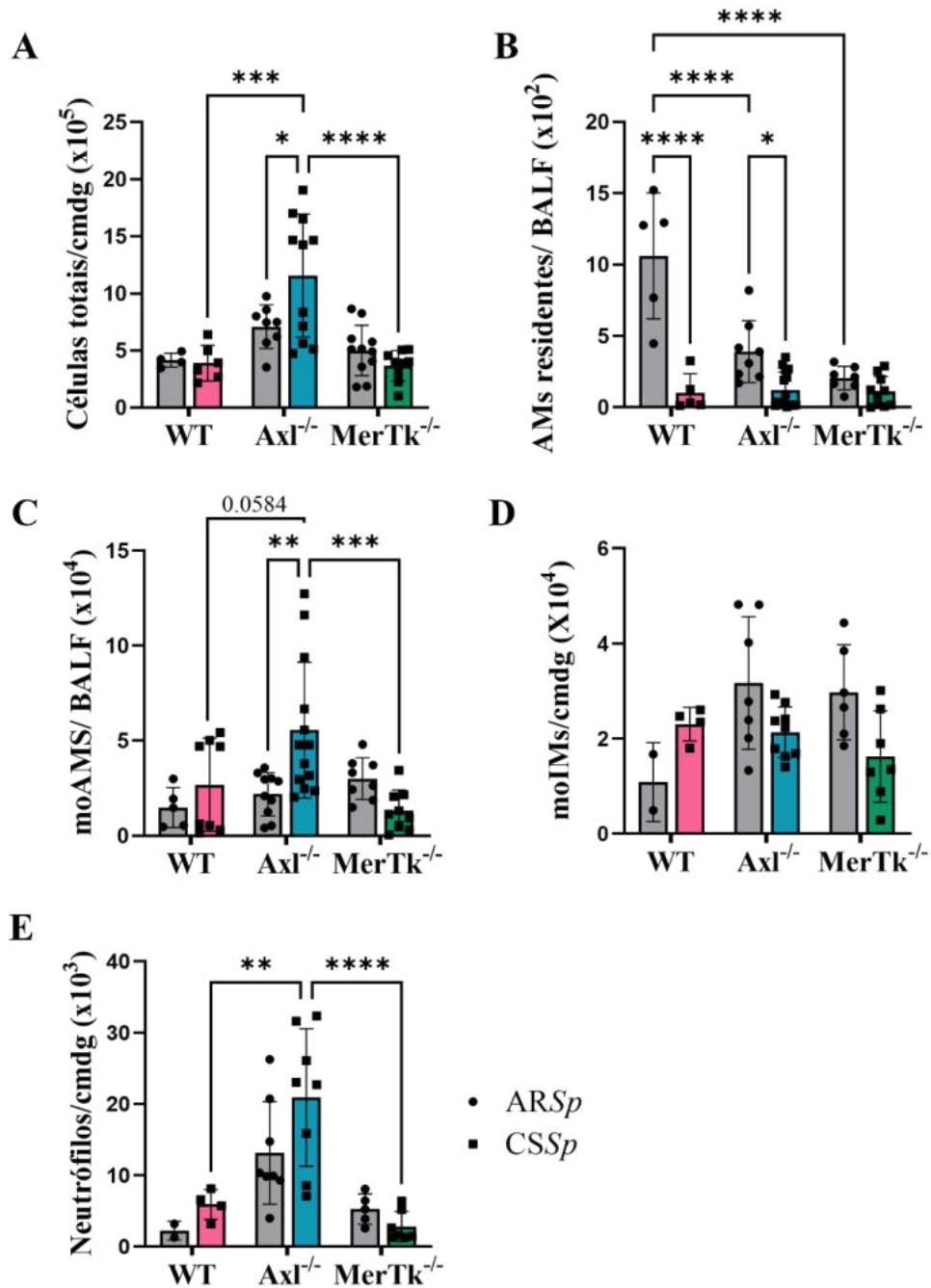


Figura 16: Quantificação e caracterização das populações de células dos BALFs após a exposição à fumaça de cigarro seguida pela infecção por *S. pneumoniae*. No 3º dia pós-infecção, células dos BALFs de camundongos WT, Axl^{-/-} e MerTk^{-/-} expostos ao AR ou à CS foram contadas (A) e caracterizadas a partir da marcação com anticorpos conjugados a fluorocromos anti-SiglecF, anti-F4/80, anti-CD11b, anti-Ly6G e anti-Ly6C para a identificação de (B) AMs residentes (SiglecF⁺CD11c⁺CD11b⁻), (C) moAMs (SiglecF⁺CD11c⁺CD11b⁺), (D) IMs derivados de monócitos (SiglecF⁻CD11c^{+/}CD11b⁺F4/80⁺Ly6C⁺), e (E) neutrófilos (SiglecF⁻CD11c CD11b⁺Ly6G⁺) por citometria de fluxo. Os dados representam a junção dois experimentos independentes com resultados semelhantes. Diferenças significativas entre os grupos foram indicadas por *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 e foram analisadas por ANOVA seguido de pós-teste Tukey. WT: selvagens; BALFs: fluidos dos lavados broncoalveolares; AMs: macrófagos alveolares;

moAMs: macrófagos alveolares derivados de monócitos; moIMs: macrófagos intersticiais derivados de monócitos; WT: selvagens.

5.4 A exposição à fumaça de cigarro estimula a produção de IL-6 em camundongos Axl^{-/-} e de IL-10 nos camundongos MerTk^{-/-} infectados com *S. pneumoniae*

Avaliamos as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α presentes nos BALFs pela técnica de ELISA do tipo sanduíche. Verificamos que BALFs de camundongos do grupo CSSp-Axl^{-/-} apresentaram maiores concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (Figura 17A) e IL-6 (Figura 17B) quando comparados com seu controle (ARSp-Axl^{-/-}) e com os grupos CSSp-WT e CSSp-MerTk^{-/-}. Por outro lado, os animais CSSp-MerTk^{-/-} apresentaram níveis mais elevados da citocina regulatória IL-10 em seus BALFs em relação ao seu controle (ARSp-MerTk^{-/-}) e aos grupos CSSp-WT e CSSp-Axl^{-/-} (Figura 17D). Vale ressaltar que ainda observamos uma redução dos níveis de TNF no grupo CSSp-Axl^{-/-} em relação ao seu grupo AR (Figura 17C). Juntamente com os resultados anteriores, esses dados sugerem que camundongos CSSp-Axl^{-/-} apresentam um perfil celular e de citocinas mais pró- inflamatório se comparados aos animais CSSp-MerTk^{-/-}.

