ESTER WILMA PACHECO GONZALES

**Avaliação de macrófagos peritoneais em
camundongos C57Bl/6 *bim*^{+/+} e *bim*^{-/-}**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós- Graduação em
Imunologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

São Paulo

2019

ESTER WILMA PACHECO GONZALES

**Avaliação de macrófagos peritoneais em
camundongos C57Bl/6 *bim*^{+/+} e *bim*^{-/-}**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Gustavo P. Amarante-Mendes

Co-Orientador: Dra. Karina Ramalho Bortoluci

Versão original

São Paulo

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pacheco Gonzales, Ester Wilma
Avaliação de macrófagos peritoneais em camundongos
bim+/+ e bim-/- / Ester Wilma Pacheco Gonzales;
orientador João Gustavo Pessini Amarante Mendes;
coorientadora Karina Ramalho Bortoluci. -- São
Paulo, 2019.
80 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. BIM. 2. Large Peritoneal Macrophages. 3.
Small Peritoneal Macrophages. I. Pessini Amarante
Mendes, João Gustavo, orientador. II. Ramalho
Bortoluci, Karina , coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ester Wilma Pacheco Gonzales

Título da Dissertação/Tese: **Avaliação de macrófagos peritoneais em camundongos C57Bl/6 *bim*^{+/+} e *bim*^{-/-}**

Orientador: João Gustavo Pessini Amarante Mendes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Análise da Apoptose, Piroptose e Necroptose em Macrófagos de Camundongos bim +/-*", registrado sob o protocolo nº **88/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **17/08/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) João Gustavo P. Amarante-Mendes**

- Departamento: *Imunologia*

- Membros da Equipe: *Ester Wilma Pacheco Gonzales (Pós-graduando), Isabela Suzuki Sampaio (Pós-graduando), Maryanne Melanie Gonzales Carazas (Pós-graduando), Elizabeth Cristina Rodrigues (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Analysis of Apoptosis, Pyroptosis and Necroptosis in bim -/- mice macrophages*", protocol nº **88/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **8/17/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) João Gustavo P. Amarante-Mendes**

- Team members: *Ester Wilma Pacheco Gonzales (Graduate Student), Isabela Suzuki Sampaio (Graduate Student), Maryanne Melanie Gonzales Carazas (Graduate Student), Elizabeth Cristina Rodrigues (Graduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C57Bl/6 selvagens	Macho/Male	6-8 semanas/weeks	112
	C57Bl/6 bim +/- e bim +/-	Macho/Male	6-8 semanas/weeks	336

São Paulo, 19 de agosto de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, meu maior agradecimento é a Deus, o qual me concedeu a existência, o tempo, a oportunidade e o amor de meus queridos amigos e familiares.

Agradeço à minha família, que sempre me deu o suporte necessário. Que me deram palavras de carinho quando me sentia sozinha; que me deram palavras de coragem quando me sentia sem saída. Que compreenderam minha ausência por tantas vezes enquanto estive no laboratório. Muito obrigada mãe, Wilma G. de Pacheco, pai, Avelino V. P. Puquio, e irmão A. Isai P. Gonzales. Este sonho não teria sido possível sem vocês!

Agradeço ao meu orientador, Dr. João Gustavo P. Amarante-Mendes, que recebeu-me em seu laboratório e me introduziu a esta maravilhosa família do “lab 244”, assim carinhosamente chamada por nós, seus alunos. Agradeço pelo conhecimento científico e pelos conselhos de vida compartilhados conosco continuamente. Jamais esquecerei o dia em que ouvi dele “não deixarei você desistir”, frase de um amigo e pai.

Agradeço a minha co-orientadora, Dra. Karina Ramalho Bortoluci (CTCMol-UNIFESP), que forneceu-me bons conselhos e até mesmo suporte material. Compartilhou seu conhecimento e nos deu muitos direcionamentos.

Agradeço aos meus queridos amigos de laboratório, àqueles que estão e àqueles que já não estão, mas que fizeram os momentos serem mais felizes. Em especial, agradeço à Melanie Gonzales (Melanie linda) por ter sido quem me acompanhou e ensinou muito sobre os animais, sobre os experimentos e que por muito tempo foi minha companheira mais próxima neste jornada. Depois que a mesma voltou ao Peru senti um vazio muito grande. Sou muito grata por sua amizade, jamais esquecerei! Agradeço ao Henry Montero, que foi um bom amigo e que fez questão de me deixar sua bancada de herança, da qual fiz uso até hoje. Agradeço à Eliza Rodrigues, que me acompanhou durante o período de estágio no laboratório e por ter me acompanhado em tantos experimentos, brindando-me mais do que sua ajuda, palavras de calma e bons conselhos. Agradeço ao Sebastian Sevin, que teve uma estadia curta entre nós, mas que mesmo assim foi sempre solícito, prestativo e alegre. Sou grata por ter me ajudado em muitos experimentos. Agradeço à Isabelinda (Isabella Suzuki) que

já no finalzinho se tornou uma grande amiga e por diversas vezes companheira de trabalho até longas horas da noite. Agradeço a Tandressa Berguetti, sempre carinhosa, paciente e que no final me ajudou muito. Agradeço ao Rodrigo Veras, que sempre nos contagiava com seu jeito alegre e cômico. Agradeço ao Aamir Rana, companheiro de bancada, companheiro de boas conversas. Agradeço à Nath (Nathalia Victo) que muito me ajudou na qualificação.

Enfim, agradeço também àqueles do laboratório com quem tive pouco contato, mas que foram pessoas importantes durante a jornada: Felipe Almeida, Jaqueline Jacysin, Luciana Medina, H-enning Boekhoff, Pricila Carvalho.

Aos colegas de outros laboratórios que eram muito próximos e praticamente faziam parte de nossa família: Nagela Zanluqui, Carla Longo (Carlinha), Lilian Oliveira, Wesley Hiryu, Caroline Manganeli, Marília Garcia, Thays Akemi, Leticia Kogachi, Thais Matoso, Sara Teixeira (Sarinha), Gretel Rodrigues, Elena Santisteban.

Agradeço ao Rogério, aluno e técnico do professor José Mosig (ICB-USP), que me ajudou muito por diversas vezes, seja com conselhos, seja com ajuda física.

Enfim, agradeço também a toda equipe de nosso departamento (Imunologia – ICB IV), que tornaram os dias mais felizes com sua gentileza e amabilidade, bem como prestando seus serviços satisfatoriamente. Em especial quero agradecer aos seguintes membros desta grande família: Otacilio Pedro, Milton Santos, Salete Silva, Neide, Eni Santos, João Pinheiro, Raquel Mota, Claudia Cunha, Sandra Alexandra. Também aos seguranças da portaria Nilson, Roni e Juscelino que sempre me trataram com carinho.

Agradeço aos membros de minha banca de qualificação, cujos conselhos foram tão importantes para o findar deste trabalho: Dra. Maria Regina D'Império Lima, Dra. Daniela Santoro Rosa, Dr. Adilson Kleber Ferreira.

Agradeço também à Laura Migliare, aluna da Dra. Karina que tão gentilmente me ajudou. Agradeço ao Dr. Ricardo Wenlich (Hospital Israelita Albert Einstein) e toda sua equipe, em especial ao Dr. Ricardo e à Larissa Janete, sua aluna, que muito me ajudaram com suporte experimental em determinados experimentos *in vitro*.

Agradeço ao professor Roger Chamas (ICESP) que prontamente nos cedeu alguns reagentes para o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço ao Instituto de Ciências Biomédicas e à Universidade de São Paulo-USP por fornecer-nos o espaço e a oportunidade de realizar este projeto.

Assim também agradeço a agência de fomento CAPES pelo suporte financeiro concedido através do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX) durante o período de julho de 2016 a julho de 2018.

Enfim, agradeço a todos, que mesmo não citados ajudaram de alguma forma, seja com um sorriso, seja com um conselho científico crucial. A todos deixo minha gratidão e o prazer de tê-los conhecido e compartilhado esta jornada.

*“Louvado seja o nome de Deus para todo
o sempre, a sabedoria e o poder a Ele
pertencem” Daniel 2:20*

RESUMO

GONZALES, E. W. P. Avaliação de macrófagos peritoneais em camundongos *bim*^{+/+} e *bim*^{-/-}. 2019. 80f. [Dissertação (Mestrado em Imunologia)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2019.

Macrófagos são células do sistema imunológico que atuam de maneira importante no sistema imune inato, por meio de fagocitose e secreção de citocinas, bem como na estimulação do sistema imune adaptativo, via apresentação de antígenos no contexto de moléculas do MHC e secreção de citocinas. É importante destacar que além de atuar na defesa contra microrganismos patogênicos, os macrófagos também atuam na eliminação de células cancerosas e de células apoptóticas. Macrófagos residentes teciduais possuem diferentes características de acordo com seu ambiente tecidual. No peritônio, em especial maneira, há duas subpopulações distintas, Large Peritoneal Macrophage (LPM) e Small Peritoneal Macrophages (SPM) que possuem características fenotípicas e funcionais distintas. Sendo que LPM predomina no peritônio em condições basais e SPM predomina em condições inflamatórias. A via intrínseca da apoptose é controlada pela família de proteínas Bcl-2, que possui membros anti-apoptóticos e pró-apoptóticos. Dentre os membros desta família, a proteína pró-apoptótica Bim tem grande destaque, visto que tem sido associada ao controle da resposta imune adaptativa, controlando a contração dos linfócitos ao término de uma resposta imune, eliminação de células B e T auto-reativas, entre outros achados. Apesar de sua grande importância, pouco há descrito na literatura de seu papel em macrófagos. Também permanece obscuro, o efeito da ausência de Bim na diferenciação e ativação de macrófagos. Recentemente, nosso grupo de pesquisa observou que macrófagos *bim*^{-/-} são mais resistentes ao efeito citopático da infecção pelo *T. cruzi*, o que sugere que a deficiência de bim pode influenciar a resposta dos macrófagos frente a diferentes infecções. Neste contexto, investigamos neste trabalho o papel de bim sobre macrófagos LPM e SPM sob condições basais e inflamatórias. Para tanto usamos como modelo animal camundongos C57Bl/6 *bim*^{+/+} e *bim*^{-/-} machos e fêmeas. Foi realizada caracterização fenotípica das populações peritoneais por imunofenotipagem e nossos resultados demonstraram que ausência de bim afeta o compartimento de células F4/80⁺ no

peritônio de machos e fêmeas em estado basal. Além disso, em condições basais, ausência de bim leva ao aumento de ativação por células LPM e SPM dependente de gênero. Por último, avaliamos a sensibilidade de macrófagos peritoneais deficientes de bim frente a drogas apoptóticas com actinomicina D e estaurosporina *in vitro*. Macrófagos *bim*^{-/-} não apresentaram maior resistência que macrófagos *bim*^{+/+}.

Palavras-chave: BIM, Large Peritoneal Macrophages. Small Peritoneal Macrophages.

ABSTRACT

GONZALES, E. W. P. Avaliation of peritoneal macrophages in *bim*^{+/+} e *bim*^{-/-} mice. 2019. 59f. [Masters thesis (Immunology Program)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2019

Macrophages are cells of the immune system that play an important role in the innate immune system, through phagocytosis and secretion of cytokines, as well as in the stimulation of the adaptive immune system, through the presentation of antigens in the context of MHC molecules and secretion of cytokines. It is important to highlight that besides acting in defense against pathogenic microorganisms, macrophages also act in the elimination of cancerous cells and apoptotic cells. Tissue resident macrophages have different characteristics according to their tissue environment. In the peritoneum, in particular, there are two distinct subpopulations, Large Peritoneal Macrophage (LPM) and Small Peritoneal Macrophages (SPM) that have distinct phenotypic and functional characteristics. LPM predominates in the peritoneum under basal conditions and SPM predominates in inflammatory conditions. The intrinsic pathway of apoptosis is controlled by the Bcl-2 family of proteins, which has anti-apoptotic and pro-apoptotic members. Among the members of this family, the pro-apoptotic protein Bim has a great prominence, because it has been associated with the control of the adaptive immune response, controlling the contraction of the lymphocytes at the end of an immune response, elimination of self-reactive B and T cells, among other findings. Despite its great importance, little has been described in the literature about its role in macrophages. Also remains unclear, the effect of the absence of Bim on the differentiation and activation of macrophages. Recently, our research group has found that *bim*^{-/-} macrophages are more resistant to the cytopathic effect of *T. cruzi* infection, suggesting that bim deficiency may influence the response of macrophages to different infections. In this context, in this work we investigated the role of bim on LPM and SPM macrophages under basal and inflammatory conditions. Thus, we used as animal model C57Bl/6 *bim*^{+/+} and *bim*^{-/-} males and females. Phenotypic characterization of the peritoneal populations was performed by immunophenotyping and our results demonstrated that the absence of bim affects the F4/80⁺ cell compartment in the peritoneum of males and females in

the steady state. In addition, in basal conditions the lack of bim leads to increased activation by LPM and SPM cells in gender-dependent manner. Finally, we evaluated the sensitivity of bim-deficient peritoneal macrophages to apoptotic drugs such as actinomycin D and staurosporine *in vitro*. *Bim*^{-/-} macrophages showed no greater resistance than *bim*^{+/+} macrophages.

