



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Depto. de Histologia e Embriologia  
Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular



## **O Papel da Galectina-3 na Diferenciação de Linfócitos B**

Lauremília Ricon G. R. da Costa

Trabalho apresentado ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Morfológicas da  
Universidade Federal do Rio de  
Janeiro como pré-requisito para  
obtenção do grau de Mestre.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Márcia Cury El-Cheikh

Rio de Janeiro  
Maio/2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Depto. de Histologia e Embriologia  
Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular

**O Papel da Galectina-3 na Diferenciação de  
Linfócitos B**

Lauremília Ricon G. R. da Costa

Trabalho apresentado ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Morfológicas da  
Universidade Federal do Rio de  
Janeiro como pré-requisito para  
obtenção do grau de Mestre.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Márcia Cury El-Cheikh

**Maio, 2008**

COSTA, LAUREMÍLIA RICON G.R. DA

O Papel da Galectina-3 na Diferenciação de Linfócitos B/ Lauremília RICON G.R. da Costa

Rio de Janeiro: UFRJ/PCM, 2008.

VIII, 86, f.: il.

Orientador: profa. Márcia Cury El-Cheikh

Dissertação de Mestrado – UFRJ/PCM, 2008-04-14

Referências Bibliográficas: f. 76-86

1. Galectina-3 2. Linfócitos B 3. Diferenciação I. El-Cheikh, Márcia Cury  
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas III. O Papel da Galectina-3 na Diferenciação de Linfócitos B.

## ***Examinadores***

---

**Dra. Déa Maria Serra Villa-Verde**  
IOC, FioCruz

**Dra. Maria Isabel Doria Rossi**  
Depto. de Histologia e Embriologia, UFRJ

**Dr. José Garcia Abreu**  
Depto. de Anatomia, UFRJ

**Dr. José Marcos da Cunha Telles**  
Depto. de Pediatria, UFRJ; Suplente

**Dra. Cláudia dos Santos Mermelstein**  
Depto. de Histologia e Embriologia, UFRJ; Revisora e Suplente

**Dra. Márcia Cury El-Cheikh**  
Depto. de Histologia e Embriologia, UFRJ; Orientadora

*Aos meus amados pais, Inaldo*

*e Sandra,*

*e ao André, pelo seu amor.*

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço a Deus, provedor de todas as coisas que me levaram a chegar até aqui.

À prof<sup>a</sup>. Márcia Cury que me aceitou quando a procurei para realizar estágio de iniciação científica, acreditou em mim e continuamos este trabalho. Obrigada pela oportunidade e pela confiança! Aprendi muito durante esses 4 anos com ela, tanto no que se refere à postura num laboratório de pesquisa quanto à postura diante da vida. Muito Obrigada!

Obrigada ao prof<sup>o</sup>. Radovan Borojevic, líder do nosso grupo.

Aos colegas, que se tornaram amigos, do laboratório: Natália, Carol, Lígia, Virginia (muita saudade!), Léo, Osama (quer dizer, Guilherme), Anderson (obrigada também por ajudar nas estatísticas), Gustavo (Paulista). Muito obrigada pela força e incentivo!

Aos amigos e companheiros de trabalho Camila e Felipe. À primeira porque está sempre disposta a me ajudar e a executar novas idéias. Ao Felipe, porque sempre esteve ao meu lado desde o primeiro dia que cheguei no laboratório. Tenho que agradecer pela orientação prática, pois me ensinou tudo o que sei. Obrigada pelas dicas, pelo incentivo e pela força. Nossos papos durante marcação de anticorpo, aquisição e análise de dados pela citometria rendem frutos, como grande parte deste trabalho, além de construirmos uma amizade. O grupo de Galectina se tornou uma equipe, graças ao respeito e ao trabalho conjunto que construimos (prof<sup>a</sup>. Márcia, Felipe, eu e Camila) no dia-a-dia.

À equipe do LPDC que trabalha nos bastidores: Edna, Gorete, Sílvio, Roberto e Gustavo.

À Marise e ao Emerson, pela recepção em Ribeirão Preto e pela ajuda na realização dos RT-PCRs em Tempo Real.

Aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado, apoiando cada uma das minhas decisões, dispostos a “segurar a barra” que fosse pela minha realização. Obrigada pela vida, por cada uma das broncas, por cada incentivo, por acreditarem em mim mais do que eu mesma... Amo vocês!

Agradeço ao meu marido, André, que sempre esteve ao meu lado, incentivando-me, torcendo, vibrando... Obrigada por todos os dias tentar me convencer de que sou capaz de realizar meus projetos de vida. Obrigada por me fazer enfrentar meus medos. Obrigada pelo apoio em todos os momentos! Obrigada pela orientação informal (discutimos muitas vezes esse trabalho durante o jantar; acho que não existe um químico que saiba mais de galectina-3 e linfócitos B do que ele). Tornou-se meu exemplo de profissional: professor e pesquisador. Te amo!

Agradeço a toda a minha família: às minhas irmãs, Lulu e Cília; Vó Alda, Vô Roberto e Vó Leda, pela torcida, pelo apoio e por estarem sempre presentes em minha vida. Amo vocês incondicionalmente!

Obrigada à família Formiga (e seus agregados) por me aceitarem e me abraçarem como filha, irmã e tia. Obrigada pela força, incentivo e torcida!

Obrigada a todas as outras pessoas que fazem parte da minha vida! Fica impossível colocar o nome de todas aqui. Obrigada pela torcida!

*"Aqueles que passam por nós não vão sós, não nos deixam sós.  
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós."  
Antoine de Saint Exupéry*

## **Sumário**

<b><u>Resumo</u></b> .....	iii
<b><u>Abstract</u></b> .....	iv
<b><u>Lista de abreviaturas</u></b> .....	v
<b>I) <u>Introdução</u></b> .....	1
1) Hematopoese.....	1
1.1) Ontogenia do Sistema Hematopoético.....	1
1.1.1) Saco Vitelínico.....	2
1.1.2) P-Sp/AGM.....	4
1.1.3) Fígado Fetal.....	5
1.2) Hematopoese na Medula Óssea.....	6
1.2.1) Mielopoese.....	10
1.2.2) Linfopoese.....	11
2) Galectinas.....	14
2.1) Galectina-3.....	15
2.1.1) Participação da galectina-3 nas células hematopoéticas.....	21
<b>II) <u>Objetivos</u></b> .....	26
<b>III) <u>Metodologia</u></b> .....	27
1) Animais.....	27
2) Obtenção das células de medula óssea.....	27
3) Citometria de Fluxo.....	28
3.1) Preparo da Suspensão Celular.....	28
3.2) Ajuste do citômetro, análise e aquisição dos dados.....	29
4) Ensaio de formação de colônias pré-B em metilcelulose.....	29
5) Culturas para obtenção de células estromais da medula óssea.....	30
6) RT-PCR em tempo real.....	31
6.1) Extração de RNA e transcrição reversa.....	31

6.2) PCR em tempo real.....	32
6.3) <i>Primers</i> utilizados na PCR em Tempo Real.....	33
7) Co-cultura.....	33
7.1) Estabelecimento de estroma.....	34
7.2) Obtenção de células mononucleares da medula óssea.....	34
<b>IV) <u>Resultados</u></b> .....	<b>36</b>
<b>V) <u>Discussão</u></b> .....	<b>58</b>
<b>VI) <u>Conclusões</u></b> .....	<b>72</b>
<b>VI) <u>Perspectivas</u></b> .....	<b>73</b>
<b>VII) <u>Referências Bibliográficas</u></b> .....	<b>74</b>

## **Resumo**

A Galectina-3 regula a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos nos órgãos linfóides periféricos. Para investigar se a linfopoese B na medula óssea de animais *knockouts* para galectina-3 (Gal-3<sup>-/-</sup>) estaria alterada, analisou-se as etapas de diferenciação dos linfócitos B, usando marcadores específicos para estas células por citometria de fluxo. O número de precursores de linfócitos B, que respondem à IL-7, foi quantificado no sistema de cultura de metilcelulose. A interação entre as células B em desenvolvimento e células estromais foi feita pelo sistema de co-cultivo celular, utilizando células mononucleares obtidas da medula óssea de animais Gal-3<sup>-/-</sup> e selvagens, e a linhagem estromal OP9. Além disso, quantificou-se a expressão de IL-7 por RT-PCR em tempo real nas células estromais de medula óssea obtidas de camundongos controles e Gal-3<sup>-/-</sup>, mantidas em cultura por 7 e 14 dias.

