

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

**A SINALIZAÇÃO ATRAVÉS DO RECEPTOR AXL DESEMPENHA UM PAPEL
PROTETOR PARA O HOSPEDEIRO DURANTE A TUBERCULOSE EXPERIMENTAL**
(versão corrigida)

ANDRÉ APARECIDO DOS SANTOS CORREA

RIBEIRÃO PRETO

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

**A SINALIZAÇÃO ATRAVÉS DO RECEPTOR AXL DESEMPENHA UM PAPEL
PROTETOR PARA O HOSPEDEIRO DURANTE A TUBERCULOSE
EXPERIMENTAL. (versão corrigida)**

ANDRÉ APARECIDO DOS SANTOS CORREA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS, NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

ORIENTADOR: PROF. DR. DIEGO LUÍS COSTA

RIBEIRÃO PRETO

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Correa, André Aparecido dos Santos

A sinalização através do receptor Axl desempenha um papel protetor para o hospedeiro durante a tuberculose experimental. (versão corrigida) Ribeirão Preto, 2022.

66 p.

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Diego Luís Costa

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Receptores TAM. 3. Axl. 4. MerTK. 5. Gas-6. 6. Fosfatidilserina. 7. Inflamação.

**A SINALIZAÇÃO ATRAVÉS DO RECEPTOR AXL DESEMPENHA UM PAPEL
PROTETOR PARA O HOSPEDEIRO DURANTE A TUBERCULOSE EXPERIMENTAL.**

(versão corrigida)

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS, NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

APROVADO EM: _____ DE _____ DE _____.

BANCA EXAMINADORA

PROF. DR. DIEGO LUÍS COSTA
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PROF. DR. LARISSA DIAS DA CUNHA
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PROFA. DRA. ALESSANDRA D' ALMEIDA FILARDY
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

DEDICO ESSE TRABALHO AO MEUS PAIS E AMIGOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Dr. Diego Luís Costa, profissional e pessoa exemplar, pela orientação, pelos valiosos ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento científico, intelectual e pessoal. Obrigado por todo apoio.

Ao Laboratório de inflamação pulmonar, em especial a Prof. Dr. Vânia Bonato, pelas contribuições científicas e ensinamentos que contribuíram para meu crescimento científico.

Agradeço às Professoras, Dra. Larissa Dias da Cunha e Dra. Alessandra D'Almeida Filardy, pela disponibilidade de participar desta banca examinadora, que será de grande valia para os aperfeiçoamentos deste trabalho.

A minha mãe Waldirene Bispo dos Santos, pelo amor, carinho e pelos ensinamentos e exemplos os quais me definiram. Obrigado por sempre estar presente.

Aos colegas do Laboratório de inflamação pulmonar, agradeço pelas discussões científicas sobre esse trabalho e por todo ensinamento.

Agradeço minha melhor amiga de longa data Jessica, obrigado por todos os momentos e por sempre se fazer presente mesmo longe, obrigado por todo apoio e companheirismo.

Obrigado aos meus amigos que fiz na FMRP, que diretamente ou indiretamente contribuíram para esse trabalho. Marina Denadai, obrigado por todo companheirismo ao longo desse tempo, pela ajuda nos experimentos e pelas trocas de informações essenciais para contribuição desse trabalho. Gabriele Caroline da Silva, TT3 do nosso laboratório que se tornou uma amiga, obrigado. Juliana Madeira, amiga construída em meio ao caos (risos), obrigado por toda troca de informações, por todas as horas de conversas e reflexões, obrigado por todo ensinamento e principalmente por ter me apresentado a Gabriélly Trindade e a Michelle Alves, vocês fazem parte de tudo isso. Luiza Cunha, obrigado por todos os cafezinhos às 8 horas da manhã, momentos incríveis. Obrigado por tudo, grande parte do que sou hoje, tem influência de vocês.

A agência de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro fundamental para desenvolvimento deste trabalho.

O meu muito obrigado!

"QUE NADA NOS DEFINA, QUE NADA NOS SUJEITE. QUE A LIBERDADE SEJA A NOSSA PRÓPRIA SUBSTÂNCIA, JÁ QUE VIVER É SER LIVRE."

(SIMONE DE BEAUVOIR)

RESUMO

Correa, André Aparecido dos Santos Correa. **A sinalização através do receptor Axl desempenha um papel protetor para o hospedeiro durante a tuberculose experimental.** 2022. 80f. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A tuberculose (TB), causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é a doença infecciosa que mais matou pessoas na última década. Estratégias voltadas para a modulação das respostas imunes do hospedeiro têm sido propostas como terapias adjuvantes promissoras aos antibióticos, com o objetivo de otimizar o tratamento da TB. Os receptores Axl e MerTK reconhecem a fosfatidilserina ligada a Gas6 na superfície das células apoptóticas e desencadeiam sinalização intracelular anti-inflamatória e imunossupressora. O papel desses receptores na patogenia da TB é desconhecido, entretanto, considerando-se seu potencial imunorregulador, é possível que a caracterização de seu papel durante a infecção por Mtb identifique tal via como potencial alvo para intervenções imuno-farmacológicas com o objetivo de otimizar a terapia para a TB. O objetivo deste projeto, portanto foi caracterizar o papel desempenhado pelos receptores Axl e MerTK durante a TB experimental. Inicialmente observamos que a infecção de macrófagos com Mtb H37Rv induz aumento relevante da expressão de Axl, mas não de MerTK nessas células. Tal aumento ocorreu de maneira parcialmente dependente da expressão de ESAT6 pela bactéria e da ativação do receptor Toll Like Receptor 2 (TLR2) nos macrófagos infectados. In vivo, observamos que a infecção com Mtb induz aumento da expressão de Axl e MerTK principalmente em macrófagos inflamatórios, e que também ocorre acúmulo do ligante Gas6 e das formas solúveis dos receptores nos pulmões de animais infectados. Para avaliar o papel de Axl e MerTK na resistência à infecção por Mtb, inicialmente avaliamos se a deficiência dos receptores altera a resistência à infecção por Mtb in vitro em macrófagos. Observamos que células Axl^{-/-} e MerTK^{-/-} controlam de maneira mais eficiente a replicação bacteriana intracelular em comparação a células C57BL/6 na ausência de estímulos, mas na presença da ativação por IFN- γ não há diferença entre a carga bacteriana de células C57BL/6, Axl^{-/-} ou MerTK^{-/-}, embora a produção de óxido nítrico por macrófagos Axl^{-/-} ativados tenha sido maior do que a de células C57BL/6 e MerTK^{-/-}. In vivo, observamos que camundongos Axl^{-/-} exibiram mortalidade aumentada em comparação com animais C57BL/6 e MerTK^{-/-} após infecção com alta dose de Mtb. Após 3 semanas de infecção, observamos principalmente uma maior infiltração de neutrófilos nos pulmões de

camundongos Axl^{-/-} em comparação aos demais grupos. Adicionalmente, os níveis de IL-1 β e TNF- α em homogenatos de pulmão, bem como a produção de IFN- γ e TNF- α por células T CD4⁺ camundongos Axl^{-/-} foram maiores em comparação aos outros grupos. Não houve, entretanto, diferença nas cargas bacterianas pulmonares entre os grupos. Em paralelo, observamos que o bloqueio farmacológico de Axl resultou em maior suscetibilidade à TB experimental, uma vez que os animais se tornaram moribundos 24 dias após infecção, fenômeno não observado em animais tratados com veículo ou inibidor de MerTK. A mortalidade não esteve associada com descontrole de replicação do patógeno, uma vez que a carga bacteriana pulmonar foi similar em animais não tratados ou tratados com inibidores de Axl ou MerTK. Entretanto, camundongos tratados com inibidor de Axl exibiram números aumentados de neutrófilos nos pulmões em comparação com os grupos controle e tratado com inibidor de MerTK. Sendo assim, esses resultados sugerem que a sinalização através do receptor Axl desempenha papel de proteção durante a TB, ao suprimir o excesso de inflamação pulmonar, que é prejudicial para o hospedeiro durante a infecção por Mtb.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, receptores TAM, Axl, MerTK, Gas-6 e inflamação.

ABSTRACT

Correa, André Aparecido dos Santos Correa. **Signaling through Axl receptor plays a host-protective role during experimental tuberculosis.** 2022. 80f. Dissertation (Master's in Basic and Applied Immunology) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) bacilli is the infectious disease that killed most people in the last decade. Strategies aimed at modulating host immune responses have been proposed as promising adjuvant therapies to antibiotics, with the aim of optimizing the TB treatment of TB. Axl and MerTK receptors recognize phosphatidylserine bound to Gas6 on the surface of apoptotic cells and trigger intracellular anti-inflammatory and immunosuppressive signaling. The role of these receptors in the pathogenesis of TB is unknown, however, considering their immunoregulatory potential, it is possible that the characterization of their role during Mtb infection identifies this pathway as a potential target for immunopharmacological interventions with the aim of optimizing the therapy for TB. The aim of this project was to characterize the role played by Axl and MerTK receptors during experimental TB. Initially, we observed that the infection of macrophages with Mtb H37Rv induces a relevant increase in the expression of Axl, but not of MerTK in these cells. This increase was partially dependent on the expression of ESAT6 by the bacteria and on the activation of the Toll Like Receptor 2 (TLR2) in the infected macrophages. In vivo, we observed that Mtb infection induces increased expression of Axl and MerTK mainly in inflammatory macrophages, and that the ligand Gas6 and soluble forms of the receptors also accumulate in the lungs of infected animals. To assess the role of Axl and MerTK in the resistance to Mtb infection, we initially evaluated whether receptor deficiency alters resistance to Mtb infection in macrophages in vitro. We observed that Axl^{-/-} and MerTK^{-/-} cells control intracellular bacterial replication more efficiently compared to C57BL/6 cells in the absence of stimuli, but in the presence of IFN- γ activation there is no difference between the bacterial load of C57BL/6, Axl^{-/-} or MerTK^{-/-} cells, although the production of nitric oxide by activated Axl^{-/-} macrophages was higher than that of C57BL/6 and MerTK^{-/-} cells. In vivo, we observed that Axl^{-/-} mice exhibited increased mortality compared to C57BL/6 and MerTK^{-/-} mice after infection with high dose of Mtb. After 3 weeks of infection, we observed mainly a higher infiltration of neutrophils in the lungs of Axl^{-/-} mice compared to the other groups. Additionally, the levels of IL1 β and TNF in lung homogenates, as well as the production of IFN- γ and TNF- α by CD4⁺ T cells in Axl^{-/-} mice were higher compared to the other groups. There was, however, no difference in pulmonary bacterial loads among the groups. In parallel, we observed that the

pharmacological blockade of Axl resulted in higher susceptibility to experimental TB, since these animals became moribund 24 days after infection, a phenomenon that was not observed in mice treated with vehicle or MerTK inhibitor. Mortality was not associated with uncontrolled replication of the pathogen, since the pulmonary bacterial load was similar in animals untreated or treated with Axl or MerTK inhibitors. However, Axl inhibitor-treated mice exhibited increased numbers of neutrophils in the lungs compared to the control and MerTK-inhibitor-treated groups. Therefore, these results suggest that signaling through the Axl receptor plays a protective role during TB, by suppressing excess lung inflammation, which is detrimental to the host during Mtb infection.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, TAM receptors, Axl, MerTK, Gas6 and inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Incidência de casos de Tuberculose no Mundo - WHO, 2020	16
Figura 2 - Ativação dos receptores TAM.....	23
Figura 3 - Estratégia de gate usada para análise de células mieloides pulmonares murinas.....	30
Figura 4 - Expressão de Axl e MerTK em macrófagos infectados com <i>M. tuberculosis</i>.	34
Figura 5 - Modulação da morte celular, produção de citocinas, óxido nítrico e atividade microbicida macrófagos infectados com <i>M. tuberculosis</i>.....	36
Figura 6 - Caracterização da cinética de expressão Axl, MerTK, Gas6 e Pros1 durante a infecção in vivo com <i>M. tuberculosis</i>.. . . .	38
Figura 7. Avaliação do efeito da deleção de Axl e MerTK na sobrevivência, modulação do infiltrado inflamatório, carga bacteriana pulmonar, produção de citocinas por linfócitos T CD4+ e T CD8+ e na produção de citocinas pulmonares de camundongos infectados com <i>M. tuberculosis</i>.. . . .	42
Figura 8. Avaliação da liberação de NETs em pulmões de camundongos infectados com <i>M. tuberculosis</i>.. . . .	43
Figura 9. Avaliação do efeito da inibição de Axl e MerTK na modulação do infiltrado inflamatório e carga bacteriana pulmonar de camundongos infectados com <i>M. tuberculosis</i>.....	45
Figura 10. Avaliação da liberação de NETs em pulmões de camundongos infectados com <i>M. tuberculosis</i>.. . . .	46

SUMÁRIO

Sumário

1.	Introdução	14
1.1	Tuberculose	14
1.2	Aspectos epidemiológicos da tuberculose.....	15
1.3	- Patogenia da infecção por <i>M. tuberculosis</i>	17
1.4	- Reconhecimento micobacteriano por receptores celulares do sistema imune inato	17
1.5	- Resposta imune adaptativa contra micobactérias.....	20
1.6	- Imunidade adaptativa humoral.....	21
1.7	- Terapias direcionadas ao hospedeiro para TB: receptores TAM como um alvo em potencial.....	22
2.	Hipótese.....	25
3.	Objetivos.....	26
3.1	Objetivo geral	26
3.2	Objetivos específicos	26
4.	Matérias e métodos	27
4.1	- Camundongos.....	27
4.2	- Macrófagos murinos primários	27
4.3	- Bactérias e infecções	27
4.4	- Enumeração bacteriana	28
4.5	- Tratamento com inibidores farmacológicos de Axl (TP-0903) e MerTK (UNC-2250)	28
4.6	- Determinação da expressão de genes por PCR em tempo real	28
4.7	- Quantificação de citocinas e nitrito	29
4.8	- Preparação de suspensões unicelulares de pulmões e citometria de fluxo	29
4.9	- Análise fenotípica de células infiltrantes pulmonares e de BMDMs.....	30
4.10	- Detecção de NETs por imunofluorescência	31
4.11	- Análise estatística.....	31
5.	Resultados	32
5.1	- A infecção por <i>Mtb</i> aumenta a expressão de Axl em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 através da ativação de TLR2 pela proteína ESAT-6.	32
5.2	- Modulação da morte celular, produção de citocinas, óxido nítrico e atividade microbicida por Axl e MerTK em macrófagos infectados com MTB	33
5.3	- Caracterização da cinética de expressão Axl, Mertk e Gas6 in vivo durante a infecção com Mtb	37
5.4	- Efeito da deleção de Axl e Mertk em camundongos infectados com alta dose de Mtb.....	40
5.5	- Efeito da inibição farmacológica de Axl e MerTK em camundongos infectados com alta dose Mtb	44
6.	Discussão	46
7.	Conclusão	52
8.	Referências Bibliográficas.....	53

1. Introdução

1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada por bacilos álcool-ácido resistentes e pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). A manifestação mais comum é a TB pulmonar, embora diferentes regiões do organismo possam ser acometidas (Peto HM, et al, 2006). Além da forma ativa, há também casos assintomáticos da doença (TB latente) que são caracterizados pela ausência de sinais clínicos (Simmons JD, 2018; WHO 2022). Apesar do avanço dos programas de controle da tuberculose, a doença permanece sendo uma questão de saúde pública global, principalmente em países subdesenvolvidos e/ou em desenvolvimento (World Health Organization, 2022). A disseminação da tuberculose ocorre a partir de aerossóis produzidos por indivíduos infectados no ato da fala, espirro ou tosse. As gotículas de aerossol, contendo partículas de Mtb são inaladas por indivíduos saudáveis e, desta forma, os bacilos alojam-se nos alvéolos pulmonares (Center for Diseases Control and Prevention, 2020). As células imunes inatas nos pulmões, principalmente macrófagos alveolares, células dendríticas, monócitos e neutrófilos, fagocitam os bacilos de Mtb e são considerados os primeiros defensores contra o patógeno (Abubakar I, et al.,2013; Roy A, et al, 20124; Sia JK, Rengarajan J, 2019). Com a doença ativa, o portador é capaz de contaminar outros indivíduos. Entretanto, na forma assintomática (TB latente) os bacilos podem manter-se vivos dentro de calcificações ou regiões granulomatosas decorrentes da infecção primária. Pela baixa disponibilidade de oxigênio nestas regiões, os bacilos mantêm sua taxa metabólica baixa, apresentando uma característica de persistência não replicadora (Flynn, Chan, 2001). Este período pode durar muitos anos, podendo ocorrer posteriormente reativação da infecção primária.

Os sintomas mais frequentes da tuberculose são: febre, sudorese noturna, falta de apetite, emagrecimento acentuado, ocorrência de dor torácica e tosse seca por mais de 3 semanas, sendo esta contínua e seca no início, seguido por expectoração de muco (escarro), com a presença de sangue nos casos mais graves (CDC, 2014).

O tratamento de pacientes com TB ativa permaneceu praticamente inalterado por mais de 30 anos, (WHO 2022) e devido à sua longa duração (6-24 meses) e efeitos colaterais consideráveis, a adesão ao tratamento em sua totalidade é baixa, favorecendo a recidiva da doença e seleção de bactérias com resistência a múltiplas drogas. No Brasil

a prevenção contra a tuberculose é feita na infância com a aplicação da vacina BCG (Bacilo Calmette Guérin), desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin. A vacina BCG, consiste na cultura de bacilos vivos atenuados, numa concentração pré-determinada, que devido à sua capacidade imunogênica preservada, consegue induzir no indivíduo uma resposta imune protetora. Conforme revisado por Kaufmann e colaboradores, não há consenso sobre a eficácia da vacina BCG com a indução de proteção contra a TB pulmonar adulta ou contra reinfecções sendo questionável (Kaufmann, 2001).

1.2 Aspectos epidemiológicos da tuberculose.

A tuberculose é uma doença que está diretamente ligada a fatores socioeconômicos, sendo de alta prevalência em países pobres e/ou populosos. As maiores incidências de novos casos de tuberculoses em 2020 ocorreram na região do sudeste asiático, com 43% dos novos casos, seguida pela região africana, com 25% dos novos casos e pacífico ocidental com 18%. As análises estatísticas também apontam que 86% destes novos casos da doença ocorreram nos 30 países com alta carga de TB. Oito países foram responsáveis por dois terços dos novos casos de TB: Índia, China, Indonésia, Filipinas, Paquistão, Nigéria, Bangladesh e África do Sul (Fig. 1) (WHO, 2022). Estima-se que um quarto da população mundial está infectada pelo bacilo Mtb, cerca de 1.7 bilhões de indivíduos. Cerca de 56 milhões de indivíduos correm o risco de desenvolver a doença. (Houben R, Dodd P., 2016). A partir dos anos 80, o crescimento dos casos de tuberculose decorreu, em grande parte, devido ao aumento dos casos de AIDS (síndrome da doença imunodeficiência adquirida), mal esse que compromete o sistema imune e favorece o estabelecimento de várias doenças infecciosas, incluindo a tuberculose.

Um total de 1,5 milhões de pessoas morreram de tuberculose em 2020 (incluindo 214.000 pessoas com HIV). Em todo o mundo, a tuberculose é a 13ª principal causa de morte e a segunda principal causa de morte infecciosa depois do COVID-19 (acima do HIV/AIDS). Em 2020, estima-se que houve 10 milhões de novos casos de pessoas acometidas por tuberculose (TB) em todo o mundo. (WHO, 2022)

O Brasil ocupa a 22ª posição em número de notificações da doença. Em 2021, foram notificados 68.271 casos novos de TB, o que equivale a um coeficiente de

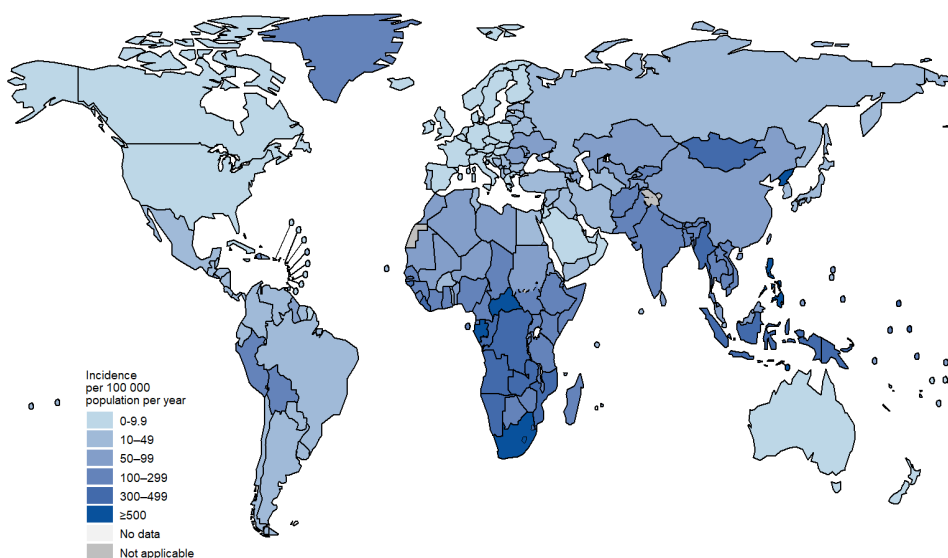


Figura 1 - Incidência de casos de Tuberculose no Mundo - WHO, 2020

incidência de 32,0 casos por 100 mil habitantes. O número de óbitos registrados em 2020 foi 4.543, o que corresponde a um coeficiente de mortalidade de 2,1 óbitos por 100 mil habitantes e segue a tendência dos últimos anos da série histórica de análise de óbitos por TB no país. Em 2020, o Brasil, junto a outros 15 países, foram responsáveis por 93% da redução das notificações da TB no mundo. Essa variação negativa pode ser justificada pelos impactos causados pela pandemia de COVID-19 nos serviços e sistemas de saúde. Levantamento mundial mostra que o número de pessoas que sofrem de tuberculose e não foram diagnosticadas e notificadas subiu 29%, passando de 2,9 milhões para 4,1 milhões de pessoas, devido a pandemia (Boletim Epidemiológico de Tuberculose, 2022; WHO, 2022).