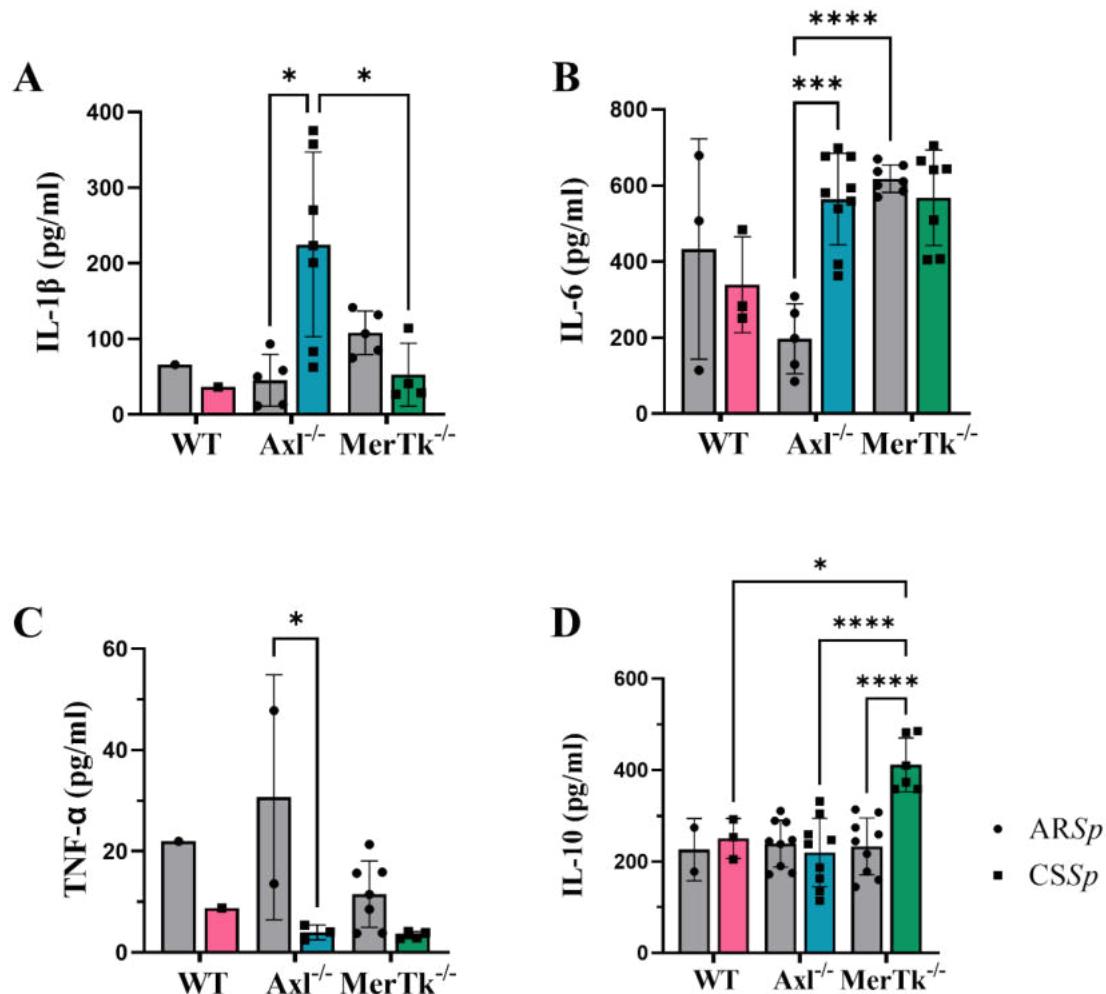


Figura 17: Dosagem de citocinas IL-1 β , IL-6, TNF e IL-10 a partir dos BALFs dos camundongos após a exposição à fumaça de cigarro e infecção bacteriana. Os primeiros fluidos de BALs obtidos no 3º dia pós-infecção de camundongos WT, Axl-/- e MerTk-/- expostos ao AR ou à CS foram utilizadas para a dosagem das citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF (C) e IL-10 (D). Os dados representam dois experimentos independentes com resultados semelhantes. Diferenças significativas entre os grupos foram indicadas por *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 e foram analisadas por ANOVA seguido de pós-teste Tukey. WT: selvagens; BALFs: fluidos dos lavados broncoalveolares.

5.5 moAMs deficientes para os receptores Axl e MerTk possuem menor atividade fagocítica e killing

Para investigar o perfil fenotípico-funcional da subpopulação de moAMs, majoritariamente encontrada nos BALFs após inalação de fumaça de cigarro, nós plaqueamos as células dos BALFs e após 1:30h em cultura, removemos as células não aderentes. Consideramos as fracamente aderentes como moAMs. Inicialmente, avaliamos o perfil de ativação dos moAMs baseado na expressão de MHC-II (M1) e CD206 (M2). Observamos um percentual maior de moAMs expressando ambos, MHC-II e CD206 (M1/M2) nos BALFs de camundongos CS-Axl^{-/-} e CS-MerTk^{-/-}, comparados aos CS-WT, que por sua vez, apresentam um percentual maior de moAMs MHC-II+ (M1) (Figura 18A).

Nós então, infectamos os moAMs *in vitro* com *S. pneumoniae* (MOI 1:10.000) para avaliar sua atividade fagocítica e microbicida. Verificamos que os moAMs deficientes para os receptores Axl ou MerTk apresentam uma menor internalização de bactérias, comparados aos moAMs derivados de WT (Figura 18B). Em contrapartida, observamos que o killing intracelular bacteriano não segue esse padrão, ou seja, macrófagos deficientes para os receptores da família TAM possem maior capacidade de killing em relação aos advindos de animais WT, com destaque para as células MerTk^{-/-} (Figura 18C). Dessa forma, realizamos uma razão entre as médias da atividade fagocítica e de killing intracelular bacteriano de macrófagos WT, Axl^{-/-} e MerTk^{-/-} e notamos que, de acordo com as bactérias que são internalizadas, os macrófagos MerTk^{-/-} apresentam menor killing (Figura 18D).