Keywords: BIM. Large Peritoneal Macrophages. Small Peritoneal Macrophages.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Características de LPMs.....	21
Figura 2 - Mudança de marcadores fenotípicos: de monócitos à SPM.....	26
Figura 3 - Características de SPMs.....	27
Figura 4 - Via Intrínseca da apoptose.....	31
Figura 5 - Estratégia de gates para caracterização de populações peritoneais e subpopulações F4/80 ⁺	42
Figura 6 - Número de células totais no peritônio.....	46
Figura 7 - Populações celulares no peritônio não elicitado.....	48
Figura 8 - Populações celulares no peritônio elicitado.....	49
Figura 9 - Populações F4/80 ⁺ no peritônio não elicitado.....	51
Figura 10 - Populações F4/80 ⁺ no peritônio elicitado.....	52
Figura 11 - Marcadores de maturação e ativação em LPM, SPM e F4/80 ^{low} MHCII ^{neg} em fêmeas não elicitadas.....	56
Figura 12 - Marcadores de maturação e ativação em LPM, SPM e F4/80 ^{low} MHCII ^{neg} em machos não elicitados.....	57
Figura 13 - Marcadores de maturação e ativação em LPM, SPM e F4/80 ^{low} MHCII ^{neg} em fêmeas elicitadas.....	58
Figura 14 - Marcadores de maturação e ativação em LPM, SPM e F4/80 ^{low} MHCII ^{neg} em machos elicitados.....	59
Figura 15 - Avaliação de morte celular com Actinomicina D.....	61
Figura 16 - Avaliação de morte celular com Estaurosporina.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de marcadores já descritos para LPM e SPM.....	20
--	-----------

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	17
1.1.Macrófagos: Aspectos Gerais	18
1.2.Macrófagos Peritoneais podem ser subdivididos em SPM e LPM.....	19
1.3.Large Peritoneal Macrophages	21
1.4.Small Peritoneal Macrophages.....	24
1.5.Proteína BIM e seu papel na via intrínseca de apoptose.....	28
1.6.Importância de Bim	32
2.OBJETIVOS.....	36
2.1.Objetivo geral	37
2.1.1.Metas Específicas	37
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1.Animais	39
3.2.Genotipagem de camundongos Bim ^{-/-} e Bim ^{+/-}	39
3.3.Obtenção de macrófagos do peritônio.....	40
3.4.Enriquecimento de macrófagos	41
3.5.Caracterização fenotípica das populações de macrófagos peritoneais	41
3.6.Avaliação de morte celular	42
3.7.Análise Estatística.....	43
4.RESULTADOS.....	44
4.1.Populações peritoneais sofrem influência de proteína Bim	45
4.2.Bim não afeta número de células totais em peritônio antes ou após estímulo com amido	45
4.3.Ausência de bim afeta a compartimento de células F4/80+ de machos e fêmeas antes e após estímulo com amido	46

4.4.Ausência de bim afeta as subpopulações F4/80+ antes e após estímulo com amido.....	50
4.5.Proteína Bim influencia em marcadores de maturação de subpopulações F4/80+.....	53
4.6.Macrófagos bim ^{-/-} frente a indutores apoptóticos.....	60
5.DISSCUSSÃO.....	63
6.CONCLUSÕES.....	71
7.REFERÊNCIAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. Macrófagos: Aspectos Gerais

Macrófagos são importantes células do sistema imunológico que realizam importantes funções tais como imunovigilância, fagocitose, apresentação de antígenos e imunossupressão (MURRAY, 2011).

São geralmente classificados como macrófagos classicamente ativados, M1, e alternativamente ativados, M2, sendo que os de ativação clássica possuem maior atividade antitumoral e antimicrobiana, enquanto que os de ativação alternativa possuem maior expressão de receptores de eliminação e fagocitose, menor produção de citocinas inflamatórias e um metabolismo preferencial de arginina (GINHOUX, 2016). Sabe-se que entre estes dois polos há um espectro de estados de ativação intermediários e que os sinais do microambiente são muito importantes para o mesmo (MURRAY, 2011).

Acreditava-se que macrófagos eram originados sempre de monócitos da circulação sanguínea, sendo isto mais evidente após estímulos estressores. Em linhas gerais, após um estímulo estressor, como por exemplo, uma infecção, há uma maior produção de monócitos e neutrófilos. Os monócitos são então recrutados para o tecido atingido, onde se diferenciam em macrófagos e/ou células dendríticas (MURRAY, 2011). Hoje, sabe-se que isto não é necessariamente verdadeiro para todos os tecidos. É sabido que macrófagos teciduais não são originados apenas a partir de monócitos de sangue periférico. Pelo contrário, em muitos compartimentos e em determinados tipos de inflamação, monócitos circulantes não são os responsáveis pela origem de macrófagos. Além de que, muitos macrófagos teciduais residentes são derivados de precursores embrionários (GINHOUX, 2014.GINHOUX, 2016).

O microambiente tecidual, além de ser importante para o estado de ativação, também é importante para a especialização de macrófagos residentes em tecidos, e mesmo macrófagos diferenciados podem ser reprogramados quando transferidos para um novo microambiente (LAVIN, 2014).

1.2. Macrófagos Peritoneais podem ser subdivididos em SPM e LPM

No interior da cavidade peritoneal coexistem diversos tipos de células imunes. São encontradas células B (células B-1 e B-2), células T, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, mastócitos, neutrófilos, células NK e células NKT. Sendo que células B representam 40% da população peritoneal e dos 60% restantes, aproximadamente metade corresponde a macrófagos (GHOSN, 2010).

Dentre estes macrófagos peritoneais, há duas populações melhor descritas, a saber Large Peritoneal Macrophage (LPM) que é maior e mais granulosa e a Small Peritoneal Macrophage (SPM), menor e menos granulosa. Estas foram caracterizados pela primeira vez por GHOSN e col. (2010), que propuseram a existência das duas subpopulações de macrófagos peritoneais e demonstraram que, além da diferença de tamanho, possuíam diferença em marcadores fenotípicos e em suas funcionalidades, sendo, portanto, duas populações distintas de macrófagos (GHOSN, 2010; CASSADO, 2011). Foi visto que ambos possuíam capacidade fagocítica em ensaios *in vivo* (GHOSN, 2010), sendo que *in vitro* e sem estimulação, SPM possui maior capacidade fagocítica em relação ao LPM (CASSADO, 2011). A capacidade fagocítica de ambos parece ser modulada positivamente por agonistas de TLR como LPS ou flagelina, embora influa mais em SPM. Ambos podem se diferenciar *in vitro* para M1 e M2, no entanto, *in vivo* LPM se diferencia para M2 (CASSADO, 2011).

Atualmente sabe-se que LPM e SPM possuem grandes semelhanças no perfil de expressão gênica (GOSSELIN, 2014) mas que, no entanto, possuem diversas diferenças funcionais marcantes além das inicialmente citadas por GHOSN e col. (2010), como na participação de apresentação de antígenos e na eliminação de células apoptóticas (ROBERT, 2017; TAKENAKA, 2018).

Devido a diferença marcante na expressão de alguns marcadores, podem ser classificados em: GATA6 dependente, F4/80⁺ ICAM2⁺ (LPM) e GATA6 independente, F4/80^{low} MHC II⁺ (SPM) (GHOSN, 2010; KIM, 2016). Ambas as populações expressam CD115 e CD11b (KIM, 2016) (Figura 1). Características mais detalhadas destas células se encontram na Tabela 1.

Large Peritoneal Macrophage é a subpopulação predominante, compõe mais de 90%, enquanto que SPM compõe menos de 10% (KIM, 2016;

CASSADO, 2011). No entanto, após estimulação inflamatória ou infecciosa há uma mudança deste perfil, onde há a predominância de SPM em detrimento da população de LPM (GHOSN, 2010; CASSADO, 2011). Tal processo pode estar de alguma forma relacionado ao fato de LPM acumular-se sobre pontos específicos do omento após estímulo inflamatório, o qual foi visto após indução de inflamação com LPS (OKABE, 2014)

LPM	SPM	Referências
CD115 ⁺	CD115 ⁺	KIM, 2016
CD11b ⁺ (> expressão; >50 vezes maior que SPM)	CD11b ⁺ (< expressão)	CASSADO, 2011; KIM, 2016
GATA 6 dependente	GATA 6 independente	KIM, 2016
F4/80⁺/F4/80^{high}	F4/80^{low}	CASSADO, 2011
ICAM2 ⁺	-	KIM, 2016
MHCII^{low/neg}	MHC II⁺	CASSADO, 2011; KIM, 2016
-	CD226 ⁺ CD11c ⁺ (subtipo predominante)	KIM, 2016
-	CD226 ⁻ (<15%)	KIM, 2016
Ly6C ⁻	Ly6C ⁻	KIM, 2016
Sem informação	TremL4 ⁻	KIM, 2016
Gr-1 ⁺	-	GHOSN, 2010
AA4.1 ⁺	-	GHOSN, 2010
TLR4 ⁺ (> expressão)	TLR4 ⁺ (< expressão)	GHOSN, 2010
TLR4 ⁺ após LPS in vivo (> expressão)	TLR4 ⁺ após LPS in vivo (< expressão)	GHOSN, 2010
c-kit ⁻	c-kit ⁻	GHOSN, 2010
DXS ⁻	DXS ⁻	GHOSN, 2010
CD40 (> expressão)	CD40 (< expressão)	GHOSN, 2010
CD80 (> expressão)	CD80 (< expressão)	GHOSN, 2010
CD86 (> expressão)	CD86 (< expressão)	GHOSN, 2010
HL3 MAb (CD11c) ⁻	HL3 MAb (CD11c) ⁺	GHOSN, 2010
N418 MAb (CD11c) (> expressão)	N418 MAb (CD11c) (< expressão)	GHOSN, 2010
-	CD62L ⁺	GHOSN, 2010
TIM4 ⁺	-	BAIN, 2016

Tabela 1- Marcadores fenotípicos de LPM e SPM. Diferenças mais bem caracterizadas em destaque em negrito. Referências na tabela.

1.3. Large Peritoneal Macrophages

Assim como SPM's, LPM's possuem marcadores característicos como CD11b e F4/80 mais elevados que SPM (classificado ora como F4/80⁺, ora como F4/80^{high} contrapondo-se a SPM, sempre F4/80^{low}), expressão positiva de ICAM2, CD93 e GATA6 (GAUTIER, 2012). Ultimamente os marcadores mais consensuais são F4/80^{high} e/ou GATA6⁺ (KIM, 2016; BAIN, 2016; WANG, 2016; CAIN, 2013).

Figura 1 – Características de LPMs. Large Peritoneal Macrophages são predominantes em estados não inflamatórios. São mais comumente caracterizados como F4/80^{high} MHCII^{low/neg}, ICAM2⁺ e GATA6⁺. Fazem *clearance* de células apoptóticas e participam na ativação de células B para secretarem IgA no intestino. Sua origem é embrionária e com o avançar da vida adulta passam a ter também contribuição de células hematopoiéticas. Machos tem maior quantidade de células LPM que tem origem hematopoiética. Fêmeas, sempre tem maior quantidade de LPMs de origem embrionária do que machos.

Estudos têm demonstrado que o fator de transcrição GATA-6 tem um papel crucial sobre LPM's. Este fator de transcrição é apenas expresso nesta subpopulação de macrófagos, diferenciando-o de macrófagos de outras origens e de outras células como células T e B, NK e células dendríticas que não expressam GATA-6 (GAUTIER, 2014; OKABE, 2014). Este fator parece ser

também regulado pelo microambiente tecidual. Assim, o ácido retinóico produzido pelo omento, ativa a expressão de GATA-6 sobre LPM. De fato, foi demonstrado que em camundongos com deficiência de vitamina A (precursora de ácido retinóico) tiveram efeitos que foram desde uma ligeira diminuição de macrófagos peritoneais até uma redução na expressão de GATA6 sobre LPM's com o avançar do período de privação desta vitamina (OKABE, 2014).

GATA6 também demonstrou ser importante para a produção de IgA no intestino. Dados sugerem que LPM's atuam sobre células B-1 do peritônio para que possam secretar IgA no intestino. Isto porque em camundongos sem expressão de GATA6 há uma menor presença de IgA em fezes destes camundongos (OKABE, 2014).

Além disto, foi visto que em camundongos com deficiência de vitamina A houve um aumento do recrutamento de células inflamatórias, com características semelhantes a SPM's e que nessas condições LPM's acumulavam-se em pontos específicos do omento. Foi proposto que isto poderia ser uma possível causa do desaparecimento de LPM após estímulos inflamatórios (OKABE, 2014). Foi proposto, ainda, que o ácido retinóico atua sobre GATA6 em um mecanismo dependente do fator de transcrição PU.1 (GOSSELIN, 2014).

Diminuição da expressão deste fator mostrou levar a diminuição de expressão de F4/80 e mudança no metabolismo celular. Esta mudança metabólica incorre na diminuição acentuada de produção de aspartocilase (GAUTIER, 2014). Além disso, falta de GATA-6 leva a maior susceptibilidade à morte celular por apoptose destes macrófagos (GAUTIER, 2014). Sua falta também leva a perda de expressão de certos genes expressos preferencialmente em macrófagos do peritônio, como CD62 P e CD49f (OKABE, 2014).

Embora seja ainda controverso, Large Peritoneal Macrophage (F4/80^{high}) parece ter origem antes do nascimento, já que esta população já está presente desde o primeiro dia pós-nascimento (KIM, 2016).

A participação de monócitos na origem desta população ainda é um pouco controversa. Estudo de mapeamento de destino com camundongos CX3CR1^{gfp/+} x ROSA26^{TdTomato} e com camundongos deficientes de CCR2, tem demonstrado que LPM's não parecem ser dependentes de células CCR2 e CX3CR1, como monócitos inflamatórios (KIM, 2016). Por outro lado, outros dados apontam que

macrófagos peritoneais residentes (F4/80^{high}) podem, dependendo da idade e do sexo, ser originados em parte por SPM (BAIN, 2016). Foi visto que em camundongos machos, parte dos macrófagos F4/80^{high} era dependente de origem hematopoiética e que esta fração aumentava com o aumento de idade. Sendo de 40% em camundongos de 3 semanas e chegando a 80% em camundongos de 16 semanas. Quando se compara a dependência de progenitores hematopoiéticos de LPM em machos e fêmeas por quimerismo, é evidente que para uma mesma idade machos têm maior porcentagem de células derivadas de medula óssea. De fato, em fêmeas, mesmo com o passar da idade, o aumento não é muito grande, permanecendo baixo (BAIN, 2016). Todas as células F4/80^{high} possuem o fenótipo de MHCII^{low} e GATA6⁺ (BAIN, 2016). No entanto, células derivadas de origem hematopoiéticas parecem ser Tim4⁻ e as de origem embrionária Tim4⁺ (BAIN, 2016; MIYANISHI, 2007). E, o que os resultados indicam, é que esta fração de LPM de origem hematopoiética é originada a partir de SPM (F4/80^{low}MHCII^{high}) (BAIN, 2016). Logo, BAIN (2016) propõe que monócitos da circulação Ly6C⁺ entrariam na cavidade peritoneal, passariam pelo fenótipo transitório de Ly6C⁺MHCII⁺ e depois para F4/80^{low}MHCII⁺, fenótipo característico de SPM. Posteriormente, poderia assumir o fenótipo F4/80^{high}GATA6⁺ de LPM, porém sendo Tim4⁻ (BAIN, 2016).

Funcionalmente, tem-se visto que LPM é importante para *clearance* de células apoptóticas no estado basal e de células necróticas após injúria estéril. Além disso mostrou-se importante para revascularização após injúria estéril. Funções que serão mais detalhadas a seguir (ROBERT, 2017. WANG, 2016).