Um importante fator a ser ressaltado é o aparecimento de cepas resistentes ao tratamento pelos quimioterápicos de primeira linha (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol), denominadas cepas MDR-TB (do inglês, multidrug resistant tuberculosis). Entre 2015 e 2021, foram diagnosticados 6.698 casos novos de MDR-TB no Brasil; destes, 848 foram diagnosticados em 2021. De 2015 a 2019, foram iniciados os tratamentos de cerca de mil casos novos de MDR-TB por ano no país (Boletim Epidemiológico de Tuberculose, 2022).

1.3 - Patogenia da infecção por *M. tuberculosis*

Logo após a infecção, o bacilo causador da doença pode ser eliminado; entrar em estado de latência, ou desencadear uma infecção/doença ativa no órgão acometido. A instalação do quadro infeccioso pode evoluir para uma doença aguda, podendo levar a óbito do indivíduo infectado. Após a inalação de partículas de aerossol contendo bacilos, estes alojam-se no trato respiratório onde entram em contato com as células residentes, infectando primariamente os macrófagos alveolares, células dendríticas e macrófagos intersticiais (Kaufmann, 2001; Ottenhoff, Kaufmann, 2012). Células inflamatórias são recrutadas para os pulmões durante a fase inicial da doença e, em muitos casos, conseguem eliminar as bactérias. A infecção micobacteriana comumente evolui para a forma latente, onde ocorre um “equilíbrio” entre o bacilo e o hospedeiro, ocorrendo uma infiltração de neutrófilos e monócitos, aumento progressivo de linfócitos T e B que circundam os macrófagos infectados pelo bacilo, células dendríticas e fibroblastos, formando o característico granuloma tuberculoso. Este granuloma é considerado o mecanismo que limita a disseminação do bacilo, criando um local para a interação da resposta entre linfócitos T e macrófagos ativados pelo IFN- γ , que agem efetivamente para impedir a replicação bacilar. Apesar disso, alguns bacilos podem permanecer viáveis por meses a décadas, e, portanto, se o portador da infecção latente sofrer alguma imunossupressão, pode ocorrer reativação da infecção (Alcais et al., 2010; Keane et al., 2001; Parwati I et al., 2010). A tuberculose ativa, ocorre quando a resposta imune do indivíduo não consegue conter a replicação da bactéria e os bacilos da Mtb podem alcançar os linfonodos drenantes locais, causando linfadenopatia, que é uma manifestação característica da tuberculose primária, e disseminar para outras áreas do pulmão, causando novas lesões (Young D et al., 2009). A falha em montar uma resposta imune celular eficaz e o reparo tecidual prejudicado pode levar a danos extensos no tecido pulmonar. Mediadores pró-inflamatórios que têm a função de eliminar o bacilo de Mtb também podem contribuir para o dano do tecido hospedeiro, levando ao desenvolvimento de necrose caseosa. Uma vez que o granuloma necrótico se rompe e alcança um ramo brônquico, a bactéria pode ser transmitida para outros indivíduos por via aérea. Portanto, grande parte da patologia da tuberculose resulta da resposta imune do hospedeiro infectado ao bacilo da tuberculose (Barr D, et al., 2020).

1.4 - Reconhecimento micobacteriano por receptores celulares do sistema imune inato

A capacidade de gerar resposta imune eficiente contra o Mtb torna a maioria dos indivíduos resistentes à doença e o curso da TB é determinada pelo tipo de resposta

imune contra a micobactéria. Em aproximadamente 5% dos indivíduos imunocompetentes a infecção poderá progredir para doença ativa em torno de dois anos; e em outros 5% a reativação pode acontecer mais tardiamente (Sarafino W, 2012).

O reconhecimento das micobactérias pelo sistema imune inato é mediado pelos receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), incluindo os receptores do tipo Toll (TLR), TLR-2, TLR-4, TLR-8 e TLR-9 (Bafica et al., 2005a; Holscher C, et al., 2008; Mortaz et al., 2014), receptor de manose (RM) e molécula de adesão intercelular de células dendríticas (MAI-CD); receptores do tipo NOD (receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo) (Divangahi M, et al., 2008; Kaufmann S, 2001; Tanne, 2011); o receptor STING (estimulador de genes do interferon) (Ishikawa, H; Barber, G., 2008), entre outros, os quais são ativados por diferentes ligantes micobacterianos.

Mutações gênicas responsáveis por imunodeficiências associadas aos RRP's ou moléculas que são necessárias na cascata de sinalização inicializadas por estes receptores, geralmente aumentam a gravidade da tuberculose em humanos (Kaufmann, 2001; O'Garra et al., 2013).

Os receptores tipo *Toll* são os principais envolvidos no reconhecimento da micobactérias e responsáveis pela ativação de células dendríticas e macrófagos (Ferraz JC, 2006). Sua atividade tem papel importante na ligação entre a resposta imune inata e adquirida, pois induzem a expressão de moléculas coestimuladoras como o CD80 e CD86 na superfície de células dendríticas e macrófagos, que durante o processo de apresentação de antígenos, interagem com os receptores CD28 nos linfócitos T, proporcionando ativação eficiente dessas células (Teixeira H, 2007). A ligação de receptores TLR também induz a produção de citocinas pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), como a IL-12, que tem papel crítico na posterior indução de uma resposta imune adaptativa celular de padrão Th1, que é protetora contra a infecção por *Mtb* (Teixeira H, 2007).

O receptor TLR-2 tem papel fundamental no reconhecimento da micobactérias pelo sistema imune inato, podendo fazer heterodímeros com, TLR-1 e TLR-6. O receptor TLR-2 reconhece glicolipídios micobacterianos, tais como lipoarabinomanana (LAM); lipomanana (LM), lipoproteína de 19KDa, fosfatidilinositol manosilada (PIM), lipoproteína triacilada e diacilada, e a proteína ESAT-6 (Park S, et al., 2000). Camundongos deficientes em TLR-2 têm aumento da suscetibilidade à infecção por micobactérias e apresentam aumento da resposta inflamatória pulmonar (Bafica et al., 2005; Drennan et al., 2004, Hu W, et al., 2022). O receptor TLR-4 também reconhece antígenos

micobacterianos, tais como as proteínas de choque térmico (Bulut et al., 2005), a proteína ribossomal MT 50S (Kim K, et al., 2012) e a glicoproteína 38-kDa (Jung et al., 2006). Já o TLR-9 é encontrado em endossomos e fagossomos, onde reconhece DNA micobacteriano após a endocitose. A deleção genética deste receptor confere aumento da suscetibilidade à infecção por Mtb em camundongos (Bafica et al., 2005). Em conjunto, a ativação do macrófago via sinalização por TLR-2, TLR-4 e TLR-9 desempenha papel importante na resistência à replicação bacteriana por essas células.

Um mecanismo adicional inato que desempenha papel importante na resistência do hospedeiro contra a infecção por Mtb envolve a produção de IL-1 β (Mayer B, et al., 2015). Estudos em camundongos demonstraram que há aumento da suscetibilidade à infecção por Mtb em camundongos deficientes para a expressão de IL-1 α , IL-1 β ou para o receptor dessas citocinas - IL1R1 (Fremond C, et al. 2007; Mayer B, et al., 2011).

A ativação da via canônica do inflamassoma NLRP3 (NOD-, LRR- e pyrin-domain contendo proteína 3) pela proteína ESAT-6 de Mtb, bem como do inflamassoma AIM2 por DNA bacteriano foram implicados na liberação de IL-1 β durante a infecção por Mtb em macrófagos de camundongos e humanos (Mishra, B. et al, 2010; Wong K, Jacobs W., 2011; Saiga, H. et al., 2012). Animais deficientes para o inflamassoma NLRP3 não apresentam diferença de suscetibilidade à infecção em comparação a camundongos do tipo selvagem (Dorhoi A, et al., 2011), ao passo que a deficiência de AIM2 confere maior suscetibilidade à TB experimental (Saiga et al. 2012). Os mecanismos precisos pelos quais a infecção por Mtb induz ativação dos diferentes inflamassomas não são, entretanto, completamente caracterizados. Adicionalmente a IL-12 e IL-1 β , outros mediadores pró-inflamatórios são secretados por macrófagos infectados em resposta à ativação de receptores da imunidade inata, incluindo as citocinas IL-1 α , IL-6, TNF- α e GM-CSF, assim como as quimionas IL-8 e RANTES. Todos estes mediadores induzem a ativação dos macrófagos após o contato e o reconhecimento do bacilo, que podem levar à sua eliminação após a fagocitose. Isto pode ocorrer por meio de enzimas lisossômicas e intermediários reativos de oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNI) no interior dos fagolisossomas (Kaufmann, 2001).

Entretanto, os bacilos possuem mecanismos que lhes permite modificar a composição do fagossoma quanto à sua interação com outras organelas da célula hospedeira para então, conseguir sobreviver dentro dos macrófagos. O bloqueio da maturação do fagossoma, ao longo da via endossoma-lisossoma, ocorre a fim de evitar a fusão do fagossoma com o lisossoma, protegendo assim o bacilo da ação de enzimas lisossomais (Glickman, Jacobs, 2001; Jayachandran et al., 2008). Adicionalmente,

através da secreção da proteína ESAT-6, as bactérias induzem a formação de poros na parede do fagossoma, o que permite seu escape para o citosol. Além de promover proteção do bacilo contra o ambiente hostil do fagossoma e fagolisossoma (que possuem enzimas líticas, ROI e RNI), este fenômeno promove a indução de morte celular necrótica da célula infectada, o qual por sua vez favorece a sobrevivência e disseminação bacteriana (Sreejit G, et al., 2014; Peng X, Sun J, 2016).

1.5 - Resposta imune adaptativa contra micobactérias

Quando a resposta imune inata não é capaz de destruir o bacilo de *M. tuberculosis*, outras células, como monócitos e linfócitos, são recrutadas para o sítio de infecção para o desenvolvimento de uma resposta mais efetiva e formação do granuloma. A resposta imune mediada por linfócitos T começa no momento em que o bacilo é transportado para os linfonodos, mas seu desenvolvimento depende da ativação precoce do sistema imune inato. No interior dos linfonodos, os linfócitos T passam por um processo de ativação e expansão das populações específicas para os antígenos micobacterianos (Cooper A, 2009)

Está claro que as células T CD4⁺ são necessárias para retardar o crescimento dos bacilos da tuberculose *in vivo*. A suscetibilidade aumentada à TB observada em pacientes com depleção de linfócitos T CD4⁺ infectados pelo vírus HIV é a evidência mais marcante do papel central dessas células na imunidade à TB (Geldmacher C, et al., 2010). Camundongos deficientes em células T CD4⁺ também sucumbem rapidamente à replicação bacteriana descontrolada (Caruso A, et al., 1999).

A produção de IL-12 por APCs durante o processo de ativação de linfócitos T CD4⁺ é crucial para o desenvolvimento de uma resposta adaptativa de padrão Th1 (Luckheeram R, et al., 2012). Camundongos deficientes para IL-12 (Cooper A, et al., 1997) ou para o fator de transcrição Tbet especificador de linhagem Th1 (Szabo S, et al., 2002) são altamente suscetíveis e sucumbem poucas semanas após a infecção por *Mtb*. Camundongos deficientes geneticamente para IFN- γ são altamente suscetíveis à infecção por *Mtb* (Flynn, 1993; Cooper, 1993), assim como indivíduos com mutações nos genes que codificam IFN- γ ou seus receptores, os quais também desenvolvem infecção disseminada pela BCG ou outros componentes não tuberculosos do gênero de micobactérias (Rosain J, et al., 2019). Também em humanos há evidências de que o eixo IL-12/IFN- γ é crítico para o controle da infecção por *Mtb* (Möller, M, et al., 2010). Portanto, as células T CD4⁺ polarizadas em direção ao fenótipo Th1 são críticas para a resistência do hospedeiro à infecção por *Mtb*.

Os linfócitos T CD8⁺ também são ativados através de um processo denominado apresentação cruzada, que ocorre quando vesículas contendo antígenos micobacterianos são fagocitadas por APCs especializadas, processadas e os peptídeos apresentados na superfície celular via molécula do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC I). (Behar, 2013; Schaible et al., 2003). Os linfócitos T CD8⁺ produzem IL-2, IFN- γ e TNF- α , que têm um papel bem conhecido no controle da infecção por *Mtb*. Além disso, os linfócitos T CD8⁺ exercem ação citotóxica por meio da produção de perforina e granulicina ou por meio da ligação de Fas (do inglês, TNF superfamily member 6), expresso no linfócito T CD8⁺, a FasL (do inglês, TNF superfamily member 6 ligand), expresso na célula infectada. Estes mecanismos ativam outras enzimas capazes de degradar lipídios e causar a morte da célula infectada por apoptose, que também agem na bactéria intracelular, resultando em sua eliminação (Behar, 2013; Canaday et al., 2001; Ferraz et al., 2006).

O processo de maturação do fagossomo em macrófagos é facilitado e aumentado por IFN- γ , produzido principalmente por linfócitos T CD4⁺ com um suporte menor de linfócitos CD8⁺ (Tsao et al. 2002). Juntamente à produção de IFN γ , outras citocinas como IL-1 β e TNF- α também aumentam a produção de ROI e óxido nítrico (NO) por macrófagos infectados, promovendo contenção da replicação bacteriana intracelular (Domingo G, et al., 2016). Estas citocinas também estimulam a secreção de quimiocinas, como CCL5, CCL9, CXCL10 e CCL2, que atraem mais células imunes para o local da infecção no intuito de controlar a disseminação bacteriana (Khalid A, et al., 2015; Turner M, et al., 2014). No entanto, embora as respostas de células T consigam frear o aumento da replicação bacteriana, elas são incapazes de eliminar a infecção por *Mtb*, indicando que as mesmas estão sujeitas a processos imunorreguladores potentes durante a tuberculose (Lin et al., 2012; Pawlowski et al. 2012; Yao et al. 2014). Dentre eles pode-se destacar a atividade de células T reguladoras (Tregs), que desempenham papel na supressão de respostas imunes e inflamatórias (Campbell D, Koch M., 2011). De fato, foi demonstrado que durante a infecção por *Mtb*, a ativação de Tregs desempenha um papel na regulação da resposta Th1 (Koch et al. 2009), e a depleção de Tregs aumenta a magnitude desta mesma resposta Th1 (Shafiani et al. 2013). É importante mencionar que o excesso de ativação de linfócitos Th1 pode resultar em aumento de dano tecidual, ao invés de impedir o progresso da infecção, tornando-se neste caso, prejudicial para o hospedeiro (Sallin M, et al., 2017).

1.6 - Imunidade adaptativa humoral

O papel da imunidade adaptativa humoral na TB não é muito bem estabelecido (Jacobs A, et al., 2016; Kazakiewicz L, et al., 2013). Glatman-Freedman e colaboradores sugerem que a opsonização mediada por complemento não altera a sobrevivência do bacilo de Mtb e os níveis elevados de títulos de anticorpos correlacionam-se com condições mais graves da doença. Ademais, a imunização passiva com anticorpos não confere proteção contra a infecção por Mtb (Glatman F, et al., 1998).

Por outro lado, demonstrou-se que há diferenças nos padrões de glicosilação do fragmento Fc de imunoglobulinas, que se liga e ativa várias linhagens celulares presentes no granuloma, como células NK, monócitos e neutrófilos, entre indivíduos com tuberculose ativa e tuberculose latente (Kazakiewicz L, et al., 2013; Lu L, et al., 2016). Adicionalmente, foi demonstrado que a perda da atividade do receptor de Fc FcγRIIIb (que induz ativação celular) junto ao aumento da função inibitória mediada pelo receptor FcγRIIa (que se correlaciona com uma alta produção de IL10) estão associados a um pior perfil clínico em pacientes com TB ativa, não observado em pacientes com TB latente. No mesmo estudo, os autores sugerem que há, portanto, uma participação de anticorpos aumentando a maturação fagolisossomal e morte de Mtb em pacientes com tuberculose latente (Lu L, et al., 2016). Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para de fato confirmar o papel da imunidade humoral na infecção por Mtb.

1.7 – Terapias direcionadas ao hospedeiro para TB: receptores TAM como um alvo em potencial.

O alvo das terapias direcionadas ao hospedeiro (TDH) são processos biológicos do paciente que favorecem a sobrevivência do microrganismo ou a patogênese da doença. Com isso, é esperado que sua combinação com os antibióticos padrões para o tratamento da TB aumente a eficácia dos mecanismos microbicidas de células infectadas, eliminando patógenos de maneira mais rápida e eficiente, ou suprimindo repostas inflamatórias excessivas, a fim de aumentar a absorção de drogas convencionais pelos tecidos e protegê-los de danos causados pela inflamação (Hawn T, et al., 2015). A TDH possui vantagens importantes sobre antibióticos atuais, uma vez que pode ser eficaz contra bactérias multirresistentes aos mesmos antibióticos; tem pouca probabilidade de causar resistência a drogas e; pode reduzir a dose de antibióticos padrões e bem como encurtar os regimes atuais de tratamento da tuberculose (Kilinç G, et al., 2021).

Um possível alvo para terapia direcionada ao hospedeiro, são os receptores TAM. A família TAM de receptores tirosina quinase tem três membros: Tyro3, Axl e MerTK.