A

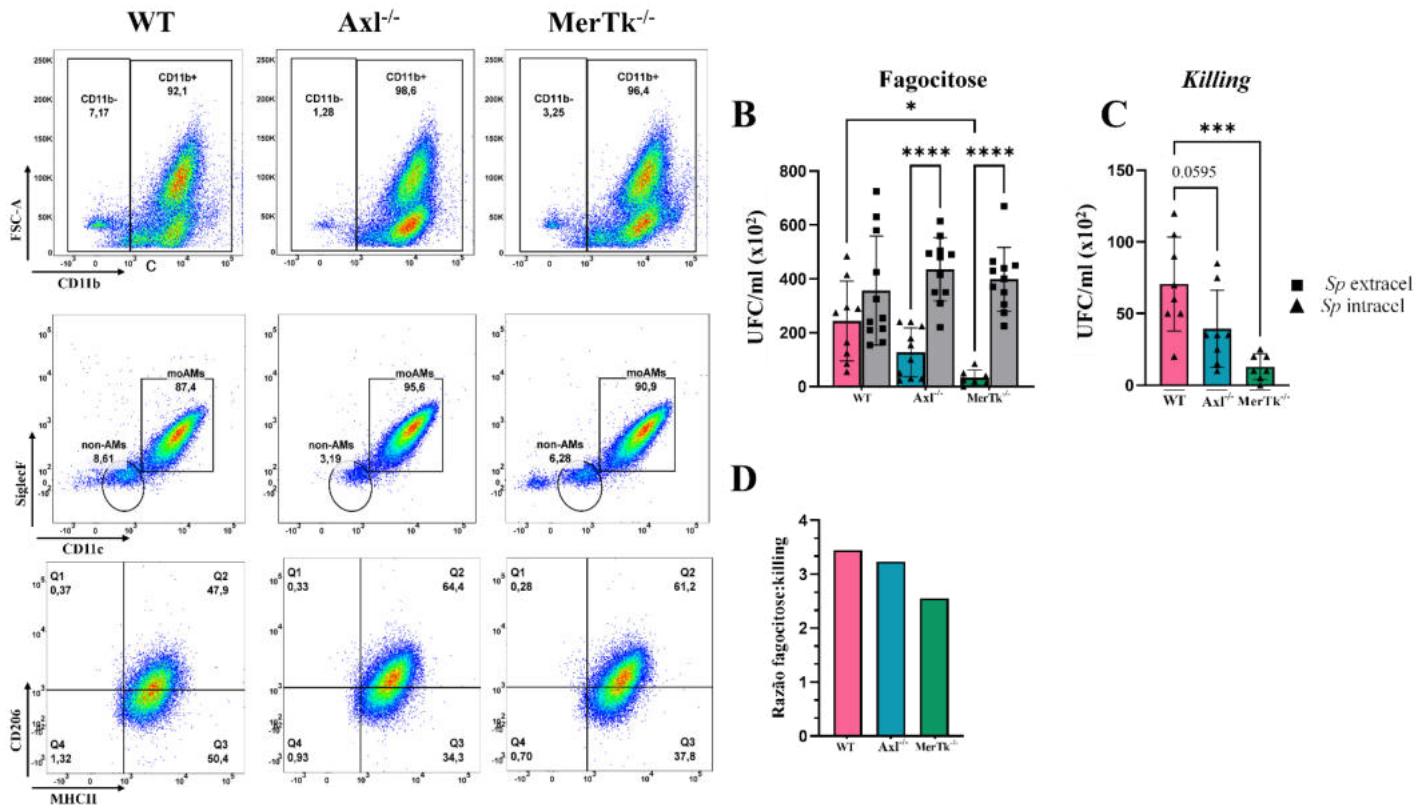


Figura 18: Análise das subpopulações presentes nos BALFs dos camundongos expostos à fumaça de cigarro e das unidades formadoras de colônias presentes nos lisados celulares (*Sp* intracel) e sobrenadantes (*Sp* extracel) dessas amostras submetidas aos ensaios funcionais. Recuperamos 5 lavados broncoalveolares de camundongos WT, Axl^{-/-} e MerTk^{-/-}, plaqueamos 1×10^5 células/poço e prosseguimos com o desafio *ex vivo* com *S. pneumoniae*. Antes do ensaio, realizamos uma citometria para averiguar as subpopulações (A). Para avaliar os resultados, depositamos o lisado em placas de petri com ágar sangue e contamos a formação de UFCs. As amostras foram utilizadas para avaliarmos a atividade fagocítica (B), o killing bacteriano intracelular (C) e a razão entre ambos os parâmetros (D). Diferenças significativas entre os grupos foram indicadas por *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 e foram analisadas por ANOVA seguido de pós-teste Tukey. WT: selvagens; BALFs: fluidos dos lavados broncoalveolares.

6. DISCUSSÃO

Nossos dados sugerem que animais deficientes para o receptor MerTk apresentam maior suscetibilidade a pneumonia pneumocócica após exposição aguda à fumaça de cigarro. Apesar de não haver dados na literatura que descrevam o papel desse receptor no contexto descrito, AngeliKi Kaseros demonstrou que amostras de BALFs de indivíduos fumantes apresentam superexpressão do receptor MerTk nos macrófagos alveolares, visto que a exposição à fumaça de cigarro aumenta a demanda de remoção de células apoptóticas (Kazeros et al., 2008). Além disso, já se sabe que pneumonias estreptocócicas são muito comuns e graves em tabagistas, que apresentam um alto processo inflamatório que, em muitos casos, pode levar à morte (Stattin et al., 2024). Logo, a ausência do receptor MerTk pode ter um papel no desenvolvimento de danos teciduais e perda de função celulares devido à fumaça de cigarro, o que impacta diretamente o sistema imunológico da mucosa pulmonar, tornando esse sítio mais suscetível às infecções.

O recrutamento de moAMs (Aegerter et al., 2020) neutrófilos para as vias aéreas durante a pneumonia está relacionando com uma resolução da infecção (Garvy & Harmsen, 1996). Os dados apresentados no presente estudo apontam que o grupo *CSSp-MerTk^{-/-}* apresentou um menor recrutamento de células, mais especificadamente, moAMs e neutrófilos quando comparados com os animais do grupo *CSSp-Axl^{-/-}*. Isso pode estar relacionado com a maior suscetibilidade dos animais *MerTk^{-/-}* à pneumonia pneumocócica, que se reflete na diminuição da sobrevivência e na elevada contagem de UFCs.

Durante o desenvolvimento da pneumonia, a citocina IL-10 foi associada com os prognósticos de doença severa (Dao* et al., 2023). Em nossos experimentos, relatamos uma alta concentração da citocina regulatória IL-10 nos animais *CSSp-MerTk^{-/-}*. Já camundongos do grupo *CSSp-Axl^{-/-}* apresentaram elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas, IL-6, que contribui para a defesa do hospedeiro em infecções por *S. pneumoniae* (van der Poll et al., 1997).