Observou-se aumento significativo de precursores de células B na medula óssea de animais Gal-3<sup>-/-</sup>, tanto *in vivo* como *in vitro*, comparados aos animais controles. A presença da linhagem estromal OP9, que expressa Gal-3, não foi suficiente para reverter o aumento destes precursores nas co-culturas com células mononucleares Gal-3<sup>-/-</sup>, dessa maneira a sinalização pela gal-3 não deve ser via célula estromal. A expressão de IL-7 nas células estromais de camundongos Gal-3<sup>-/-</sup> foi menor que as de células controles, o que não interferiu na geração e proliferação de precursores de células B. Nesse sentido, sugerimos que outros mecanismos possam estar envolvidos na desregulação da linfopoese B na ausência de Gal-3, tais como o controle de sobrevivência *versus* apoptose.

## ***Abstract***

---

Galectin-3 regulates the differentiation of B lymphocytes into plasma cells in the secondary lymphoid organs. To investigate if B lymphopoiesis in the bone marrow of galectin-3 knockout mice would be altered, the steps of B cell development was analyzed by flow cytometry, using specific markers. The number of B cell precursors, that respond to IL-7, was quantified in methyl cellulose culture system. The interaction of B cell progenitors and stromal cells was investigated in co-culture system, using bone marrow mononuclear cells from Gal-3<sup>-/-</sup> and wild type mice and the stromal cell line OP9. The expression of IL-7 was evaluated by Real-Time PCR in stromal cells from the bone marrow of Gal-3<sup>-/-</sup> and wild type mice maintained *in vitro* for 7 and 14 days.

It was observed a significant increase in B cell precursors in bone marrow of Gal-3<sup>-/-</sup> mice, both *in vivo* and *in vitro*, compared with control mice. The presence of the stromal cell lineage OP9, which express Gal-3, was not sufficient to reverse the augment of precursors in co-culture systems with mononuclears cells Gal-3<sup>-/-</sup>. This suggests that the signalling by Gal-3 would not be envoied by stromal cells. The expression of IL-7 in stromal cells of Gal-3<sup>-/-</sup> mice was diminished, compared with control cells, which did not affect the generation and proliferation of B cell precursors.

We suggest that others mechanisms could be involved in the disrerulation of B lymphopoiesis in the absence of Gal-3, such as the control of survival *versus* apoptosis.

## **Lista de Abreviaturas**

---

**AGM:** aorta-gônada-mesonéfrons

**APC:** alofocianina

**BCR:** receptor de células B

**BSS:** *buffered saline solution*

**CCl<sub>4</sub>:** tetracloreto de carbono

**CLP:** precursor linfóide comum

**CMP:** precursor mielóide comum

**CRD:** domínio de reconhecimento de carboidratos

**CTH:** célula-tronco hematopoética

**DMEM:** Meio Essencial modificado por Dulbecco

**dpc:** dias pós-coito

**ETP:** Progenitor da linhagem T

**FITC:** isotiocianato de fluorescena

**FSC:** *Forward scatter*

**Gal-3<sup>-/-</sup>:** Animal *knockout* para galectina-3

**Gal-3:** galectina-3

**G-CSF:** fator de estimulação de colônias de granulócitos

**GFP:** proteína verde fluorescente

**GM-CSF:** fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos

**Ig:** Imunoglobulina

**IL-:** interleucina

**INF - $\gamma$ :** interferon  $\gamma$

**KO:** *knockout* (animal deficiente em gal-3)

**LPS:** lipopolissacarídeos

**PBS:** *phosphate buffered saline*

**PE:** ficoeritrina

**P-Sp:** esplanonopleura pára-aórtica

**RPMI:** *Roswell Park Memorial Institute*

**RT-PCR:** *reverse transcriptase- polymerase chain reaction*

**SFB:** soro fetal bovino

**SSC:** *Side scatter*

**TCR:** receptor de células T

**WT:** *wild-type* (animal controle)

**$\alpha$ -MEM:** Meio Essencial modificação  $\alpha$

**$\alpha$ -SMA:**  $\alpha$ -actina de músculo liso

## **I) Introdução**

### **1) Hematopoese**

A hematopoese é um processo complexo e altamente organizado no qual uma célula-tronco hematopoética (CTH) gera todas as células sanguíneas diferenciadas. Estas células primordiais ao se dividirem são capazes de se auto-renovar e de gerar uma célula progenitora multipotente, menos indiferenciada, que dá origem aos progenitores comprometidos com alguma linhagem - eritro-mielóide ou linfóide. Seguindo este processo de proliferação e diferenciação, as células vão se tornando cada vez mais especializadas até se tornarem maduras e funcionais (revisado por Douagi e cols., 2002).

Vários tecidos estão envolvidos na hematopoese: o saco vitelínico, a região da esplanopleura para-aórtica (P-Sp), a região da aorta-gônada-mesonefrons (AGM), o fígado, o timo, o baço e a medula óssea, esta como sítio definitivo de hematopoese na vida adulta.

#### **1.1) Ontogenia do sistema hematopoético**

O sistema hematopoético de camundongos é gerado da camada mesodérmica, formada no 6,5 dias pós-coito (dpc). A hematopoese se inicia no saco vitelínico, uma estrutura extra-embriônica e na região intraembriônica P-Sp/AGM (esplanopleura para-aórtica/Aorta-gônada-mesonéfrons). A partir de então as células precursoras colonizam o fígado

fetal que é considerado o principal sítio hematopoético na vida intra-uterina. O timo e o baço são formados tardiamente durante a gestação e estão envolvidos na diferenciação e maturação de progenitores hematopoéticos oriundos de outros sítios embrionários (Dzierzak e Medvinsk, 1995).

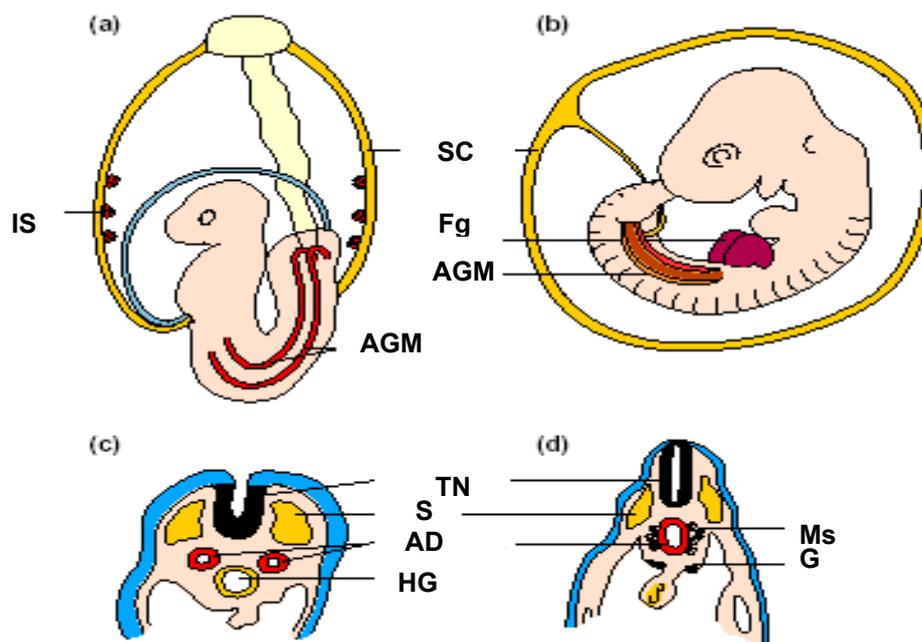
### **1.1.1) Saco vitelínico**

O saco vitelínico (Figura 1a e b) é o primeiro tecido hematopoético durante o desenvolvimento dos mamíferos e, por muito tempo, foi considerado o único sítio embrionário “pré-fígado” devido à sua abundante produção de células hematopoéticas morfológicamente reconhecíveis: eritrócitos primitivos (células nucleadas cujas isoformas de hemoglobina possuem maior afinidade ao oxigênio que os eritrócitos adultos). No sétimo dia de gestação (7 dpc), começam a se formar ilhotas sanguíneas extraembionárias a partir de agregados de células mesodérmicas; as células endoteliais se diferenciam na camada externa destas ilhotas enquanto os eritrócitos na camada interna. Esta associação íntima entre estes dois tipos celulares mesodérmicos (células endoteliais e hematopoéticas) levou à formulação da hipótese de existir um precursor comum, o hemangioblasto (revisado por Douagi e cols., 2002 e Dzierzak e cols., 1998).