(Wium M, et al., 2018; McAdoo S, et al., 2018). Os receptores TAM são essenciais para a fagocitose de células mortas por apoptose, processo também conhecido como eferocitose, e desempenham papel importante na homeostase da resposta imune. A ativação de receptores TAM contribui na regulação negativa do processo inflamatório (Lemke G, 2013; Lu Q, et al., 2001). Os principais ligantes dos receptores TAM são duas proteínas dependentes de vitamina K: interrupção do crescimento específico 6 (Gas6) e proteína S (Pros1). Gas6 liga-se a todos os receptores TAM com maior afinidade por Axl, enquanto PROS1 liga-se apenas a Tyro3 e MerTK (Tsou W, et al., 2014). Gas6 e Pros1 compartilham estrutura semelhante, contendo um domínio ácido glutâmico γ -carboxilado (Gla) N-terminal, seguido por quatro repetições semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF) e dois domínios de laminina G, que interagem com os dois domínios semelhantes a IgG extracelulares dos receptores TAM (Rothlin C, et al., 2015). A γ -carboxilação dependente de vitamina K do Gas6 e de PROS1 é importante para que ocorra uma ligação entre a célula apoptótica expressando resíduos de fosfatidilserina em sua membrana e o fagócito expressando os receptores TAM (Geng K, et al., 2017). O ligante Gas6 é o mais bem descrito. Ele

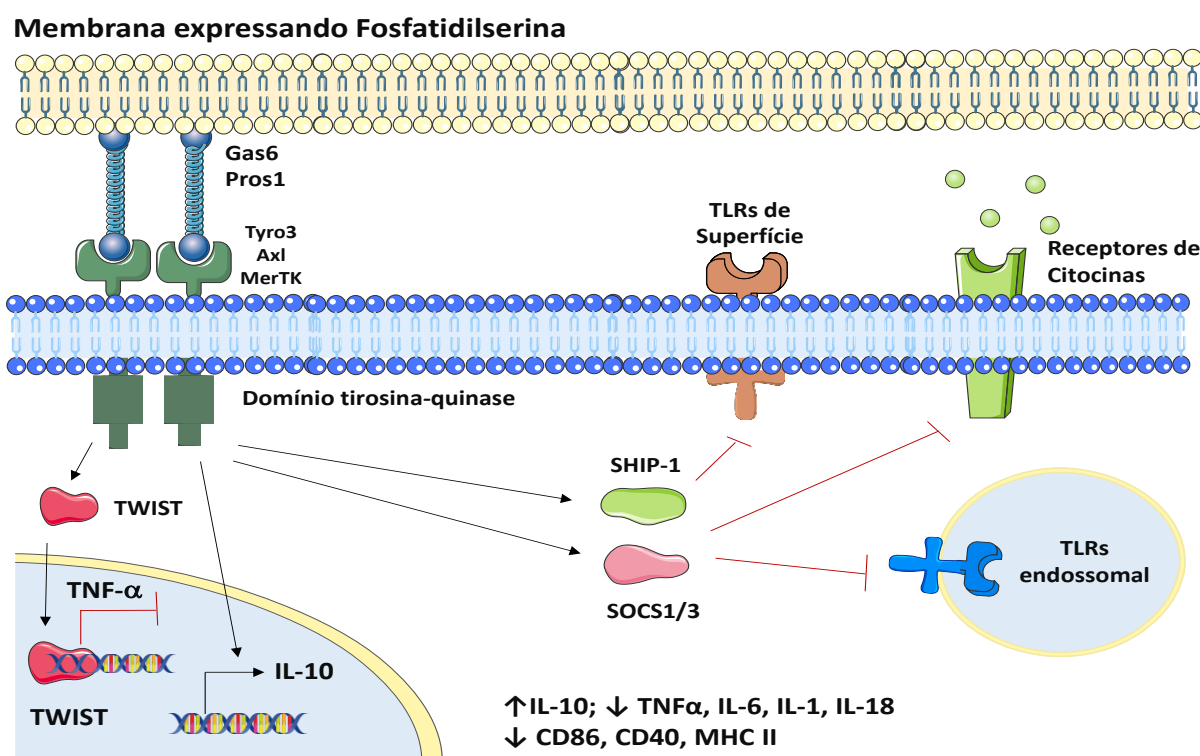


Figura 2 - Ativação dos receptores TAM. Receptores TAM (verde) e ligantes (azul). Os receptores TAM são amplamente expressos por células maduras dos sistemas imunológico, nervoso, vascular e reprodutivo. Os ligantes dos receptores TAM (azul) são Gas6 e Proteína S (Pros1). Os ligantes ligam-se a fosfatidilserina expressa na superfície da célula apoptótica através do domínio N-terminal e aos receptores TAM através do domínio C-terminal. A ativação dos receptores TAM desencadeia vias de sinalização imunomoduladoras nas células imunes.

se liga a Axl e Tyro3 com igual afinidade, mas se liga a MerTK com uma afinidade 3 a 10 vezes menor do que os outros receptores TAM (Chen J, et al., 1997).

Os receptores TAM, conforme mencionado anteriormente, atuam como reguladores negativos da inflamação. A deleção genética de MerTK em camundongos, por exemplo, leva a um aumento da sensibilidade ao choque endotóxico em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS), devido a níveis aumentados de TNF- α produzidos por macrófagos (Camenisch T, et al., 1999). A expressão de Axl em células mieloides pode ser regulada positivamente na presença de ligantes de receptores TLR, e foi demonstrado que a subsequente ativação de Axl por Gas6 resulta em redução da produção de citocinas pró-inflamatórias pelas mesmas células (Rothlin C, et al., 2007; Zagórska A, et al., 2014). Além disso, camundongos deficientes geneticamente para os três receptores TAM desenvolvem espontaneamente um forte fenótipo de autoimunidade e inflamação crônica com hiperativação de células mieloides conforme envelhecem (Lu Q, Lemke G, 2001). A sinalização pelos receptores TAM está associada à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12 e IFN do tipo I, devido à indução da expressão gênica inibitória, com destaque para SOCS 1 e 3 (supressor das proteínas de sinalização de citocinas 1 e 3) e Twist (Houben R, Dodd P, 2016; Rothlin et al., 2007). Todos os três receptores têm sequências semelhantes a ITIM (motivo inibidor baseado em tirosina imunorreceptor, LL Y SRL) (E(I/M) Y (D/N) Y L) que são mais semelhantes às encontradas no imunorreceptor PIR-B (Staub E, et al., 2004). (Fig. 2).

O envolvimento dos receptores TAM e seus ligantes na resposta imune a tumores é descrito em diversos estudos (Aehnlich P, et al., 2021; Zhou, Y, et al., 2021; Mikaella V, Sassan H, 2017) Também há estudos demonstrando a participação desses receptores em algumas infecções virais e bacterianas (Wang ZY, Wang P, 2020), porém, seu papel na resposta imunológica à infecção por Mtb é desconhecido.

2. Hipótese

Levando-se em consideração que a produção de citocinas pró-inflamatórias por células de imunidade inata bem como o desenvolvimento de resposta imune adaptativa Th1 são críticos para a contenção da infecção por Mtb, mas, quando ativadas de maneira descontrolada e exacerbada podem desempenhar papel prejudicial ao hospedeiro, causando dano tecidual e favorecendo o descontrole da infecção e, ao mesmo tempo, considerando-se o papel anti-inflamatório e imunoregulador dos receptores TAM, duas hipóteses foram elaboradas para este trabalho:

- A sinalização através de receptores TAM e seus ligantes Gas6 e Pros 1 suprimem respostas imunes protetoras e favorecem a replicação bacteriana e patogênese da TB experimental, aumentando assim a suscetibilidade do hospedeiro à infecção por Mtb.
- A sinalização através de receptores TAM media a regulação da resposta inflamatória, impedindo o desenvolvimento de hiper inflamação que promove dano tecidual e maior suscetibilidade à TB experimental, desempenhando desta forma um papel protetor para o hospedeiro contra a infecção por Mtb.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Caracterizar o papel da sinalização via receptores Axl e MerTK na modulação da resposta inflamatória e patogênese da infecção por *M. tuberculosis*.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a modulação da expressão dos receptores Axl e MerTK e do ligante Gas6 durante a infecção com *M. tuberculosis*.

- Avaliar o efeito da administração de bloqueadores farmacológicos de Axl e MerTK e a deleção genética de Axl e MerTK na modulação do processo inflamatório, ativação da imunidade adaptativa mediada por linfócitos T, e suscetibilidade à replicação bacteriana durante a infecção por *M. tuberculosis*.

4. Matérias e métodos

4.1 - Camundongos

Camundongos C57BL/6 e camundongos geneticamente deficiente para Axl e MerTK fêmeas de 6 a 10 semanas de idade foram usados nos experimentos. Os animais Axl^{-/-} e MerTK^{-/-} foram originalmente cedidos pela Dra. Carla Rothlin (Universidade de Yale). Todos os camundongos foram mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Todos os estudos em animais foram conduzidos em instalações com nível 2 e 3 de biossegurança. Os camundongos foram alojados em condições específicas livres de patógenos com acesso a comida e água *ad libitum* e foram distribuídos aleatoriamente em grupos experimentais. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, protocolo nº 043/2020.

4.2 - Macrófagos murinos primários

Macrófagos derivados de medula óssea (*bone marrow-derived macrophages* – BMDMs) murinos foram gerados pelo seguinte procedimento: medula óssea de ambos os fêmures e tíbias foi colhida em PBS estéril livre de pirógenos (Gibco) e os grumos celulares foram desfeitos com uso de uma seringa com uma agulha de calibre 25G. As células dispersas foram então semeadas em placas de Petri (100 × 15 mm) contendo 10 ml de RPMI suplementado (2mM de L -glutamina (Gibco), 10% de soro bovino fetal (SBF), 10mM de HEPES (Life Technologies), 1 mM de piruvato de sódio (Gibco), 100 U/ml de Penicilina G) contendo 20% de meio condicionado (sobrenadante de cultura de células L929). Após 4 dias de incubação a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, 10ml adicionais do mesmo meio fresco foi adicionado. No dia 7, os macrófagos foram coletados das placas para realização dos experimentos.

4.3 - Bactérias e infecções

Bacilos de Mtb cepa H37Rv tipo selvagem ou deficientes para a expressão de ESAT-6 (Δ ESAT6), foram cultivados em caldo 7H9 suplementado com 0,05%

Tween80, 10% de meio de enriquecimento OADC a 37°C com agitação constante leve. Bactérias na fase *mid-log* (OD_{600} 0,6–1,0) foram centrifugadas a 5.000 rotações por minuto (rpm) por 10 min, ressuspensas em meio 7H9 fresco e congeladas a -80°C em alíquotas de $\sim 3 \times 10^8$ bacilos/ml. Para infecções *in vivo*, alíquotas congeladas de bactéria foram trazidas para temperatura ambiente, diluídas em água milli-Q estéril para a concentração desejada, e 30 μ l de suspensão bacteriana contendo aproximadamente 100 ou 1000 unidades formadoras de colônia (*colony forming units* – CFU) foram inoculados por via intrafaringeal. Para infecções de BMDMs *in vitro*, alíquotas bacterianas foram descongeladas, diluídas em meio completo de caldo 7H9 e cultivadas a 37°C por 5 dias nas mesmas condições descritas acima. A concentração bacteriana foi então determinada por espectrofotometria a 600 nm, as culturas centrifugadas a 5.000 rpm por 10 min, e a concentração ajustada em meio RPMI suplementado. Os BMDMs foram expostos às bactérias na multiplicidade de infecção (*multiplicity of infection* – MOI) indicada por 4 h, período após as quais bactérias não internalizadas foram removidas através de lavagem com PBS. Para todos os protocolos de infecção, as bactérias foram sonicadas por 30 segundos e homogeneizadas para reduzir a aglomeração bacteriana.

4.4 - Enumeração bacteriana

As quantificações de CFU em homogenatos de tecidos ou culturas celulares foram determinadas por plaqueamento de diluições em série em placas de Petri contendo ágar Middlebrook 7H11 (Sigma) suplementado com 10% de meio de enriquecimento OADC e 100 U/ml de Penicilina G (Sigma). A enumeração das colônias foi realizada após 21 dias de incubação das placas de ágar 7H11 a 37°C.

4.5 - Tratamento com inibidores farmacológicos de Axl (TP-0903) e MerTK (UNC-2250)

Camundongos infectados foram tratados diariamente por gavagem oral com inibidores farmacológicos de Axl (TP0903) ou MerTK (UNC2250) (30 mg/kg de peso corporal cada) diluídas em 0.5% de carboximetilcelulose de sódio, ou com veículo apenas.

4.6 - Determinação da expressão de genes por PCR em tempo real

Pulmões de camundongos infectados e não infectados por Mtb foram homogeneizados em reagente Trizol e, em seguida, usando o kit Direct-zol RNA Miniprep (Zymo) de acordo com as instruções do fabricante, foi isolado RNA total das amostras. O cDNA foi gerado por transcrição reversa de RNA total (1 µg de cada amostra de RNA) usando transcrição reversa. A PCR quantitativa em tempo real para vários genes foi realizada usando o sistema SYBR Green PCR Master Mix. A expressão relativa de mRNA de genes de interesse em pulmões de camundongos infectados com Mtb foi normalizada pela expressão do controle endógeno β-actina nas mesmas amostras e posteriormente calculada em relação à expressão dos mesmos genes em amostras de camundongos não infectados, usando a metodologia $2^{-\Delta\Delta CT}$ (limiar do ciclo).

4.7 - Quantificação de citocinas e nitrito

Os níveis de citocinas em homogenato pulmonar ou sobrenadantes de culturas foram determinados utilizando-se kits específicos para IFN-γ, TNF-α, IL-12/23p40, IL-1β, IL-6, e IL -10 - R&D Duoset ELISA (R&D Systems), seguindo recomendações dos fabricantes. A quantificação indireta de óxido nítrico, através da detecção de NO₂⁻ foi realizada pelo método de Griess (J.P. Griess, 1879)

4.8 - Preparação de suspensões unicelulares de pulmões e citometria de fluxo

Camundongos infectados ou não infectados foram inoculados com 1µg de anti-CD45 FITC e 10U de heparina 3 a 5 minutos antes da eutanásia. Em seguida, os pulmões foram perfundidos com PBS estéril para posterior coleta dos lóbulos pulmonares. Estes foram digeridos com 100U/ml de colagenase IV e 20 U/ml de DNase I a 37°C por 30 min sob agitação (200 rpm). A reação enzimática foi interrompida pela adição de SBF. As células pulmonares foram dispersas por passagem através de um filtro de células de tamanho de poro de 100 µm e os glóbulos vermelhos removidos pela incubação em tampão de lise de cloreto de amônio-potássio à temperatura ambiente por 2 min. As células foram em seguida lavadas em PBS por centrifugação (1.500 rpm por 10 min) e ressuspensas em RPMI suplementado. As preparações de células resultantes foram contadas, marcadas com sonda de viabilidade celular e posteriormente com anticorpos específicos conjugados a fluorocromos. Para marcação de citocinas intracelulares em linfócitos T CD4⁺, antes

da marcação com anticorpos, a suspensão de células foi incubada por 5 horas na presença dos peptídeos imunodominantes de Mtb ESAT-6₁₋₂₀ + Ag85B₂₈₀₋₂₉₄ + esxG₄₆₋₆₁ (cada um a 10 µg/ml) na presença de brefeldina e monensina de acordo com indicação do fabricante. Para marcação de citocinas em linfócitos T CD8⁺, houve estímulo das células com os peptídeos Mtb32c₉₃₋₁₀₂ + TB10.4₄₋₁₇ (cada um a 10 µg/ml) e anti-CD28 (10 µg/ml) por 5 h na presença de brefeldina e monensina de acordo com o fabricante. Para a marcação das citocinas e enzimas intracelulares, as células foram previamente permeabilizadas com a utilização do kit eBioscience™ FOXP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific) de acordo com instruções do fabricante.

4.9 - Análise fenotípica de células infiltrantes pulmonares e de BMDMs

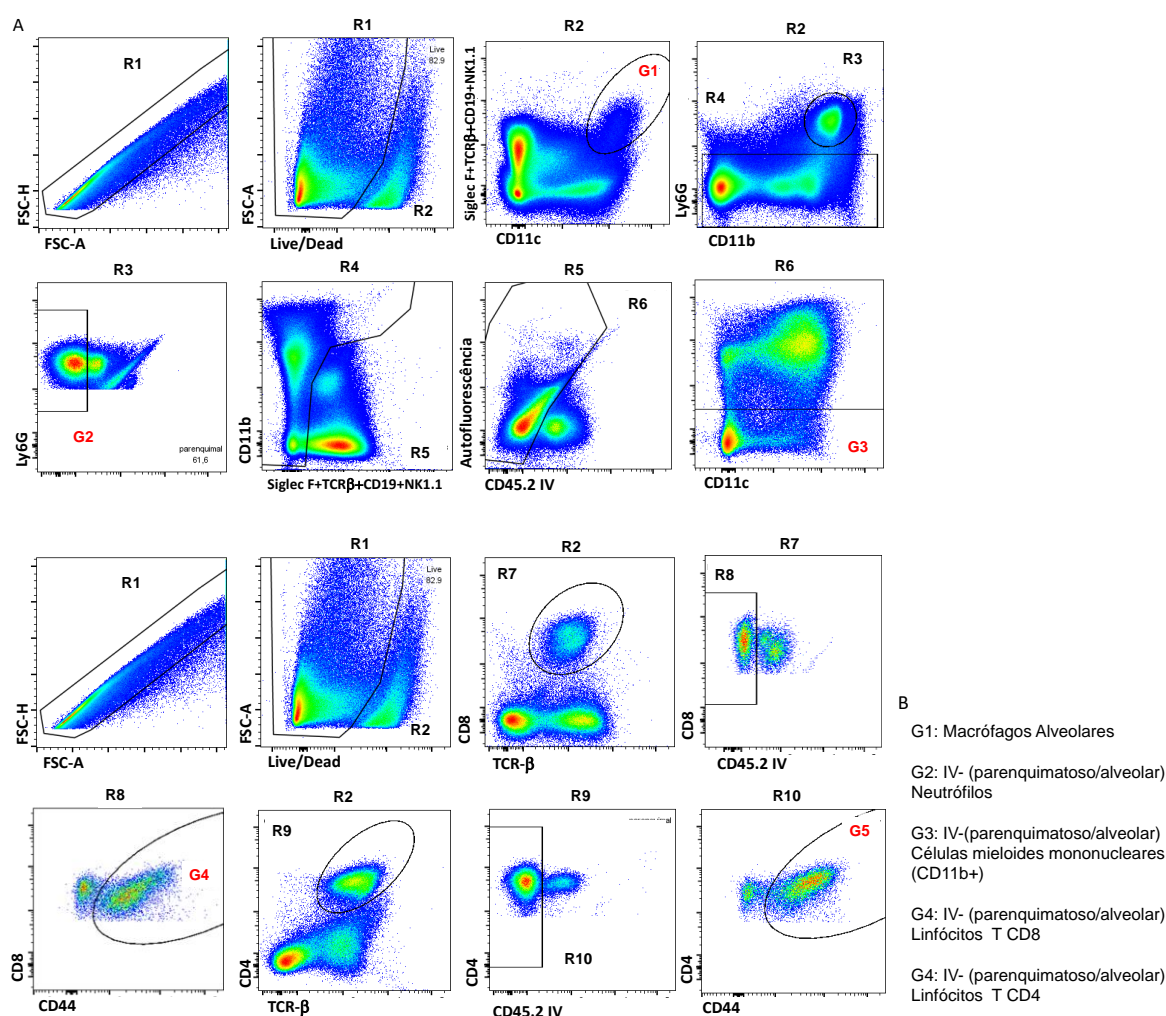


Figura 3 - Estratégia de gate usada para análise de células mieloides pulmonares murinas. As células foram fenotipadas de acordo com sua viabilidade, CD11c, Siglec-F, CD11b, Ly6G, CD8, CD4, CD44, TCRβ e coloração intravascular de CD45.2. Gráficos de pontos representativos de células isoladas de pulmões de camundongos infectados por Mtb (A). Nomenclatura para identificar populações de células específicas, conforme definido na Fig. A (B)

As células infiltrantes nos pulmões e BMDMs de cultura analisadas de acordo com a expressão de Ly6C, Ly6G, CD11c, CD45.2, CD45 (intravenoso), CD11b, Siglec-F, CD64, TCR beta, CD19, NK1.1, CD4, CD8, CD44, iNOS, Axl, MerTK, T-bet, IFN- γ , TNF- α e CD107a. As estratégias de gate usadas para as análises de experimentos in vivo estão demonstradas na Figura 4 (Fig. 3 A e B). Todas as amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo FacsCanto II e/ou FACSymphony A1 (BD Biosciences) e analisadas usando o software FlowJo 10.4.2.

4.10 - Detecção de NETs por imunofluorescência

A detecção de NETs nos tecidos pulmonares de camundongos infectados com *M. tuberculosis* foi realizada, conforme descrito por Moreira-Teixeira et al (Moreira-Teixeira, et al., 2020). Seções de tecido pulmonar foram desparafinadas e reidratadas antes da coloração. As amostras foram incubadas com um tampão de bloqueio (PBS com 2% de BSA e 2% de soro de burro) por 1 h à temperatura ambiente e coradas com anticorpo anti-histona citrulinada H3 e anticorpo anti- mieloperoxidase (MPO) durante a noite a 4°C. Após a lavagem das amostras com PBS, as seções foram incubadas com anticorpos secundários a fluorocromos específicos por 2h a temperatura ambiente. A marcação nuclear foi realizada com DAPI. As imagens foram adquiridas em um microscópio confocal Leica SP5.

A porcentagem da área contendo NETs foi calculada para os diferentes canais com base nas imagens geradas. A porcentagem da medida do sinal CitH3 foi normalizada para a porcentagem medida do sinal MPO e os valores de % CitH3/MPO obtidos das três regiões diferentes foram calculados e plotados.

4.11 - Análise estatística

Todos os dados gráficos são apresentados como valores de média \pm erro padrão da média (EPM). *As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 8.0 usando o teste t bicaudal não pareado paramétrico para comparação entre dois grupos. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ com asteriscos denotando o grau de significância (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).*

5. Resultados

5.1 - A infecção por *Mtb* aumenta a expressão de Axl em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 através da ativação de TLR2 pela proteína ESAT-6.