De acordo com a literatura, a fumaça de cigarro acarreta diversos danos teciduais e perdas de função celular, dentre elas estão a diminuição da capacidade de fagocítica e, consequente, de killing bacteriano (Phipps et al., 2010) (Bewley et al., 2017). Observamos esse mesmo padrão, tendo em vista a redução de atividade fagocítica nos macrófagos *Axl^{-/-}* e *MerTk^{-/-}* em relação aos WT.

No entanto, nossos dados demonstram que macrófagos deficientes para o receptor MerTk apresentam maior killing quando comparados com animais WT. Esse fenômeno pode ser explicado a partir da razão entre atividade fagocítica e killing intracelular, sendo as células *MerTk^{-/-}* com a menor razão, ou seja, apresentam menor fagocitose e killing. Apesar da contradição entre os dados, o killing desses macrófagos é elevado quando avaliado separadamente porque essas células internalizam menos bactérias.

Em resumo, os receptores Axl e MerTk desempenham papéis importantes frente à inflamação e infecção, mas se diferem apesar de pertencerem à mesma classificação. Isso se reflete na resistência apresentada pelos camundongos do grupo *CSSp-Axl^{-/-}*, com baixa UFC, elevado nível de recrutamento celular (moAMs e neutrófilos) e citocinas pró-inflamatórias. Em contrapartida, animais do grupo *CSSp-MerTk^{-/-}* obtiveram altos índices de UFC, perda de integridade do epitélio pulmonar e baixo recrutamento de células. Além disso, nos experimentos *ex vivo* observamos a redução das atividades fagocítica e de *killing* intracelular bacteriano de macrófagos derivados de monócitos *Axl^{-/-}* e *MerTk^{-/-}* recrutados após o estabelecimento dos efeitos da exposição à fumaça de cigarro, sendo os *MerTk^{-/-}* mais prejudicados. Dessa maneira, nossos dados sugerem que a ausência do receptor MerTk acentua a susceptibilidade à pneumonia pneumocócica no contexto do tabagismo.

7. CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que o receptor MerTk é importante para a fagocitose e o *killing* bacteriano em subpopulações de macrófagos. Além disso, esse receptor regula a liberação de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, bem como o recrutamento de células fagocíticas, processos que, em conjunto, podem contribuir para o controle da infecção pulmonar por *S. pneumoniae* em camundongos previamente expostos à fumaça de cigarro.

8. REFERÊNCIAS

Aegerter, H., Kulikauskaite, J., Crotta, S., Patel, H., Kelly, G., Hessel, E. M., Mack, M., Beinke, S., & Wack, A. (2020). Influenza-induced monocyte-derived alveolar macrophages confer prolonged antibacterial protection. *Nature Immunology*, 21(2), 145–157. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0568-x>

Amatngalim, G., & Hiemstra, P. (2018). Airway Epithelial Cell Function and Respiratory Host Defense in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. In *Chinese Medical Journal* (Vol. 131, Issue 9, pp. 1099–1107). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.230743>

Aoshiba, K., Tamaoki, J., & Nagai, A. (2001). *Acute cigarette smoke exposure induces apoptosis of alveolar macrophages*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.281.6.11392>

Arredouani, M., Yang, Z., Ning, Y., Qin, G., Soininen, R., Tryggvason, K., & Kobzik, L. (2004). The Scavenger Receptor MARCO Is Required for Lung Defense against Pneumococcal Pneumonia and Inhaled Particles. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(2), 267–272. <https://doi.org/10.1084/jem.20040731>

Bai, X., Wei, H., Liu, W., Coker, O. O., Gou, H., Liu, C., Zhao, L., Li, C., Zhou, Y., Wang, G., Kang, W., Ng, E. K. W., & Yu, J. (2022a). Cigarette smoke promotes colorectal cancer through modulation of gut microbiota and related metabolites. *Gut*, 71(12), 2439–2450. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-325021>

Bai, X., Wei, H., Liu, W., Coker, O. O., Gou, H., Liu, C., Zhao, L., Li, C., Zhou, Y., Wang, G., Kang, W., Ng, E. K., & Yu, J. (2022b). Cigarette smoke promotes colorectal cancer through modulation of gut microbiota and related metabolites. *Gut*, 71(12), 2439–2450. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-325021>

Bardales, R. H., Xie, S. S., Schaefer, R. F., & Hsu, S. M. (1996). Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury. *The American Journal of Pathology*, 149(3), 845–852.

Bewley, M. A., Preston, J. A., Mohasin, M., Marriott, H. M., Budd, R. C., Swales, J., Collini, P., Greaves, D. R., Craig, R. W., Brightling, C. E., Donnelly, L. E., Barnes, P. J., Singh, D., Shapiro, S. D., Whyte, M. K. B., & Dockrell, D. H. (2017). Impaired Mitochondrial Microbicidal Responses in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Macrophages. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 196(7), 845–855. <https://doi.org/10.1164/rccm.201608-1714OC>

Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Vitale, L., Pelleri, M. C., Tassani, S., Piva, F., Perez-Amodio, S., Strippoli, P., & Canaider, S.

(2013). An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of Human Biology*, 40(6), 463–471. <https://doi.org/10.3109/03014460.2013.807878>

Blériot, C., Chakarov, S., & Ginhoux, F. (2020). Determinants of Resident Tissue Macrophage Identity and Function. *Immunity*, 52(6), 957–970. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.014>

Blumenthal, R. L., Campbell, D. E., Hwang, P., DeKruyff, R. H., Frankel, L. R., & Umetsu, D. T. (2001). Human alveolar macrophages induce functional inactivation in antigen-specific CD4 T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(2), 258–264. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.112845>

Boada-Romero, E., Martinez, J., Heckmann, B. L., & Green, D. R. (2020). The clearance of dead cells by efferocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(7), 398–414. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0232-1>

Bogaert, D., van Belkum, A., Sluijter, M., Luijendijk, A., de Groot, R., Rümke, H., Verbrugh, H., & Hermans, P. (2004). Colonisation by Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus in healthy children. *The Lancet*, 363(9424), 1871–1872. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16357-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16357-5)

Caliri, A. W., Tommasi, S., & Besaratinia, A. (2021). Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*, 787, 108365. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108365>

Coleman, M. M., Ruane, D., Moran, B., Dunne, P. J., Keane, J., & Mills, K. H. G. (2013). Alveolar macrophages contribute to respiratory tolerance by inducing FoxP3 expression in naive T cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 48(6), 773–780. <https://doi.org/10.1165/rccb.2012-0263OC>