A exemplo de macrófagos residentes de outras cavidades corporais como cavidade pleural e alveolar (GOSSELIN, 2014; MURRAY, 2011), LPMs (residentes do peritônio) são programados por fatores do microambiente tecidual. O mesmo também ocorre para que possuam boa atividade fagocítica e, mesmo assim, ser menos responsivo aos ácidos nucleicos de células apoptóticas endógenas fagocitadas; características que permitem que macrófagos “limpem” a grande quantidade de células apoptóticas endógenas que normalmente existem e, mesmo assim, não causem uma grande resposta inflamatória. O microambiente tecidual do peritônio parece reprimir a expressão de TLR9 em LPMs e, conseqüentemente, diminuir a resposta desta aos ácidos nucleicos de células apoptóticas fagocitadas. (ROBERT, 2017). Este ambiente

tecidual induz a ativação de fatores de transcrição KLF2 e KLF4 que, além de suprimir a expressão de TLR9, também coordena outras alterações como aumento de receptores que reconhecem células apoptóticas (ROBERT, 2017).

Uma característica importante de se observar é a expressão de Tim-4 sobre LPM. Como foi visto (BAIN, 2016), LPM embrio-derivadas apresentam expressão de Tim4, receptor fagocítico, que foi visto em células Mac1⁺ de tecidos como baço e linfonodo (MIYANISHI, 2007). Nessas células, ele se liga à fosfatidilserina e é, portanto, importante para o reconhecimento de células mortas e para a fagocitose das mesmas por células como fibroblastos e macrófagos tímicos (MIYANISHI, 2007).

Tem-se visto que após uma injúria estéril de um órgão visceral como o fígado, esta população de macrófagos F4/80^{hi}GATA6⁺ pode infiltrar-se rapidamente no tecido sem a necessidade de via de recrutamento via vasos sanguíneos (WANG, 2016). Após a liberação de ATP por células necróticas, LPMs migram através do mesotélio até o local da injúria e usam CD44 para ligar-se ao ácido hialurônico exposto na superfície do local afetado. Há, então proliferação e adoção de um fenótipo de ativação alternativo. Isto é, LPMs têm aumento de proliferação local, característico de resposta imune tipo 2 em macrófagos residentes; aumentam expressão de arginase I, além de passarem a expressar CD206 e CD273, que são marcadores de ativação alternativa de macrófagos. Ainda no tecido afetado, LPMs destroem núcleo de células necróticas e contribuem para a formação de camadas de DNA sobre a ferida, ajudando também na revascularização tecidual (WANG, 2016).

1.4. Small Peritoneal Macrophages

Esta subpopulação, assim como LPM, poder ser caracterizada por diversos marcadores fenotípicos (ver tabela 1), sendo descrita na literatura de diferentes maneiras. Primeiramente foi descrita por GHOSN (2010) como tendo menores níveis de CD11b e F4/80 em relação a LPM (que possui altos níveis de CD11b e F4/80). Hoje, após estudos que mostram outros marcadores característicos (GAUTIER, 2012; GAUTIER, 2014; KIM, 2016; BAIN, 2016) parece ser consenso caracterizar SPM como a subpopulação de macrófagos

MHCII^{high}. De fato, interessante, foi visto que o fator de transcrição Ciita, descrito como importante para regular expressão de MHCII, é preferencialmente expresso sobre SPM e não LPM (GOSSELIN, 2014).

Ainda existe certa controvérsia quanto a população CD11c⁺ pertencente a população MHCII^{high}. Alguns pesquisadores consideram a população CD11c⁺ apenas como célula dendrítica (GHOSN, 2011; CAIN 2013) enquanto que outros consideram que todas as células CD11c⁺ (KIM, 2016) ou parte delas (BAIN, 2016) são uma subpopulação de SPM. Tem sido demonstrado que uma parte desta população CD11c⁺, expressa CD272 e é altamente dependente de Flt3l. O que pode indicar que esta fração seja de fato composta de células dendríticas convencionais (cDC) e a fração restante de CD11c⁺ seja SPM propriamente dita (BAIN, 2016). Assim sendo, a partir de dois estudos, que melhor descrevem a origem e a maturação de SPM no peritônio, consideram que a população de SPM é subdivida de diferentes formas: 1) BAIN e *col.* (2016) considera que é subdivida em três frações caracterizadas pela expressão de CSF1R e CD11c. Duas frações possuem CSF1R, mas diferem na presença de CD11c: CSF1R⁺CD11c⁺ e CSF1R⁺CD11c⁻. E uma terceira fração que não possui CSF1R: CSF1R⁻CD11c⁺, sendo esta a provável cDC (BAIN, 2016). 2) KIM e *col.* (2016) considera que é subdivida CD226⁺CD11c⁺ (majoritária, cerca de 90% das SPMs) e CD226⁻CD11c⁻ (minoritária, inferior a 15% das SPMs) (Figura 4).

A origem de SPM tem tido opiniões mais convergentes. Baseado em estudo de transferência adotiva, foi demonstrado que SPM's não eram originados a partir da população residente (LPM) após estímulo do peritônio. Pelo contrário, pareciam ser originados de monócitos do sangue que passavam a ganhar expressão de MHCII até chegar ao fenótipo de SPM (GHOSN, 2010). De fato, mais tarde foi demonstrado que as subpopulações SPM têm precursores CCR2 e CX3CR1 positivos (KIM, 2016), moléculas expressas em monócitos inflamatórios, CCR2⁺CX3CR1^{low} (GORDON, 2005). Estudos de mapeamento de destino têm dado indícios de que estas populações advêm de células CX3CR1, e têm a expressão deste marcador diminuído progressivamente a medida que a célula vai maturando (KIM, 2016).

Figura 2 – Mudança de marcadores fenotípicos: de monócitos à SPM. Monócitos da circulação Ly6C^{hi}CCR2⁺CX₃CR1⁺ entram no peritônio. No peritônio ganham expressão e aumentam gradativamente expressão MHCII enquanto perdem expressão de Ly6C e de CX3CR1. Neste momento ainda são CD226⁻CD11c⁻. Posteriormente ganham expressão de CD11c e de CD226.

Além disso, SPMs são GFP⁺ em camundongos CCR2-GFP, indicando que possuem expressão recente de CCR2, e estão diminuídos em camundongos CCR2 deficientes, onde não há entrada adequada de monócitos no sangue (KIM, 2016). Esta dependência de precursores CCR2⁺, no entanto, parece ser heterogênea. A partir de ensaios de quimerismo por transferência adotiva, foi visto que certa fração era totalmente dependente de CCR2, assim como monócitos. Já outra fração foi parcialmente dependente e, finalmente, a fração que compõe provável população de cDC não foi afetada (BAIN, 2016). No entanto, mesmo sendo derivadas de células CCR2⁺, nenhuma das populações de SPM, CD226⁺ e CD226⁻, possui expressão de Ly6C ou TremL4, marcadores característicos de monócitos Ly6C⁺ e Ly6C^{low}, respectivamente, demonstrando que podem ser derivadas de monócitos, mas que ambas as populações MHCII^{high} já possuem fenótipo distinto (KIM, 2016). Portanto, é consenso que esta população é originada a partir de monócitos Ly6C^{hi} do sangue (GHOSN, 2010; KIM, 2016) assim como a exemplo de macrófagos derivados de monócitos em outros tecidos (BAIN, 2014; GINHOUX, 2014).

A partir de estudos com camundongos, onde foi acompanhada o desenvolvimento populacional pós-natal, KIM (2016) propôs que monócitos dariam origem a população SPM $CD226^-CD11c^-$ transitória e esta, por sua vez, daria origem a população SPM $CD226^+CD11c^+$, majoritária. Este processo é acompanhado por uma série de modificações de marcadores superficiais e ocorre da seguinte maneira: Monócitos $Ly6C^{hi}CCR2^+CX_3CR1^+$ entram no peritônio. No peritônio ganham expressão de MHCII e, à medida que aumentam expressão de MHCII perdem expressão de Ly6C e de CX3CR1. Neste momento ainda são $CD226^-CD11c^-$. Em seguida, passam a ganhar expressão de CD11c e posteriormente passa a ganhar expressão de CD226 em um processo que parece ser dependente do fator de transcrição IRF4. De modo que toda célula $MHCII^+$ já é $CD11c^+$. Os dados têm indicado que a medida que a célula amadurece de $CD226^-$ para $CD226^+$ também vai perdendo CX3CR1. Finalmente,

Figura 3 – Características de SPMs. SPMs são predominantes em estados inflamatórios. São mais comumente caracterizados como $F4/80^{low} MHCII^{high}$. Literaturas que melhor descrevem a diferenciação de SPMS também as classificam como tendo subpopulações. Apresentam antígenos para células Th0. Têm origem embrionária, isto é, são originados a partir de monócitos da circulação que se diferenciam até atingir o fenótipo de SPM. Na vida adulta, monócitos circulantes podem chegar ao peritônio e apresentar o fenótipo $CD226^+CD11c^+$ após 2,5 dias e ganham expressão de $CD11c^+$ após 4 dias.

há a presença majoritária do fenótipo F4/80^{low}MHCII^{high}CD226⁺CD11c⁺ de SPM. Mesmo no peritônio adulto, ainda há a presença da população F4/80^{low}MHCII^{high}CD226⁻CD11c⁻ mas em pequena proporção (<15%), indicando que é uma população transitória presente não só no povoamento do peritônio após o nascimento, mas também durante toda a vida adulta (KIM, 2016) (Figura 3).

Apesar de ser uma população bem definida após completa maturação, alguns resultados deram indício de que SPM poderia dar origem a LPM na vida adulta. Como já mencionado anteriormente, a medida que o animal vai envelhecendo e principalmente em machos, a origem de LPM passa a depender de células hematopoiéticas (BAIN, 2016). Sendo confirmado, posteriormente, que SPMs poderiam dar origem a LPMs (GUNDRA, 2017).

Em relação a funcionalidade de SPM, tem sido visto que são os SPM que apresentam antígenos para células TCD4 naive e que este processo é dependente de receptor CD226 (TAKENAKA, 2018).

1.5. Proteína BIM e seu papel na via intrínseca de apoptose

Bim é uma proteína que foi primeiramente identificada por O'CONNOR e colaboradores (1998) e hoje, apesar de possuir mais isoformas, as mais importantes e mais estudadas são Bim_{EL} (Extra Longa), Bim_L (Longa) e Bim_S (Curta), sendo esta última a mais potente (SIONOV, 2015; O'CONNOR, 1998). É encontrada em células hematopoiéticas, epiteliais, neuronais e em células germinativas (O'REILLY, 2000).

As isoformas Bim_{EL} e Bim_L não estão constitutivamente ativadas. Estas são sequestradas no complexo motor de dineína de microtúbulos e após estímulos apoptóticos, como a privação de citocinas, permitem a liberação de Bim deste complexo, permitindo que Bim se ligue a proteínas anti-apoptóticas homólogas de Bcl-2. Sua isoforma Bim_S não se liga ao complexo motor de dineína de microtúbulos e parece estar presente em condições patológicas específicas (PUTHALAKATH, 1999; BOUILLET, 2000).

Bim pode sofrer alteração de expressão em respostas a fatores externos como a presença de fator de crescimento – diminuindo expressão - e a presença

de componentes bacterianos – aumentando expressão (PUTHALAKATH, 1999; STRASSER, 2002; KIRSCHNEK, 2005).

Apesar de sua importância, a função de *bim* depende de sua ação conjunta com membros da família Bcl-2, uma família de proteínas que controlam a via intrínseca ou mitocondrial da apoptose (CORY, 2003; GARCIA-SAEZ, 2012). Esta família é dividida e agrupada segundo suas funções, anti ou pró-apoptóticas, e por seus domínios de homologia BH (do inglês, BCL2-Homology). São três grupos, o grupo de proteínas anti-apoptóticas, o de proteínas pró-apoptóticas executoras e o de proteínas pró-apoptóticas *BH3-only* (WAREN, 2019).

O primeiro grupo, de proteínas anti-apoptóticas, possui em geral quatro domínios de homologia, BH1, BH2, BH3 e BH4. Fazem parte deste grupo as proteínas BCL-2, BCL-B, BCL-X_L, BCL-W, MCL-1, BCL-F/A1; sendo que destas, as duas últimas não possuem o domínio BH4 (LOMONOSOVA, 2009. HOSSINI, 2008). Este grupo, como propriamente dito, possui atividade anti-apoptótica (WAREN, 2019). O segundo grupo, de proteínas pró-apoptóticas executoras, possui domínios BH1, BH2 e BH3. É constituído pelas proteínas BAX, BAK e BOK (WAREN, 2019). O terceiro grupo, de proteínas pró-apoptóticas *BH3-only*, possuem apenas um domínio BH3, como seu nome sugere. Fazem parte deste grupo as proteínas BIM, BID, PUMA, BMF, BIK, HRK, entre outras (WAREN, 2019; LOMONOSOVA, 2009).

O domínio BH3 consiste de 9 a 16 aminoácidos e é essencial para que haja um dobramento que permite a interação entre membros da família bcl-2 (WAREN, 2019; LOMONOSOVA, 2009). Mais especificamente, resíduos de leucina e ácido aspártico de BH3 mais conservados parecem ser os mais importantes para interação das proteínas *BH3-only* com membros anti-apoptóticos (HINDS, 2005).

O ponto determinante para que a apoptose por esta via aconteça é a permeabilização da membrana externa mitocondrial, que leva a ativação de cisteíno-proteinases, denominadas caspases. Assim, quando há estímulos intrínsecos à célula, como DNA danificado, privação de fatores de crescimento e estresse oxidativo esta via pode ser ativada e a membrana mitocondrial é permeabilizada. Uma vez permeabilizada, há a liberação de citocromo c e de SMAC de seu interior. Citocromo c se liga a APAF-1 (apoptosis protease-activating factor 1) e à pró-caspase 9, formando o apoptossomo. Este

apoptossomo ativa a caspase 9, que ativa as caspases 3 e 7. SMAC, por sua vez atua liberando caspases 3 e 7 de sua inibição por XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis). Finalmente, caspases 3 e 7 ativadas clivam mais de 1.000 proteínas, o que afeta diversos processos fisiológicos da célula culminando em sua morte. O resultado pode ser observado através do fenótipo característicos de células apoptóticas: picnose (devido a condensação da cromatina), retração celular e formação de bolhas na membrana (KALKAVAN, 2018; ASHKENAZI, 2017).