Primeiramente, avaliamos se a infecção com *M. tuberculosis* induz a expressão dos receptores Axl e MerTK em macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) *in vitro*. Empregamos um modelo no qual macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) murinos foram expostos a bactérias virulentas, cepa H37Rv, em diferentes multiplicidades de infecção (MOIs) e a expressão de Axl e MerTK foi avaliada usando citometria de fluxo 24h após infecção. Nossos resultados demonstraram que os BMDM de C57BL/6 infectados com *Mtb* apresentam aumento significativo da expressão de Axl em todos os MOIs quando comparado com células não infectadas (NI) (Fig. 4A e B). Macrófagos NI expressam níveis altos de MerTK, e quando infectados a expressão aumenta apenas com o MOI de 1 quando comparados com células NI. Importaneamente, apesar de havermos observado diferença significativa, a mesma é muito pequena, e a relevância biológica do aumento é provavelmente negligenciável (Fig.4C e D). É compreensível que a expressão de MerTK praticamente não sofra alterações, uma vez que o receptor MerTK é um conhecido marcador de macrófagos (Zizzo G, et al., 2012; Lemke G, 2019; Scott R, et al., 2001).

Em seguida avaliamos de a expressão de ESAT-6, um importante fator de virulência de *Mtb* poderia estar envolvido na indução da expressão de Axl por BMDMs, utilizando uma cepa de *Mtb* H37Rv geneticamente deficiente em ESAT-6 (Δ ESAT6). Embora a infecção com a cepa Δ ESAT6 também tenha induzido um aumento na expressão de Axl, a mesma foi reduzida quando comparada à infecção com a *Mtb* selvagem (H37Rv) nos mesmos MOIs (Fig. 4A e B). Entretanto, o mesmo fenômeno não foi observado em relação à expressão de MerTK, pois um padrão muito similar ao observado na infecção com a cepa selvagem (H37Rv) foi visto. Houve aumento significativo, porém muito pequeno, na expressão de MerTK nas amostras infectadas com *Mtb* Δ ESAT-6 em relação às amostras NI. De forma importante, não foi observada diferença na expressão de MerTK em relação à infecção com a cepa selvagem (Fig. 4C e D).

Uma vez que é descrito que o fator de virulência ESAT6 é um importante ativador de TLR2 (Chatterjee S, et al., 2011; Pathak S, et al., 2007), em seguida avaliamos se a indução da expressão de Axl pela infecção com Mtb requer a sinalização deste receptor, utilizando BMDMs deficientes geneticamente para TLR2.

Quando comparamos a expressão dos receptores Axl utilizando a cepa H37Rv em macrófagos derivados de medula óssea tanto de animais C57BL/6 quanto TLR2^{-/-}, houve aumento da expressão de Axl após infecção com ambos MOIs testados (Fig. 4E e F), assim como já havia sido observado na Fig.4A. Entretanto, a expressão de Axl em BMDMs de TLR2^{-/-} se encontra reduzida quando comparada à de BMDMs de C57BL/6, no MOI de 1, e uma tendência à diminuição é observada com MOI de 3 (Fig. 4E e F). A dinâmica da expressão de MerTK após infecção de BMDMs C57BL/6 foi similar à demonstrada na Fig. 4C e D. Importaneamente, após a infecção de BMDMs TLR2^{-/-}, uma dinâmica similar foi observada, com um pequeno aumento na expressão de MerTK quando comparado com o grupo não infectado com o grupo infectado em ambos os MOIs, mas importantemente, não houve diferença entre a expressão de MerTK após a infecção quando comparamos células C57BL/6 e TLR2^{-/-} (Fig. 4G e H). Sendo assim, estes resultados demonstram que a infecção por Mtb induz expressão de Axl em BMDMs de forma parcialmente dependente de ESAT6 e da sinalização via TLR2.

5.2 - Modulação da morte celular, produção de citocinas, óxido nítrico e atividade microbicida por Axl e MerTK em macrófagos infectados com MTB

Em seguida, utilizamos BMDM deficientes geneticamente para Axl ou MerTK para avaliamos a interferência dos receptores nos padrões de indução de morte celular, produção de óxido nítrico (NO), citocinas e atividade microbicida de BMDMs infectados com *M. tuberculosis* in vitro.

Utilizamos o mesmo método citado acima, empregamos um modelo no qual BMDMs foram expostos a bactérias virulentas da cepa H37Rv em diferentes multiplicidades de infecção (MOIs) e a indução de morte celular foi avaliada por citometria de fluxo 24h após infecção. Observamos aumento significativo na frequência de morte celular nos BMDMs de animais C57BL/6 e MerTK^{-/-} no MOI de 3. Não houve aumento significativo na frequência de células mortas em BMDMs de

camundongos *Axl*^{-/-} infectados, entretanto, uma tendência de aumento foi observada com MOI de 3 (Fig. 5 A e B).

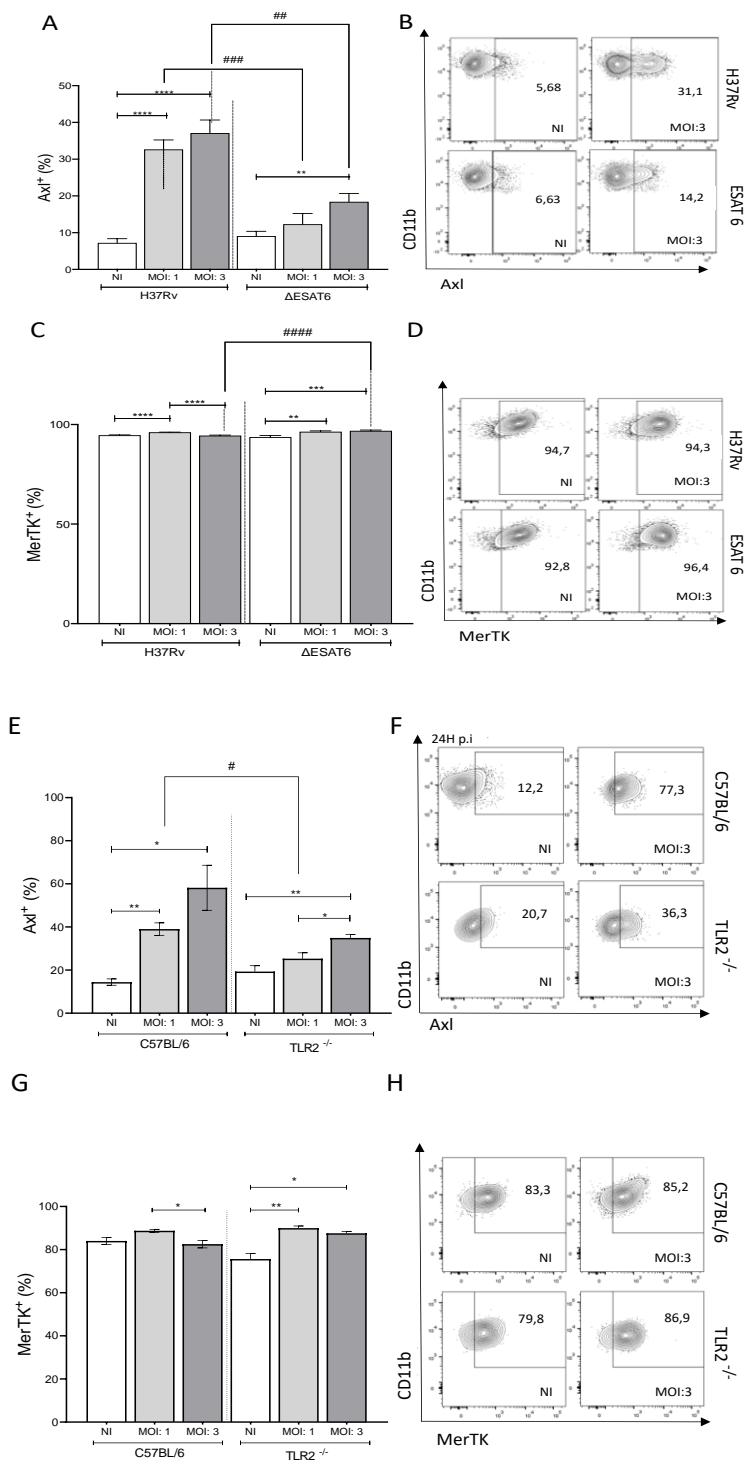


Figura 4 - **Expressão de Axl e MerTK em macrófagos infectados com *M. tuberculosis*.** Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 e TLR2^{-/-} foram infectados ou não com *M. tuberculosis* da cepa H37Rv tipo selvagem ou deficientes em ESAT6 (ΔESAT 6) nos MOI: 1 e 3 por 4 horas, período após o qual as bactérias não internalizadas foram removidas e as células cultivadas. Frequência de macrófagos expressando Axl (A) ou MerTK (C) 24h após a infecção com as duas cepas; (B e D) “Dot plots” representativos dos dados mostrados em (A) e (C) de macrófagos não infectados (NI) ou infectados com MOI de 3 após 24 horas cultura. Macrófagos derivados de

medula óssea de camundongos C57BL/6 e TLR 2^{-/-} infectados com *M. tuberculosis* da cepa H37Rv tipo selvagem. Frequência de macrófagos expressando Axl (E) ou MerTK (G) 24h após a infecção; (F e H) “Dot plots” representativos dos dados mostrados em (E) e (F) de macrófagos não infectados (NI) ou infectados com MOI de 3 após 24 horas cultura. Resultados representados como média ± erro padrão da média (A, C, E e G) ou dot plots representativos (B, D, F e H). Análise estatística: teste t de Student. * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01.

Importantemente, nas culturas infectadas com MOI de 3, não houve diferença entre as frequências de células mortas dos grupos C57BL/6, Axl^{-/-} e MerTK^{-/-} (Fig. 5A). Estes resultados demonstram que a ausência de Axl e MerTK não afeta a morte celular induzida pela infecção com Mtb em macrófagos.

Em seguida, avaliamos se a deleção genética dos receptores afetaria a secreção de citocinas pró-resolução. Podemos observar que houve aumento significativo na produção de todas as citocinas avaliadas após a infecção em todos os grupos. Em células infectadas, a produção de IL-6 foi maior em BMDMs MerTK^{-/-} comparada aos demais grupos (Fig. 5C). Não houve diferença significativa na produção de IL-10 em células de animais Axl^{-/-} em comparação a células C57BL/6 e MerTK^{-/-}, ao passo que a produção de IL-10 em células MerTK^{-/-} foi similar ao grupo C57BL/6, mas significativamente maior do que o grupo Axl^{-/-} (Fig. 5D). Não observamos diferença significativa relação à produção de IL-1β entre os grupos (Fig. 5E). A produção de IL-12p40, entretanto, foi significativamente maior por BMDMs de MerTK^{-/-} quando comparados com C57BL/6, ao passo que uma tendência de aumento foi observada em células Axl^{-/-} (Fig. 5F). Estes resultados demonstram que os receptores Axl e MerTK interferem de maneira diferencial na produção de citocinas por macrófagos infectados com Mtb.

Macrófagos infectados ou não por Mtb foram cultivados na presença ou ausência de IFN-γ e Gas6 por 24 h para avaliação da produção de óxido nítrico por reação de Griess ou 96h para quantificação de atividade microbicida. Conforme esperado os grupos não infectados (NI) apresentaram baixa produção de NO, assim como os grupos apenas infectados com Mtb e não houve diferença entre os grupos C57BL/6, Axl^{-/-} e MerTK^{-/-}. O tratamento com IFN-γ induziu aumento da produção de NO em todos os grupos, entretanto, a produção pelo grupo Axl^{-/-} foi significativamente maior em comparação a células C57BL/6 e MerTK^{-/-}. Nos grupos tratados com IFN-γ e Gas6, observamos que não houve diminuição da produção de NO em nenhum dos grupos em comparação ao tratamento apenas com IFN-γ, e, novamente, os BMDMs de Axl^{-/-} apresentaram uma maior produção de NO quando comparados com os

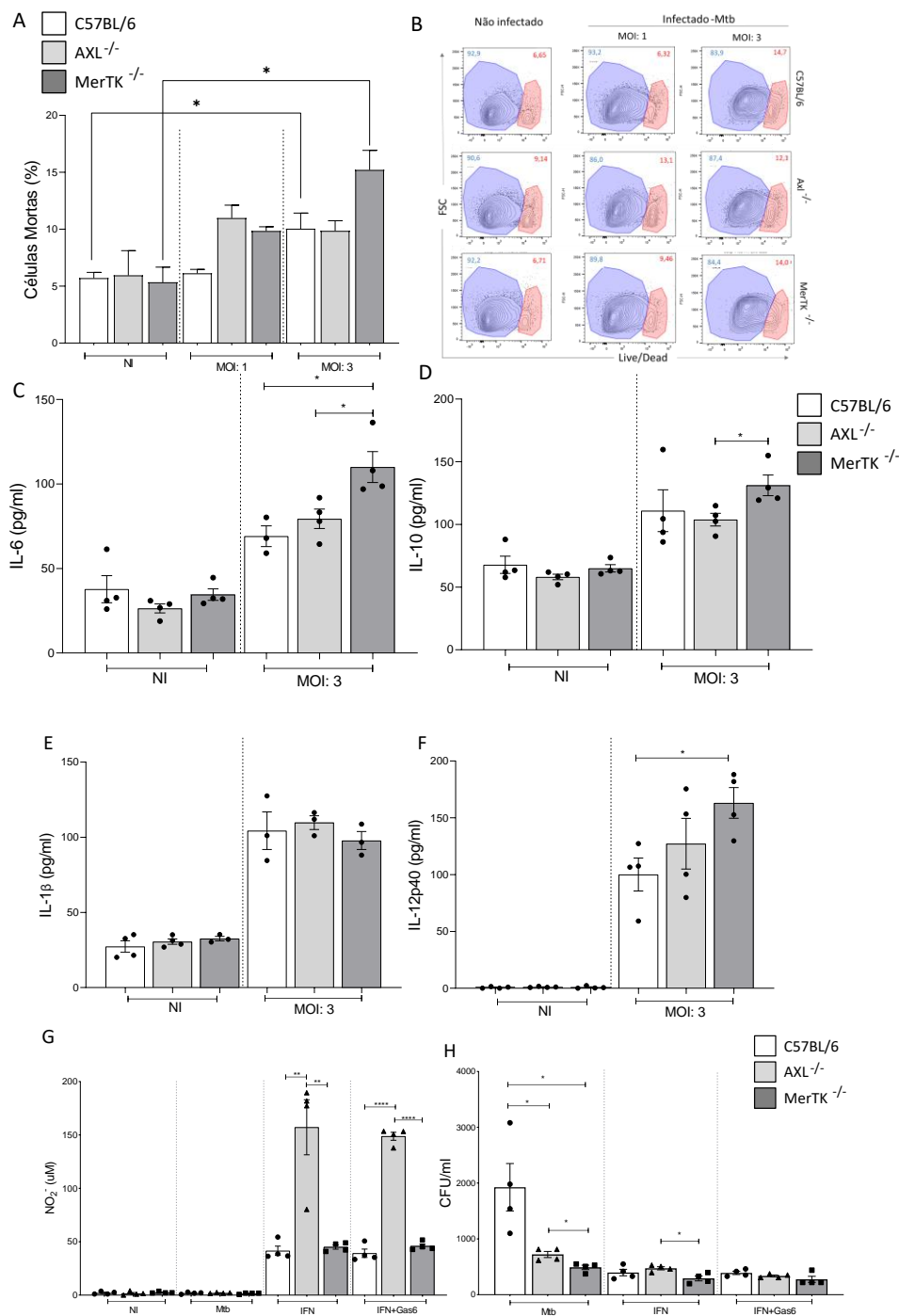


Figura 5 - Modulação da morte celular, produção de citocinas, óxido nítrico e atividade microbicida macrófagos infectados com *M. tuberculosis*. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6, Axl^{-/-} ou MerTK^{-/-} foram infectados ou não com *M. tuberculosis* H37Rv com MOI: 1 e 3 por 4 horas, período após o qual as bactérias não internalizadas foram removidas e as células cultivadas, com apenas meio, IFN- γ (100U/ml), ou IFN- γ (100U/ml) + Gas6 (100ng/ml) por 24 ou 96h. (A) Frequência de macrófagos mortos 24h após infecção; (B) “Dot plots” representativos dos dados mostrados em (A); Quantificação de IL-6 (C), IL-10 (D), IL-1 β (E), IL-12p40 (F) e nitrito (G) no sobrenadante de culturas macrófagos derivados de medula óssea não infectados ou infectados com *M. tuberculosis* MOI:3 24 horas após infecção; (H) Quantificação de CFU 96h após infecção com MOI:3 Resultados representados como média \pm erro padrão da média (A, C, D, E, F, G e H) ou dot plots representativos (B). Análise estatística: teste t de Student. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$.

BMDMs de C57BL/6 e MerTK^{-/-} (Fig. 5G). Estes resultados demonstram que, novamente, assim como observado em relação à produção de citocinas, os receptores Axl e MerTK interferem de maneira diferencial na produção de NO por macrófagos infectados com Mtb.

Em seguida, observamos que BMDMs de animais Axl^{-/-} e MerTK^{-/-} controlaram de maneira mais eficaz a replicação bacteriana, quando comparados ao BMDMs de C57BL/6 na ausência de estímulos. Houve diminuição da carga bacteriana em células MerTK^{-/-} mediante adição de IFN- γ , mas não houve alteração em células de animais C57BL/6 e Axl^{-/-}. Similarmente, a adição de Gas6 a IFN- γ não alterou a carga bacteriana em nenhum dos grupos em comparação às culturas ativadas apenas com IFN γ (Fig. 5H)

Estes resultados demonstram que na ausência de estímulos, a deleção de Axl e MerTK conferem uma maior habilidade a macrófagos em conter a replicação bacteriana intracelular, entretanto, na presença de ativação por IFN- γ , a deficiência dos receptores não interfere na capacidade microbicida das células. Importaneamente, a maior produção de NO observada em células Axl^{-/-} não foi refletida em aumento de capacidade micobactericida.

5.3 - Caracterização da cinética de expressão Axl, Mertk e Gas6 in vivo durante a infecção com Mtb

Nosso próximo passo foi avaliar de qual maneira a infecção por Mtb modula a expressão de Axl e MerTK in vivo. Para isso, infectamos camundongos C57BL/6 com baixo (100 CFU) ou alto (1000 CFU) inóculo de Mtb e avaliamos se ocorrem alterações na expressão de Axl e MerTK em diferentes populações de células mieloides alveolares e parênquimais (CD45 IV negativas) (Costa, D, et al., 2020) do infiltrado inflamatório dos pulmões em comparação a animais não infectados, bem como se há alteração nos níveis do ligante Gas6, Axl solúvel (sAxl) e MerTK solúvel (sMerTK), no soro ou nos homogenatos pulmonares desses mesmos animais. Também realizamos a quantificação da expressão do ligante PROS1 nos homogenatos pulmonares dos mesmos animais.