Dao*, B. N., Le, H. D. T., Nguyen*, K. X., Viet, T. T., Tran, C. T., Luong, T. C., Le, T. D., Nguyen, S. T., Vu, H. N., Pham, N. T. K., Nguyen, A. Van, Dinh, H. T., Tong, T. T., Nguyen, M. L. T., & Ta*, T. B. (2023). Relationship between serum TNF- α , IL-6, and IL- 10 levels and disease severity, and changes in the cytokines after treatment in patients with bacterial community-acquired pneumonia. *Pneumon*, 36(4), 1–8. <https://doi.org/10.18332/pne/170181>

Davis, J. D., & Wypych, T. P. (2021). Cellular and functional heterogeneity of the airway epithelium. In *Mucosal Immunology* (Vol. 14, Issue 5, pp. 978–990). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-00370-7>

Dechanet, C., Anahory, T., Mathieu Daude, J. C., Quantin, X., Reyftmann, L., Hamamah, S., Hedon, B., & Dechaud, H. (2011). Effects of cigarette smoking on reproduction. *Human Reproduction Update*, 17(1), 76–95. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq033>

Dick, S. A., Wong, A., Hamidzada, H., Nejat, S., Nechanitzky, R., Vohra, S., Mueller, B., Zaman, R., Kantores, C., Aronoff, L., Momen, A., Nechanitzky, D., Li, W. Y., Ramachandran, P., Crome, S. Q., Becher, B., Cybulsky, M. I., Billia, F., Keshavjee, S., ... Epelman, S. (2022). Three tissue resident macrophage subsets coexist across organs with conserved origins and life cycles. *Science Immunology*, 7(67). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abf7777>

Ding, A. H., Nathan, C. F., & Stuehr, D. J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *The Journal of Immunology*, 141(7), 2407–2412. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.141.7.2407>

Doran, A. C., Yurdagul, A., & Tabas, I. (2020). Efferocytosis in health and disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 20, Issue 4, pp. 254–267). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0240-6>

Drope, J., Liber, A. C., Cahn, Z., Stoklosa, M., Kennedy, R., Douglas, C. E., Henson, R., & Drope, J. (2018). Who's still smoking? Disparities in adult cigarette smoking prevalence in the United States. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(2), 106–115. <https://doi.org/10.3322/caac.21444>

Engholm, D. H., Kilian, M., Goodsell, D. S., Andersen, E. S., & Kjærgaard, R. S. (2017). A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(6), 854–879. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux037>

Franke-Ullmann, C., Pfortner, C., Walter, P., Steinmuller, C., Lohmann-Matthes, M.-L., & Kobzik, L. (1996). Characterization of Murine Lung Interstitial Macrophages Comparison with Alveolar Macrophages In Vitro in. In *The Journal of Immunology* (Vol. 157). <http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/157/7/3097/1074205/3097.pdf>

Garvy, B. A., & Harmsen, A. G. (1996). The importance of neutrophils in resistance to pneumococcal pneumonia in adult and neonatal mice. *Inflammation*, 20(5), 499–512. <https://doi.org/10.1007/BF01487042>

Gibbings, S. L., Thomas, S. M., Atif, S. M., McCubbrey, A. L., Desch, A. N., Danhorn, T., Leach, S. M., Bratton, D. L., Henson, P. M., Janssen, W. J., & Jakubzick, C. V. (2017). Three unique interstitial macrophages in the murine lung at steady state. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 57(1), 66–76. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0361OC>

Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *Journal of Hygiene*, 27(2), 113–159. <https://doi.org/10.1017/S0022172400031879>

Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2013). Alveolar macrophages develop

from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *Journal of Experimental Medicine*, 210(10), 1977–1992. <https://doi.org/10.1084/jem.20131199>

Harris, J. O., Swenson, E. W., & Johnson, J. E. (1970). Human alveolar macrophages: comparison of phagocytic ability, glucose utilization, and ultrastructure in smokers and nonsmokers. *Journal of Clinical Investigation*, 49(11), 2086–2096. <https://doi.org/10.1172/JCI106426>

Hautamaki, R. D., Kobayashi, D. K., Senior, R. M., & Shapiro, S. D. (1997). Requirement for Macrophage Elastase for Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice. *Science*, 277(5334), 2002–2004. <https://doi.org/10.1126/science.277.5334.2002>

Hellermann, G. R., Nagy, S. B., Kong, X., Lockey, R. F., & Mohapatra, S. S. (2002). Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respiratory Research*, 3(1), 15. <https://doi.org/10.1186/rr172>

Hiemstra, P. S., McCray, P. B., & Bals, R. (2015). The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *European Respiratory Journal*, 45(4), 1150–1162. <https://doi.org/10.1183/09031936.00141514>

Hong, K. U., Reynolds, S. D., Watkins, S., Fuchs, E., & Stripp, B. R. (2004). In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286(4), L643–L649. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00155.2003>

Huang, M., Rigby, A. C., Morelli, X., Grant, M. A., Huang, G., Furie, B., Seaton, B., & Furie, B. C. (2003). Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K-dependent proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(9), 751–756. <https://doi.org/10.1038/nsb971>

Hume, P. S., Gibbings, S. L., Jakubzick, C. V., Tuder, R. M., Curran-Everett, D., Henson, P. M., Smith, B. J., & Janssen, W. J. (2020). Localization of Macrophages in the Human Lung via Design-based Stereology. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 201(10), 1209–1217. <https://doi.org/10.1164/rccm.201911-2105OC>

Hussell, T., & Bell, T. J. (2014). Alveolar macrophages: Plasticity in a tissue-specific context. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 14, Issue 2, pp. 81–93). <https://doi.org/10.1038/nri3600>

Instituto Nacional de Câncer. (2022, June 6). *Tabagismo*. <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/tabagismo>

Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C., & Andrew, P. W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), 288–301. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1871>

Kawano, H., Kayama, H., Nakama, T., Hashimoto, T., Umemoto, E., & Takeda, K. (2016). IL-10-producing lung interstitial macrophages prevent neutrophilic asthma. *International Immunology*, 28(10), 489–501. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw012>

Kazeros, A., Harvey, B.-G., Carolan, B. J., Vanni, H., Krause, A., & Crystal, R. G. (2008). Overexpression of Apoptotic Cell Removal Receptor MERTK in Alveolar Macrophages of Cigarette Smokers. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 39(6), 747–757. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0306OC>