Além dos eritroblastos, encontram-se também macrófagos e megacariócitos. Essas células são consideradas primitivas visto que se diferenciam das células geradas em indivíduos adultos: no caso dos macrófagos pela síntese diferencial de um grupo de enzimas e pela capacidade fagocitária; e dos megacariócitos pela acelerada produção de plaquetas e pela sua reduzida ploidia (Cumano e Godin, 2002).

A hematopoese continua até o 13º dia de gestação. Acredita-se que a rápida geração e diferenciação das primeiras células hematopoéticas no saco vitelínico permite a sobrevivência e o crescimento do embrião e que a hematopoese extraembrionária não é mais necessária quando os sítios intraembrionários e a placenta já estão formados (revisado por Dzierzak, e cols., 1998).

Dessa maneira, no saco vitelínico a hematopoese é restrita a funções de oxigenação celular, tamponamento plaquetário, caso haja sangramento embrionário, e a funções fagocíticas, regulando a drenagem de restos celulares apoptóticos.



**Figura 1:** Sítios embrionários hematopoéticos de camundongo. Representação esquemática do embrião em (a) 8,5/9 dpc e (b) 10,5/11 dpc e cortes transversais da região P-Sp/AGM em (c) 8,5/9 dpc e (d) 10,5/11 dpc. Abreviações: **IS:** Ilhotas sanguíneas; **SC:** Saco vitelínico; **Fg:** Fígado; **AGM:** Região Aorta-gônada-mesonéfrons; **TN:** Tubo neural; **S:** somito; **AD:** Aorta dorsal; **HG:** intestino posterior; **Ms:** mesonéfrons; **G:** Gônadas. Fonte: Adaptado de Dzierzak e cols., 1998.

### 1.1.2) P-Sp/ AGM:

A região da esplancnopleura para-aórtica/Aorta-Gônadas-Mesonéfrons (P-Sp/AGM) é o primeiro sítio hematopoético intraembrionário (Figura 1a e b). A hematopoese intraembrionária é independente da hematopoese do saco vitelínico. Entretanto, esses dois sítios são chamados hemogênicos, porque possuem a capacidade de gerar precursores hematopoéticos. Todavia, nesta região, ao contrário do saco vitelínico, não ocorre diferenciação de precursores, mas geração e expansão dos mesmos.

A região P-Sp/AGM é uma estrutura complexa formada pela aorta e o mesênquima subjacente – o mesentério, as gônadas e mesonéfrons. A P-Sp (esplancnopleura) compreende os tecidos do endoderma intestinal em desenvolvimento, a artéria onfalomesentérica, a aorta dorsal e a membrana esplancnopleurica destes tecidos. Durante a organogênese, começam a se formar, adjacente à aorta dorsal, componentes do sistema urogenital. Dessa forma, da P-Sp se desenvolve a aorta, gônadas e mesonéfrons, dando subseqüentemente origem à região AGM (revisado por Ling e Dzierzak, 2002).

Os precursores hematopoéticos dessa região são multipotentes, uma vez que uma única célula é capaz de gerar todas as linhagens hematopoéticas *in vitro*. No entanto, quando as células são obtidas *ex vivo* parece não haver precursores hematopoéticos linhagem-específicos, indicando, portanto que esta região é um sítio rico em células-tronco ou células indiferenciadas ( Godin e cols., 1995; Godin e cols., 1999).

Dados obtidos *in vivo* e *in vitro* demonstram que as primeiras células-tronco hematopoéticas adultas são geradas na região AGM no dia 10 dpc.,

de onde saem e colonizam o fígado fetal. Dessa maneira, estes dados sugerem que a região P-Sp/AGM é o primeiro sítio gerador de progenitores hematopoéticos e CTHs definitivos (revisado por Dzierzak e cols., 1998).

Embora esta região seja capaz de gerar precursores multipotentes, não podemos considerá-la como um sítio permissivo de diferenciação destes precursores em linhagens celulares específicas. Esta diferenciação só ocorrerá quando o fígado se tornar o órgão hematopoético predominante (Zon, 1995; Sanchez e cols., 1996).

### **1.1.3) Fígado Fetal**

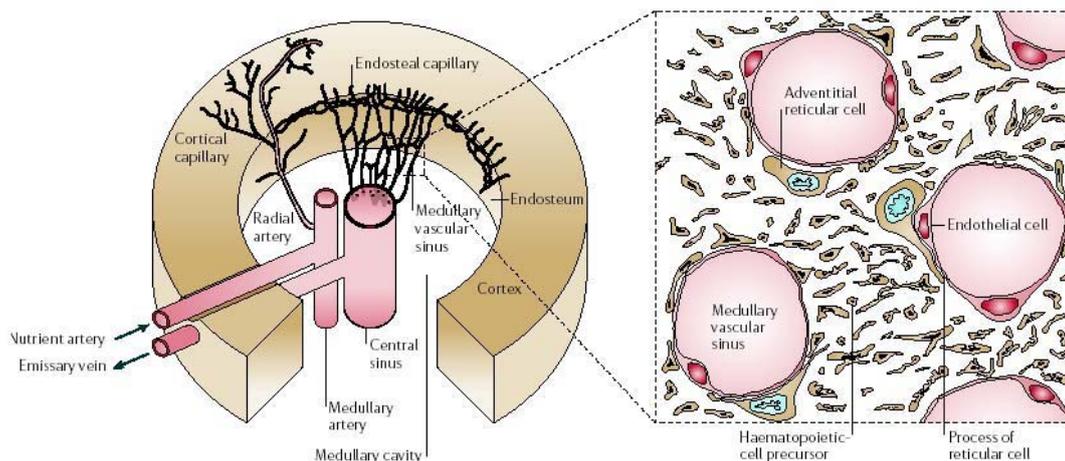
O fígado fetal (Figura 1b) é considerado o principal tecido hematopoético durante o desenvolvimento embrionário. As CTHs geradas na AGM, colonizam o fígado fetal a partir do dia 10 do desenvolvimento embrionário. Este sítio hematopoético oferece condições únicas para a expansão e diferenciação das CTHs. Até o 15<sup>o</sup> dpc, as CTHs expandem numericamente e adquirem os marcadores fenotípicos característicos que as define na medula óssea adulta. Além da expansão de CTHs, o fígado fetal suporta a diferenciação de eritrócitos, células mielóides e linfócitos (Cumano e Godin, 2007) .

Ao longo do desenvolvimento o processo de expansão das CTHs declina e termina essencialmente próximo ao nascimento. Do fígado fetal, as células hematopoéticas vão colonizar a medula óssea, que é o sítio hematopoético definitivo, onde serão gerados continuamente células maduras e precursores hematopoéticos (revisado por Dzierzak e cols., 1998).

## **1.2) Hematopoese na medula óssea**

A medula óssea (figura 2) é encontrada nas cavidades ósseas do organismo adulto: nos ossos chatos da bacia, no esterno e na clavícula; assim como, em murinos, localiza-se em ossos longos, como o fêmur e a tíbia. Na cavidade medular encontra-se uma rede de vasos, entre os quais as células sanguíneas e seus precursores se encontram. Além dos sistemas hematopoético e vascular, a medula óssea possui um outro, o sistema estromal. Os sistemas vascular e estromal formam um microambiente que favorece a viabilidade das células sanguíneas e fornece fatores necessários ao seu desenvolvimento (revisado por Nagasawa, 2006).