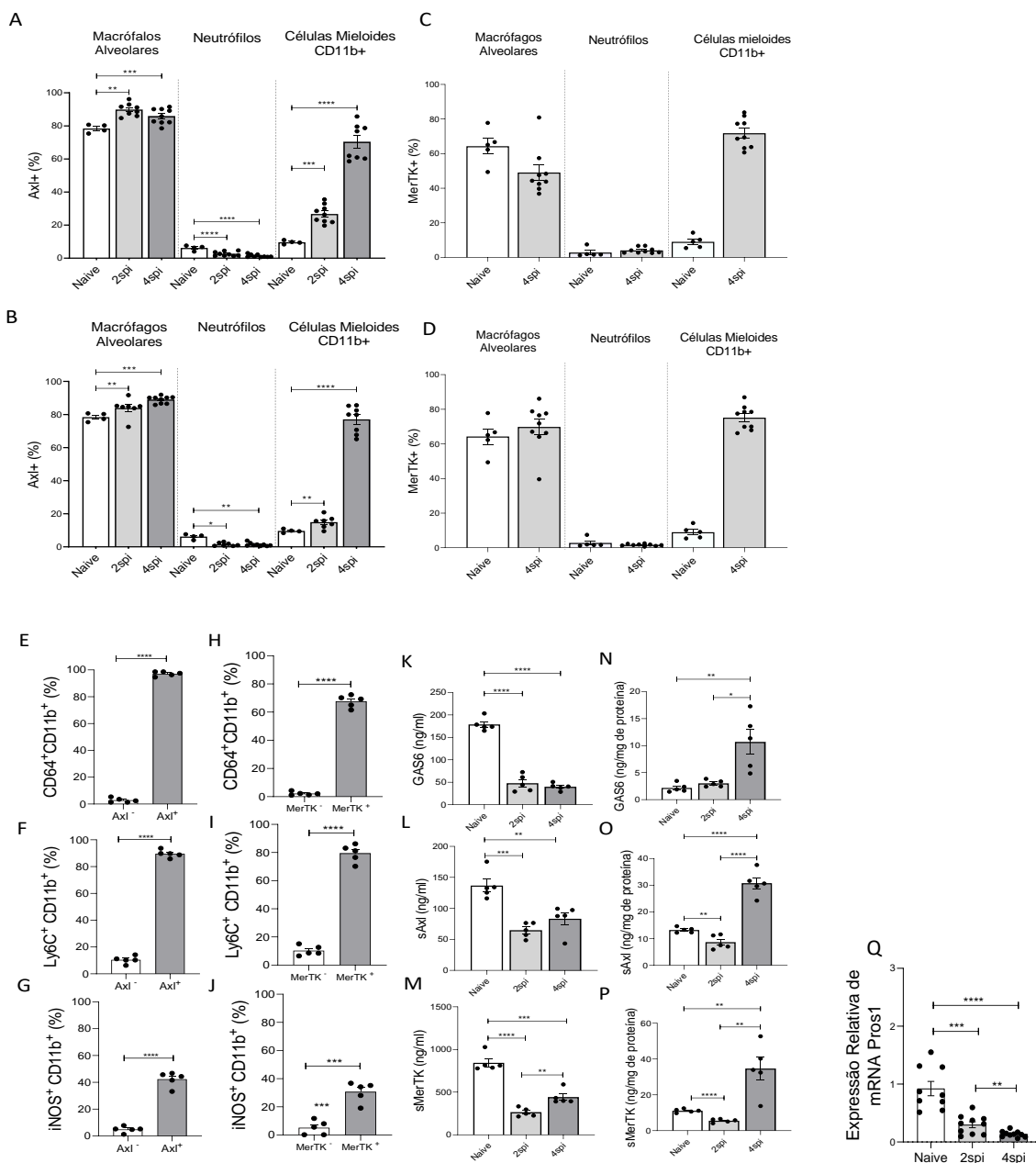


Figura 6 - Caracterização da cinética de expressão Axl, MerTK, Gas6 e Pro1 durante a infecção in vivo com *M. tuberculosis*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 100 ou 1000 unidades formadoras de colônia (CFU) de *Mtb* H37Rv e os pulmões foram processados em diferentes pontos após a infecção para as análises. Os gráficos mostram a frequência de células Axl+ (A e B) e MerTK+ (C e D) em macrófagos alveolares, neutrófilos parenquimais e células mieloides CD11b+ parenquimais nos pulmões. Frequência de células Axl+ nos pulmões de camundongos naïve, 2 e 4 semanas pós- infecção (spi) com 100 (A) ou 1000 (B) CFU. Frequência de células MerTK+ nos pulmões de camundongos naïve e 4 semanas pós- infecção (spi) com 100 (C) ou 1000 (D) CFU. Frequências de células mieloides CD11b+ Axl+ ou Axl- expressando CD64 (E), Ly6C (F) e iNOS (G). Frequências de células mieloides CD11b+ MerTK+ ou MerTK- expressando CD64 (H), Ly6C (I) e iNOS (J). Dosagem de Gas6 (K e N), sAxl (L e O) e sMerTK (M e P) no soro (K, L e M) e homogenatos pulmonares (M, N e O) de animais infectados ou não com 1000 CFU, 2 e 4 spi. (Q) Expressão relativa de *Pro1* em homogenatos de pulmões de animais infectados ou não com 1000 CFU 2 e 4 spi. Resultados representados como média \pm erro padrão da média. Análise estatística: teste t de Student. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$.

Observamos que em animais naïve, a expressão de Axl em macrófagos alveolares é elevada (Fig. 6A e B). Em animais infectados com 100 CFU, houve aumento na expressão de Axl em macrófagos alveolares às 2 e 4 semana pós-infecção

(spi) quando comparados de animais naïve (Fig. 6A). Em camundongos infectados com 1000 CFU, observamos aumento progressivo da expressão de Axl em macrófagos alveolares, que foi maior às 2 e 4 spi em animais infectados quando comparados a camundongos naïve (Fig. 6B). Neutrófilos de animais naïve expressam baixos níveis de Axl (Fig. 6A e B). Em animais infectados com 100 ou 1000 CFU, houve diminuição na expressão de Axl em neutrófilos em comparação a animais naïve às 2 e 4 spi (Fig. 6A e B). As alterações mais marcantes foram detectadas em células mieloides CD11b⁺. Animais naïve apresentam uma baixa expressão de Axl nestas células (Fig. 6A e B). A infecção com 100 como com 1000 CFU de Mtb resultou em aumento progressivo da expressão de Axl em células mieloides CD11b⁺ às 2 e 4 spi em comparação a animais naïve (Fig. 6A e B). Nesta população celular, o aumento observado na infecção com 1.000 CFU em relação à expressão de Axl foi mais pronunciado em comparação ao inóculo com 100 CFU (Fig. 6A e B).

Em relação a expressão de MerTK observamos que em animais naïve a expressão do receptor em macrófagos alveolares é elevada (Fig. 6C e D). Não houve aumento na expressão de MerTK em macrófagos alveolares 4 semanas pós-infecção (spi) com 100 ou 1000 CFU quando comparados de animais naïve (Fig. 6C e D). Neutrófilos de animais naïve expressam baixos níveis de MerTK e a infecção com 100 ou 1000 CFU não induziu alterações nesses níveis 4 spi (Fig. 6C e D). As alterações mais marcantes foram detectadas em células mieloides CD11b⁺, o mesmo observado quanto à expressão de Axl. Animais naïve apresentam uma baixa expressão de MerTK nestas células, a qual aumenta de maneira significativa após 4 semanas de infecção com 100 ou 1000 CFU de Mtb (Fig. 6C e D).

Como observamos que as alterações mais marcantes na expressão dos receptores Axl e MerTK foram detectadas em células mieloides CD11b⁺, em seguida investigamos dentro desta subpopulação qual eram as características das células Axl positivas e Axl negativas, assim, como células MerTK positivas e MerTK negativas. Foi observado que dentro das células mieloides CD11b⁺ Axl⁺, aproximadamente 90% das dos eventos são positivos para CD64 e Ly6C (Fig. 6E e F). Também observamos que as células Axl positivas expressam mais iNOS do que as células Axl negativas (Fig. 6G). Quando a mesma análise foi realizada em células mieloides CD11b⁺ que eram positivas ou negativas para MerTK, observamos que dentro das células MerTK positivas, aproximadamente 70% das células são positivas para CD64 (Fig. 6H) e

aproximadamente 80% são positivas para Ly6C (Fig. 6I). Da mesma maneira, as células MerTK positivas também expressam mais iNOS quando comparadas a células MerTK negativas (Fig. 6J). Estes resultados demonstram que as células mieloides CD11b⁺, nas quais ocorre o aumento mais pronunciado da expressão de Axl e MerTK 4 spi com Mtb, são de fato macrófagos inflamatórios infiltrantes do parênquima pulmonar.

Ao avaliar os níveis de Gas6, sAxl e sMerTK no soro e homogenato pulmonar de animais infectados com alta dose de Mtb (1.000 CFU), observamos que a infecção resulta numa redução desses mediadores no soro (Fig. 6K, L e M), ao passo que há um aumento dos mesmos mediadores no homogenato pulmonar, particularmente 4 spi em comparação a animais naïve (Fig. 6N, O e P).

A expressão de Pros1 em homogenatos pulmonares de animais infectados ou não com alta dose de Mtb (1.000 CFU) também foi quantificada 2 e 4 spi por PCR em tempo real. Diferentemente de Gas6, observamos que a expressão relativa de mRNA do ligante Pros1, diminui 2 e 4 spi em comparação a animais naïve (Fig. 6Q).

Estes resultados demonstram que a infecção por Mtb induz expressão de Axl e MerTK in vivo nos pulmões de animais infectados, principalmente em macrófagos inflamatórios. Adicionalmente, eles sugerem que a ativação destes receptores in vivos ocorra principalmente pela ação de Gas6, uma vez que sua concentração aumenta nos pulmões em resposta à infecção, o que não é observado em relação a Pros1.

5.4 - Efeito da deleção de Axl e Mertk em camundongos infectados com alta dose de Mtb

Com o objetivo de avaliar o papel dos receptores Axl e MerTK durante a infecção por Mtb in vivo, nós utilizamos o modelo de infecção com alta dose de Mtb (1000 CFU), pois foi nele em que observamos maior indução da expressão dos receptores em macrófagos inflamatórios pulmonares de animais infectados. Camundongos C57BL/6, Axl^{-/-} e MerTK^{-/-} foram infectados e monitorados para análise de sobrevivência. Observamos que animais geneticamente deficientes para Axl apresentaram 100% de mortalidade 29 dias após a infecção, ao passo que camundongos C57BL/6 e geneticamente deficientes para MerTK apresentaram mortalidade de 20% após acompanhamento por mais de 60 dias de infecção (Fig. 7A). Ao acessarmos a carga

bacteriana pulmonar nestes mesmos grupos 3 semanas após a infecção, encontramos que não houve diferença entre animais C57BL/6, *Axl*^{-/-} e *MerTK*^{-/-} (Fig. 7B).

Em seguida realizamos a caracterização do infiltrado inflamatório pulmonar nesses grupos após 21 dias de infecção. Os resultados demonstraram que houve aumento significativo do número de macrófagos alveolares nos animais *Axl*^{-/-} em comparação a animais *MerTK*^{-/-} ao passo que não houve diferença significativa comparando-se esta mesma população celular em camundongos C57BL/6 e *Axl*^{-/-} ou C57BL/6 e *MerTK*^{-/-} (Fig. 7C). A diferença mais evidente foi observada no número de neutrófilos parênquimais, que foi maior em animais *Axl*^{-/-} em comparação a camundongos C57BL/6 e *MerTK*^{-/-} (Fig. 7C). A quantidade de macrófagos inflamatórios, entretanto, foi similar entre os grupos (Fig. 7C).

Ao avaliar a expressão de iNOS nos macrófagos inflamatórios, observamos que não houve diferença na frequência de células iNOS⁺ entre os grupos (Fig. 7D).

Com relação aos linfócitos T, houve uma diminuição no número total de linfócitos T CD8⁺ em animais *MerTK*^{-/-} em comparação a animais *Axl*^{-/-}, à medida que não houve alteração expressiva no número total de linfócitos T CD4⁺ (Fig. 7E). A frequência de linfócitos T CD4⁺ ativados (CD44⁺) foi similar em todos os grupos analisados (Fig. 7F). Não houve diferença significativa na frequência de células T reguladores (CD4⁺FoxP3⁺) (Fig. 7G). A frequência de linfócitos T CD4⁺ Th1 (Tbet⁺) foi similar em todos os grupos analisados (Fig. 8H). Entretanto, mediante estímulo com os peptídeos imunodominantes de *Mtb* ESAT-6, Ag85B e *esxG*, observamos aumento da frequência de linfócitos T CD4⁺ duplo produtores de IFN γ e TNF α em camundongos *Axl*^{-/-} e *MerTK*^{-/-} em comparação a animais C57BL/6 (Fig. 7I).

Por fim, realizamos a quantificação das citocinas TNF α , IL-1 β e IFN- γ (Fig. 7J, K e L respectivamente) no homogenato de pulmões extraídos desses mesmos grupos. A concentração pulmonar de TNF α foi maior em camundongos *Axl*^{-/-} em comparação a animais C57BL/6 (Fig. 7J). A expressão de TNF α não foi significativamente diferente entre animais C57BL/6 e *MerTK*^{-/-} (Fig. 7J). A expressão de IL-1 β foi maior em camundongos *Axl*^{-/-} em comparação a animais C57BL/6 e *MerTK*^{-/-}, sendo que não houve diferença significativa entre o grupo C57BL/6 e *MerTK*^{-/-} (Fig. 7K). Entretanto, não houve aumento expressivo de IFN- γ entre os animais, porém, é possível observar

uma tendência de aumento nos animais $Axl^{-/-}$ quando comparados com animais C57BL/6 e $MerTK^{-/-}$ (Fig. 7L).

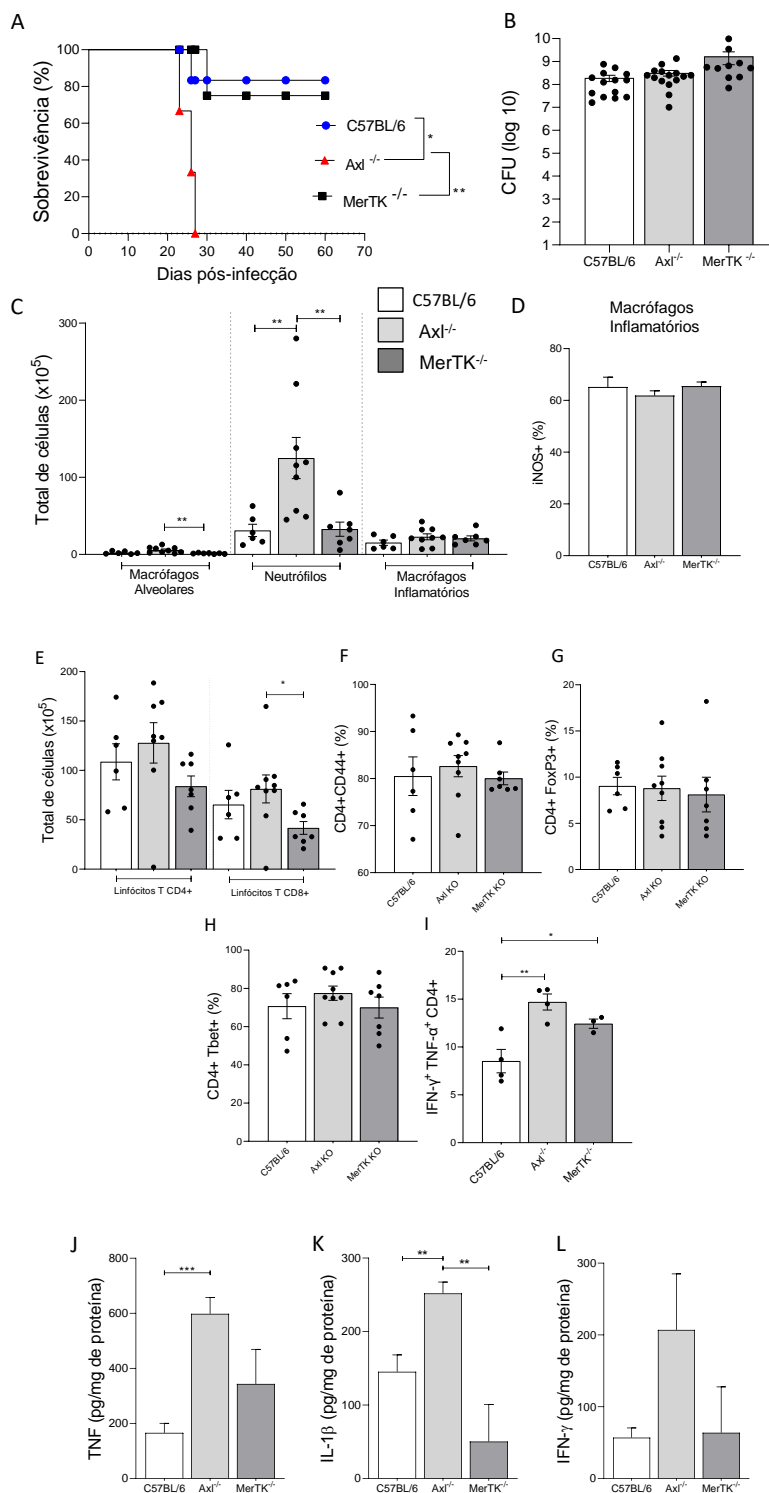


Figura 7. Avaliação do efeito da deleção de Axl e $MerTK$ na sobrevida, modulação do infiltrado inflamatório, carga bacteriana pulmonar, produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e na produção de citocinas pulmonares de camundongos infectados com *M. tuberculosis*. Camundongos C57BL/6 e deficientes de Axl ou de $MerTK$ foram infectados com 1.000 unidades formadoras de colônia (CFU). (A) Sobrevida avaliada por 60 dias após infecção; (B) carga bacteriana pulmonar 21 dias após infecção; (C) Fenótipo do infiltrado

inflamatório pulmonar mieloide 21 dias pós infecção - número total de macrófagos alveolares, neutrófilos parenquimais e macrófagos inflamatórios parênquimais; (D) Expressão de iNOS em macrófagos inflamatórios parênquimais pulmonares 21 dias após infecção; (E) O número total de linfócitos T CD4+ e T CD8+ pulmonares 21 dias após infecção; (F), Frequência de células T CD4+ CD44+ (F), FoxP3+ (G) e Tbet+ (H) pulmonares 21 dias após infecção; (I) Frequência de linfócitos T CD4+ duplamente positivos para IFN γ e TNF α após estímulo ex vivo com 10 μ g/ml dos peptídeos ESAT6₁₋₂₀, esxG₄₆₋₆₁ e Ag85B₂₈₀₋₂₉₄ 21 dias após a infecção; Quantificação de TNF- α (J), IL-1 β (K) e IFN γ (L) nos homogenatos pulmonares 21 dias após a infecção. Resultados representados como média \pm erro padrão da média. Análise estatística: teste t de Student. * = $p \leq 0,05$.

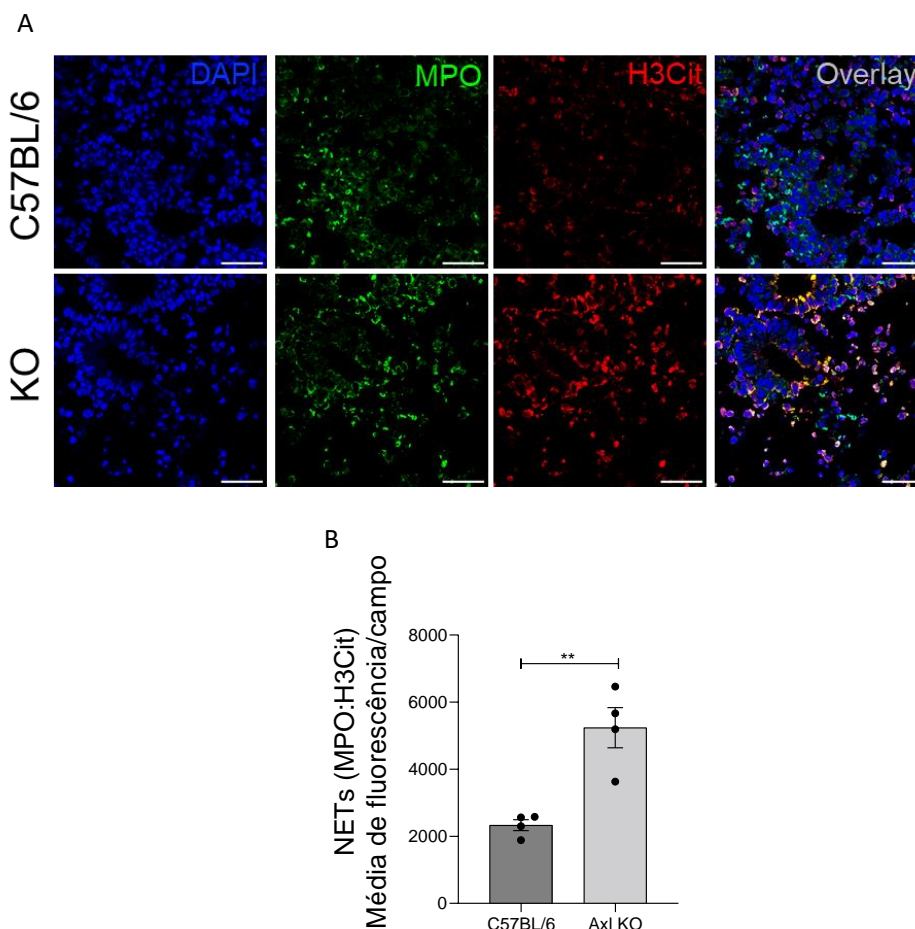


Figura 8. **Avaliação da liberação de NETs em pulmões de camundongos infectados com *M. tuberculosis*.** Camundongos C57BL/6 ou geneticamente deficientes para Axl foram infectados com 1.000 unidades formadoras de colônia (CFU). (A) fotos representativas de infiltrado inflamatório contendo marcação para DNA em azul, MPO (mieloperoxidase) em verde, e histona citrulinada H3 (H3Cit) em vermelho nas estruturas de NETs; (B) Gráficos com a média da intensidade de fluorescência das sobreposições por campo (B). Resultados representados como média \pm erro padrão da média. Análise estatística: teste t de Student. * = $p \leq 0,05$.

Como observamos nos dados anteriores, animais Axl^{-/-} tem um aumento significativo no número de neutrófilos presentes no infiltrado inflamatório pulmonar, quando comparados com animais C57BL/6 e MerTK^{-/-} (Fig. 7C). Portanto, realizamos a quantificação de NETs (do inglês neutrophil extracellular traps) no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 e Axl^{-/-}. Observamos que os animais Axl^{-/-} tem um aumento significativo na liberação de NETs, quando comparado com os animais C57BL/6 (Fig. 8 A e B).