Kimura, S. (2018). Molecular insights into the mechanisms of M-cell differentiation and transcytosis in the mucosa-associated lymphoid tissues. *Anatomical Science International*, 93(1), 23–34. <https://doi.org/10.1007/s12565-017-0418-6>

KNIGHT, D. A., & HOLGATE, S. T. (2003). The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease. *Respirology*, 8(4), 432–446. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1843.2003.00493.x>

Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., D’Herde, K., & Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44(3), 205–221. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.12.001>

Lapraz, F., Röttinger, E., Duboc, V., Range, R., Duloquin, L., Walton, K., Wu, S.-Y., Bradham, C., Loza, M. A., Hibino, T., Wilson, K., Poustka, A., McClay, D., Angerer, L., Gache, C., & Lepage, T. (2006). RTK and TGF- β signaling pathways genes in the sea urchin genome. *Developmental Biology*, 300(1), 132–152. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.048>

Laskin, D. L., Weinberger, B., & Laskin, J. D. (2001). Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 70(2), 163–170. <https://doi.org/10.1189/jlb.70.2.163>

Lee, S. Y., Miller, M., Cho, J. Y., Song, D. J., Karin, M., & Broide, D. H. (2010). Inactivation of I κ B-kinase- β dependent genes in airway epithelium reduces tobacco smoke induced acute airway inflammation. *International Immunopharmacology*, 10(8), 906–912. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.05.001>

Leiva-Juárez, M. M., Kolls, J. K., & Evans, S. E. (2018). Lung epithelial cells: Therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense. In *Mucosal Immunology* (Vol. 11, Issue 1, pp. 21–34). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.71>

Lemke, G. (2013). Biology of the TAM Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(11), a009076–a009076. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009076>

Lemke, G. (2017). Phosphatidylserine Is the Signal for TAM Receptors and Their Ligands. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(9), 738–748. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.06.004>

Lemke, G. (2019a). How macrophages deal with death. *Nature Reviews Immunology*, 19(9), 539–549. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0167-y>

Lemke, G. (2019b). How macrophages deal with death. *Nature Reviews Immunology*, 19(9), 539–549. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0167-y>

Lemke, G., & Rothlin, C. V. (2008). Immunobiology of the TAM receptors. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 8, Issue 5, pp. 327–336). <https://doi.org/10.1038/nri2303>

Levy, D. E., & Darnell, J. E. (2002). STATs: transcriptional control and biological impact. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(9), 651–662. <https://doi.org/10.1038/nrm909>

Lockshin, R. A., & Zakeri, Z. (2001). Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(7), 545–550. <https://doi.org/10.1038/35080097>

Lugg, S. T., Scott, A., Parekh, D., Naidu, B., & Thickett, D. R. (2022). Cigarette smoke exposure and alveolar macrophages: Mechanisms for lung disease. In *Thorax* (Vol. 77, Issue 1, pp. 94–101). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-216296>

Metcalfe, H. J., Lea, S., Hughes, D., Khalaf, R., Abbott-Banner, K., & Singh, D. (2014). Effects of cigarette smoke on Toll-like receptor (TLR) activation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) macrophages. *Clinical and Experimental Immunology*, 176(3), 461–472. <https://doi.org/10.1111/cei.12289>

Miah, K. M., Hyde, S. C., & Gill, D. R. (2019). Emerging gene therapies for cystic fibrosis. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 13(8), 709–725. <https://doi.org/10.1080/17476348.2019.1634547>

Minematsu, N., Blumenthal-Perry, A., & Shapiro, S. D. (2011). Cigarette Smoke Inhibits Engulfment of Apoptotic Cells by Macrophages through Inhibition of Actin Rearrangement. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 44(4), 474–482. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0463OC>

Ministério da Saúde. (2024). *Meningite no Brasil*. <https://bit.ly/painel-meningites>,

Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., & Nagata, S. (2007). Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*, 450(7168), 435–439. <https://doi.org/10.1038/nature06307>

Mohan Sopori. (2002). Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 2. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nri803>

Montoro, D. T., Haber, A. L., Biton, M., Vinarsky, V., Lin, B., Birket, S. E., Yuan, F., Chen, S., Leung, H. M., Villoria, J., Rogel, N., Burgin, G., Tsankov, A. M., Waghray, A., Slyper, M., Waldman, J., Nguyen, L., Dionne, D., Rozenblatt-Rosen, O., ... Rajagopal, J. (2018). A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature*, 560(7718), 319–324. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0393-7>

Moon, B., Yang, S., Moon, H., Lee, J., & Park, D. (2023). After cell death: the molecular machinery of efferocytosis. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 55, Issue 8, pp. 1644–1651). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01070-5>

Nagata, K., Ohashi, K., Nakano, T., Arita, H., Zong, C., Hanafusa, H., & Mizuno, K. (1996). Identification of the Product of Growth Arrest-specific Gene 6 as a Common Ligand for Axl, Sky, and Mer Receptor Tyrosine Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 271(47), 30022–30027. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.47.30022>

Nakaya, M., Tanaka, M., Okabe, Y., Hanayama, R., & Nagata, S. (2006). Opposite Effects of Rho Family GTPases on Engulfment of Apoptotic Cells by Macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), 8836–8842. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510972200>

Neupane, A. S., Willson, M., Chojnacki, A. K., Vargas E Silva Castanheira, F., Morehouse, C., Carestia, A., Keller, A. E., Peiseler, M., DiGiandomenico, A., Kelly, M. M., Amrein, M., Jenne, C., Thanabalasuriar, A., & Kubes, P. (2020). Patrolling Alveolar Macrophages Conceal Bacteria from the Immune System to Maintain Homeostasis. *Cell*, 183(1), 110-125.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.020>

Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(12), 3448–3459. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>

Nunes, S., Sá-Leão, R., Carriço, J., Alves, C. R., Mato, R., Avô, A. B., Saldanha, J., Almeida, J. S., Sanches, I. S., & de Lencastre, H. (2005). Trends in Drug Resistance, Serotypes, and Molecular Types of *Streptococcus pneumoniae* Colonizing Preschool-Age Children Attending Day Care Centers in Lisbon, Portugal: a Summary of 4 Years of Annual Surveillance. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), 1285–1293. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1285-1293.2005>

Ogunniyi, A. D., Mahdi, L. K., Trappetti, C., Verhoeven, N., Mermans, D., Van der Hoek, M. B., Plumptre, C. D., & Paton, J. C. (2012). Identification of Genes That Contribute to the Pathogenesis of Invasive Pneumococcal Disease by *In Vivo* Transcriptomic Analysis. *Infection and Immunity*, 80(9), 3268–3278. <https://doi.org/10.1128/IAI.00295-12>