O estroma medular é constituído por uma rede de tecido conjuntivo, contendo uma variedade de tipos celulares que incluem fibroblastos, macrófagos, adipócitos (células acumuladoras de gordura), células musculares lisas, células reticulares, células endoteliais e células ósseas (osteoblastos e osteoclastos) e por matriz extracelular, que é produzida por essas mesmas células (revisado por Dennis e Charbord, 2002).



**Figura 2:** Representação morfológica da medula óssea. A hematopoese ocorre nos espaços extravasculares entre os sinusóides. Os sinusóides vasculares da medula óssea são cobertos por células endoteliais e cercados por células reticulares adventícias. Fonte: Nagasawa, 2006.

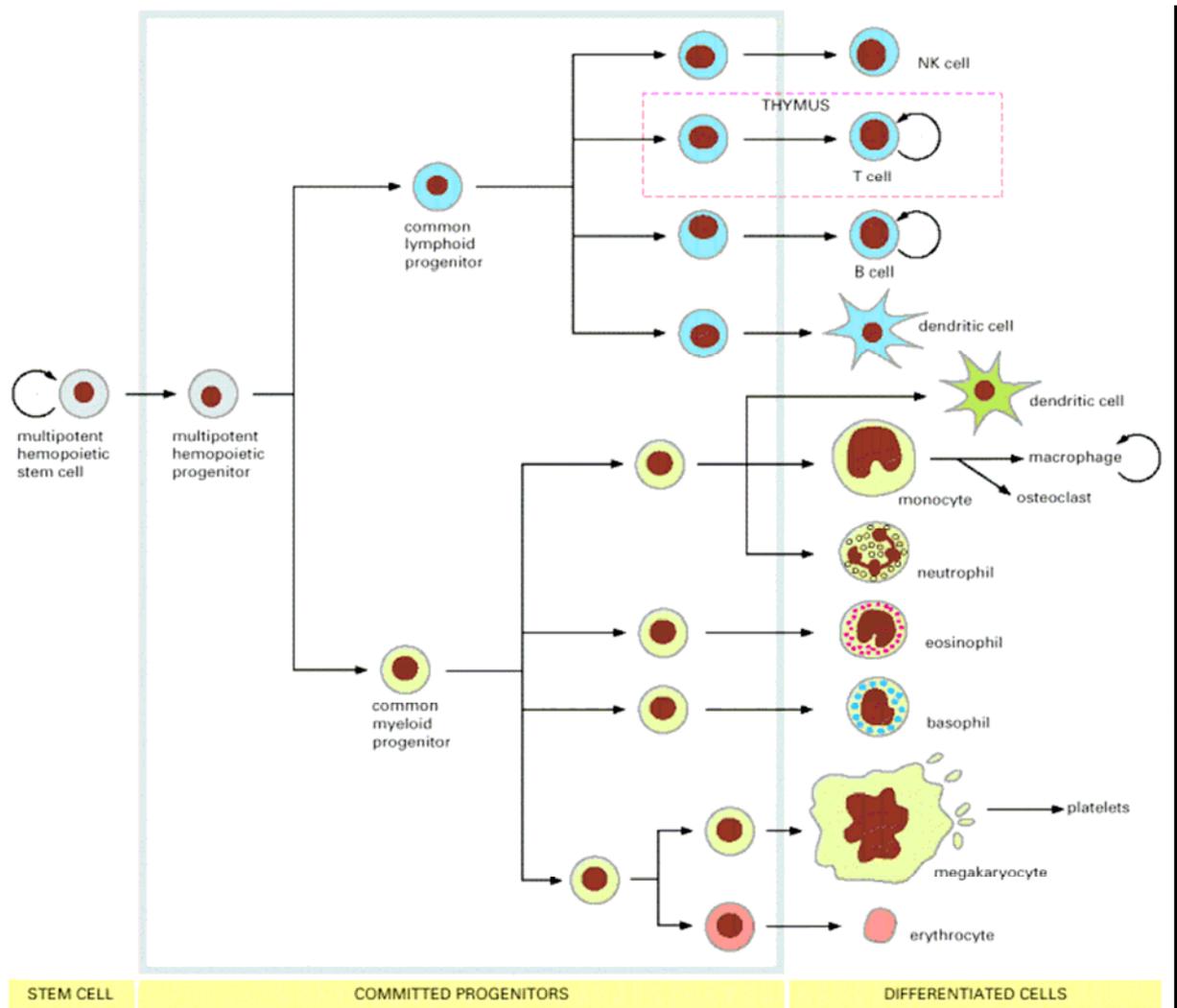
As células estromais regulam a hematopoese, a manutenção e liberação das células diferenciadas através da secreção de fatores solúveis ou pelas interações célula-célula ou célula-matriz extracelular. O estroma medular é formado a partir de uma série de eventos que ocorrem após a diferenciação de células osteogênicas primitivas, a formação óssea e a invasão vascular dos rudimentos ósseos. Esta íntima relação das células estromais com o sistema vascular medular também é observada na medula adulta. Portanto, o sistema hematopoético coexiste anatômica e funcionalmente com os sistemas ósseo, vascular e estromal - mesenquimal (revisado por Bianco e cols., 2001).

A hematopoese na medula óssea (figura 3) é um processo complexo e altamente hierarquizado. Como base desse sistema, encontra-se as células-tronco hematopoéticas (CTH) de longa duração (LT-HSC: *long-term hematopoietic stem cell*), que são capazes de gerar todas as linhagens hematopoéticas por mais de 6 meses quando transplantadas para

camundongos letalmente irradiados e com capacidade de auto-renovação. Estas células multipotentes e auto-renováveis dão origem às células-tronco de curta duração (ST-HSC: *short-term-hematopoietic stem cell*) cuja capacidade de auto-renovação é limitada, porém são capazes de dar origem a todas as linhagens hematopoéticas por um período menor que o das células de longa duração, apenas por até 12 semanas. O próximo estágio nessa cascata de diferenciação é a geração de progenitores multipotentes, que embora sejam capazes de gerar quaisquer das linhagens hematopoéticas, não possuem capacidade de auto-renovação (revisado por Kondo e cols., 2001).

Os progenitores multipotentes dão origem a progenitores já comprometidos com a linhagem mielóide ou linfóide, os quais são chamados progenitor mielóide comum (CMP) e progenitor linfóide comum (CLP), respectivamente. O CMP é capaz de dar origem a todas células da linhagem mielóide, as quais incluem granulócitos, monócitos, eritrócitos e megacariócitos. O CLP origina todas as classes de linfócitos - T, B e células NK (revisado por Kondo e cols., 2001; Akashi e cols., 2000; Kondo e cols., 1997). Interessante é o fato de que ambos os progenitores podem dar origem às células dendríticas (Traver e cols., 2000 e Manz e cols., 2001).

A partir daqui cada uma das cascatas tem características próprias, envolvendo diversos fatores de transcrição e citocinas que participam dos eventos de diferenciação que vão terminar nas células maduras, prontas para exercer sua função.