Para tanto, o destino da célula depende de como os membros da família Bcl-2 irão atuar. Isto é, de como o balanço entre as ações dos membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos levará à permeabilização ou não da membrana, respectivamente. Se as proteínas pró-apoptóticas executoras se oligomerizarem e formarem poros na membrana da mitocôndria, haverá a permeabilização dela e todos os eventos já descritos ocorrerão. Assim as proteínas anti-apoptóticas atuam inibindo as proteínas pró-apoptóticas executoras e as pró-apoptóticas BH3-only, impedindo que haja permeabilização da membrana (KALE, 2018). Quando há um estímulo de *stress* celular, os membros pró-apoptóticos BH3-only atuam inibindo os anti-apoptóticos, permitindo a liberação dos membros executores (BAX e BAK) que irão se oligomerizar e formar poros na membrana mitocondrial. Alguns membros BH3-only, como Bid e Bim podem também ativar diretamente BAX e BAK, embora isto seja um pouco controverso (ASHKENAZI, 2017; KALE, 2018). Esta via está ilustrada na figura 1 a partir do ponto de vista de que bim também ativa BAX/BAK, como será discorrido em seguida.

Sabe-se que bim, assim como bid, é uma das proteínas pró-apoptóticas mais potentes indutoras de permeabilização da membrana externa mitocondrial (KWANA, 2005). No entanto, o meio pela qual Bim ativa Bax e Bak para desencadear a apoptose ainda é relativamente controverso (CZOBATAR, 2009). Viu-se que peptídeos de domínio BH3 de Bim podem tanto inibir proteínas anti-apoptóticas, como também ativar Bax diretamente. (KWANA, 2005). Entretanto, outro estudo demonstrou que o peptídeo BH3 Bim não é capaz de ligar-se a Bax ou causar a oligomerização de Bax quando Bax está em sua conformação nativa. Liga-se a Bax apenas quando esta já está ativa. Este estudo demonstrou que o peptídeo BH3 Bim se liga a proteínas anti-apoptóticas, indicando que não leva ao engajamento de apoptose pela ligação direta com Bax mas que poderia fazê-lo pela inibição de proteínas anti-apoptóticas (WILLIS, 2007).

Apesar da controvérsia, estudos mais atuais descrevem o mecanismo de ativação de BAX como sendo dependente de Bim. Assim, o domínio de BH3 de Bim interage como sítio ativador de Bax, permitindo mudanças estruturais em Bax, como a exposição de seu domínio BH3 e de hélice α -9, uma porção necessária para sua translocação para a membrana da mitocôndria. Isto permite

Figura 4. Via Intrínseca da Apoptose. Após estímulo estressor, proteínas BH3-only inibem efeito de proteínas anti-apoptóticas. BAX e BAX são liberadas e formam oligômeros que formam poros sobre a membrana mitocondrial. Bim pode ativar BAX/BAK diretamente. BAX/BAK ativas podem também ativar a oligomerização de outras proteínas BAX/BAK. Com a formação de poros na membrana mitocondrial citocromo c e SMAC (tardiamente) são liberados para o citosol. Citocromo c forma apoptossomo com APAF-1. Apoptossomo ativa caspase-9 que ativa caspases-3/7. SMAC liberado atua de forma a liberar caspases-3/7 de sua inibição por XIAP. Caspases-3/7 engajam maquinaria apoptótica levando a célula a morte.

que BAX se torne ativa e transloque-se para a membrana mitocondrial. Com o domínio BH3 exposto ela pode ativar demais proteínas Bax inativas, que ativas formam o poro oligomérico para promover apoptose e liberação de citocromo c. Assim, segundo este mecanismo proposto, Bim desempenha o papel iniciador para a formação de poro homo-oligomérico de Bax, (GAVATHIOTHIS, 2010).

Quanto a sua atividade inibitória sobre as proteínas anti-apoptóticas, tem sido visto que de fato Bim é capaz de ligar-se a todas as proteínas anti-apoptóticas, Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 e A1 (CHEN, 2005).

1.6. Importância de Bim

Bim está importantemente envolvido no controle de auto-imunidade, pois mostrou-se essencial para a eliminação de linfócitos T (BOUILLET, 2002; DAVEY, 2002) e B (ENDERS, 2003) auto-reativos.

Para evitar que linfócitos T saiam até a periferia, timócitos podem ser eliminados por um processo conhecido como seleção negativa (STARR, 2003). Para tanto foi visto que a falta da proteína Bim tornou timócitos resistentes a apoptose induzida por estimulação do complexo TCR-CD3 (modelo usado para simular seleção negativa de timócitos) (BOUILLET, 2002). Viu-se também que a estimulação do TCR leva ao aumento de expressão de Bim, levando a maior complexação de Bim com Bcl-X_L (membro anti-apoptótico mais abundante da família Bcl-2 em timócitos CD4⁺CD8⁺). Em contrapartida, indução da via extrínseca da apoptose pareceu não influenciar diretamente na indução de seleção negativa. Portanto, mostra que a via intrínseca e a proteína BIM são cruciais para este processo (BOUILLET, 2002).

Uma vez na periferia, linfócitos T auto-reativos podem ainda ser eliminados em um processo denominado tolerância cruzada. Neste processo, auto-antígenos associados a tecidos são apresentados por DCs de forma cruzada. Há uma ativação e proliferação inicial destas células seguida da eliminação das mesmas (KURTz, 1997). Este processo de eliminação mostrou-se dependente de Bim, pois na ausência de Bim estas células não foram eliminadas enquanto que, na presença estas células foram eliminadas após proliferação (DAVEY, 2002).

Na deleção de linfócitos B auto reativos Bim também desempenha importante papel, embora não seja imprescindível. Enders (2003) demonstrou que na ausência da proteína Bim há um número muito maior de células B auto reativas e que as mesmas eram resistentes à morte por apoptose. No entanto os resultados deste estudo indicaram que poderiam haver também outros mecanismos independentes de Bim neste controle.

Além de estar envolvido no controle de auto-imunidade, Bim também é importante na retração da resposta imune após o término da mesma. Viu-se que Bim é importante para a regressão da resposta imune mediada por células T após a eliminação da carga viral, pois células T bim^{+/+} antígeno-específicas parecem sofrer apoptose na falta de citocinas, enquanto que em células deficientes de Bim há uma marcada persistência mesmo em privação de citocinas. Apesar disto, é importante destacar que a eficiência sobre a eliminação viral é similar na presença como na ausência de Bim, denotando que esta resistência à morte celular na falta de Bim não afetou a função efetora das células T. Portanto, embora Bim não seja indispensável para a eliminação viral, é indispensável para o controle da resposta imune mediada por células T (PELEGRINNI, 2003).

Outro exemplo que demonstra o papel de Bim sobre a sobrevivência celular é a ação de citocinas que diminuem a expressão de Bim, tais como IL-3 e IL-7. Estas citocinas promovem aumento da sobrevivência de progenitores hematopoiéticos e células T, respectivamente. (SIONOV, 2015; DIJKERS, 2000). Além disso, a ação de IL-15 promove a diminuição de expressão de Bim em células NK, promovendo também um aumento da vida-média destas células (HUNTINGTON, 2007).

Por outro lado, tem sido visto que bim pode ter um papel importante no desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Resistência à morte celular é um dos pontos chave para o desenvolvimento do câncer (HANAHAHAN, 2011) e, neste contexto, a família Bcl-2 tem um importante papel, sobretudo na resistência a quimioterápicos. A super expressão de membros anti-apoptóticos ou a perda de expressão de membros pró-apoptóticos pode ser um fator oncogênico (ADAMS, 2007). Foi vista sua importância em leucemias de célula B. Em camundongos transgênicos propensos ao desenvolvimento de leucemia de células B e pré-B, a perda de bim em um ou em ambos os alelos acelerou a morbidade, de modo que estes camundongos transgênicos sem bim morriam mais rápido do que aqueles bim^{+/+}. Além disso a formação de tumores de células B foi encurtado para metade do tempo sem bim. Indicando que bim poderia ser um possível supressor de tumor em leucemias de célula B (EGLE, 2004). De fato, algumas drogas indutoras de apoptose utilizadas na terapia contra leucemia linfocítica crônica parecem depender também de bim (ZHANG, 2013). Como é o caso da

ciclofosfamida (HAPPO, 2010) e glicocorticoides (ERLACHER, 2005). Através de análises de expressão gênica também foi demonstrado que bim é frequentemente silenciado em alguns tipos de linfomas não-Hodkin de células B (MESTRE-ESCORIHUELA, 2007).

Além do seu papel na imunidade, bim também participa do processo de formação de estruturas, tais como na formação do lúmen de glândulas mamárias (MAILLEUX, 2008). Foi demonstrado em modelo *in vitro* que bim, na sua isoforma BimEL, tem sua expressão aumentada juntamente com o processo de apoptose no interior da estrutura do ácino. Diminuição de expressão de bim levou a atraso na formação do lúmen bem como redução de apoptose (REGINATO, 2005). O mesmo foi confirmado em modelo *in vivo*. Viu-se que bim é expresso no epitélio mamário desde o desenvolvimento embrionário e que a falta desta proteína influencia na morfogênese das mesmas. Em camundongos *bim*^{-/-} de 5 semanas os gomos terminais estavam preenchidos e isto era coincidente com diminuição de apoptose nestas estruturas. Após esse período o espaço luminal volta a ser formado a partir de morte celular independente de caspase. De forma que o mecanismo principal de morfogênese destas estruturas é dependente de morte celular mediada por bim, mesmo que depois isto seja contornado com o uso de outra maquinaria independente da mesma (MAILLEUX, 2007).

Embora o maior papel de Bim seja de fato através de morte celular, um aumento de expressão de bim em macrófagos foi associado a um papel que não necessariamente associado a morte celular. Ao analisarem macrófagos em cultura infectados por HIV foi visto que, embora a grande maioria seja levada a morte celular, a pequena fração que sobrevive a infecção tem expressão aumentada de bim. No entanto, este acúmulo de bim nas mitocôndrias não resultou em apoptose. Pelo contrário, foi visto que a apoptose foi bloqueada, não havendo liberação de citocromo c da mitocôndria. O acúmulo de bim em mitocôndrias de células infectadas por HIV foi visto tanto *in vivo* como *in vitro*. Embora não se saiba ainda ao certo o que acontece, foi proposto pelos autores que bim tenha aumentado como passo inicial para a apoptose que foi bloqueada; e ainda que bim de alguma forma possa desempenhar um papel na regulação metabólica de sobrevivência de células infectadas (CASTELLANO, 2017).

Em suma, devido ao seu aspecto pró-apoptótico, bim tem grande importância em diversos cenários. Entretanto, apesar de todos estes papéis em

que bim atua, o foco principal de pesquisas tem sido sobre outros tipos celulares. Pouco tem sido investigado sobre o papel de bim em macrófagos. Nenhuma literatura, ainda, tem abordado o papel de bim sobre processos dinâmicos de macrófagos, tais como sua maturação a partir de monócitos. Entretanto, dados não publicados de nosso grupo tem dado indícios que ausência de bim poderia conferir certo atraso de morte celular a macrófagos após infecção por *Trypanosoma cruzi*, e que no pico da parasitemia o peritônio de camundongos *bim*^{-/-} apresenta uma deficiência da população SPM (small peritoneal macrophage). De modo que decidimos averiguar se bim poderia interferir nas populações de macrófagos peritoneais tanto no estado basal como em um estado inflamatório.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar o papel da proteína bim sobre macrófagos peritoneais antes e após estímulo inflamatório com amido.

2.2. Metas Específicas

- Caracterizar por imunofenotipagem as principais populações do peritônio de camundongos *bim*^{+/+} e *bim*^{-/-} machos e fêmeas antes e após estímulo com amido.
- Caracterizar por imunofenotipagem as subpopulações de macrófagos do peritônio LPM e SPM de camundongos *bim*^{+/+} e *bim*^{-/-} machos e fêmeas antes e após estímulo com amido.
- Avaliar expressão de CD11c, Ly6C e CD80 sobre LPM e SPM de camundongos *bim*^{+/+} e *bim*^{-/-} machos e fêmeas antes e após estímulo com amido.
- Avaliar sensibilidade de macrófagos peritoneais à estímulos indutores de apoptose.

•

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Para o presente estudo, foram utilizados camundongos machos e fêmeas de linhagem C57BL/6 com os seguintes genótipos : *bim*^{+/+} e *bim*^{-/-}. Os mesmos tiveram de 6-8 semanas de idade e foram fornecidos pelo biotério do Instituto de Ciências Biomédicas do departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo - USP. Todos os animais foram mantidos em condições “germ-free”, em microisoladores com livre acesso à água e ração. O uso dos animais e as condições aplicadas foram submetidas à aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da instituição.

A obtenção dos animais é feita a partir de cruzamentos de machos *bim*^{-/-} com fêmeas *bim*^{+/+} para a maximização do número de filhotes, devido à baixa taxa de reprodução de fêmeas *bim*^{-/-}.

3.2. Genotipagem de camundongos *bim*^{+/+} e *bim*^{-/-}

Para a verificação do genótipo dos filhotes obtidos, faz-se genotipagem a partir de células da cauda dos camundongos. Estes são devidamente identificados e corta-se um milímetro de suas caudas.

Para extração de DNA, o tecido é adicionado de tampão de lise, contendo: 200 mM NaCl (Invitrogen), 100 mM Tris-HCL pH 8,0 (Invitrogen), 5 mM EDTA (Invitrogen), 0,2% SDS (Invitrogen) e 100 µg/mL de proteinase K (Ambion). Centrifugado à 56 °C, 750 rpm até completa dissolução do tecido.

Logo, as amostras são centrifugadas a 15000 rpm, 4 °C por 5 minutos e o sobrenadante transferido para outro *ependorf*. Adiciona-se 400 µL de isopropanol (MERK) e executa-se movimentos de inversão de tubo cerca de 15 vezes e verifica-se se ocorreu precipitação do DNA. Em seguida, centrifuga-se a 12000 rpm, 4 °C por 10 minutos. Descarta-se o sobrenadante e adicionados 500 µL de etanol 70% gelado. Centrifuga-se novamente a 12000 rpm, 4°C por 5 minutos. Descarta-se o sobrenadante e o tubo é deixado em temperatura ambiente até secagem completa em fluxo laminar. Após secagem, o *pellet* é ressuspensionado em 100 µL de TE e posta a 64 °C por 30 minutos (em *Thermomixer*) para completar a diluição do DNA. Em seguida, a solução de DNA é quantificada *Nanodrop 2000* (ThermoScientific).