Organização Mundial da Saúde. (2022). *International Classification of Diseases 11th Revision*. <https://www.who.int/classifications/classification-of-diseases>

Organização Mundial da Saúde. (2023, July 31). *Epidemia do Tabaco (OMS)*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>

Parmar, M. P., Kaur, M., Bhavanam, S., Mulaka, G. S. R., Ishfaq, L., Vempati, R., C, M. F., Kandepi, H. V., ER, R., Sahu, S., & Davalgi, S. (2023). A Systematic Review of the Effects of Smoking on the Cardiovascular System and General Health. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.38073>

Phipps, J. C., Aronoff, D. M., Curtis, J. L., Goel, D., O'Brien, E., & Mancuso, P. (2010). Cigarette smoke exposure impairs pulmonary bacterial clearance and alveolar macrophage complement-mediated phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 78(3), 1214–1220. <https://doi.org/10.1128/IAI.00963-09>

Pinto M., & Bardach A. (2024). *O tabagismo no Brasil- Morte, doença e política de preços e impostos*. tabaco.iefs.org.ar

Prasad, D., Rothlin, C. V., Burrola, P., Burstyn-Cohen, T., Lu, Q., Garcia de Frutos, P., & Lemke, G. (2006). TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 33(1), 96–108. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.06.011>

Qiu, S.-L., Zhang, H., Tang, Q., Bai, J., He, Z.-Y., Zhang, J.-Q., Li, M.-H., Deng, J.-M., Liu, G.-N., & Zhong, X.-N. (2017). Neutrophil extracellular traps induced by cigarette smoke activate plasmacytoid dendritic cells. *Thorax*, 72(12), 1084–1093. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-209887>

Rahman, I. (2003). Oxidative Stress, Chromatin Remodeling and Gene Transcription in Inflammation and Chronic Lung Diseases. *BMB Reports*, 36(1), 95–109. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2003.36.1.095>

Rawlins, E. L., Okubo, T., Xue, Y., Brass, D. M., Auten, R. L., Hasegawa, H., Wang, F., & Hogan, B. L. M. (2009). The Role of Scgb1a1+ Clara Cells in the Long-Term Maintenance and Repair of Lung Airway, but Not Alveolar, Epithelium. *Cell Stem Cell*, 4(6), 525–534. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.04.002>

Rehn, B., Bruch, J., Zou, T., & Hobusch, G. (1992). Recovery of rat alveolar macrophages by bronchoalveolar lavage under normal and activated conditions. *Environmental Health Perspectives*, 97, 11–16. <https://doi.org/10.1289/ehp.929711>

Rezende, S. M., Simmonds, R. E., & Lane, D. A. (2004). Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S–C4b binding protein complex. *Blood*, 103(4), 1192–1201. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1551>

Roberts, A. W., Lee, B. L., Deguine, J., John, S., Shlomchik, M. J., & Barton, G. M. (2017). Tissue-Resident Macrophages Are Locally Programmed for Silent Clearance of Apoptotic Cells. *Immunity*, 47(5), 913–927.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.006>

Rothlin, C. V., Ghosh, S., Zuniga, E. I., Oldstone, M. B. A., & Lemke, G. (2007). TAM Receptors Are Pleiotropic Inhibitors of the Innate Immune Response. *Cell*, 131(6), 1124–1136. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.034>

Schmeck, B., Gross, R., N'Guessan, P. D., Hocke, A. C., Hammerschmidt, S., Mitchell, T. J., Rousseau, S., Suttorp, N., & Hippenstiel, S. (2004). Streptococcus pneumoniae-Induced Caspase 6-Dependent Apoptosis in Lung Epithelium. *Infection and Immunity*, 72(9), 4940–4947. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.4940-4947.2004>

Schneider, C., O'Leary, C. E., & Locksley, R. M. (2019). Regulation of immune responses by tuft cells. *Nature Reviews Immunology*, 19(9), 584–593. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0176-x>

Schyns, J., Bai, Q., Ruscitti, C., Radermecker, C., De Schepper, S., Chakarov, S., Farnir, F., Pirottin, D., Ginhoux, F., Boeckxstaens, G., Bureau, F., & Marichal, T. (2019). Non-classical tissue monocytes and two functionally distinct populations of interstitial macrophages populate the mouse lung. *Nature Communications*, 10(1), 3964. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11843-0>

Schyns, J., Bureau, F., & Marichal, T. (2018). Lung interstitial macrophages: Past, present, and future. In *Journal of Immunology Research* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/5160794>

Shaykhiev, R., & Crystal, R. G. (2014). Early events in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: Smoking-induced reprogramming of airway epithelial basal progenitor cells. *Annals of the American Thoracic Society*, 11, S252–S258. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201402-049AW>

Shen, P., Morissette, M. C., Vanderstocken, G., Gao, Y., Hassan, M., Roos, A., Thayaparan, D., Merlano, M., Dorrington, M. G., Nikota, J. K., Bauer, C. M. T., Kwiecien, J. M., Labiris, R., Bowdish, D. M. E., Stevenson, C. S., & Stämpfli, M. R. (2016). Cigarette Smoke Attenuates the Nasal Host Response to Streptococcus pneumoniae and

Predisposes to Invasive Pneumococcal Disease in Mice. *Infection and Immunity*, 84(5), 1536–1547. <https://doi.org/10.1128/IAI.01504-15>

Shen, P., Whelan, F. J., Schenck, L. P., McGrath, J. J. C., Vanderstocken, G., Bowdish, D. M. E., Surette, M. G., & Stämpfli, M. R. (2017). Streptococcus pneumoniae colonization is required to alter the nasal microbiota in cigarette smoke exposed mice. *Infection and Immunity*, 85(10). <https://doi.org/10.1128/IAI.00434-17>

Shen, S., Shao, Y., & Li, C. (2023). Different types of cell death and their shift in shaping disease. *Cell Death Discovery*, 9(1), 284. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01581-0>

Simell, B., Kilpi, T. M., & Käyhty, H. (2002). Pneumococcal Carriage and Otitis Media Induce Salivary Antibodies to Pneumococcal Capsular Polysaccharides in Children. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(8), 1106–1114. <https://doi.org/10.1086/344235>

Simell, B., Korkeila, M., Pursiainen, H., Kilpi, T. M., & Käyhty, H. (2001). Pneumococcal Carriage and Otitis Media Induce Salivary Antibodies to Pneumococcal Surface Adhesin A, Pneumolysin, and Pneumococcal Surface Protein A in Children. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(6), 887–896. <https://doi.org/10.1086/319246>

Snelgrove, R. J., Goulding, J., Didierlaurent, A. M., Lyonga, D., Vekaria, S., Edwards, L., Gwyer, E., Sedgwick, J. D., Barclay, A. N., & Hussell, T. (2008). A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. *Nature Immunology*, 9(9), 1074–1083. <https://doi.org/10.1038/ni.1637>

Sociedade Brasileira de Imunizações. (2025). *Doença Pneumocócica*. <https://familia.sbm.org.br/doencas/doenca-pneumococica-dp#:~:text=Segundo%20a%20Organiza%C3%A7%C3%A3o%20Mundial%20da,por%20doen%C3%A7a%20preven%C3%ADvel%20por%20vacinas>.