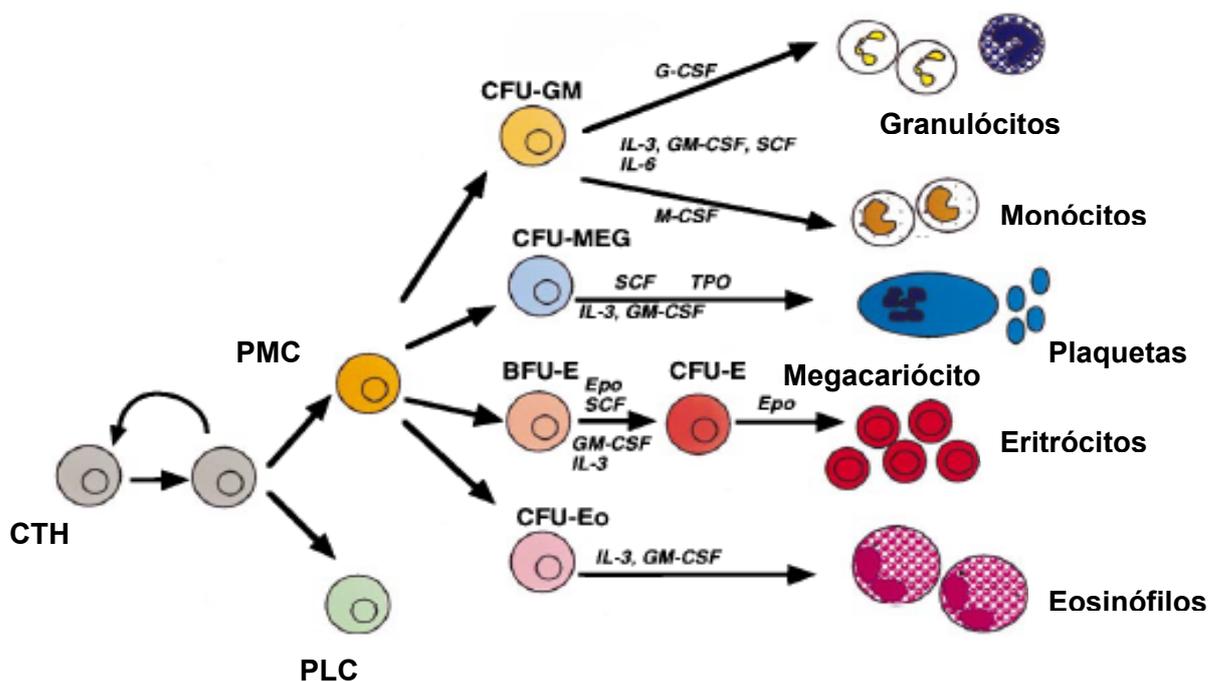


**Figura 3:** Esquema da hematopoese na medula óssea. Nos mamíferos adultos, quase todas as células se originam e desenvolvem na medula óssea. Os linfócitos T são a exceção, pois seus progenitores se originam na medula óssea, mas migram para o timo, onde amadurecem e se tornam linfócitos T maduros. Fonte: Molecular Biology of the Cell, 4a ed., pg. 1290 (2002).

### 1.2.1) Mielopoese

O comprometimento mielóide é controlado por uma série de fatores de transcrição, dentre os quais Notch1 e PU.1, e citocinas que estão diretamente envolvidas na proliferação e diferenciação das células comprometidas, como G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos) e GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos) (Socolovsky e cols., 1998).

As células da linhagem mielóide se diferenciam a partir de um precursor mielóide comum (PMC). Cada etapa de comprometimento possui diversos fatores de transcrição e inúmeras citocinas envolvidas, como demonstra a Figura abaixo:



**Figura 4:** Representação esquemática da diferenciação mielóide, incluindo algumas citocinas que participam deste processo. **CTH:** Células-tronco hematopoéticas; **PMC:** progenitor mielóide comum; **PLC:** progenitor linfóide comum; **CFU:** unidades formadoras de colônias; **GM:** granulócitos e macrófagos; **MEG:** megacariócitos; **E:**eritrócitos; **Eo:** eosinófilos; **IL:**Interleucina; **G-CSF:** fator estimulador de colônias de granulócitos; **GM-CSF:** fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos; **TPO:** trombopoetina; **Epo:** eritropoetina; **SCF:** fator de célula-tronco. Fonte: Adaptação de Socolovsky e cols., 1998.

### 1.2.2) Linfopoese

As células da linhagem linfóide (linfócitos B e T e células NK) se originam a partir do precursor linfóide comum (PLC). O desenvolvimento de linfócitos depende de interações entre estes precursores, o estroma medular e fatores solúveis, além de mecanismos moleculares que regulam o comprometimento da linhagem linfóide. Dentre os fatores de transcrição essenciais para o comprometimento dos PLCs, pode-se destacar IKaros, Pax-5, E2A, EBF e PU.1. Outro ponto muito importante para o comprometimento destes precursores é a perda de expressão de receptores para as citocinas IL-2 e GM-CSF, que são imprescindíveis para a diferenciação mielóide (Kondo e cols., 2001; Kee e Murre, 2001).

O comprometimento linfóide, segundo Kondo e colaboradores (2001), possui duas fases distintas. A primeira fase é estabelecida pelo comprometimento de células hematopoéticas com a linhagem linfóide, representadas pelos PLCs, que deixam de expressar receptores imprescindíveis à mielopoese. A segunda fase corresponde ao desenvolvimento de células em alto grau de comprometimento linfóide, representadas pelas etapas “pré-pró B” e “pré-T”.

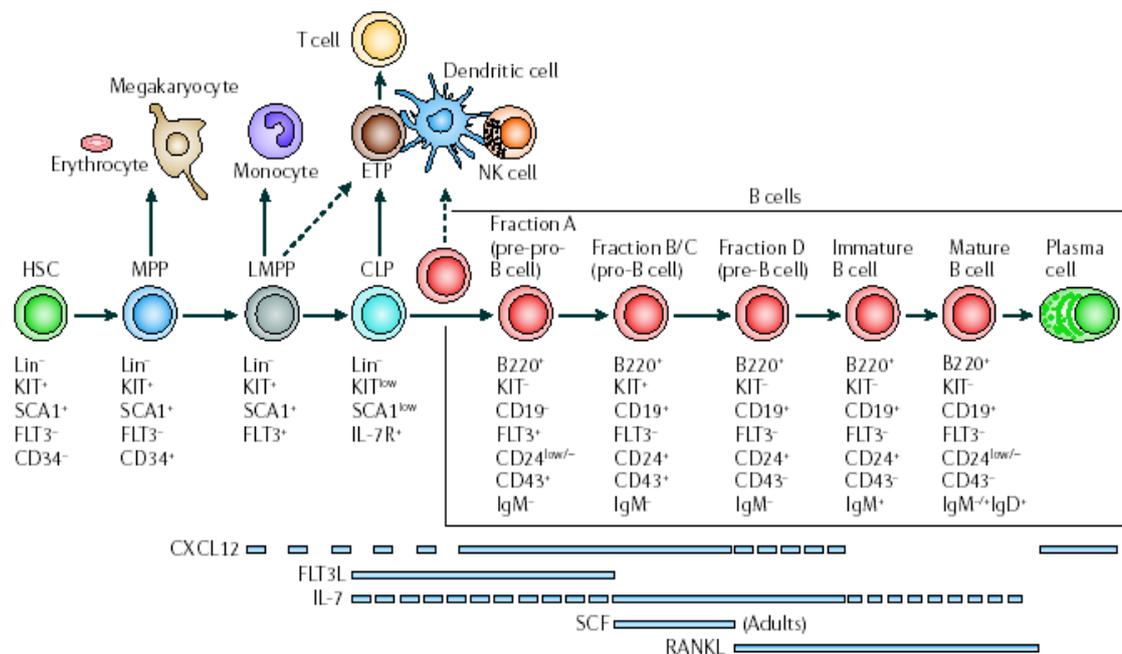
No que se refere a linfócitos B, vários estudos procuram identificar o passo decisivo no processo de diferenciação. O fator de transcrição Pax-5 parece ser o principal candidato ao comprometimento irreversível. O desenvolvimento das células B em camundongos que não expressam esse fator ( $Pax5^{-/-}$ ) é bloqueado na etapa pró-B e estas células expressam genes mielo-específicos, sugerindo que o Pax-5 está também envolvido na inativação de fatores transcricionais relacionados com outras linhagens.

Visto que o desenvolvimento da linhagem B é determinado por uma combinação e concentração de moléculas que estão no microambiente medular, outra molécula importante é a citocina IL-7 que é produzida por células estromais na medula óssea, timo, baço e rim e atua estimulando a proliferação dos linfócitos B. Cabe ressaltar que esta molécula não participa do comprometimento destas células, tendo em vista que animais IL7<sup>-/-</sup> apenas apresentam uma redução do número de células B (Kincade, 1994).

Os linfócitos B são originados e amadurecem na medula óssea. Quando a célula B está num estágio chamado de célula B imatura, migra através da circulação sanguínea para os órgãos periféricos onde completa o amadurecimento e poderão ser estimulados a proliferar e se diferenciar em plasmócitos (Abbas e Lichtman, Cap.7, 2005) .