Após a quantificação, as soluções de DNA são diluídas à 50 µg DNA/mL e o DNA é amplificado por PRC convencional. Os primers utilizados foram PB20 (CAT TCT CGT AAG TCC AGA TCT), PB65 (CTC AGT CCA TTC ATC AAC AG) e PB335 (GTG CTA ACT GAA ACC AGA TTA G)

As quantidades usadas por reação foram: 1,08 µL de 10 X PCR Buffer (Invitrogen), 0,32 µL de MgCl₂ 50 Mm (Invitrogen), 0,22 µL de cada *primer* (PB20, PB65, PB335), 0,11 µL de dNTPs 10mM (Invitrogen), 0,43 µL de Taq DNA polimerase (Gene-Direx), 7,4 µL de água miliQ e 2 µL de DNA (50 µg/mL).

A sequência de temperaturas aplicadas foi de 4 minutos a 94°C seguido de 30 ciclos de: 30 segundos a 94°C / 30 segundos A 50°C / 1min a 72°C. E 5 minutos a 72 °C.

A verificação do genótipo dos DNAs extraídos é feita por eletroforese em gel a 1,5%. Para animais WT verifica-se presença de banda de 400pb. Para animais *bim*^{-/-} verifica-se presença de banda de 540 pb. Para animais *bim*^{+/-} verifica-se a presença de ambas as bandas.

3.3. Obtenção de macrófagos do peritônio

Os animais são primeiramente inoculados i.p. com 2 ml de amido de batata (Sigma) a 1,5% diluído em PBS 1X com o objetivo de aumentar o número de macrófagos peritoneais. Após 4 dias, para obtenção dos macrófagos, é feito lavado peritoneal com 5 mL de PBS 1X gelado e a suspensão resultante é mantida em gelo. Esta suspensão celular é centrifugada por 10 minutos a 200 g e 4°C. O sobrenadante é descartado e as células são ressuspensas em meio em tampão hemolítico [contendo 0,15 M NH₄Cl (Invitrogen), 1 mM KHC₃O₃ (Invitrogen), 0,1 mM Na EDTA (Invitrogen), pH 7.2]. Após 2 minutos adiciona-se 5 mL de meio RPMI 3% (Gibco), contendo 3% de Soro Fetal Bovino (Gibco), 1% de penicilina e estreptomicina (Gibco) e 1% de L-glutamina (Gibco). A amostra é centrifugada por 5 minutos a 500g 4°C e, após o descarte do sobrenadante, ressuspensado em meio RPMI 3% para cultura celular ou RPMI 10% para fenotipagem do peritônio.

3.4. Enriquecimento de macrófagos

Para a obtenção de macrófagos, células totais já previamente processadas, como descrito anteriormente, são contadas utilizando contador automático (Countess II – Thermo Fischer) e plaqueadas sobre placas de cultura celular. Logo são postas a 37°C por 3 horas em atmosfera contendo 5% de Co₂. Assim, macrófagos são enriquecidos por aderência. Após as 3 horas, as células não aderentes são removidas lavando com vigor médio os poços com RPMI morno.

3.5. Caracterização fenotípica das populações de macrófagos peritoneais

Para a caracterização fenotípica das populações de macrófagos do exsudato peritoneal, realizou-se marcação anticorpos monoclonais para MHC-II-BB515 (I-A^b), F4/80-PE, CD19-PE-Cy7, CD11c-BV421, Ly6C-PE-CF594, Ly6G-BV711, todos da BD Biosciences. Corante de viabilidade, LIVE/DEAD (LD) Fixable Dead Cell Strain (ThermoFischer).

Primeiramente, células foram obtidas e processadas como descrito anteriormente, sendo ressuspensas em RPMI 10 %. As mesmas são contadas e, 5x10⁵ células obtidas de cada animal são transferidos para cada tubo ou poço correspondente. Células são centrifugadas a 400 g por 5 minutos. Sobrenadante é descartado e o pellet é ressuspendido em 25 uL de solução de anticorpos. São incubados por 30 minutos a 4°C sobre proteção de luz e leve agitação a cada 10 minutos. Após o período de incubação, as células são centrifugadas a 400g, por 5 minutos a 4°C. Procede-se lavagem com 200 µL tampão MACS por duas vezes. Para a leitura das amostras, estas são ressuspensas em 200 µL de tampão MACS e captadas em citômetro BD LSRFacsFortessa.

Figura 5 – Estratégia de gates para caracterização de populações peritoneais e subpopulações F4/80⁺. A estratégia de gates utilizada foi FSC-H x FSC-A para exclusão de *doublets*, SSC-A x FSC-A para exclusão de *debris* celulares, SSC-A x FVD para exclusão de células inviáveis, SSC-A x Ly6G para seleção de neutrófilos, CD19 x F4/80 para seleção de células B e células F4/80⁺, MHC-II x F4/80 para discriminar entre LPM e SPM

Como estratégia de *gating* para a análise dos resultados usou-se dos parâmetros FSC-H x FSC-A para exclusão de *doublets*, SSC-A x FSC-A para exclusão de *debris* celulares, SSC-A x FVD para exclusão de células inviáveis, SSC-A x Ly6G para seleção de neutrófilos, CD19 x F4/80 para seleção de células B e células F4/80⁺, MHC-II x F4/80 para discriminar entre LPM e SPM (Figura 5).

Um dos problemas enfrentados durante a interpretação de nossos resultados foi a presença de algumas células claramente F4/80⁺ de alta intensidade que expressavam CD19 (Figura 6). CASSADO (2011) demonstrou que no exsudato peritoneal há células que permanecem aderidas, como linfócitos B-1 entre si ou até mesmo linfócitos aderidos à macrófagos. Tentamos minimizar este problema excluindo rigorosamente os *doublets* de nossas análises por citometria utilizando os parâmetros FSC-A x FSC-H. Além disso, consideramos como sendo células F4/80 positivas apenas aquelas que possuíam F4/80 significativamente maior que a grande massa de células CD19⁺.

3.6. Avaliação de morte celular

Células são obtidas e previamente processadas como descrito anteriormente e plaqueadas em placas de 24 poços na razão de 6×10^5 a 7×10^5

células por poço. Procede-se o enriquecimento de macrófagos por aderência e lavagem, também já descrito anteriormente.

Após o enriquecimento, células são deixadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 12 horas em meio de cultura RPMI 3%.

Para ensaios de apoptose, após as 12 horas de incubação, meio de cultura é retirado e são aplicadas as drogas diluídas em RPMI 3% contendo corante Anexina V conjugada a APC (produzida e conjugada por nosso grupo), Sytox Green (ThermoFischer), e HOECHST (Sigma).

As drogas utilizadas foram Actinomicina-D 5µg/mL (sigma) e estaurosporina 1uM (Alfa Aesar). Controles não receberam drogas. Imediatamente inserem-se as placas na estufa de IN Cell Analyser 2200 GE e analisa-se por meio de registro de imagens subsequentes dos mesmos pontos por intervalo variável de tempo. Mensurou-se a apoptose por meio de marcação com Anexina V e necrose secundária decorrente após apoptose em cultura por meio de Sytox Green, os quais geram sinal detectável pelo aparelho após exposição de fosfatidilserina e a entrada de Sytox Green (corante impermeável intercalante de DNA), respectivamente.

O sinal de fluorescência de cada ponto é detectado, armazenado e posteriormente processado por software IN Carta - GE.

3.7. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphpadPrism 6 (companhia Graphpad Software Incorporation). Foi utilizado o teste Two-Away ANOVA. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Populações peritoneais sofrem influência de proteína Bim

Como foi visto, a população celular do peritônio é grandemente heterogênea. Sendo as principais populações compostas de Linfócitos B (LB) e macrófagos. E, dentre a população de macrófagos, duas subpopulações principais: Large Peritoneal Macrophages (LPM) e Small Peritoneal Macrophages (SPM). Assim, para verificar a influência da proteína Bim sobre estas populações foi realizada imunofenotipagem do exsudato peritoneal nos estados basal, sem estímulo algum, e inflamatório, com estímulo de amido intraperitoneal (i.p.). Camundongos C57Bl/6 WT e *bim*^{-/-} machos e fêmeas foram, ou não, inoculados i.p. com amido 1,5% diluído em PBS 1X. Após o período de 96 horas foi realizado o lavado peritoneal e imunofenotipagem das células do exsudato peritoneal foram marcadas com anticorpos específicos como descrito em material e métodos.

4.2. Bim não afeta número de células totais em peritônio antes ou após estímulo com amido

Primeiramente, avaliamos se o número de células sofre alguma alteração na ausência de bim no estado basal (não elicitado) e após estímulo inflamatório (elicitado). Também avaliamos se isto também varia de acordo com o gênero.

Em peritônio não elicitado de fêmeas observamos que animais WT possuem $2,0 \pm 1,1 \times 10^6$ e *bim*^{-/-} $5,3 \pm 1,5 \times 10^6$ células totais (Figura 6A). Em peritônio de camundongos machos não elicitados obteve-se $3,9 \pm 1,5 \times 10^6$ células em animais WT e $5,2 \pm 0,6$ em animais *bim*^{-/-} (Figura 6B). Embora não haja diferença significativa entre animais WT e *bim*^{-/-}, é interessante observar que a celularidade de animais *bim*^{-/-} tende a ser maior tanto em machos como em fêmeas, sendo que isto foi observado em todos os experimentos independentes.

Em peritônio que recebeu estímulo com amido temos que fêmeas WT possuem $8,4 \pm 1,4 \times 10^6$ e *bim*^{-/-} $12,2 \pm 1,0 \times 10^6$ células totais. Machos WT possuem $10,1 \pm 1,2 \times 10^6$ e *bim*^{-/-} $9,7 \pm 0,9 \times 10^6$ células totais. Logo, machos e fêmeas não elicitados também não possuem diferença significativa de celularidade total entre animais Wt e *bim*^{-/-}.

Figura 6. Número de Células Totais no Peritônio. Foi visto o número total de células no peritônio em (A) Fêmeas não elicitadas (B) Fêmeas elicitadas (C) Machos não elicitados (D) Machos elicitados. Foi utilizado o teste-t. Gráfico representativo de 2 experimentos independentes (n=3-7) *(p<0,05). NEL= Não Elicitados. EL= Elicitados.

4.3. Ausência de bim afeta a compartimento de células F4/80+ de machos e fêmeas antes e após estímulo com amido

Posteriormente, estratificamos a análise, averiguando número e frequência das principais populações do peritônio não elicitado (Figura 7) e elicitado (Figura 8). Consideramos população CD19⁺ como linfócitos B, população F4/80⁺ como a população que contém as subpopulações LPM, SPM e também F4/80^{low}MHCII⁻, população Ly6G^{high} como neutrófilos e a população CD19⁻F4/80⁻ como contendo todas as demais células que não pertencem a nenhuma das populações anteriores.

Em fêmeas não elicitadas, animais *bim*^{-/-} possuem maior número e frequência de células F4/80⁺ que animais WT (Figura 7A e 7B). Populações CD19⁺, Ly6G^{high} e CD19⁻F4/80⁻ não apresentaram diferenças na ausência de bim em número e frequência (Figuras 7B e 7C). Em machos não elicitados o número de células F4/80⁺ também foi maior em animais *bim*^{-/-} (Figura 7E), no entanto a frequência não apresentou diferença significativa entre animais WT e *bim*^{-/-} (Figura 7F). Assim como em fêmeas, populações CD19⁺, Ly6G^{high} e CD19⁻F4/80⁻ não apresentaram diferenças na ausência de bim em número e frequência (Figuras 7E e 7F).

Quando peritônios de machos e fêmeas são elicitados há uma mudança nos compartimentos celulares. Em ambos os casos o número de células do compartimento F4/80⁺ já não é diferente entre animais WT e *bim*^{-/-}, machos e fêmeas possuem celularidade equivalente (Figuras 8B e 8E). No entanto, quando olhamos a proporção em relação ao peritônio total, animais *bim*^{-/-} machos e fêmeas têm menor proporção de células F4/80⁺ que animais WT (Figuras 8C e 8F).

Estes resultados indicam que, no caso das fêmeas há uma inversão na proporção de células F4/80⁺. Em estado basal animais *bim*^{-/-} tinham maior proporção de células F4/80⁺ (Figura 7C) e após serem elicitados passam a ter menor proporção (Figura 8C). Já em machos não havia diferença na proporção de células F4/80⁺ (Figura 7F) e após serem elicitados animais *bim*^{-/-} passam a ter menor proporção (Figura 8F).

Figura 7. Populações celulares no peritônio não elicitado. Fêmeas (A-C) e machos (D-F). Células de peritônio de camundongos C57Bl/6 WT e *bim*^{-/-} sem elicitação prévia foram marcadas com anticorpos segundo descrito em M&M. Populações foram analisadas em número absoluto (B e E) e frequência relativa (C e F). CD19⁺ (Linfócito B - LB); F4/80⁺ (macrófagos e monócitos); Ly6G^{high} (neutrófilos); F4/80⁻CD19⁻ (outras populações). Gráficos representativos de 2 e 3 experimentos independentes, para número de células e frequência, respectivamente (n= 3-8 animais). Foi utilizado o teste-t em células totais e Two-way ANOVA em Populações para análise estatística seguida pelo teste Sidak. * (p<0,05).

Figura 8. Populações celulares no peritônio elicito. Fêmeas (A-C) e machos (D-F). Células de peritônio de camundongos C57Bl/6 WT e *bim*^{-/-} elicito com amido foram marcadas com anticorpos segundo descrito em M&M. Populações foram analisadas em número absoluto (B e E) e frequência relativa (C e F). CD19⁺ (Linfócito B - LB); F4/80⁺ (macrófagos e monócitos); Ly6G^{high} (neutrófilos); F4/80⁺CD19⁻ (outras populações). Gráficos representativos de 2 e 3 experimentos independentes, para número de células e frequência, respectivamente (n= 3-8 animais). Foi utilizado o teste-t em células totais e Two-way ANOVA em Populações para análise estatística seguida pelo teste Sidak. * (p<0,05).

Quanto as populações CD19⁺, Ly6G^{high} e CD19⁻F4/80⁻ em peritônio elicito temos que, em fêmeas WT e *bim* não há diferenças em frequência ou número das duas primeiras populações, mas a população CD19⁻F4/80⁻ está em maior número de células em *bim*^{-/-} (Figuras 8B e 8C). Em machos nenhuma destas populações apresenta diferença entre em número ou frequência de células entre WT e *bim*^{-/-} (Figuras 8E e 8F).

4.4. Ausência de *bim* afeta as subpopulações F4/80⁺ antes e após estímulo com amido

Tendo em vista que o compartimento de células F4/80⁺ apresenta-se diferente na ausência de *bim*, avaliamos as subpopulações que o compõe (LPM, SPM e F4/80^{low}MHCII⁻). Avaliamos as proporções de cada uma destas subpopulações em relação ao compartimento de células F4/80⁺.