Em conjunto estes resultados indicam que a deficiência de Axl promove suscetibilidade à TB experimental. Adicionalmente, eles sugerem que a maior suscetibilidade não está associada ao descontrole da replicação bacteriana, mas sim à inflamação exacerbada, mediada principalmente por neutrófilos.

5.5 - Efeito da inibição farmacológica de Axl e MerTK em camundongos infectados com alta dose Mtb

Em seguida, nós repetimos o desenho experimental descrito acima para avaliar o papel dos receptores Axl e MerTK na infecção por Mtb, mas utilizamos tratamento com inibidores farmacológicos de Axl e MerTK em camundongos C57BL/6 ao invés de animais geneticamente deficientes. Camundongos C57BL/6 infectados com alto inóculo (1000 CFU) de Mtb foram tratados ou não com TP-0903 (inibidor de Axl) ou UNC-2250 (inibidor de MerTK), diariamente, por via oral. Após 24 dias de infecção e tratamento, camundongos tratados com inibidor de Axl se encontravam muito debilitados e moribundos, portanto, realizamos a eutanásia de todos os grupos para fazer as análises. De maneira similar ao que foi observado nos experimentos com animais geneticamente deficientes, não houve diferença significativa na carga bacteriana pulmonar entre os grupos (Fig. 9 A).

Ao avaliar o infiltrado inflamatório desses animais, observamos que não houve diferença no número de macrófagos alveolares e macrófagos inflamatórios pulmonares entre os grupos. Entretanto, similarmente ao que foi encontrado nos experimentos com animais geneticamente deficientes, observamos um aumento expressivo de neutrófilos parenquimais nos pulmões de animais tratados com o inibidor de Axl em comparação a animais não tratados. O tratamento com o inibidor de MerTK (UNC 2250) não alterou de maneira significativa a quantidade dessas mesmas células em comparação aos animais controles (Fig. 9 B). Ao avaliar a expressão de iNOS nos macrófagos inflamatórios, observamos que não houve diferença na frequência de células iNOS⁺ entre os grupos (Fig. 9 C).

Com relação aos linfócitos T, não houve diferença significativa no número total de linfócitos T CD8⁺ e no número total de linfócitos T CD4⁺ entre os grupos (Fig. 9 D).

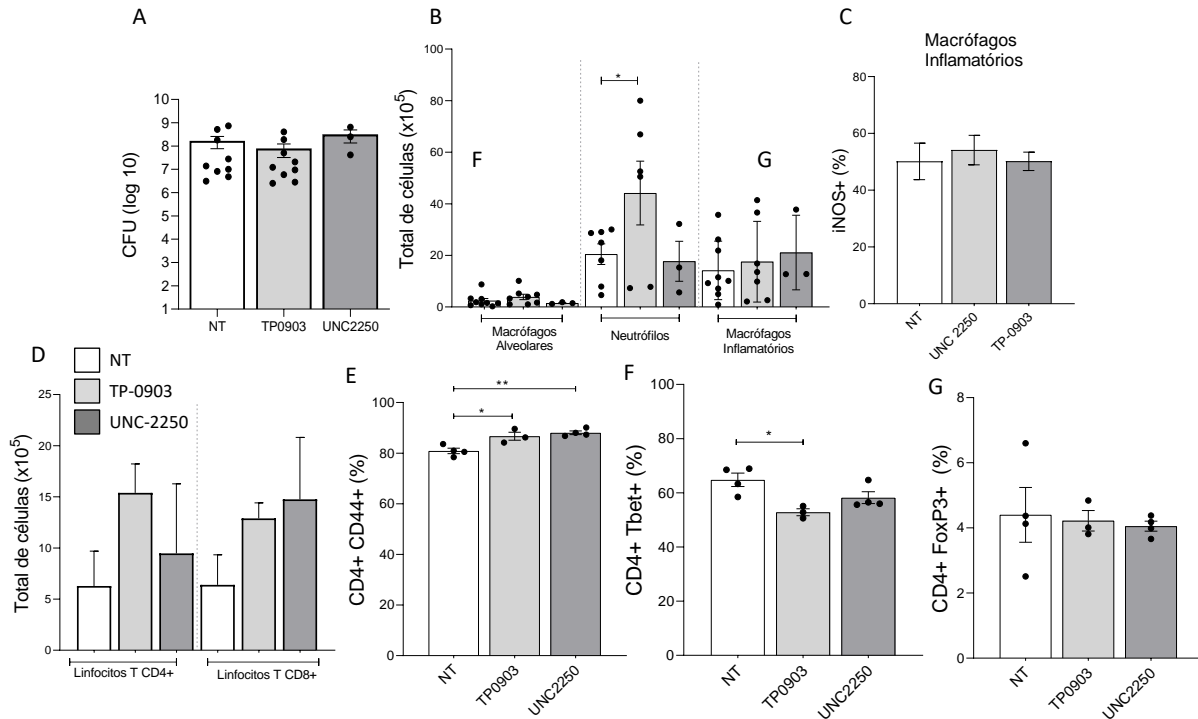


Figura 9. Avaliação do efeito da inibição de Axl e MerTK na modulação do infiltrado inflamatório e carga bacteriana pulmonar de camundongos infectados com *M. tuberculosis*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 1.000 unidades formadoras de colônia (CFU) e tratados ou não (NT – não tratados) com inibidores dos receptores Axl (TP-0903) ou MerTK (UNC-2250) por via oral, durante 24 dias diariamente. O fenótipo do infiltrado inflamatório pulmonar desses animais foi caracterizado por citometria de fluxo e carga bacteriana quantificada por diluição limitante do homogenato pulmonar. (A) Carga bacteriana pulmonar 24 dias pós infecção; (B) Fenótipo do infiltrado inflamatório pulmonar mieloide 24 dias pós infecção - número total de macrófagos alveolares, neutrófilos parenquimais e macrófagos inflamatórios parênquimais; (C). Expressão de iNOS em macrófagos inflamatórios parênquimais pulmonares 24 dias após infecção; (D) Número total de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ pulmonares 24 dias após infecção; Frequência de células T CD4⁺ CD44⁺ (E), Tbet⁺ (F) e FoxP3⁺ (G) pulmonares 24 dias após infecção. Resultados representados como média \pm erro padrão da média. Análise estatística: teste t de Student. * = $p \leq 0,05$, **= $p \leq 0,01$

Observamos aumento na frequência de linfócitos T CD4⁺ ativados (CD44⁺) tanto em animais tratados com o inibidor de Axl (TP-0903) quanto com o inibidor de MerTK (UNC 2250) em comparação a camundongos não tratados (Fig. 9 E). Observamos diminuição da expressão de Tbet em animais tratados com TP-0903, indicando uma possível diminuição na resposta Th1, porém, não houve diferença significativa entre animais tratados com UNC2250 e animais controles (não tratados) (Fig. 9 F). A expressão de FoxP3 foi similar em linfócitos T CD4⁺ de todos os grupos (Fig. 9 G).

Como observamos nos dados anteriores, animais tratados com inibidor de Axl^{-/-} tem um aumento significativo no número de neutrófilos presentes no infiltrado inflamatório pulmonar, quando comparados com animais não tratados e tratados com inibidor de MerTK^{-/-} (Fig. 9 B). Portanto, novamente avaliamos a liberação de NETs no tecido pulmonar de animais infectados com Mtb não tratados ou tratados com inibidor de Axl. Similarmente ao que foi observado em animais geneticamente deficientes,

aumento significativo na liberação de NETs em pulmões de animais tratados com inibidor de Axl^{-/-} em comparação aos de animais não tratados (Fig. 10 A e B).

Em conjunto, estes dados reforçam os resultados obtidos em camundongos com deleção genética de Axl e MerTK, demonstrando que a sinalização via Axl desempenha um papel protetor durante a infecção por Mtb, que está associado ao controle da resposta inflamatória exacerbada, principalmente mediada por neutrófilos, consequente protegendo o órgão do hospedeiro do dano tecidual.

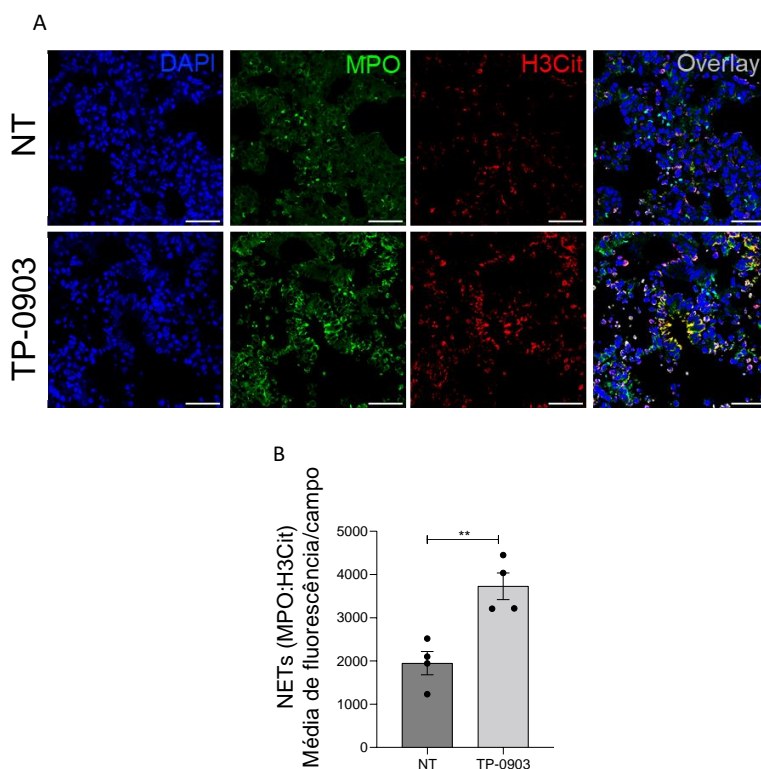


Figura 10. **Figura 11. Avaliação da liberação de NETs em pulmões de camundongos infectados com *M. tuberculosis*.** Camundongos C57BL/6 foram infectados com 1.000 unidades formadoras de colônia (CFU) e tratados ou não com TP-0903 (30mg/kg) por 21 dias. (A) fotos representativas de infiltrado inflamatório contendo marcação para DNA em azul, MPO (mieloperoxidase) em verde, e histona citrulinada H3 (H3Cit) em vermelho nas estruturas de NETs; (B) Gráficos com a média da intensidade de fluorescência das sobreposições por campo (B). Resultados representados como média \pm erro padrão da média. Análise estatística: teste t de Student. * = $p \leq 0,05$.

6. Discussão

Conforme mencionado na seção introdutória, a o papel desempenhado pelos receptores Axl e MerTK, juntamente com seus ligantes, na infecção por Mtb, era totalmente desconhecido. No entanto, no presente trabalho, caracterizamos como a sinalização desses receptores contribui para a modulação da patogênese da TB experimental em camundongos. Os receptores Axl e MerTK têm sido amplamente caracterizados por desempenharem funções similares no reconhecimento de células em apoptose por fagócitos e sua subsequente fagocitose. Adicionalmente, é bastante

conhecida a função anti-inflamatória desencadeada pela sinalização via Axl e MerTK em fagócitos (Zizzo G, et al., 2012; Lemke G, 2013; Scott R, et al., 2001). Nossos resultados iniciais obtidos com a infecção de macrófagos por Mtb in vitro, entretanto, já sugeriam que estes receptores poderiam desempenhar papéis não redundantes na TB, uma vez que a infecção por Mtb resultou em um pronunciado aumento da expressão de Axl, o que não foi observado em relação a MerTK. Dados similares foram encontrados em modelo experimental de infecção in vitro por vírus H1N1 e vírus sincicial respiratório primário (RSV) nos quais houve aumento da expressão de Axl, mas não de MerTK em macrófagos derivados de medula óssea (Shibata T, et al., 2014)

Estudos anteriores demonstraram que a expressão de Axl pode ser induzida em monócitos, em resposta a estímulos bacterianos e inflamatórios, como ligantes de receptores TLRs (Pam3SK4, LPS, CpG e poli (I:C)) que regulou significativamente a expressão de AXL in vitro. Da mesma forma, fatores pró-inflamatórios (IFN- α e TNF- α) induziram a regulação positiva de AXL (Mahida R, et al., 2021; Lemke G, Rothlin V, 2008; Brenig R, et al., 2019), em infecções por vírus (Read S, et al., 2015) ou em doenças autoimunes (Ekman C, et al., 2011). De fato, nossos resultados demonstraram que a deficiência de ESAT6, um importante fator de virulência de Mtb que ativa receptores de imunidade inata, dentre eles TLR2 (Chatterjee S, et al., 2011; Pathak S, et al., 2007), compromete significativamente a indução da expressão de Axl em macrófagos infectados, e, da mesma forma, a deficiência de TLR2 em macrófagos resulta em diminuição da indução da expressão de Axl em resposta à infecção. Entretanto, a expressão de MerTK se manteve inalterada em ambos os casos. Estes dados, portanto, demonstram que a ativação de TLR2 pela proteína ESAT6 é um importante mecanismo indutor da expressão de Axl em macrófagos durante a infecção por Mtb.

Conforme mencionado acima, a ativação dos receptores TAM em macrófagos ou células dendríticas regula negativamente as respostas imunes inatas e a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-12 e IL-18. A indução da expressão de reguladores negativos da sinalização intracelular de receptores de imunidade inata e citocinas, bem como supressores transcricionais, dentre eles SHP-1, SOCS1 e 3 e Twist, mediante ativação dos receptores TAM por seus ligantes, está diretamente associada a este fenômeno (Behrens et al., 2003; Tong L, et al., 2017; Rothlin C, et al., 2007; Sharif M, et al., 2006; Rothlin C, et al., 2015). De fato, nossos

resultados *in vitro* com macrófagos infectados por Mtb, demonstraram que a produção de IL-12p40 e IL-6 foi maior em células de animais MerTK^{-/-} comparadas a células tipo selvagem. Foi demonstrado que ambas as citocinas, IL-6 e IL-12, desempenham um papel importante no processo de maturação fagossomal em macrófagos (Jung J, Robinson C., 2014; Bhattacharya M, et al., 2006). Os mecanismos de acidificação dos fagossomos e fusão da membrana fagossoma-lisossomo em fagócitos desempenham um papel importante na eliminação do bacilo de Mtb intracelular (Lewinsohn et al., 1998; Stenger et al., 1998; Ernst et al., 2000; Serbina et al., 2001). Sendo assim, estes mecanismos podem estar associados à maior resistência à replicação bacteriana intracelular observada em macrófagos Axl^{-/-} e MerTK^{-/-} infectados em comparação a células do tipo selvagem. Por outro lado, a maior resistência à replicação bacteriana em células Axl^{-/-} não esteve associada a uma maior produção dessas citocinas. É possível, entretanto, que a produção de outros mediadores associados com aumento da maturação fagossomal e fusão fagolisossomal, que não foram quantificados em nossos experimentos, possam estar aumentados em macrófagos Axl^{-/-} infectados por Mtb, favorecendo desta forma uma maior resistência à replicação micobacteriana nessas células.

Entretanto, a indução eficiente de mecanismos microbicidas de macrófagos frente à infecção por Mtb é criticamente dependente da ativação por IFN γ e subsequente indução da produção de NO a partir da L-arginina pela enzima iNOS (MacMicking J, et al., 1997; Fleisch, Kaufmann, 1991; Appelberg, Orme, 1993; Liew, Cox, 1991; Nathan, Hibbs, 1991; Wang et al., 1998). Estudos mostram que a inibição de MerTK em macrófagos tratados com LPS por 24h, aumenta a produção de NO pelas células (Kim S, et al., 2016), e que a inibição de Axl aumenta a expressão de iNOS em modelo de infecção fúngica em camundongos (Shibata T, et al., 2014). De fato, mediante ativação com IFN- γ observamos maior produção de NO em macrófagos Axl^{-/-} comparados a células do tipo selvagem, o que não foi observado em células MerTK^{-/-}. Curiosamente, a adição de Gas6 à IFN- γ nas culturas não reverteu o aumento da produção de NO por macrófagos do tipo selvagem ou de animais Axl^{-/-} ou MerTK^{-/-} infectados com Mtb. Igualmente, o aumento da produção de NO nas células de animais KO não foi refletida em aumento da atividade micobactericida dos macrófagos infectados. Apenas macrófagos tipo selvagem apresentaram diminuição da carga bacteriana frente à ativação com IFN- γ . Sendo assim, como mencionado acima, se torna interessante

avaliar se outros mecanismos micobactericidas independentes da via iNOS-NO, como aqueles relacionados à maturação fagossomal e autofagia (Cemma M, et al., 2016; Kinchen, J., Ravichandran, K, 2008), podem estar modulados diferencialmente em macrófagos *Axl*^{-/-} e *MerTK*^{-/-} infectados por *Mtb*.

Em camundongos, *MerTK* é expresso em todos os macrófagos teciduais maduros ao passo que a expressão de *Axl* é restrita a populações específicas de macrófagos: macrófagos alveolares/das vias aéreas, células de Kupffer no fígado e macrófagos da polpa vermelha no baço (Fujimori T, et al., 2015; Zagórska A, et al., 2014). De fato, nossos dados demonstraram que a infecção por *Mtb* induz alteração mínima da expressão de *Axl* e *MerTK* em macrófagos alveolares, cuja expressão se manteve alta tanto em animais naïve quanto infectados. A alteração mais marcante nos níveis de expressão de ambos os receptores in vivo foi observada em células *CD11b*⁺*CD64*⁺*Ly6C*^{high}, demonstrando que se tratam de macrófagos derivados de monócitos inflamatórios (*Ly6C*^{high}), os quais em condições inflamatórias são recrutados para o tecido acometido e expressam iNOS (Serbina et al., 2008). De fato, observamos que a expressão de iNOS nas células mieloides *CD11b*⁺ pulmonares de camundongos infectados se concentra nas subpopulações *Axl*⁺ e *MerTK*⁺, o que nos permite concluir que ocorre aumento da expressão de ambos os receptores em macrófagos inflamatórios com alta porcentagem de expressão de iNOS. Estudos anteriores demonstraram que macrófagos inflamatórios representam a principal população celular que abriga bactérias nos pulmões a partir do cronificação da infecção (a partir de 3 semanas pós-infecção) (Cohen S, et al., 2018). Sendo assim, estes resultados sugerem que a expressão dos receptores aumenta justamente nas principais células infectadas pela bactéria nos pulmões. Adicionalmente, os níveis do ligante Gas6 também aumentam nos pulmões de animais infectados, ao passo que diminuem no soro. Somados, os dados que demonstram acúmulo de Gas6 no tecido pulmonar juntamente à elevada expressão de ambos os receptores nas principais células infectadas, indicam que a via de sinalização de *Axl* e *MerTK* podem, de fato, modular a atividade das células infectadas por *Mtb* in vivo.

Entretanto, os receptores podem sofrer processamento enzimático na membrana celular através da ação de ADAM10/ADAM17, que cliva a parte extracelular dos receptores, liberando uma forma solúvel (Cohen S, et al., 2018). Em particular, o receptor AXL solúvel (sAXL) está presente no sangue humano complexado a GAS6, e

é detectado em níveis elevados em diferentes patologias, como insuficiência cardíaca, certas condições inflamatórias e vários tumores (Ekman C, et al., 2010a; Ekman C, et al., 2010b; Batlle M, et al., 2014). A produção de sMerTK também é significativamente aumentada em células J447 (células monocíticas) em resposta a estímulos como LPS ou PMA (Sather. S, et al, 2006). Os receptores solúveis formam complexos com Gas6 e Pros1, sequestrando-os, e, desta forma, modulando negativamente sua ação, pois competem com os receptores de membrana pelos ligantes (Sather S, et al., 2007; O'Bryan J, et al., 1995). Nossos dados mostram que os níveis dos receptores clivados ou solúveis (sAxl e sMerTK), diminuem no soro, mas aumentam no pulmão com o decorrer da infecção por Mtb. Sendo assim, também é possível que o acúmulo dos receptores solúveis nos pulmões de camundongos infectados com Mtb atue como um fator regulador da ativação dos receptores celulares por Gas6.