O precursor linfóide comum, que não apresenta nenhum marcador de comprometimento com alguma linhagem linfóide específica dá origem ao precursor da linhagem T (ETP), que sai da medula óssea e vai para o timo onde segue a sua cascata de diferenciação até se tornar um linfócito T maduro, e às células pré-pró B (Figura 5). As células pré-pró-B são células ainda auto-renováveis, mas com capacidade de diferenciação reduzida, apresentando, alto grau de comprometimento com a linhagem B cujo início é a expressão do marcador B220. A próxima célula, pró-B, possui capacidade de auto-renovação limitada e já realiza rearranjos dos segmentos gênicos, responsáveis pela formação de parte da cadeia pesada  $\mu$ , mas ainda são IgM e IgD negativas. Nas células pré-B a cadeia pesada da imunoglobulina é formada apesar de permanecerem IgM<sup>-</sup> e IgD<sup>-</sup> na superfície. Quando as células expressam o receptor de células B (BCR) completo e a IgM é

funcional, mas ainda são IgD- são chamadas imaturas. As células B imaturas são submetidas à tolerância do próprio organismo e à capacidade de sobreviver na periferia; são elas que saem da medula e migram para os órgãos linfóides secundários, onde podem ser estimuladas por antígenos, proliferando e diferenciando-se em células secretoras, os plasmócitos. Caso não ocorra a estimulação, os linfócitos recirculam pelo organismo durante um determinado período de tempo (revisado por Nagasawa, 2006; Abbas e Lichtman, cap.7, 2005).



**Figura 5:** Representação esquemática da diferenciação de linfócitos B e fatores necessários na medula óssea. Os precursores de linfócitos B podem ser divididos em 4 grupos de acordo com a expressão de uma série de marcadores de superfícies que aparecem durante o desenvolvimento. Estes quatro grupos são chamados de: Fração A (ou células pré-pró B), B (ou pró-B), C (pró-B) e D (células pré-B). As células B imaturas, que são geradas pela fração D, saem da medula óssea e alcançam o baço, onde amadurecem em células B maduras periféricas e plasmócitos. O CXCL12 (também conhecida como SDF1 e PBSF) é essencial para a geração de células pré-pró-B e pró-B e para o encaminhamento dos plasmócitos para a medula óssea. FLT3L (ou ligante de FLK2) é essencial para a geração de PLCs e células pré-pró-B. O SCF tem um papel importante a partir do estágio de célula pro-B. RANKL (membro da família TNF) está envolvido na geração de células pré-B e células B imaturas. Abreviações: HSC (Célula tronco hematopoética); MPP (progenitor multipotente); LMPP (progenitor linfóide multipotente); CLP (progenitor linfóide comum); ETP (progenitor de linhagem T). Fonte: Nagasawa, 2006.

## 2) Galectinas

As lectinas são proteínas caracterizadas por se ligarem a carboidratos. Nas últimas décadas tem sido relatada sua participação em diversos processos biológicos, como a migração celular, sinalização intracelular e inflamação. O papel das lectinas nos processos inflamatórios ganhou maior destaque com a identificação das selectinas e seus ligantes oligossacarídeos no tráfego de leucócitos (revisado por Rabinovich e cols., 2002).

Dentre as lectinas, as galectinas são membros de um grupo bastante estudado. As galectinas são proteínas conservadas evolutivamente na natureza; seus membros são encontrados em esponjas, fungos, nematodos, insetos e vertebrados, inclusive em mamíferos nos quais foram identificadas 15 galectinas em diversos tecidos de variadas espécies. As galectinas são caracterizadas por se ligarem a determinadas regiões de oligossacarídeos, presentes em glicoproteínas ou glicolípidos. Apresentam duas propriedades fundamentais: possuem seqüências conservadas de aminoácidos nos sítios de ligação aos carboidratos (CRD- carbohydrate-recognition domain) (Liu e cols., 2002) e apresentam intensa afinidade por  $\beta$ -galactosídeos, principalmente resíduos de N-acetilactosaminas (Barondes e cols., 1994). As galectinas podem ser encontradas na superfície celular, ligando-se aos  $\beta$ -galactosídeos de membrana, e na matriz extracelular, assim como no citoplasma e no núcleo das células (Rabinovich e cols., 2002).

As galectinas têm atraído a atenção de biólogos celulares e imunologistas, devido à sua participação na homeostase das células imunes e nos processos inflamatórios. Dentre esses processos, duas galectinas têm

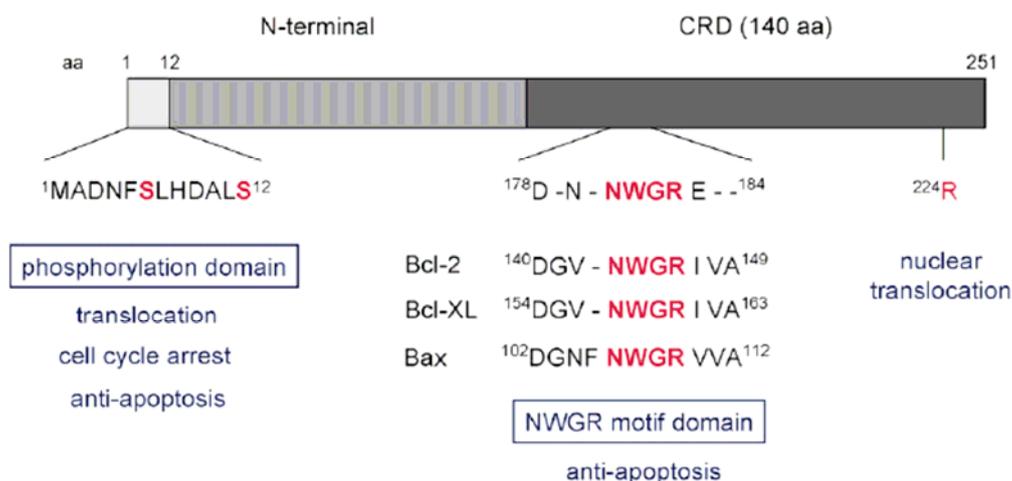
sido identificadas como as mais importantes: galectina-1 e galectina-3. Esta última tem sido relacionada a vários processos, fisiológicos e patológicos, como ativação, proliferação, diferenciação, migração e morte celular, além de patologias relacionadas à progressão de tumores (Rabinovich e cols., 2002).

### **2.1) Galectina-3**

A galectina-3 (gal-3) foi descrita em 1982 por Ho e Springer, como uma proteína de 32 kDa denominada Mac-2, presente em concentrações mais elevadas na superfície de macrófagos peritoneais estimulados com tioglicolato (Sato e Hugues, 1994). Durante a maturação de precursores mielóides, observa-se um aumento na concentração de Mac-2 intracitoplasmática e de superfície (Nibbering e cols., 1987).

A estrutura da galectina-3 (Figura 6) consiste de três domínios: (a) um domínio NH<sub>2</sub>-terminal de 12 aminoácidos que contém um sítio de fosforilação serina, o qual é importante na regulação da sua sinalização intracelular; (b) uma seqüência repetida semelhante a colágeno rica em glicina, prolina e tirosina; e (c) um domínio COOH-terminal de reconhecimento de carboidrato (CRD), consistindo de 140 resíduos aminoácidos que contém um único CRD. O domínio C-terminal inclui o sítio NWGR (Asp-Trp-Gly-Arg) que é altamente conservado no domínio BH1 da família de proteínas Bcl-2, incluindo Bcl-2, Bcl-XL e Bax. Este sítio é importante para a função anti-apoptótica da proteína Bcl-2, e também é essencial na ligação de carboidratos pelas galectinas. Vale ressaltar que apenas a galectina-3 possui o sítio NWGR completo dentre os membros da família de galectinas, embora outras

galectinas conservem este domínio (revisado por Fukumori e cols., 2007 e Dumic e cols., 2006).



**Figura 6:** Estrutura e domínio funcional da galectina-3: demonstrando o domínio N-terminal com o domínio de fosforilação na serina; a sequência seguinte semelhante a colágeno; e o CRD (domínio de ligação de carboidrato) com o sítio NWGR. Fonte: Fukumori e cols., 2007.

A gal-3 pode ser encontrada no citoplasma, no núcleo, na superfície celular e no meio extracelular, o que sugere uma multifuncionalidade desta molécula (Krzyszak e Lipinska, 2004). As principais células produtoras de gal-3 são monócitos e macrófagos (Liu e cols., 1995), células endoteliais (Lotan e cols., 1994), células epiteliais renais (Bao e Hugues, 1995), intestinais (Lotz e cols., 1993), mamárias (Castronovo e cols., 1996) e tímicas (Villa-Verde e cols., 2002).