Espera-se que em peritônio não elicito LPM predomine sobre SPM. Tanto em machos como em fêmeas esta predominância de LPM não foi afetada pela ausência de *bim* (Figura 9B e 9E).

Em peritônio não elicito de fêmeas verificamos que em animais *bim*^{-/-} há menor proporção de LPM e maior proporção de células F4/80^{low}MHCII⁻ (Figura 9C), no entanto apenas a população F4/80^{low}MHCII⁻ foi acompanhado de um aumento no número de células (Figura 9B).

Em peritônio não elicito de machos não há alteração na proporção ou número de células das subpopulações F4/80⁺ (Figura 9E e 9F).

Ao analisarmos o peritônio de animais elicitados com amido, verificamos que em fêmeas a ausência de *bim* não causa mudança nas proporções das subpopulações F4/80⁺ e o mesmo ocorre com o número de células (Figuras 10B e 10C).

Em machos, a proporção de LPM é menor e de SPM é menor em animais *bim*^{-/-}, quando comparados a WT (Figura 10F). O número de células de cada população, no entanto, não é alterado na ausência de *bim* (Figura 10E).

Portanto, em peritônio não elicito ausência de *bim* afeta as subpopulações F4/80⁺ em fêmeas, mas não em machos (Figura 9). Já após elicitar o peritônio afeta machos, mas não fêmeas (Figura 10).

Figura 9. Populações F4/80⁺ no peritônio não elicitados. Fêmeas (A-C) e machos (D-F). Células de peritônio de camundongos C57Bl/6 WT e *bim*^{-/-} sem elicitação prévia foram marcadas com anticorpos segundo descrito em M&M. Populações foram analisadas em número absoluto (B e E) e frequência relativa (C e F). CD19⁺ (Linfócito B - LB); F4/80⁺ (macrófagos e monócitos); Ly6G^{high} (neutrófilos); F4/80⁻CD19⁻ (outras populações). Gráficos representativos de 2 e 3 experimentos independentes, para número de células e frequência, respectivamente (n= 3-8 animais). Foi utilizado o teste-t em células totais e Two-way ANOVA em Populações para análise estatística seguida pelo teste Sidak. * (p<0,05).

Figura 10. Populações F4/80⁺ no peritônio elicito. Fêmeas (A-C) e machos (D-F). Células de peritônio de camundongos C57Bl/6 WT e *bim*^{-/-} elicito com amido foram marcadas com anticorpos segundo descrito em M&M. Populações foram analisadas em número absoluto (B e E) e frequência relativa (C e F). CD19⁺ (Linfócito B - LB); F4/80⁺ (macrófagos e monócitos); Ly6G^{high} (neutrófilos); F4/80^{low}CD19⁻ (outras populações). Gráficos representativos de 2 e 3 experimentos independentes, para número de células e frequência, respectivamente (n= 3-8 animais). Foi utilizado o teste-t em células totais e Two-way ANOVA em Populações para análise estatística seguida pelo teste Sidak. * (p<0,05).

4.5. Proteína Bim influencia em marcadores de maturação de subpopulações F4/80⁺

Como foi visto, CD11c e Ly6C são marcadores que podem indicar estados de maturação durante a transição de monócitos até sua completa maturação em SPMs (Figura 4). Para verificar se a ausência da proteína Bim poderia interferir na expressão dos mesmos, foi feito imunofenotipagem destes marcadores. Além disso, foi visto estado de ativação através da expressão de CD80.

Para tanto é importante salientar que a população SPM quando completamente madura, segundo KIM (2016) é CD11c⁺. Assim também que a população F4/80^{low}MHCII^{neg} possui população de monócitos que são Ly6C⁺ (BAIN, 2016).

Analisando peritônio não elicitado de fêmeas vê-se que LPM possui pequena expressão de CD11c e que esta expressão é de baixa intensidade, muito próxima aos seus respectivos controles negativos (FMO de CD11c). Ainda assim, surpreendentemente, na ausência de Bim (camundongos bim^{-/-}) há maior porcentagem de células positivas para CD11c. Como já esperado, LPM não possui expressão significativa de Ly6C para ambos WT e bim^{-/-}. Quase todas as células (mais que 90%) possuem expressão de marcador de ativação CD80 e não há diferença no estado de ativação mensurado por expressão de CD80 entre WT e bim^{-/-} (Figuras 11A e 11B).

Em SPM observa-se que mais de 70% das células expressam CD11c e que esta expressão não é afetada pela ausência de bim. De modo que bim parece não influir na proporção de células que já são CD11c. Menos de 20% de SPM's expressam Ly6C e quase todas as células possuem expressão de CD80. Ausência de bim também não afeta a expressão de Ly6c e CD80 (Figuras 11C e 11D). De maneira que bim parece não afetar na maturação de SPMs em estado basal nem em seu estado de ativação.

Na população F4/80^{low}MHCII^{neg} tem-se baixa expressão de CD11c (menos de 20%) e ainda assim com intensidade quase nula quando comparada ao controle negativo. A falta de bim não causa diferença em CD11c. A expressão de Ly6C está entre 25-55% e é afetada pela ausência de bim. Em animais bim^{-/-} há menor porcentagem de células Ly6C⁺. A expressão de CD80 é menor que

40% e sua intensidade é quase nula quando comparada ao controle negativo. Sua expressão não é afetada na ausência de bim (Figuras 11E e 11F).

Ao elicitar o peritônio de fêmeas com amido, nota-se que em LPM a expressão de CD11c e de Ly6C também são baixas, abaixo de 40 e 15%, respectivamente, e de baixa intensidade. No entanto, a expressão de CD11c já não é diferente entre WT e $bim^{-/-}$. Além disso, quase todas as células LPM continuam a expressar CD80. (Figuras 12A e 12B).

A população SPM, assim como no estado basal, tem grande porcentagem de células CD11c+, baixa expressão e intensidade de Ly6C e quase totalidade de expressão de CD80. (Figuras 12C e 12D).

Ao analisarmos a população $F4/80^{low}MHCII^{neg}$, vemos que esta população, assim como antes de estímulo com amido, continua com expressão de CD11c de baixa intensidade. A expressão de Ly6C já não é afetada pela expressão de bim. A expressão de CD80 está entre 50-60% e não é afetada na ausência de bim (Figuras 12E e 12F). Portanto, ainda que bim afete a proporção de células Ly6C+ da subpopulação $F4/80^{low}MHCII^{neg}$ do peritônio em estado basal (Figura 11C); quando este é elicitado, esta diminuição de células Ly6C+ já não existe (Figura 12C).

Analisou-se também o peritônio de machos antes e após estímulo inflamatório com amido. No peritônio não elicitado de machos o padrão de expressão de CD11c e Ly6C é similar ao de fêmeas (Figura 13). Onde ausência de bim também causa aumento de células CD11c+ em LPM, ainda que a expressão seja de baixa intensidade (Figura 13A e 13B), e causa diminuição de células Ly6C+ na subpopulação $F4/80^{low}MHCII^{neg}$ (Figura 13E e 13F). No entanto, a expressão do marcador de ativação CD80 é afetado em LPM e SPM. Animais $bim^{-/-}$ possuem maior expressão de células que são CD80+, de modo que mesmo em estado basal animais $bim^{-/-}$ tem diferente padrão de ativação em machos, o que não acontece em fêmeas.

Entretanto, após elicitarmos o peritônio de machos, o padrão de marcadores CD11c, Ly6C e CD80 nas distintas subpopulações $F4/80^{+}$ não é alterado pela presença de bim (Figura 14).

Em suma, em estado basal bim afeta padrão de expressão de CD11c e Ly6C de igual forma em machos e fêmeas. O padrão de ativação, no entanto, é afetado por bim dependente de gênero. Após estímulo com amido, bim não muda

o padrão de expressão de CD11c e Ly6C nem o padrão de ativação, sendo independente de gênero.

Figura 11. Análise de Marcadores de Maturação e de ativação em LPM, SPM e F4/80^{low} MHCII^{neg} em fêmeas não elicítadas. Foi feito lavado peritoneal em camundongos C57Bl/6 bim^{+/+} e bim^{-/-} fêmeas sem elicitação prévia, células foram marcadas com anticorpos e analisados por citometria de fluxo. (A) e (B) Marcadores de maturação CD11c e Ly6C e marcador de ativação CD80 em LPM. (C) e (D) Marcadores de maturação CD11c e Ly6C e marcador de ativação CD80 em SPM. (E) e (F) Marcadores de maturação CD11c e Ly6C e marcador de ativação CD80 em F4/80^{low} MHCII^{neg}. Gráficos representativos de 3 experimentos independentes (n= 3-8 animais). Foi utilizado o teste Two-way ANOVA para análise estatística seguida pelo teste Sidak. * (p<0,05).

Figura 12. Análise de Marcadores de Maturação e de ativação em LPM, SPM e F4/80^{low} MHCII^{neg} em Fêmeas elicítadas. Foi feito lavado peritoneal em camundongos C57Bl/6 bim^{+/+} e bim^{-/-} fêmeas previamente elicítadas com amido 1,5% e células foram marcadas com anticorpos e analisados por citometria de fluxo. (A) e (B) Marcadores de maturação CD11c e Ly6C e marcador de ativação CD80 em LPM. (C) e (D) Marcadores de maturação CD11c e Ly6C e marcador de ativação CD80 em SPM. (E) e (F) Marcadores de maturação CD11c e Ly6C e marcador de ativação CD80 em F4/80^{low} MHCII^{neg}. Gráficos representativos de 3 experimentos independentes (n= 3-8 animais). Foi utilizado o teste Two-way ANOVA para análise estatística seguida pelo teste Sidak. * (p<0,05).

Figura 13. Análise de Marcadores de Maturação e de ativação em LPM, SPM e F4/80^{low} MHCII^{neg} em machos não elicitados. Foi feito lavado peritoneal em camundongos C57Bl/6 bim^{+/+} e bim^{-/-} machos sem elicitação prévia e células foram marcadas com anticorpos e analisados por citometria de fluxo. (A) e (B) Marcadores de maturação CD11c e Ly6C e marcador de ativação CD80 em LPM. (C) e (D) Marcadores de maturação CD11c e Ly6C e marcador de ativação CD80 em SPM. (E) e (F) Marcadores de maturação CD11c e Ly6C e marcador de ativação CD80 em F4/80^{low} MHCII^{neg}. Gráficos representativos de 3 experimentos independentes (n= 3-8 animais). Foi utilizado o teste Two-way ANOVA para análise estatística seguida pelo teste Sidak. * (p<0,05).

Figura 14. Análise de Marcadores de Maturação e de ativação em LPM, SPM e F4/80^{low} MHCII^{neg} em machos elicitados. Foi feito lavado peritoneal em camundongos C57Bl/6 *bim*^{+/+} e *bim*^{-/-} machos previamente elicitados com amido 1,5% e células foram marcadas com anticorpos e analisados por citometria de fluxo. (A) e (B) Marcadores de maturação CD11c e Ly6C e marcador de ativação CD80 em LPM. (C) e (D) Marcadores de maturação CD11c e Ly6C e marcador de ativação CD80 em SPM. (E) e (F) Marcadores de maturação CD11c e Ly6C e marcador de ativação CD80 em F4/80^{low} MHCII^{neg}. Gráficos representativos de 3 experimentos independentes (n= 3-8 animais). Foi utilizado o teste Two-way ANOVA para análise estatística seguida pelo teste Sidak. * (p<0,05).

4.6. Macrófagos $bim^{-/-}$ frente a indutores apoptóticos.

Testamos, ainda, a resistência de células aderentes do peritônio, predominantemente composta por macrófagos, frente a indutores de apoptose como Actinomicina D e Estaurosporina. Assim, camundongos C57Bl/6 WT e $bim^{-/-}$ machos foram inoculados i.p. com amido 1,5% diluído em PBS 1X. Após o período de 96 horas foi realizado o lavado peritoneal e células enriquecidas como descrito em material e métodos. Células foram cultivadas em meio RPMI 3%, mantidas a 36°C e 5% de CO₂ por 12 horas antes do ensaio de morte celular. Meio de cultura foi retirado e adicionou-se drogas e marcação em RMI3% como já descrito. As drogas utilizadas foram Actinomicina D 5µg/mL e estaurosporina 100µM.

Actinomicina D é um importante agente antitumoral indutor de apoptose. Seu mecanismo de ação é se intercalar ao DNA e inibição de síntese de RNA (KOBAYASHI, 2005; GELLERT, 1965). Quanto à estaurosporina leva a aumento de cálcio intracelular (KRUMAN, 1998).

Durante o período de análise células $bim^{-/-}$ não mostraram maior resistência à morte por apoptose nem apresentaram curva cinética de morte distinta de células WT frente a actinomicina D (Figura 15) nem a estaurosporina (Figura 16).

Figura 15. Avaliação de morte celular com Actinomicina D. Macrófagos foram enriquecidos (como descrito em materiais e métodos) a partir de lavado em camundongos C57/Bl6 bim^{+/+} e bim^{-/-} machos. Foram submetidos a tratamento com Actinomicina D 5µg/mL. Células foram marcadas com corante nuclear Hoechst (azul), Anexina V (vermelho) e Sytox Green (verde). (A) Curva cinética de anexina V. (B) Marcação de Anexina V em Tempo inicial e Tempo final de tratamento. (C) Curva cinética de Sytox Green. (D) Marcação com Sytox Green em Tempo Inicial e Tempo final de tratamento. Gráfico representativo de dois ensaios indeoendentes. (n=3). Foi utilizado o teste Two-way ANOVA para análise estatística seguida pelo teste Sidak. * (p<0,05).

Figura 16. Avaliação de morte celular com Estaurosporina. Macrófagos foram enriquecidos (como descrito em materiais e métodos) a partir de lavado em camundongos C57/Bl6 $bim^{+/+}$ e $bim^{-/-}$ machos. Foram submetidos a tratamento com Estaurosporina 10mM. Células foram marcadas com corante nuclear Hoechst (azul), Annexina V (vermelho) e Sytox Green (verde). (A) Curva cinética de anexina V. (B) Marcação de Annexina V em Tempo inicial e Tempo final de tratamento. (C) Curva cinética de Sytox Green. (D) Marcação com Sytox Green em Tempo Inicial e Tempo final de tratamento. Gráfico representativo de dois ensaios independentes. ($n=3$). Foi utilizado o teste Two-way ANOVA para análise estatística seguida pelo teste Sidak. * ($p<0,05$).

5. DISCUSSÃO

Desde a descrição de fagócitos por Metchnikof (TAUBER, 2003) até a atualidade, muitos conceitos têm sido mudados, outros aperfeiçoados e muitos novos conceitos têm surgido. Exemplo disto é a ampliação do conhecimento de estados de ativação de macrófagos (MOSSER, 2008).