Ao utilizar camundongos geneticamente deficientes para Axl ou MerTK, que não expressam ambas as formas, de membrana e solúveis, dos receptores, identificamos que não há diferença na carga bacteriana pulmonar na ausência dos receptores em comparação a animais do tipo selvagem. Entretanto, a deficiência de Axl resultou em maior suscetibilidade à doença, culminando em elevado grau de mortalidade. Resultados similares foram observados quando camundongos foram tratados com inibidores farmacológicos de Axl (TP-0903) ou MerTK (UNC-2250), os quais inibem a atividade tirosina quinase dos receptores de membrana (Zhang Y, et al, 2022; Shi. C, et al, 2018), e não é esperado que interfiram com os níveis ou atividade de receptores solúveis. Não houve diferença na carga bacteriana pulmonar entre animais tratados e não tratados, mas animais tratados com inibidor de Axl se tornaram moribundos na durante a terceira semana pós-infecção. Sendo assim, estes resultados sugerem que o efeito protetor mediado por Axl identificado está relacionado à sinalização pelo receptor de membrana. Adicionalmente, eles demonstram que de fato, os receptores Axl e MerTK desempenham papéis não redundantes durante a infecção por Mtb. Ademais, in vivo, a sinalização via ambos os receptores não interfere com resistência à replicação bacteriana pelo hospedeiro.

Em camundongos Axl^{-/-}, a maior mortalidade esteve associada à inflamação pulmonar mais elevada, composta principalmente por neutrófilos, e maiores níveis de netose pulmonar. Nos animais tratados com TP-0903, a maior suscetibilidade também esteve associada à maior inflamação, principalmente neutrofílica, e níveis mais

elevados de netose nos pulmões. Nos experimentos em que foram utilizados camundongos geneticamente deficientes para os receptores, também identificamos maiores níveis de TNF α e IL-1 β , bem como maior produção de IFN- γ e TNF α por linfócitos T CD4⁺ em comparação a animais do tipo selvagem.

As citocinas pró-inflamatórias possuem propriedades imunológicas que podem ser benéficas ao hospedeiro contra a invasão de bactérias (Dinarello C, 2000). Em particular, a produção de IL-1 β , TNF- α e IFN- γ são críticas para a resistência do hospedeiro à infecção por Mtb (Mayer-Barber, 2011; Flynn, 1993; Cooper, 1993; Flynn 1995). Porém, quando descontroladas, as produções dessas mesmas citocinas são prejudiciais, pois induzem dano tecidual nos pulmões do hospedeiro (Bekker L, et al., 2000; Roca F, et al., 2016; Mishra B, et al., 2013; Sakai S, et al., 2016). Em particular, a produção exacerbada de IL-1 β é associada com o desenvolvimento de necrose pulmonar mediada por excesso de inflamação neutrofílica (Mishra B, et al., 2013). Adicionalmente, foi demonstrado em um estudo recente que o desencadeamento de netose no tecido pulmonar de camundongos infectados promove crescimento bacteriano e maior gravidade da doença (Moreira-Teixeira L, et al., 2020). Sendo assim, considerando os resultados dos estudos citados acima, nossos dados sugerem que a deleção de Axl ou sua inibição resultam maior suscetibilidade à TB devido à inflamação exacerbada, em particular, devido ao excesso de acúmulo de neutrófilos e indução de netose pulmonar.

Diversos estudos indicam, conforme mencionado anteriormente, que os receptores da família TAM desempenham um papel importante nas respostas anti-inflamatórias através da modulação da função dos macrófagos e outras células mieloides (Alciato F, et al., 2010; Rothlin C, et al., 2010; Sharif M, et al., 2006). Sendo assim, é possível que o fenótipo observado em nosso trabalho esteja associado simplesmente ao fato de que na ausência da sinalização via Axl, células mieloides pulmonares estejam produzindo quantidades exacerbadas de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção por Mtb e conseqüentemente promovendo dano tecidual. Sabe-se que a morte da célula hospedeira por necrose em detrimento de apoptose favorece a disseminação e sobrevivência bacteriana durante a infecção por Mtb (Afriyie-Asante A, et al., 2021; Mohareer K, et al., 2018). A produção exacerbada de IL-1 β pode promover a morte necrótica programada de macrófagos por piroptose, ao passo que o excesso de TNF α pode induzir morte necrótica programada dessas células por necroptose (Afriyie-

Asante A, et al., 2021; Mohareer K, et al., 2018). Embora o papel destes tipos de morte celular necrótica na infecção por Mtb não seja bem estabelecido in vivo (Behar, S. et al., 2010; Mahamed D, et al., 2017), postula-se que elas possam ser importantes para a patogênese da doença. Sendo assim, levando em consideração os maiores níveis de TNF α e IL-1 β detectados nos pulmões de animais Axl^{-/-} infectados em comparação aos controles tipo selvagem, é possível que estes mecanismos de morte necrótica de macrófagos infectados estejam aumentados na ausência de Axl, promovendo desta maneira, maior suscetibilidade à doença.

Outra possibilidade pode estar ligada ao aumento de necrose secundária de neutrófilos e outras células mieloides infectadas no tecido pulmonar de camundongos Axl^{-/-}. Os receptores TAM Axl e MerTK, em conjunto com seus ligantes Gas6 e Pros1 têm um papel muito bem estabelecido como mediadores críticos da fagocitose de células apoptóticas e corpúsculos apoptóticos por macrófagos através da interação com fosfatidilserina. Diversos estudos demonstraram que a ausência de receptores TAM em macrófagos acarreta em uma deficiência na depuração de células apoptóticas pelos mesmos, o que pode promover necrose secundária das células apoptóticas, favorecendo o desenvolvimento de respostas inflamatórias (Lemke G, 2013; Lemke G; 2019; Zagórska, 2014; Huang Y, et al., 2021; Burstyn C, et al., 2012; Prasad D, et al., 2006; Lee C, Chun T, 2019; Rothlin C, et al., 2010; Lu Q, Lemke G, 200; Lu Q, Lemke G, 200; Camenisch T, et al., 1999) e citocinas inflamatórias. Sendo assim, é possível que durante a infecção por Mtb, a ausência de Axl prejudique a depuração de células infectadas apoptóticas por macrófagos, resultando em necrose secundária das mesmas. Com isso, amplifica-se a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias local bem como o recrutamento de neutrófilos para o sítio infeccioso, aumentando o dano tecidual pulmonar e causando a morte dos animais.

7. Conclusão

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, nós concluímos que os receptores Axl e MerTK desempenham papéis não redundantes durante a infecção por Mtb. Adicionalmente, concluímos que a sinalização através do receptor Axl tem um papel protetor durante a TB grave ao passo que a sinalização através do receptor MerTK é dispensável para a proteção do hospedeiro durante a TB. O papel protetor de Axl ocorre através da modulação de respostas inflamatórias exacerbadas, promovendo maior integridade do tecido pulmonar durante a

infecção. Sendo assim, se torna interessante o desenvolvimento de estudos futuros com o objetivo de avaliar o potencial terapêutico de Gas6 e Pros1 como terapias direcionadas ao hospedeiro para o tratamento da TB.

8. Referências Bibliográficas

ABUBAKAR I, Pimpin L, Ariti C, Beynon R, Mangtani P, Sterne JA, Fine PE, Smith PG, Lipman M, Elliman D, Watson JM, Drumright LN, Whiting PF, Vynnycky E, Rodrigues LC. 2013. Systematic review and meta-analysis of the current evidence on the duration of protection by bacillus Calmette-Guerin vaccination against tuberculosis. **Health Technol Assess** 17:1–372, v–vi

AEHNLIICH P, Powell RM, Peeters MJW, Rahbech A, Thor Straten P. TAM Receptor Inhibition-Implications for Cancer and the Immune System. **Cancers** (Basel). 2021 Mar 10;13(6):1195. doi: 10.3390/cancers13061195. PMID: 33801886; PMCID: PMC7998716.

Afriyie-Asante A, Dabla A, Dagenais A, Berton S, Smyth R, Sun J. Mycobacterium tuberculosis Exploits Focal Adhesion Kinase to Induce Necrotic Cell Death and Inhibit Reactive Oxygen Species Production. *Front Immunol*. 2021 Oct 20;12:742370. doi: 10.3389/fimmu.2021.742370. PMID: 34745115; PMCID: PMC8564185.

Alcais A, Quintana-Murci L, Thaler DS, Schurr E, Abel L, Casanova JL. Lifethreatening infectious diseases of childhood: single-gene inborn errors of immunity? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010; 1214:18-33.

Alciato F, Sainaghi PP, Sola D, Castello L, Avanzi GC. TNF-alpha, IL-6, and IL-1 expression is inhibited by GAS6 in monocytes/macrophages. *J Leukoc Biol*. 2010 May;87(5):869-75. doi: 10.1189/jlb.0909610. Epub 2010 Jan 26. PMID: 20103767.

Appelberg R, Orme IM. Effector mechanisms involved in cytokine-mediated bacteriostasis of *Mycobacterium avium* infections in murine macrophages. *Immunology*. 1993 Nov;80(3):352-9. PMID: 8288311; PMCID: PMC1422224.

Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005 ;202(12):1715-24

Barr DA, Lewis JM, Feasey N, Schutz C, Kerkhoff AD, Jacob ST, Andrews B, Kelly P, Lakhi S, Muchemwa L, Bacha HA, Hadad DJ, Bedell R, van Lettow M, Zachariah R, Crump JA, Alland D, Corbett EL, Gopinath K, Singh S, Griesel R, Maartens G, Mendelson M, Ward AM, Parry CM, Talbot EA, Munseri P, Dorman SE, Martinson N, Shah M, Cain K, Heilig CM, Varma JK, von Gottberg A, Sacks L, Wilson D, Squire SB, Lalloo DG, Davies G, Meintjes G. *Mycobacterium tuberculosis* bloodstream infection prevalence, diagnosis, and mortality risk in seriously ill adults with HIV: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Infect Dis*. 2020 Jun;20(6):742-752. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30695-4. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32178764; PMCID: PMC7254058.

Batlle M, Recarte-Pelz P, Roig E, Castel MA, Cardona M, Farrero M, Ortiz JT, Campos B, Pulgarín MJ, Ramírez J, Pérez-Villa F, García de Frutos P. AXL receptor tyrosine kinase is increased in patients with heart failure. *Int J Cardiol*. 2014 May 15;173(3):402-9. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.03.016. Epub 2014 Mar 15. PMID: 24681018.

Behar SM. Antigen-specific CD8(+) T cells and protective immunity to tuberculosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013;783:141-63.

Behar, S., Divangahi, M. & Remold, H. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy?. *Nat Rev Microbiol* 8, 668–674 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2387>.

Behrens E.M. Gadue P. Gong S.Y. Garrett S. Stein P.L, Cohen P.L. The mer receptor tyrosine kinase: expression and function suggest a role in innate immunity. *Eur. J. Immunol*. 2003; 33: 2160-2167

Bekker LG, Moreira AL, Bergtold A, Freeman S, Ryffel B, Kaplan G. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. *Infect Immun*. 2000 Dec;68(12):6954-61. doi: 10.1128/IAI.68.12.6954-6961.2000. PMID: 11083819; PMCID: PMC97804

Bhattacharya M, Ojha N, Solanki S, Mukhopadhyay CK, Madan R, Patel N, Krishnamurthy G, Kumar S, Basu SK, Mukhopadhyay A. IL-6 and IL-12 specifically regulate the expression of Rab5 and Rab7 via distinct signaling pathways. *EMBO J*. 2006 Jun 21;25(12):2878-88. doi: 10.1038/sj.emboj.7601170. Epub 2006 Jun 8. PMID: 16763563; PMCID: PMC1500850.

Boletim Epidemiológico de Tuberculose - Número Especial - março 2022.

Brenig R, Pop OT, Triantafyllou E, Geng A, Singanayagam A, Perez-Shibayama C, Besse L, Cupovic J, Künzler P, Boldanova T, Brand S, Semela D, Duong FH, Weston CJ, Ludewig B, Heim MH, Wendon J, Antoniadis CG, Bernsmeier C. Expression of AXL receptor tyrosine kinase relates to monocyte dysfunction and severity of cirrhosis. *Life Sci Alliance*. 2019 Dec 10;3(1):e201900465. doi: 10.26508/lsa.201900465. PMID: 31822557; PMCID: PMC6907389.

Bulut Y, Michelsen KS, Hayrapetian L, Naiki Y, Spallek R, Singh M, Arditi M. *Mycobacterium tuberculosis* heat shock proteins use diverse Toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(22):20961-7.

Burstyn-Cohen T, Lew ED, Traves PG, Burrola PG, Hash JC, Lemke G. Genetic dissection of TAM receptor-ligand interaction in retinal pigment epithelial cell phagocytosis. *Neuron* (2012) 76(6):1123–32. doi: 10.1016/j.neuron.2012.10.015

Camenisch TD, Koller BH, Earp HS, Matsushima GK. A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF- α production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Immunol*. 1999 Mar 15;162

Campbell DJ, Koch MA. 2011. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 11: 119–130

Canaday DH, Wilkinson RJ, Li Q, Harding CV, Silver RF, Boom WH. CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular *Mycobacterium tuberculosis* by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. *Journal of Immunology*. 2001;167(5):2734-42.

Caruso AM, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom BR, Flynn JL. Camundongos deficientes em células T CD4 têm níveis apenas transitoriamente diminuídos de IFN-gama, mas sucumbem à tuberculose. *J Immunol*. (1999) 162:5407-16.

CDC. Center for Diseases Control and Prevention. Trends in Tuberculosis. 2020 Available from: <http://www.cdc.gov>.

CDC. Center for Diseases Control and Prevention. Trends in Tuberculosis. 2014 Available from: <http://www.cdc.gov>.

Cemma M, Grinstein S, Brumell JH. Autophagy proteins are not universally required for phagosome maturation. *Autophagy*. 2016 Sep;12(9):1440-6. doi: 10.1080/15548627.2016.1191724. Epub 2016 Jun 16. PMID: 27310610; PMCID: PMC5082775.

Chatterjee S, Dwivedi VP, Singh Y, Siddiqui I, Sharma P, Van Kaer L, Chattopadhyay D, Das G. Early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* promotes protective T helper 17 cell responses in a Toll-like receptor-2-dependent manner. *PLoS Pathog*. 2011;7:e1002378.

Chen JCK, Carey K, Godowski PJ. Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene* 1997;14:2033–2039.

Cohen SB, Gern BH, Delahaye JL, Adams KN, Plumlee CR, Winkler JK, Sherman DR, Gerner MY, Urdahl KB. Alveolar Macrophages Provide an Early *Mycobacterium tuberculosis* Niche and Initiate Dissemination. *Cell Host Microbe*. 2018 Sep 12;24(3):439-446.e4. doi: 10.1016/j.chom.2018.08.001. Epub 2018 Aug 23. PMID: 30146391; PMCID: PMC6152889.

Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM. 1997. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 1997; 186: 39–45.

Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:393-422

Cooper, AM D K Dalton, T A Stewart, J P Griffin, D G Russell, I M Orme; Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice.. *J Exp Med* 1 December 1993; 178 (6): 2243–2247. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.178.6.2243>

Costa DL, Amaral EP, Namasivayam S, Mittereder LR, Fisher L, Bonfim CC, Sardinha-Silva A, Thompson RW, Hieny SE, Andrade BB, Sher A. Heme oxygenase-1 inhibition promotes IFN γ - and NOS2-mediated control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Mucosal Immunol*. 2021 Jan;14(1):253-266. doi: 10.1038/s41385-020-00342-x. Epub 2020 Aug 29. PMID: 32862202; PMCID: PMC7796944.

Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000 Aug;118(2):503-8. doi: 10.1378/chest.118.2.503. PMID: 10936147.

Divangahi M, Mostowy S, Coulombe F, Kozak R, Guillot L, Veyrier F, Kobayashi KS, Flavell RA, Gros P, Behr MA. NOD2-deficient mice have impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection through defective innate and adaptive immunity. *Journal of Immunology*. 2008;181(10):7157-65

Domingo-Gonzalez R, Prince O, Cooper A, Khader SA. Cytokines and chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbiol Spectr*. (2016) 4:TBTB2-0018-2016. doi: 10.1128/microbiolspec.TBTB2-0018-2016

Dorhoi A, Nouailles G, Jörg S, Hagens K, Heinemann E, Pradl L, Oberbeck-Müller D, Duque-Correa MA, Reece ST, Ruland J, Brosch R, Tschopp J, Gross O, Kaufmann SH. Activation of the NLRP3 inflammasome by *Mycobacterium tuberculosis* is uncoupled from susceptibility to active tuberculosis. *Eur J Immunol*. 2012 Feb;42(2):374-84. doi: 10.1002/eji.201141548. Epub 2011 Dec 20. PMID: 22101787.

Drennan MB, Nicolle D, Quesniaux VJ, Jacobs M, Allie N, Mpagi J, Fremont C, Wagner H, Kirschning C, Ryffel B. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The American Journal of Pathology*. 2004;164(1):49-5

Ekman C, Gottsäter A, Lindblad B, Dahlbäck B. Plasma concentrations of Gas6 and soluble Axl correlate with disease and predict mortality in patients with critical limb ischemia. *Clin Biochem.* 2010a; 43: 873876

Ekman C, Jonsen A, Sturfelt G, et al. Plasma concentrations of gas6 and saxl correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2011; 50: 1064–1069.

Ekman C, Linder A, Akesson P, Dahlbäck B. Plasma concentrations of Gas6 (growth arrest specific protein 6) and its soluble tyrosine kinase receptor sAxl in sepsis and systemic inflammatory response syndromes. *Crit Care.* 2010b; 14: R158.

Ernst JD. Bacterial inhibition of phagocytosis. *Cell Microbiol.* 2000 Oct;2(5):379-86. doi: 10.1046/j.1462-5822.2000.00075.x. PMID: 11207593.

Ferraz JC, Melo FB, Albuquerque MF, Montenegro SM, Abath FG. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al.].* 2006;39(11):1387-97.

Flesch IE, Kaufmann SH. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition gamma interferon-activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun.* 1991 Sep;59(9):3213-8. doi: 10.1128/iai.59.9.3213-3218.1991. PMID: 1908829; PMCID: PMC258155.

Flynn JL, Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infection and Immunity.* 2001;69(7):4195-201.

Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, Bloom BR. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* 1995 Jun;2(6):561-72. doi: 10.1016/1074-7613(95)90001-2. PMID: 7540941.

Flynn, JL J Chan, K J Triebold, D K Dalton, T A Stewart, B R Bloom; An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection.. *J Exp Med* 1 December 1993; 178 (6): 2249–2254. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.178.6.2249>

Fremont CM, Togbe D, Doz E, Rose S, Vasseur V, Maillet I, et al. IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 2007;179: 1178–1189. pmid:17617611

Fujimori T, Grabiec AM, Kaur M, Bell TJ, Fujino N, Cook PC, Svedberg FR, MacDonald AS, Maciewicz RA, Singh D, Hussell T. The Axl receptor tyrosine kinase is a discriminator of macrophage function in the inflamed lung. *Mucosal Immunol.* 2015 Sep;8(5):1021-1030

Geldmacher C, Ngwenyama N, Schuetz A, Petrovas C, Reither K, Heeregrave EJ, Casazza JP, Ambrozak DR, Louder M, Ampofo W, Pollakis G, Hill B, Sanga E, Saathoff E, Maboko L, Roederer M, Paxton WA, Hoelscher M, Koup RA. Preferential infection and depletion of *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4 T cells after HIV-1 infection. *J Exp Med.* 2010 Dec 20;207(13):2869-81. doi: 10.1084/jem.20100090. Epub 2010 Nov 29. PMID: 21115690; PMCID: PMC3005236.

Geng K, Kumar S, Kimani SG, Kholodovych V, Kasikara C, Mizuno K, Sandiford O, Rameshwar P, Kotenko SV, Birge RB. Requirement of Gamma-Carboxyglutamic Acid Modification and Phosphatidylserine Binding for the Activation of Tyro3, Axl, and Merck Receptors by Growth Arrest-Specific 6. *Front Immunol.* 2017 Nov 10;8:1521. doi: 10.3389/fimmu.2017.01521. PMID: 29176978; PMCID: PMC5686386.

Glatman-Freedman A, Casadevall A. Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jul;11(3):514-32. doi: 10.1128/CMR.11.3.514. PMID: 9665981; PMCID: PMC88894.

Glickman MS, Jacobs WR, Jr. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell*. 2001;104(4):477-85.

Griess J P; Measurement of Nitrate and Nitrite in Biological Samples Using Nitrate Reductase and Griess Reaction By DONALD L. GRANGER, READ R. TAINTOR, KENNETH S. BOOCKVAR, and JOHN B. HIBBS, JR. 1879

Hawn TR, Shah JA, Kalman D. New tricks for old dogs: countering antibiotic resistance in tuberculosis with host-directed therapeutics. *Immunological reviews*. 2015;264(1):344-62.

Holscher C, Reiling N, Schaible UE, Holscher A, Bathmann C, Korbel D, Lenz I, Sonntag T, Kroger S, Akira S, Mossmann H, Kirschning CJ, Wagner H, Freudenberg M, Ehlers S. Containment of aerogenic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice does not require MyD88 adaptor function for TLR2, -4 and -9. *European Journal of Immunology*. 2008;38(3):680-94.