No citoplasma, regula o ciclo celular durante as fases G1 e G2/M, controlando o crescimento de populações celulares através de seu efeito anti-apoptótico em determinadas células, e ainda participa do processamento pós-transcricional de *RNAm* (revisado por Dumic e cols., 2006). No núcleo,

pode estar relacionada à regulação da transcrição de alguns genes, como o da citocina IL-5, que regula negativamente (Moutsatsos e cols., 1987 e Liu e cols., 2002). No meio extracelular, participa de interações célula-célula e célula-matriz extracelular (figura 7) (Perillo e cols., 1998).

Resultados sugerem o papel da galectina-3 no controle da proliferação em diferentes tipos celulares; regula o crescimento celular estimulando a proliferação e inibindo a apoptose (Liu e cols., 2002). Fibroblastos murinos aumentaram sua taxa de proliferação quando estimulados com gal-3 recombinante (Mountsatsos e cols., 1987). Células T *Jurkat* transfectadas com cDNA de gal-3, apresentaram maior taxa de proliferação em relação às células controles. Linfócitos T estimulados com anti-CD3 reduziram sua taxa de proliferação, quando bloqueados com nucleotídeos *antisense* para gal-3 (Huflejt e cols., 1993). A gal-3 estimula síntese de DNA e previne de apoptose outros tipos celulares, como fibroblastos humanos, granulócitos murinos, linfomas de células B e condrócitos (Rabinovich e cols., 2002 e Hoyer, e cols., 2004, Boileau e cols., 2008). Além disso, a atividade antiapoptótica da gal-3 foi demonstrada também em animais *knockout* para esta proteína. Macrófagos peritoneais obtidos desses animais mostraram-se mais sensíveis a estímulos apoptóticos, como LPS (lipopolissacarídeos), do que os obtidos de animais controles (Hsu e cols., 2000).

Estudos têm demonstrado que a gal-3 modula a adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, através da ligação com os seus ligantes de superfície celular e de matriz extracelular, como a fibronectina e laminina. Promove a adesão de neutrófilos, mas não de células de melanoma à laminina. Também promove adesão entre células dendríticas, que estão

entrando nos linfonodos, e linfócitos via L-selectina (Rabinovich e cols., 2002). A galectina-3, expressa em eosinófilos (provenientes de pacientes alérgicos) e células endoteliais, contribui significativamente para o rolamento e adesão dos eosinófilos sob condições de fluxo *in vitro* e pode, independentemente ou em cooperação com as selectinas e integrinas, participar ou aumentar a cascata de adesão para promover o recrutamento eosinofílico para os sítios de inflamação (Rao e cols., 2007).

Os efeitos de adesão celular podem ser relacionados com a migração celular, especialmente na progressão tumoral (Figura 7) e metástase (Danguy *et al*, 2002). Neste contexto, pode-se dizer que a gal-3 apresenta também uma atividade anti-adesiva sob diferentes condições fisiopatológicas, principalmente em certos processos metastáticos.

A gal-3 tem atuado como um mediador pró-inflamatório à medida que participa da ativação de mastócitos e basófilos (Zuberi e cols., 1994), estimula a produção de superóxidos em neutrófilos periféricos (Yamaoka e cols., 1995), NADPH-oxidase em neutrófilos obtidos de exsudatos provenientes de lesões cutâneas (Karlsson e cols., 1998), síntese de IL-1 em monócitos induzidos por LPS (Figura 7) (Jeng e cols., 1994) e inibição da expressão do gene da IL-5 por eosinófilos (Figura 7) (Cortegano e cols., 1998).

Animais gal-3-deficientes (*gal-3<sup>-/-</sup>*) apresentam menores sintomas de inflamação, como redução do número de granulócitos peritoneais durante uma peritonite aguda, causada por injeção de tioglicolato (Colnot e cols., 1998 e Hsu e cols., 2000). Quanto à migração de células inflamatórias, foi demonstrado que a gal-3 amplifica sinais quimiotáticos específicos para

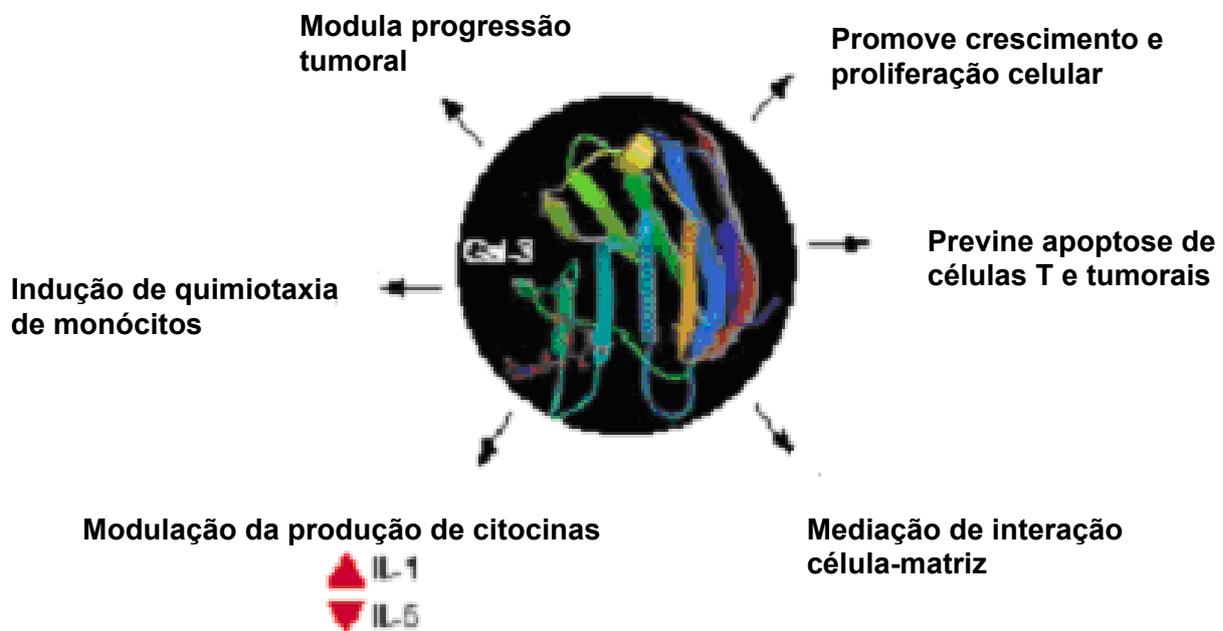
monócitos e macrófagos (Sano e cols., 2000). Em neutrófilos, promove adesão à laminina, além de ser importante durante a diapedese (Sato e cols., 2002). Em linfócitos, a gal-3 regula contatos entre células dendríticas e linfócitos T, sugerindo que esta proteína tem um importante papel sobre a atividade desta lectina na resposta imune celular. Além disso, dois estudos mostraram que há um predomínio da resposta TH1 nos animais *gal-3<sup>-/-</sup>* durante a infecção por *Schistosoma mansoni* e por *Toxoplasma gondii*, assim como no modelo de asma (Breuilh e cols, 2007; Bernardes e cols., 2006).

Demonstrou-se também que a gal-3 participa na formação de fibrose após injúrias hepáticas. No modelo de fibrose hepática como consequência do tratamento com CCl<sub>4</sub>, mostrou-se que há uma redução no depósito de colágeno nos camundongos *gal-3<sup>-/-</sup>*. A diferença na fibrose hepática observada entre estes camundongos e os controles não é devido ao recrutamento de células inflamatórias ou liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos, mas devido à ativação defeituosa de células estreladas hepáticas em miofibroblastos. Essa ativação é um evento crucial na deposição da matriz extracelular e na cirrose. Após injúrias hepáticas, as células estreladas hepáticas, que se encontram quiescentes, se ativam em miofibroblastos proliferativos, fibrogênicos e contráteis, aumentando a expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), um marcador de ativação de miofibroblastos *in vitro* e *in vivo*. Em animais *gal-3<sup>-/-</sup>* demonstrou-se que após a administração de CCl<sub>4</sub> a expressão de  $\alpha$ -SMA diminuía comparada à expressão nos animais controles, ou seja, na ausência de galectina-3 há uma ativação defeituosa dos miofibroblastos. Estes resultados sugerem que a

ativação das células estreladas hepáticas *in vivo* mediada pela galectina-3 é um mecanismo central durante a formação da fibrose hepática (Henderson e cols., 2006).