Stattin, K., Eriksson, M., Frithiof, R., Kawati, R., Crockett, D., Hultström, M., & Lipcsey, M. (2024). Smoking is associated with higher risk of contracting bacterial infection and pneumonia, intensive care unit admission and death. *PLOS ONE*, 19(5), e0302505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302505>

Stitt, T. N., Conn, G., Goret, M., Lai, C., Bruno, J., Radzlejewski, C., Mattsson, K., Fisher, J., Gies, D. R., Jones, P. F., Masiakowski, P., Ryan, T. E., Tobkes, N. J., Chen, D. H., DiStefano, P. S., Long, G. L., Basilico, C., Goldfarb, M. P., Lemke, G., ... Yancopoulos, G. D. (1995a). The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*, 80(4), 661–670. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90520-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90520-0)

Stitt, T. N., Conn, G., Goret, M., Lai, C., Bruno, J., Radzlejewski, C., Mattsson, K., Fisher, J., Gies, D. R., Jones, P. F., Masiakowski, P., Ryan, T. E., Tobkes, N. J., Chen, D. H., DiStefano, P. S., Long, G. L., Basilico, C., Goldfarb, M. P., Lemke, G., ... Yancopoulos, G. D. (1995b). The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*, 80(4), 661–670. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90520-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90520-0)

G. D. (1995b). The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*, 80(4), 661–670. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90520-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90520-0)

Subramanian, S., Busch, C. J.-L., Molawi, K., Geirsdottir, L., Maurizio, J., Vargas Aguilar, S., Belahbib, H., Gimenez, G., Yuda, R. A. A., Burkon, M., Favret, J., Gholamhosseini, Najjar, S., de Laval, B., Kandalla, P. K., Sarrazin, S., Alexopoulou, L., & Sieweke, M. H. (2022). Long-term culture-expanded alveolar macrophages restore their full epigenetic identity after transfer in vivo. *Nature Immunology*, 23(3), 458–468. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01146-w>

Sui, P., Wiesner, D. L., Xu, J., Zhang, Y., Lee, J., Van Dyken, S., Lashua, A., Yu, C., Klein, B. S., Locksley, R. M., Deutsch, G., & Sun, X. (2018). Pulmonary neuroendocrine cells amplify allergic asthma responses. *Science*, 360(6393). <https://doi.org/10.1126/science.aan8546>

Szklo, A. S., Mendes, F. L., & Viegas, J. R. (2025). A Conta que a Indústria do Tabaco Não Conta! *Revista Brasileira de Cancerologia*, 71(2). <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2025v71n2.5129>

T. Madigan, M., M. Martinko, J., S. Bender, K., H. Buckley, D., & A. Stahl, D. (2016). *Brock Biology of Microorganisms* (14th Edition). Artmed.

Tata, P. R., Mou, H., Pardo-Saganta, A., Zhao, R., Prabhu, M., Law, B. M., Vinarsky, V., Cho, J. L., Breton, S., Sahay, A., Medoff, B. D., & Rajagopal, J. (2013). Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo. *Nature*, 503(7475), 218–223. <https://doi.org/10.1038/nature12777>

Trapnell, B. C., Carey, B. C., Uchida, K., & Suzuki, T. (2009). Pulmonary alveolar proteinosis, a primary immunodeficiency of impaired GM-CSF stimulation of macrophages. *Current Opinion in Immunology*, 21(5), 514–521. <https://doi.org/10.1016/j.coim.2009.09.004>

U.S. Department of Health and Human Services, & et al. (2010). *How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53017/>

Valença, S. S., Da Hora, K., Castro, P., Moraes, V. G., Carvalho, L., & Cristó Vão De Moraes Sobrino Porto, L. (2004). Emphysema and Metalloelastase Expression in Mouse Lung Induced by Cigarette Smoke. *Toxicologic Pathology*, 32(3), 351–356. <https://doi.org/10.1080/01926230490431466>

van der Poll, T., Keogh, C. V., Guirao, X., Buurman, W. A., Kopf, M., & Lowry, S. F. (1997). Interleukin-6 Gene-Deficient Mice Show Impaired Defense against Pneumococcal

Pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*, 176(2), 439–444. <https://doi.org/10.1086/514062>

Wang, Z.-Y., Wang, P.-G., & An, J. (2021). The Multifaceted Roles of TAM Receptors during Viral Infection. *Virologica Sinica*, 36(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00264-9>

Weiser, J. N., Ferreira, D. M., & Paton, J. C. (2018). *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nature Reviews Microbiology*, 16(6), 355–367. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0001-8>

Whitsett, J. A. (2018). Airway Epithelial Differentiation and Mucociliary Clearance. *Annals of the American Thoracic Society*, 15(Supplement_3), S143–S148. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201802-128AW>

Whitsett, J. A., & Alenghat, T. (2015). Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. In *Nature Immunology* (Vol. 16, Issue 1, pp. 27–35). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ni.3045>

Woo, Y. D., Jeong, D., & Chung, D. H. (2021). Development and functions of alveolar macrophages. *Molecules and Cells*, 44(5), 292–300. <https://doi.org/10.14348/molcells.2021.0058>

World Health Organization. (2024). *WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>

Yamane, T. (2018). Mouse yolk sac hematopoiesis. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 6, Issue JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00080>

Yoshida, T., & Tuder, R. M. (2007). *Pathobiology of Cigarette Smoke-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2006>.-Chronic

Yu, G., Phillips, S., Gail, M. H., Goedert, J. J., Humphrys, M. S., Ravel, J., Ren, Y., & Caporaso, N. E. (2017). The effect of cigarette smoking on the oral and nasal microbiota. *Microbiome*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0226-6>

ZHANG, J. H., & XU, M. (2000). DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Research*, 10(3), 205–211. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290049>