Houben RM, Dodd PJ. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *PLoS Med*. 2016 Oct 25;13(10):e1002152. doi: 10.1371/journal.pmed.1002152. PMID: 27780211; PMCID: PMC5079585.

Hu W, Spaink HP. The Role of TLR2 in Infectious Diseases Caused by Mycobacteria: From Cell Biology to Therapeutic Target. *Biology (Basel)*. 2022 Feb 5;11(2):246. doi: 10.3390/biology11020246. PMID: 35205112; PMCID: PMC8869699.

Huang Y, Happonen KE, Burrola PG, O'Connor C, Hah N, Huang L, et al. Microglia use TAM receptors to detect and engulf amyloid beta plaques. *Nat Immunol* (2021) 22(5):586–94. doi: 10.1038/s41590-021-00913-5

Ishikawa, H., Barber, G. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455, 674–678 (2008). <https://doi.org/10.1038/nature07317>

Jacobs AJ, Mongkolsapaya J, Sreaton GR, McShane H, Wilkinson RJ. Antibodies and tuberculosis. *Tuberculosis*. (2016) 101:102–3. doi: 10.1016/j.tube.2016.08.001

Jayachandran R, Gatfield J, Massner J, Albrecht I, Zanolari B, Pieters J. RNA interference in J774 macrophages reveals a role for coronin 1 in mycobacterial trafficking but not in actin-dependent processes. *Molecular Biology Cell*. 2008;19(3):1241-51.

Jung JY, Robinson CM. IL-12 and IL-27 regulate the phagolysosomal pathway in mycobacteria-infected human macrophages. *Cell Commun Signal*. 2014 Mar 11;12:16. doi: 10.1186/1478-811X-12-16. PMID: 24618498; PMCID: PMC4007735.

Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews Immunology*. 2001;1(1):20-30

Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, Siegel JN, Braun MM. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *The New England Journal of Medicine*. 2001;345(15):1098-104

Khalid A, Wolfram J, Ferrari I, Mu C, Mai J, Yang Z, Zhao Y, Ferrari M, Ma X, Shen H. Recent Advances in Discovering the Role of CCL5 in Metastatic Breast Cancer. *Mini Rev Med Chem*. 2015;15(13):1063-72. doi: 10.2174/138955751513150923094709. PMID: 26420723; PMCID: PMC4968951.

Kiliñç G, Saris A, Ottenhoff THM, Haks MC. Host-directed therapy to combat mycobacterial infections. *Immunol Rev*. 2021 May;301(1):62-83. doi: 10.1111/imr.12951. Epub 2021 Feb 9. PMID: 33565103; PMCID: PMC8248113.

Kim K, Sohn H, Kim JS, Choi HG, Byun EH, Lee KI, Shin SJ, Song CH, Park JK, Kim HJ. Mycobacterium tuberculosis Rv0652 stimulates production of tumour necrosis factor and monocytes chemoattractant protein-1 in macrophages through the Toll-like receptor 4 pathway. *Immunology*. 2012;136(2):231-40.

Kim, SY., Lim, EJ., Yoon, YS. et al. Liver X receptor and STAT1 cooperate downstream of Gas6/Mer to induce anti-inflammatory arginase 2 expression in macrophages. *Sci Rep* 6, 29673 (2016).

Kinchen, J., Ravichandran, K. Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 781–795 (2008). <https://doi.org/10.1038/nrm2515>

Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ. 2009. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol* 10: 595–602

Kozakiewicz L, Phuah J, Flynn J, Chan J. The role of B cells and humoral immunity in Mycobacterium tuberculosis infection. *Adv Exp Med Biol*. 2013;783:225-50. doi: 10.1007/978-1-4614-6111-1_12. PMID: 23468112; PMCID: PMC4184189

Lee CH, Chun T. Anti-Inflammatory Role of TAM Family of Receptor Tyrosine Kinases Via Modulating Macrophage Function. *Mol Cells*. 2019 Jan 31;42(1):1-7. doi: 10.14348/molcells.2018.0419. Epub 2019 Jan 2. PMID: 30699285; PMCID: PMC6354059.

Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the tam receptors. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 327–336

Lemke G. Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harbor Perspect* (2013) 5(11):1-17. doi: 10.1101/cshperspect.a009076

Lemke G. How macrophages deal with death. *Nat Rev Immunol*. 2019 Sep;19(9):539-549. doi: 10.1038/s41577-019-0167-y. PMID: 31019284; PMCID: PMC6733267.

Lewinsohn DM, Alderson MR, Briden AL, Riddell SR, Reed SG, Grabstein KH. Characterization of human CD8+ T cells reactive with Mycobacterium tuberculosis-infected antigen-presenting cells. *J Exp Med*. 1998 May 18;187(10):1633-40. doi: 10.1084/jem.187.10.1633. PMID: 9584141; PMCID: PMC2212289.,

Liew FY, Cox FE. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol Today*. 1991 Mar;12(3):A17-21. doi: 10.1016/S0167-5699(05)80006-4. PMID: 1712593.

Lin PL, Rutledge T, Green AM, Bigbee M, Fuhrman C, Klein E, Flynn JL. 2012. CD4 T cell depletion exacerbates acute Mycobacterium tuberculosis while reactivation of latent infection is dependent on severity of tissue depletion in cynomolgus macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28: 1693–1702

Lu LL, Chung AW, Rosebrock TR, Ghebremichael M, Yu WH, Grace PS, et al. A functional role for antibodies in tuberculosis. *Cell*. (2016) 167:433-443.e14. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.072

Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science*. 2001 Jul 13;293(5528):306-11.

Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:925135. doi: 10.1155/2012/925135. Epub 2012 Mar 14. PMID: 22474485; PMCID: PMC3312336.

MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 May 13;94(10):5243-8. doi: 10.1073/pnas.94.10.5243. PMID: 9144222; PMCID: PMC24663.

Mahamed D, Boulle M, Ganga Y, et al. Intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* after macrophage cell death leads to serial killing of host cells [published correction appears in *Elife*. 2017 May 05;6:]. *Elife*. 2017;6:e22028. Published 2017 Jan 28. doi:10.7554/eLife.2202

Mahida RY, Scott A, Parekh D, Lugg ST, Belchamber KBR, Hardy RS, Matthay MA, Naidu B, Thickett DR. Assessment of Alveolar Macrophage Dysfunction Using an in vitro Model of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Sep

Mayer-Barber KD, Andrade BB, Barber DL, Hieny S, Feng CG, Caspar P, et al. Innate and adaptive interferons suppress IL-1 α and IL-1 β production by distinct pulmonary myeloid subsets during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunity*. 2011;35: 1023–1034. pmid:22195750

Mayer-Barber KD, Sher A. Cytokine and lipid mediator networks in tuberculosis. *Immunol Rev*. 2015;264: 264–275. pmid:25703565

McAdoo S, Tam FWK. Role of the Spleen Tyrosine Kinase Pathway in Driving Inflammation in IgA Nephropathy. *Semin Nephrol*. 2018 Sep;38(5):496-503. doi: 10.1016/j.semnephrol.2018.05.019. PMID: 30177021; PMCID: PMC6135887

Mikaella Vouri, Sassan Hafizi; TAM Receptor Tyrosine Kinases in Cancer Drug Resistance. *Cancer Res* 1 June 2017; 77 (11): 2775–2778. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2675>

Mishra BB, Rathinam VA, Martens GW, Martinot AJ, Kornfeld H, Fitzgerald KA, Sasseti CM. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β . *Nat Immunol*. 2013 Jan;14(1):52-60. doi: 10.1038/ni.2474. Epub 2012 Nov 18. PMID: 23160153; PMCID: PMC3721324.

Mishra, B. B. et al. *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cell. Microbiol* 12, 1046–1063 (2010).

Mohareer K, Asalla S, Banerjee S. Cell death at the cross roads of host-pathogen interaction in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinb)*. 2018 Dec;113:99-121. doi: 10.1016/j.tube.2018.09.007. Epub 2018 Sep 29. PMID: 30514519.

Möller, M., Nebel, A., van Helden, P.D. et al. Analysis of eight genes modulating interferon gamma and human genetic susceptibility to tuberculosis: a case-control association study. *BMC Infect Dis* 10, 154 (2010). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-154>

Moreira-Teixeira L, Stimpson PJ, Stavropoulos E, Hadebe S, Chakravarty P, Ioannou M, Aramburu IV, Herbert E, Priestnall SL, Suarez-Bonnet A, Sousa J, Fonseca KL, Wang Q, Vashakidze S, Rodríguez-Martínez P, Vilaplana C, Saraiva M, Papayannopoulos V, O'Garra A. Type I IFN exacerbates disease in tuberculosis-susceptible mice by inducing neutrophil-mediated lung inflammation and NETosis. *Nat Commun*. 2020 Nov 4;11(1):5566. doi: 10.1038/s41467-020-19412-6. PMID: 33149141; PMCID: PMC7643080.

- Mortaz E, Adcock IM, Tabarsi P, Masjedi MR, Mansouri D, Velayati AA, Casanova JL, Barnes PJ. Interaction of Pattern Recognition Receptors with Mycobacterium Tuberculosis. *Journal Clinical Immunology*. 2014.
- Nathan CF, Hibbs JB Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol*. 1991 Feb;3(1):65-70. doi: 10.1016/0952-7915(91)90079-g. PMID: 1711326.
- O'Bryan JP, Fridell YW, Koski R, Varnum B, Liu ET. The transforming receptor tyrosine kinase, Axl, is post-translationally regulated by proteolytic cleavage. *J Biol Chem*. 1995 Jan 13;270(2):551-7. doi: 10.1074/jbc.270.2.551. PMID: 7822279.
- O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune response in tuberculosis. *Annual Reviews of Immunology*. 2013; 31:475-527
- Ottenhoff TH, Kaufmann SH. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *PLoS Pathogens*. 2012;8(5):e1002607.
- PARK, S. H. & BENDELAC, A. (2000). CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. *Nature* 406, 788-792. 2000
- Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(2):103-11.
- Pathak SK, Basu S, Basu KK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, Kaisho T, Kundu M, Basu J. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat Immunol*. 2007;8: 610–618
- Pawlowski A, Jansson M, Sköld M, Rottenberg ME, Källenius G. 2012. Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Pathog* 8: e1002464.
- Peng X, Sun J. Mechanism of ESAT-6 membrane interaction and its roles in pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis. *Toxicon*. 2016 Jun 15;116:29-34. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.10.003. Epub 2015 Oct 9. PMID: 26456678; PMCID: PMC4973572.
- Peto HM, Pratt RH, Harrington TA, LoBue PA, Armstrong LR. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in the United States, 1993-2006. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009;49(9):1350-7.
- Prasad D, Rothlin CV, Burrola P, Burstyn-Cohen T, Lu Q, Garcia de Frutos P, Lemke G. TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol Cell Neurosci*. 2006 Sep;33(1):96-108. doi: 10.1016/j.mcn.2006.06.011. Epub 2006 Aug 9. PMID: 16901715.
- Read SA, Tay ES, Shahidi M, et al. Hepatitis c virus driven axl expression suppresses the hepatic type i interferon response. *PloS One* 2015; 10: e0136227.
- Roca FJ, Whitworth LJ, Redmond S, Jones AA, Ramakrishnan L. TNF Induces Pathogenic Programmed Macrophage Necrosis in Tuberculosis through a Mitochondrial-Lysosomal-Endoplasmic Reticulum Circuit. *Cell*. 2019 Sep 5;178(6):1344-1361.e11. doi: 10.1016/j.cell.2019.08.004. Epub 2019 Aug 29. PMID: 31474371; PMCID: PMC6736209
- Rosain J, Kong X-F, Martinez-Barricarte R, Oleaga-Quintas C, Ramirez-Alejo N, Markle J, et al. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: 2014–2018 update. *Immunol Cell Biol*. (2019) 97:360–7. doi: 10.1111/imcb.12210
- Rothlin CV, Carrera-Silva EA, Bosurgi L, Ghosh S. TAM receptor signaling in immune homeostasis. *Annu Rev Immunol*. (2015) 33:355–91. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112103

Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell*. 2007 Dec 14;131(6):1124-36. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.034. PMID: 18083102.

Rothlin CV, Lemke G. TAM receptor signaling and autoimmune disease. *Curr Opin Immunol*. 2010 Dec;22(6):740-6.

Roy A, Eisenhut M, Harris RJ, Rodrigues LC, Sridhar S, Habermann S, Snell L, Mangtani P, Adetifa I, Lalvani A, Abubakar I. 2014. Effect of BCG vaccination against *Mycobacterium tuberculosis* infection in children: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 349:g4643

Saiga, H. et al. Critical role of AIM2 in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int. Immunol*. 24, 637–644 (2012).

Sakai S, Kauffman KD, Sallin MA, Sharpe AH, Young HA, Ganusov VV, Barber DL. CD4 T Cell-Derived IFN- γ Plays a Minimal Role in Control of Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* Infection and Must Be Actively Repressed by PD-1 to Prevent Lethal Disease. *PLoS Pathog*. 2016 May 31;12(5):e1005667. doi: 10.1371/journal.ppat.1005667. PMID: 27244558; PMCID: PMC4887085.

Sallin MA, Sakai S, Kauffman KD, Young HA, Zhu J, Barber DL. Th1 differentiation drives the accumulation of intravascular, non-protective CD4 T cells during tuberculosis. *Cell Rep*. (2017) 18:3091–104. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.007

Sarafino Wani RL. 2012. Tuberculosis 1. Epidemiology of *mycobacterium tuberculosis*. *SSMJ*; 5(2): 45-46

Sather S, Kenyon KD, Lefkowitz JB, Liang X, Varnum BC, Henson PM, Graham DK. A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation. *Blood*. 2007 Feb 1;109(3):1026-33.

Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, Modlin RL, Brinkmann V, Kaufmann SH. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med*. 2003;9(8):1039-46.

Scott, R., McMahon, E., Pop, S. et al. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 411, 207–211 (2001). <https://doi.org/10.1038/35075603>

Serbina NV, Lazarevic V, Flynn JL. CD4(+) T cells are required for the development of cytotoxic CD8(+) T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 2001 Dec 15;167(12):6991-7000. doi: 10.4049/jimmunol.167.12.6991. PMID: 11739519.

SERBINA, Natalya V. et al. Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annual Review of Immunology*, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 421–452, Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326>

Shafiani S, Dinh C, Ertelt JM, Moguche A O, Siddiqui I, Smigiel KS, Sharma P, Campbell DJ, Way SS, Urdahl KB. 2013. Pathogen-specific Treg cells expand early during *Mycobacterium tuberculosis* infection but are later eliminated in response to Interleukin-12. *Immunity* 38: 1261–1270.

Sharif MN, Sosic D, Rothlin CV, Kelly E, Lemke G, Olson EN, Ivashkiv LB. Twist mediates suppression of inflammation by type I IFNs and Axl. *J Exp Med*. 2006 Aug 7;203(8):1891-901. doi: 10.1084/jem.20051725. Epub 2006 Jul 10. PMID: 16831897; PMCID: PMC2118370.

- Shi C, Li X, Wang X, Ding N, Ping L, Shi Y, Mi L, Lai Y, Song Y, Zhu J. The proto-oncogene Mer tyrosine kinase is a novel therapeutic target in mantle cell lymphoma. *J Hematol Oncol*. 2018 Mar 20;11(1):43. doi: 10.1186/s13045-018-0584-6. PMID: 29554921; PMCID: PMC5859520.
- Shibata T., D. M. Habel, A. L. Coelho, S. L. Kunkel, N. W. Lukacs, C. M. Hogaboam. 2014. Axl receptor blockade ameliorates pulmonary pathology resulting from primary viral infection and viral exacerbation of asthma. *J Immunol*. 192: 3569–3581 Shibata T, et al., 2014
- Sia JK, Rengarajan J. Immunology of Mycobacterium tuberculosis Infections. *Microbiol Spectr*. 2019 Jul;7(4):10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018. PMID: 31298204;
- Simmons JD, Stein CM, Seshadri C, Campo M, Alter G, Fortune S, et al. Immunological mechanisms of human resistance to persistent Mycobacterium tuberculosis infection. *Nat Rev Immunol*. (2018) 18:575–89. doi: 10.1038/s41577-018-0025-3
- Sreejit G, Ahmed A, Parveen N, Jha V, Valluri VL, Ghosh S, Mukhopadhyay S. The ESAT-6 protein of Mycobacterium tuberculosis interacts with beta-2-microglobulin (β 2M) affecting antigen presentation function of macrophage. *PLoS Pathog*. 2014 Oct 30;10(10):e1004446. doi: 10.1371/journal.ppat.1004446. PMID: 25356553; PMCID: PMC4214792.
- Staub E, Rosenthal A, Hinzmann B. Systematic identification of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs in the human proteome. *Cell Signal*. 2004 Apr;16(4):435-56. doi: 10.1016/j.cellsig.2003.08.013. PMID: 14709333.
- Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melián A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*. 1998 Oct 2;282(5386):121-5. doi: 10.1126/science.282.5386.121. PMID: 9756476.
- Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science*. 2002 Jan 11;295(5553):338-42. doi: 10.1126/science.1065543. PMID: 11786644
- Tanne A, Neyrolles O. C-type lectins in immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Frontiers in Bioscience (Schol Ed)*. 2011; 3:1147-64
- Teixeira HC, Abramo C, Munk ME. Diagnóstico imunológico da TB: problemas e estratégias para o sucesso. *J Bras Pneumol*. 2007;33(3):323-34
- Tong LS, Shao AW, Ou YB, et al. Recombinant Gas6 augments Axl and facilitates immune restoration in an intracerebral hemorrhage mouse model. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(6):1971-1981. Tong L, et al., 2017
- Tsao TCY, Huang CC, Chiou WK, Yang PY, Hsieh MJ, Tsao KC. 2002. Levels of interferon- γ and interleukin-2 receptor-alpha for bronchoalveolar lavage fluid and serum were correlated with clinical grade and treatment of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 6: 720–727.
- Tsou W-I, Nguyen K-QN, Calarese DA, Garforth SJ, Antes AL, Smirnov SV, et al. Receptor tyrosine kinases, TYRO3, AXL, and MER, demonstrate distinct patterns and complex regulation of ligand-induced activation. *J Biol Chem*. (2014) 289:25750–63. doi: 10.1074/jbc.M114.569020

Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Nov;1843(11):2563-2582. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.014. Epub 2014 Jun 2. PMID: 24892271.

Wang CH, Liu CY, Lin HC, Yu CT, Chung KF, Kuo HP. Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages. *Eur Respir J*. 1998 Apr;11(4):809-15. doi: 10.1183/09031936.98.11040809. PMID: 9623681.

Wang ZY, Wang PG, An J. The Multifaceted Roles of TAM Receptors during Viral Infection. *Virologica Sinica*. 2021 Feb;36(1):1-12. doi: 10.1007/s12250-020-00264-9. Epub 2020 Jul 27. PMID: 32720213; PMCID: PMC7973326.

WHO. Global tuberculosis report 2021. World Health Organization, Geneva.

Wium M, Paccez JD, Zerbini LF. The Dual Role of TAM Receptors in Autoimmune Diseases and Cancer: An Overview. *Cells*. 2018 Oct 12;7(10):166. doi: 10.3390/cells7100166. PMID: 30322068; PMCID: PMC6210017.

Wong, K.-W. & Jacobs, W. R. Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell. Microbiol.* 13, 1371–1384 (2011).

Yao S, Huang D, Chen CY, Halliday L, Wang RC, Chen ZW. 2014. CD4+ T Cells contain early extrapulmonary tuberculosis (TB) dissemination and rapid TB progression and sustain multi-effector functions of CD8+ T and CD3- lymphocytes: Mechanisms of CD4+ T cell immunity. *J Immunol* 192: 2120–2132.

Young DB, Gideon HP, Wilkinson RJ. Eliminating latent tuberculosis. *Trends Microbiol.* 2009 May;17(5):183-8. doi: 10.1016/j.tim.2009.02.005. Epub 2009 Apr 16. PMID: 19375916.

Zagórska A, Través PG, Lew ED, Dransfield I, Lemke G. Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. *Nat Immunol* (2014) 15(10):920–8. doi: 10.1038/ni.2986

Zhang Y, Arner EN, Rizvi A, Toombs JE, Huang H, Warner SL, Foulks JM, Brekken RA. AXL Inhibitor TP-0903 Reduces Metastasis and Therapy Resistance in Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2022 Jan;21(1):38-47. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0293. Epub 2021 Oct 21. PMID: 34675118; PMCID: PMC8742768.

Zhou, Y., Wang, Y., Chen, H. et al. Immuno-oncology: are TAM receptors in glioblastoma friends or foes?. *Cell Commun Signal* 19, 11 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00694-8>

Zizzo G, Hilliard BA, Monestier M, Cohen PL. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J Immunol.* (2012) 189:3508–20. doi: 10.4049/jimmunol.1200662