A ontogenia de macrófagos teciduais também tem sido mudada (GINHOUX, 2014). Diferente do que se acreditava (VAN FURTH, 1968) macrófagos teciduais não são sempre repostos de monócitos periféricos. Muitos macrófagos residentes são originados já de uma semente embrionária e na vida adulta podem desenvolver-se e proliferar-se localmente sem necessariamente depender de reposição monocítica (YONA, 2013. HASHIMOTO, 2013). Sendo este o caso de macrófagos residentes do peritônio (YONA, 2013).

Quando focamos em macrófagos do peritônio, mais especificamente, vemos que a base conceitual tem passado também por reformas. Em 2011 (GHOSN) viu-se que a população de macrófagos peritoneais era heterogênea, possuindo duas populações, LPM e SPM e que LPM era dominante no estado basal. Nesta época já se propôs que SPM não tinha origem a partir de LPM e sim de monócitos (GHOSN, 2011). Em 2013 (YONA) viu-se que a população residente peritoneal não dependia de monócitos circulantes. Em 2016 (KIM) provou-se por mapeamento de destino que SPM de fato era originado a partir de monócitos da circulação e ainda deu indícios de que LPM de fato teria origem anterior ao nascimento (origem embrionária). No mesmo ano (2016), BAIN e col. demonstraram que a população LPM poderia sim ter origem monocítica. Pois viu-se que com o passar da idade e dependente do gênero, LPMs eram dependentes de células hematopoiéticas. Assim, monócitos circulantes dariam origem a SPM que dariam origem a LPMs. O que não contradisse achados anteriores, visto que isto ocorria em machos, enquanto que em fêmeas a dependência de células hematopoiéticas era muito baixa. E, além disso, a dependência só passava a ser mais expressiva com o avançar da idade. Estes achados, em conjunto, lançaram novas abrangências ao conhecimento geral atual sobre macrófagos peritoneais.

Portanto, deve-se pensar em macrófagos peritoneais primeiro como uma população heterogênea com duas populações distintas. Segundo, deve-se levar em conta que esta população irá mudar seu perfil de predominância (entre LPM e SPM) após um estímulo inflamatório. E terceiro, que a origem destas

populações poderá ser alterada com a idade e com gênero que se trabalha. De forma que neste trabalho, ao olharmos para macrófagos do peritônio o enfoque foi multidirecional. Isto é, levamos em conta a presença ou ausência de estímulo inflamatório, o gênero do animal (macho e fêmeas) e claro, o mais importante, o impacto de bim sobre macrófagos levando em conta o estado inflamatório e o gênero do modelo animal.

Para dar início a nossa busca dos efeitos de bim, olhamos primeiramente a celularidade total do peritônio. Demonstramos que no estado basal e após estímulo inflamatório o número de células totais em machos e fêmeas não se altera na ausência de bim. No entanto, quando estratificamos a análise e olhamos para as populações do peritônio ($CD19^+$, $F4/80^+$, $Ly6G^{high}$ e $CD19^- F4/80^-$) não elicitado vimos que bim afeta a celularidade da população $F4/80^+$ em fêmeas e machos (Figuras 7B e 7E). Vimos ainda que este aumento em fêmeas se deve à subpopulação $F4/80^{low}MHCII^-$ (Figura 9B) enquanto que em machos não se deve a nenhuma população específica, mas sim a aumentos discretos de todas as populações somadas (Figura 9E).

Bim tem demonstrado ter papel na sobrevivência de granulócitos, linfócitos e células NK (BOUILLET, 1999; HUNTINGTON, 2007), no entanto seu papel na sobrevivência sobre macrófagos do peritônio ainda não foi descrito em literatura. Como bim atua no controle de morte celular (CORY, 2002) e sua ausência é associada ao aumento de sobrevivência de outros tipos celulares (ANDINA, 2009), este aumento em subpopulações $F4/80^+$ pode ser devido a uma maior resistência à morte celular e consequente acúmulo destas células. No entanto, não sabemos se existe outro mecanismo causal associado.

Após elicitar o peritônio com amido há um aumento da população $F4/80^+$. Isto porque há um recrutamento de monócitos que dará origem a SPMs. De modo que no período entre 48 e 96 horas após o estímulo, espera-se que o número de células desta população $F4/80^+$ continue grandemente elevado e que seja composto majoritariamente pelas subpopulações $F4/80^{low}MHCII^{neg}$ (onde estão monócitos recrutados da circulação) e SPM (CASSADO, 2011; BAIN, 2016). Nossos resultados indicam que após 96 horas do estímulo com amido a soma das populações SPM e $F4/80^{low}MHCII^{neg}$ seja em número ou frequência predomina sobre a população LPM independente de bim (Figura 10) em machos

e fêmeas. Mostrando que o recrutamento de SPM a partir de monócitos existe independente de Bim.

Foi demonstrado que quando monócitos são injetados na circulação, mesmo sem estímulo inflamatório peritoneal, parte destes entram na cavidade peritoneal e após 2,5 dias tornam-se MHCII⁺CD226⁻ (que são SPMs CD11c⁻). Após 4 dias tornam MHCII⁺CD226⁺ (que são SPMs CD11c⁺) (KIM, 2016). Da mesma forma, após estímulo inflamatório no peritônio como LPS, há recrutamento de monócitos que se diferenciam em SPM (GHOSN, 2011). Estímulo com amido leva a uma mudança no padrão de células do peritônio semelhante, onde o acompanhamento cinético dá indícios deste recrutamento de monócitos da circulação e sua passagem para o perfil de SPM (CASSADO, 2011). Assim sendo, nossos resultados demonstraram que bim não interfere na porcentagem de células SPM maduras (CD11c⁺) antes (Figuras 11C e 14C) ou após estímulo com amido (Figura 12C e 14C) em machos e fêmeas.

Embora tenhamos nos baseado em que células CD11c⁺ dentro do compartimento F4/80^{low}MHCII^{high} sejam todas SPM maduras (KIM, 2016), devemos salientar que BAIN e col. (2016) sugeriram que certa parte destas células CD11c⁺ sejam as células dendríticas convencionais (cDC). Assim sendo, nossos dados podem também ser interpretados como a ausência bim não afetando a porcentagem total de células CD11c⁺, sejam elas SPMs apenas ou a soma de SPM e cDC.

Células F4/80^{high} (LPM) do peritônio não possuem CD11c (KIM, 2016). No entanto, surpreendentemente, existe maior porcentagem de células CD11c⁺ no compartimento de LPM em machos e fêmeas não elicitados (11A e 13A). Embora animais WT expressem CD11c em intensidade praticamente nula, animais bim^{-/-} possuem intensidade visivelmente maior (11A e 13A). Logo é surpreendente que um marcador que não é normalmente expresso nesta população esteja expresso em maior quantidade de células LPM na falta de bim,

Foi demonstrado que SPM pode se diferenciar em LPM no peritônio dependente ácido retinóico/vitamina A e de ativação de GATA6 (GUNDRA, 2017; OKABE, 2014). Sabe-se, ainda, que com o passar da idade e dependente do gênero, parte da população LPM passa a ser também derivada de células monocíticas (BAIN, 2016). Em adição, bim tem papel importante na eliminação de células B e T auto-reativas (BOUILLET, 2002; DAVEY, 2002; ENDERS,

2003). Assim sendo, é possível que a falta de bim possa levar a um acúmulo de células que não tenham se diferenciado com sucesso em LPM e que deveriam ter sido eliminadas por apoptose. No entanto, como a deficiência de bim neste estudo se dá em todas as células do animal, é possível que o ambiente celular, como a falta de ácido retinóico (GUNDRA, 2014), tenha sido alterado levando a deficiência da diferenciação de SPM para LPM. Em ambos os casos, estas sugestões são especulativas e precisariam ser confirmadas por outros ensaios.

Também em condições basais, demonstramos que deficiência de bim leva a uma diminuição na proporção de células LY6C⁺ (possivelmente monócitos) em machos e fêmeas (11E e 13E). O que pode indicar que em estado basal a constante chegada de monócitos seja menor em animais bim^{-/-}. No entanto, para confirmar seria necessário acompanhar a chegada de monócitos circulantes ao peritônio por transferência adotiva ou outra técnica.

Finalmente, ainda a respeito de subpopulações F4/80⁺ no estado basal, demonstramos que quase a totalidade de células LPM e SPM expressam CD80 em fêmeas (Figura 11A e 11C). Por outro lado, machos possuem maior frequência de células CD80⁺ na ausência de bim (Figura 13A e 13C). Embora não saibamos o motivo pela qual estas células estejam mais ativadas no peritônio de machos na ausência de bim, é evidente que ausência de bim no animal como um todo muda o padrão de ativação de macrófagos em machos mas não em fêmeas.

O fato de haver diferenças em números e/ou porcentagem das subpopulações F4/80⁺ entre machos e fêmeas (Figura 9) começa a nos dar indícios de que a ausência de bim afeta diferentemente machos e fêmeas. No entanto, a análise dos marcadores de diferenciação Ly6C e CD11c, bem como do marcador de ativação CD80 nos permitiu ver melhor esta diferença na influência de bim entre machos e fêmeas. Pois em conjunto, nossos dados demonstram que, em condições não inflamatórias, deficiência de bim afeta igualmente machos e fêmeas no padrão de expressão de CD11c e Ly6C sobre as distintas populações F4/80⁺. Por outro lado, ausência de bim afeta padrão de ativação em LPM e SPM dependente de gênero. E, finalmente, após estímulo inflamatório todas estas diferenças deixam de existir (Figuras 11 e 14).

Outros exemplos em que o sexo influi na celularidade de populações residentes foi observado por SCOTLAND e *col.* (2011) que demonstraram que o

número de linfócitos T e B, bem como macrófagos residentes era o dobro nas cavidades peritoneal e pleural de camundongos e ratos fêmeas. Neste mesmo estudo viu-se que macrófagos de camundongos fêmeas em estado basal possuem maior expressão de TLR2 e TLR4. E que em leucócitos peritoneais fêmeas também possuem maior expressão de TLR3 e MyD88, bem como maior atividade fagocítica. Não somente isso, viu-se que em tecidos mesentéricos de fêmeas havia diferença de expressão de quimiocinas (CX3CL1, CCL2, CCL5 e CXCL12) e de receptores de quimiocinas (CCR1, CCR2, CCR4 e CX3CR1) entre machos e fêmeas. Demonstrando que o ambiente tecidual, o perfil de populações peritoneais e a expressão de alguns tipos de TLRs em macrófagos peritoneais são diferentes entre machos e fêmeas.

Além de olharmos para células F4/80+, também analisamos as populações de linfócitos B e neutrófilos. Em relação a linfócitos B (CD19⁺), demonstramos que não há diferença significativa em frequência e número entre WT e *bim*^{-/-}, e sim um ligeiro aumento de número em *bim*^{-/-}. De modo, que o compartimento de linfócitos B não parece ser alterado de maneira significativa pela ausência de *bim*. Isso se repete em machos e fêmeas em estado basal e após estímulo com amido (Figuras 7 e 8). Este achado é interessante, visto que sabe-se que na ausência de *bim* o número de linfócitos B, linfócitos T (CD4 e CD8) e granulócitos é o dobro ou mais no baço e no compartimento sanguíneo (BOUILLET, 1999). De maneira que, embora ausência de *bim* seja determinante para linfócitos e granulócitos no baço e no sangue, isto parece não se estender necessariamente ao peritônio. Tem sido demonstrado *in vitro* que em linfócitos B e T murinos (células Ba/F3 e CTLL-2, respetivamente) que sofrem apoptose pela privação de IL-3 e IL-2 há aumento de expressão de *bim*, em um mecanismo que parece ser dependente da ativação do fator de transcrição FKHR-L1 (Foxo3) (DIJKERS, 2000; STAHL, 2002). Demonstrando, assim, que a expressão e atividade pró-apoptótica de *bim* também pode ser regulada por citocinas. Talvez a mudança do microambiente e, conseqüentemente, do perfil de citocinas do mesmo possa interferir de maneira diferente sobre linfócitos B no peritônio.

Similarmente, demonstramos que neutrófilos também não estão alterados em número ou frequência na ausência de *bim*, tanto em machos como em fêmeas no estado basal (Figura 7). O que também é interessante, visto que além de BOUILLET e col. (1999) que demonstraram *in vivo* que há mais granulócitos

no sangue e baço de camundongos *bim*^{-/-}, foi demonstrado (ANDINA, 2009) *in vitro* que a morte espontânea de neutrófilos *bim*^{-/-} era retardada, mostrando que *bim* reduz a sobrevida destas células e sua falta, por contraste, aumenta.

Portanto, embora ausência de *bim* esteja associada ao aumento de linfócitos B e neutrófilos em baço e sangue *in vivo* e aumento de sobrevida de neutrófilos *in vitro*, demonstramos que *in vivo* *bim* não afeta no número destas células no peritônio.

Em conjunto estes dados indicam que em peritônio não elicitado de machos e fêmeas, surpreendentemente, *bim* não incorre no aumento de linfócitos B e de neutrófilos, mas sim na celularidade de células F4/80⁺. Sugerindo que *bim*, em estado basal, possa ter um papel importante no controle de sobrevivência e/ou recrutamento de alguma das subpopulações F4/80⁺ do peritônio.

Sabe-se que neutrófilos são recrutados para a cavidade peritoneal após estímulos inflamatórios como tioglicolato, LPS e zimozan e este recrutamento é dependente de macrófagos peritoneais (AJUEBOR, 1999). Amido também induz recrutamento de neutrófilos (CASSADO, 2011). Assim, quando olhamos para a população de neutrófilo após estímulo inflamatório, demonstramos que a frequência e número de neutrófilos é igual entre animais WT e *bim*^{-/-} em machos e fêmeas (Figura 8).

Após infecção com *streptococcus* do grupo B, peritônio de fêmeas apresentam um número mais elevado de neutrófilos em comparação com machos (SCOTLAND, 2011) denotando um recrutamento diferencial entre machos e fêmeas. *Bim*, no entanto, não parece influir neste aspecto, ao menos com estímulo com amido, visto que não há aparente diferença de recrutamento de neutrófilos entre animais WT e *bim*^{-/-} e que isto se repete em machos e fêmeas. Assim, nossos resultados indicam que *bim* parece não interferir no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal após estímulo inflamatório. E, que, além disso, efeito de *bim*, no caso a ausência de efeito, não muda com o gênero do animal.

Entretanto, devemos salientar que nossa análise após estímulo com amido i.p. foi feita após período de 96 horas, sendo que o pico de neutrófilos é esperado por volta de 12 horas após o estímulo inicial (CASSADO, 2011). Logo,

para confirmar se bim interfere ou não de fato no recrutamento, é necessário verificar este fenômeno em ensaio cinético.

Por último, direcionamo-nos para ver se bim poderia influir na morte celular de macrófagos tratados com drogas apoptóticas como Actinomicina D e Estaurosporina. Demonstramos que, durante o tempo acompanhado, bim não interfere no processo de apoptose ou apoptose tardia após tratamento com estas drogas (Figuras 15 e 16). É importante salientar, no entanto, que a técnica utilizada para o enriquecimento de macrófagos da cavidade peritoneal foi a de aderência (descrito em materiais e métodos). De modo que espera-se que a grande maioria de células aderentes sejam macrófagos, especialmente SPMs. Visto que as células foram adquiridas de peritônio elicito com amido. No entanto, deve-se levar em conta que existe uma pequena contaminação de células aderentes que não são necessariamente macrófagos, fato já questionado em literatura (BODGAN, 2006). Portanto estes dados são preliminares e devem ser confirmados mais vezes e com outros métodos adicionais.

Em suma, nossos resultados demonstram que, na ausência de estímulo inflamatório, bim é importante no controle celular de células F4/80⁺ do peritônio, independente de gênero, e interfere no padrão de ativação de células LPM e SPM dependente de gênero. Também demonstram que bim, no peritônio, não interfere na celularidade de linfócitos B.

Logo, embora seja necessário investigar mais a fundo o papel de bim sobre a população de macrófagos/monócitos no peritônio, este trabalho dá indícios de que bim interfere na celularidade destas células e mais do que isso, abre-nos a questão da imunidade diferencial entre gêneros. Já tem sido demonstrado que diferenças cromossômicas (XX e XY) podem conferir maior ou menor susceptibilidade a determinadas doenças (SMITH-BOUVIER, 2008; MIGEON, 2006). Além disso, até mesmo a produção de mediadores imunológicos podem ser diferentemente regulados entre os dois sexos (GRIESBECK, 2015; TORCIA, 2012). Assim sendo, torna-se importante ver mais a fundo o papel de bim sobre a sobrevivência de macrófagos, bem como explorar seu papel na ativação dos mesmos levando em conta a influência do gênero.

6. CONCLUSÕES

- Camundongos $bim^{-/-}$ apresentam maior número de células F4/80⁺ independente de gênero.
- Linfócitos B e neutrófilos não estão aumentados no peritônio em camundongos $bim^{-/-}$ independente de gênero.
- Camundongos $bim^{-/-}$ tem aumento de expressão de CD11c⁺ sobre a população LPM no estado basal independente do gênero.
- Em estado basal animais $bim^{-/-}$ machos, mas não fêmeas, têm maior expressão de CD80.
- Bim não é importante para morte de macrófagos por Actinomicina D e Estaurosporina.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, Jerry M.; CORY, Suzanne. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1324, 2007.

AJUEBOR, Maureen N. et al. Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 3, p. 1685-1691, 1999.

ANDINA, N. et al. Induction of Bim limits cytokine-mediated prolonged survival of neutrophils. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 9, p. 1248, 2009.

ASHKENAZI, Avi et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 ily inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 4, p. 273, 2017.

BAIN, Calum C. et al. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. **Nature immunology**, v. 15, n. 10, p. 929, 2014.

BAIN, Calum C. et al. Long-lived self-renewing bone marrow-derived macrophages displace embryo-derived cells to inhabit adult serous cavities. **Nature communications**, v. 7, p. ncomms11852, 2016.

BOGDAN, Christian; SCHLEICHER, Ulrike. Production of interferon- γ by myeloid cells—fact or fancy?. **Trends in immunology**, v. 27, n. 6, p. 282-290, 2006.

BOUILLET, Philippe et al. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. **Science**, v. 286, n. 5445, p. 1735-1738, 1999.

BOUILLET, Philippe et al. The role of the pro-apoptotic Bcl-2 family member bim in physiological cell death. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 926, n. 1, p. 83-89, 2000.

BOUILLET, Philippe et al. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. **Nature**, v. 415, n. 6874, p. 922, 2002.

CAIN, Derek W. et al. Identification of a tissue-specific, C/EBP β -dependent pathway of differentiation for murine peritoneal macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 9, p. 4665-4675, 2013.

CASSADO, Alexandra dos Anjos. **Heterogeneidade dos macrófagos peritoneais**: São Paulo: Universidade de São Paulo, 2011.

CASTELLANO, Paul; PREVEDEL, Lisa; EUGENIN, Eliseo A. HIV-infected macrophages and microglia that survive acute infection become viral reservoirs by a mechanism involving Bim. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 12866, 2017.

CHEN, Lin et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. **Molecular cell**, v. 17, n. 3, p. 393-403, 2005.

CORY, Suzanne; ADAMS, Jerry M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, n. 9, p. 647-656, 2002.

CORY, Suzanne; HUANG, David CS; ADAMS, Jerry M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. **Oncogene**, v. 22, n. 53, p. 8590-8607, 2003.

CZABOTAR, P. E.; COLMAN, P. M.; HUANG, D. C. S. Bax activation by Bim?. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 9, p. 1187, 2009.

DAVEY, Gayle M. et al. Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 7, p. 947-955, 2002.

de Kruif, P. *The Microbe Hunters* 2nd edn (Harcourt, Brace e Jovanovich, San Diego, 1954)

DIJKERS, Pascale F. et al. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. **Current Biology**, v. 10, n. 19, p. 1201-1204, 2000.

DOS ANJOS CASSADO, Alexandra et al. Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e22141, 2011.

EGLE, Alexander et al. Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 16, p. 6164-6169, 2004.

ENDERS, Anselm et al. Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 7, p. 1119-1126, 2003.

ERLACHER, Miriam et al. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for γ -radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. **Blood**, v. 106, n. 13, p. 4131-4138, 2005.

GARCIA-SAEZ, A. J. The secrets of the Bcl-2 family. *Cell Death & Differentiation*, v. 19, n. 11, p. 1733-1740, 2012.

GAUTIER, Emmanuel L. et al. Gata6 regulates aspartoacylase expression in resident peritoneal macrophages and controls their survival. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 8, p. 1525-1531, 2014.

GAUTIER, Emmanuel L. et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. **Nature immunology**, v. 13, n. 11, p. 1118, 2012.

GAVATHIOTIS, Evripidis et al. BH3-triggered structural reorganization drives the activation of proapoptotic BAX. **Molecular cell**, v. 40, n. 3, p. 481-492, 2010.

GELLERT, Martin et al. Actinomycin binding to DNA: mechanism and specificity. **Journal of molecular biology**, v. 11, n. 3, p. 445-457, 1965.

GHOSN, Eliver Eid Bou et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 6, p. 2568-2573, 2010.

GINHOUX, Florent et al. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. **Nature immunology**, v. 17, n. 1, p. 34, 2016.

GINHOUX, Florent; JUNG, Steffen. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 6, p. 392-404, 2014.

GORDON, Siamon; TAYLOR, Philip R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature reviews immunology**, v. 5, n. 12, p. 953, 2005.

GOSSELIN, David et al. Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1327-1340, 2014.

GRIESBECK, Morgane et al. Sex differences in plasmacytoid dendritic cell levels of IRF5 drive higher IFN- α production in women. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 11, p. 5327-5336, 2015.

GUNDRA, Uma Mahesh et al. Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. **Blood**, v. 123, n. 20, p. e110-e122, 2014.

GUNDRA, Uma Mahesh et al. Vitamin A mediates conversion of monocyte-derived macrophages into tissue-resident macrophages during alternative activation. **Nature immunology**, v. 18, n. 6, p. 642, 2017.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HAPPO, Lina et al. Maximal killing of lymphoma cells by DNA damage-inducing therapy requires not only the p53 targets Puma and Noxa, but also Bim. **Blood**, v. 116, n. 24, p. 5256-5267, 2010.

HASHIMOTO, Daigo et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 792-804, 2013.

HINDS, Mark G.; DAY, Catherine L. Regulation of apoptosis: uncovering the binding determinants. **Current opinion in structural biology**, v. 15, n. 6, p. 690-699, 2005.

HOSSINI, Amir M.; EBERLE, Jürgen. Apoptosis induction by Bcl-2 proteins independent of the BH3 domain. **Biochemical pharmacology**, v. 76, n. 11, p. 1612-1619, 2008.

HUNTINGTON, Nicholas D. et al. Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1. **Nature immunology**, v. 8, n. 8, p. 856-863, 2007.

JENKINS, Stephen J. et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. **Science**, v. 332, n. 6035, p. 1284-1288, 2011.

KALE, Justin; OSTERLUND, Elizabeth J.; ANDREWS, David W. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. **Cell death and differentiation**, v. 25, n. 1, p. 65, 2018.

KALKAVAN, Halime; GREEN, Douglas R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. **Cell death and differentiation**, v. 25, n. 1, p. 46, 2018.

KIM, Ki-Wook et al. MHC II+ resident peritoneal and pleural macrophages rely on IRF4 for development from circulating monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 10, p. 1951-1959, 2016.

KIRSCHNEK, Susanne et al. Phagocytosis-induced apoptosis in macrophages is mediated by up-regulation and activation of the Bcl-2 homology domain 3-only protein Bim. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 2, p. 671-679, 2005.

KOBA, M.; KONOPA, J. Actinomycin D and its mechanisms of action. **Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)**, v. 59, p. 290, 2005.

KRUMAN, Inna; GUO, Qing; MATTSON, Mark P. Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. **Journal of neuroscience research**, v. 51, n. 3, p. 293-308, 1998.

KURTS, Christian et al. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8+ T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 2, p. 239-245, 1997.

KUWANA, Tomomi et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. **Molecular cell**, v. 17, n. 4, p. 525-535, 2005.

LAVIN, Yonit et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1312-1326, 2014.

LOMONOSOVA, Elena; CHINNADURAI, G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. **Oncogene**, v. 27, n. S1, p. S2, 2009.

MAILLEUX, Arnaud A. et al. BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms. **Developmental cell**, v. 12, n. 2, p. 221-234, 2007.

MAILLEUX, Arnaud A.; OVERHOLTZER, Michael; BRUGGE, Joan S. Lumen formation during mammary epithelial morphogenesis: insights from in vitro and in vivo models. **Cell cycle**, v. 7, n. 1, p. 57-62, 2008.

MESTRE-ESCORIHUELA, Cinta et al. Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. **Blood**, v. 109, n. 1, p. 271-280, 2007.

MIGEON, Barbara R. The role of X inactivation and cellular mosaicism in women's health and sex-specific diseases. **Jama**, v. 295, n. 12, p. 1428-1433, 2006.

MIYANISHI, Masanori et al. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. **Nature**, v. 450, n. 7168, p. 435, 2007.

MOSSER, David M.; EDWARDS, Justin P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews immunology**, v. 8, n. 12, p. 958, 2008.

MURRAY, Peter J.; WYNN, Thomas A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 11, p. 723, 2011.

O'REILLY, Lorraine A. et al. The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. **The American journal of pathology**, v. 157, n. 2, p. 449-461, 2000.

O'CONNOR, Liam et al. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. **The EMBO journal**, v. 17, n. 2, p. 384-395, 1998.

OH, Min-Hee et al. mTORC2 signaling selectively regulates the generation and function of tissue-resident peritoneal macrophages. **Cell reports**, v. 20, n. 10, p. 2439-2454, 2017.

OKABE, Yasutaka; MEDZHITOV, Ruslan. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. **Cell**, v. 157, n. 4, p. 832-844, 2014.

PELLEGRINI, Marc et al. Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 24, p. 14175-14180, 2003.

PUTHALAKATH, Hamsa et al. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. **Molecular cell**, v. 3, n. 3, p. 287-296, 1999.

REGINATO, Mauricio J. et al. Bim regulation of lumen formation in cultured mammary epithelial acini is targeted by oncogenes. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 11, p. 4591-4601, 2005.

ROBERTS, Allison W. et al. Tissue-resident macrophages are locally programmed for silent clearance of apoptotic cells. **Immunity**, v. 47, n. 5, p. 913-927. e6, 2017.

SCOTLAND, Ramona S. et al. Sex differences in resident immune cell phenotype underlie more efficient acute inflammatory responses in female mice. **Blood**, v. 118, n. 22, p. 5918-5927, 2011.

SIONOV, Ronit Vogt; VLAHOPOULOS, Spiros A.; GRANOT, Zvi. Regulation of Bim in health and disease. **Oncotarget**, v. 6, n. 27, p. 23058, 2015.

SMITH-BOUVIER, Deborah L. et al. A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 5, p. 1099-1108, 2008.

STAHL, Marie et al. The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 10, p. 5024-5031, 2002.

STARR, Timothy K.; JAMESON, Stephen C.; HOGQUIST, Kristin A. Positive and negative selection of T cells. **Annual review of immunology**, v. 21, n. 1, p. 139-176, 2003.

TAKENAKA, Eri et al. Selective DNAM-1 expression on small peritoneal macrophages contributes to CD4+ T cell costimulation. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 15180, 2018.

TAUBER, Alfred I. Metchnikoff and the phagocytosis theory. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 11, p. 897, 2003.

TORCIA, Maria Gabriella et al. Sex differences in the response to viral infections: TLR8 and TLR9 ligand stimulation induce higher IL10 production in males. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e39853, 2012.

VAN FURTH, Ralph; COHN, Zanvil A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 128, n. 3, p. 415-435, 1968.

VILLUNGER, Andreas et al. Essential role for the BH3-only protein Bim but redundant roles for Bax, Bcl-2, and Bcl-w in the control of granulocyte survival. **Blood**, v. 101, n. 6, p. 2393-2400, 2003.

WANG, Jing; KUBES, Paul. A reservoir of mature cavity macrophages that can rapidly invade visceral organs to affect tissue repair. **Cell**, v. 165, n. 3, p. 668-678, 2016.

WARREN, Chloe FA; WONG-BROWN, Michelle W.; BOWDEN, Nikola A. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. **Cell death & disease**, v. 10, n. 3, p. 177, 2019.

WILLIS, Simon N. et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 856-859, 2007.

WYNN, Thomas A.; CHAWLA, Ajay; POLLARD, Jeffrey W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 445, 2013.

YONA, Simon et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 79-91, 2013.

ZHANG, L. N.; LI, J. Y.; XU, W. A review of the role of Puma, Noxa and Bim in the tumorigenesis, therapy and drug resistance of chronic lymphocytic leukemia. **Cancer gene therapy**, v. 20, n. 1, p. 1, 2013.