No modelo utilizando a infecção esquistossomótica, os granulomas hepáticos na fase crônica mostram-se menores nos animais *gal-3<sup>-/-</sup>*. Além disso, observou-se redução na deposição de colágeno e um arranjo mais esparsas das suas fibras nos granulomas desses animais quando comparados aos controles (Oliveira e cols., 2007). Estes resultados foram confirmados pelo trabalho de Breuilh e colaboradores (2007).

Esses três trabalhos (Henderson e cols., 2006; Oliveira e cols., 2007 e Breuilh e cols., 2007) demonstram que na ausência de gal-3, a fibrose se apresenta menos severa do que na sua presença.



**Figura 7:** Esquema representativo da molécula de galectina-3 e algumas de suas funções. Fonte: Adaptação de Rabinovich e cols., 2002

### 2.1.1) Participação da galectina-3 nas células hematopoéticas

A expressão de gal-3 ao longo das etapas de diferenciação de monócitos, macrófagos e neutrófilos na medula óssea está aumentada (Truong e cols., 1993). Em macrófagos a gal-3 é utilizada como um marcador de diferenciação (Le Marer, 2000). Sua concentração aumenta à medida que os monócitos se diferenciam em macrófagos (Liu e cols., 1995). Animais *gal-3<sup>-/-</sup>* durante a infecção por *S. mansoni* apresentam maior número de monócitos na circulação e nos granulomas hepáticos, formados pela presença de ovos do verme no fígado. Esse aumento, no entanto, não é acompanhado por um aumento proporcional na população macrofágica. Além disso, a fração de células mononucleares obtidas dos granulomas dos animais *gal-3<sup>-/-</sup>* infectados permanece, em sua maioria, como células redondas em cultura sem se espalhar pelo plástico, característica esta de diferenciação em macrófagos. Ou seja, parece haver um atraso na diferenciação de monócitos em macrófagos na ausência de gal-3. Dessa maneira, sugeriu-se que a gal-3 tem um importante papel na diferenciação e ativação da linhagem monocítica-macrofágica (Oliveira e cols., 2007).

A gal-3 participa da ativação de neutrófilos mediante interações de alta afinidade com IgE (Yamaoka e cols., 1995). Um estudo mostrou que neutrófilos mobilizados para sítios pulmonares infectados com *Streptococcus pneumoniae*, apresentam intensa dependência de gal-3 para aderirem ao endotélio vascular. O mesmo estudo revelou que a gal-3 é importante para a diapedese (Sato e cols., 2002). Animais *gal-3<sup>-/-</sup>* apresentam distúrbios durante respostas agudas, como redução numérica de neutrófilos nos sítios

lesionados. Logo, pode-se sugerir que a gal-3 é um fator de ativação de neutrófilos, regulada por quimiocinas e outros moduladores inflamatórios.

Os eosinófilos são células que atuam especialmente em processos alérgicos, sintetizando mediadores inflamatórios, dentre eles a IL-5, citocina que prolonga o tempo de vida e induz a diferenciação destas células. Em pacientes eosinofílicos, a gal-3 passa a ser detectada na superfície dos eosinófilos (Truong e cols., 1993). Além disso, a gal-3 inibe a transcrição e produção de IL-5 em eosinófilos humanos (Cortegano e cols., 1998). Os eosinófilos são células importantes durante a infecção por *S. mansoni*, pois estão envolvidos na morte do ovo desse verme e na redução do tamanho do granuloma. Animais *gal-3<sup>-/-</sup>*, infectados por *S. mansoni*, apresentam aumento de eosinófilos na medula óssea, no sangue periférico e no granuloma hepático em relação aos controles (Oliveira e cols., 2007).

A gal-3 não parece ser um fator chave na diferenciação de células dendríticas, visto que estas células quando imaturas exibem as mesmas características em animais *gal-3<sup>-/-</sup>* e controles. Além do mais, a ausência desta lectina não modificou a maturação induzida por receptores tipo-Toll dessas células. Por outro lado, no mesmo trabalho, mostrou-se que a expressão de gal-3 é essencial para controlar a magnitude de ativação da célula T, já que as células dendríticas *gal-3<sup>-/-</sup>* aumentaram a proliferação e a liberação de citocinas pelos linfócitos T (Breuilh e cols., 2007).

A expressão intracelular de gal-3, induzida por ligação de TCR e aumentada por citocinas como IL-2, IL-4 e IL-7, é capaz de proteger as células T de apoptose. A intensidade da expressão e secreção desta lectina correlaciona-se com o estado de proliferação das células T ativadas. Não

havia relatos que demonstrassem a presença de gal-3 na superfície de linfócitos T, tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> (Joo e cols., 2001). Em 2007, Silva-Monteiro e cols. mostraram que células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> expressavam gal-3 e que sua expressão era aumentada após a infecção por *T. cruzi*. Observaram também que a galectina-3 induzia a resposta de migração dos timócitos à laminina e que essa resposta era aumentada nos timócitos de animais infectados por *T. cruzi*. Além disso, observaram que esta molécula está envolvida na saída prematura de células T imaturas duplo-positivas CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> para os órgãos linfóides periféricos. E mais, a exposição prolongada de timócitos à gal-3 resulta em maior morte celular (Silva-Monteiro e cols., 2007).

Quanto a linfócitos B, ainda não há muitas informações sobre o papel da gal-3 na fisiologia destas células, tanto em relação à sobrevivência quanto à diferenciação. Um estudo muito importante e pioneiro foi feito por Acosta-Rodríguez e colaboradores, em 2004, no qual o grupo mostrou a expressão de gal-3 em células B maduras que receberam algum estímulo de diferenciação e/ou ativação. Nesse sentido, o grupo observou expressão de gal-3 em células B retiradas de animais infectados pelo *T. cruzi*. e em células B normais que receberam estímulos mitogênicos, como o LPS, e de diferenciação/ativação, como o anti-CD40 e IL-4. Além disso, mostraram que esta lectina tem um importante papel na sobrevivência e diferenciação induzida por IL-4 em células B de camundongos infectados com o protozoário *T. cruzi*. A inibição de gal-3 durante a fase aguda da infecção, através de estratégia anti-senso, promoveu aceleração do desenvolvimento de plasmócitos que resultaram em maior quantidade de imunoglobulinas e

eliminação mais efetiva do parasita. Esses resultados mostram que a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos está sendo influenciada pela galectina-3 (Acosta-Rodriguez e cols., 2004).

Resultados anteriores do nosso grupo mostraram, dentre outros já discutidos anteriormente, que animais *gal-3<sup>-/-</sup>* infectados por *S. mansoni* apresentam um aumento de linfócitos na medula óssea e no sangue periférico na fase crônica da infecção quando comparados aos animais controles. Esse aumento na medula óssea está relacionado apenas ao aumento na população madura de linfócitos B, caracterizados como B220<sup>high</sup>. Em paralelo, observou-se aumento de plasmócitos na medula óssea de animais *gal-3<sup>-/-</sup>* infectados e, também dos não-infectados. Em contrapartida, na periferia (baço e linfonodos mesentéricos), observou-se diminuição de células B (B220<sup>+</sup>) e aumento de plasmócitos. Além disso, o aumento de plasmócitos na periferia é acompanhado por maior nível de IgG e IgE séricas, tanto durante a infecção como em animais não infectados. Estes dados demonstraram uma possível aceleração na diferenciação de linfócitos B em plasmócitos na ausência de galectina-3, corroborando com os resultados obtidos por Acosta-Rodriguez e colaboradores (2004) (Oliveira e cols. 2007).

Ainda que se conheça bastante a biologia dos linfócitos B e que se tenha muitas informações sobre os fatores de transcrição envolvidos na diferenciação destas células, pouco se sabe acerca dos sinais intermediários envolvidos nas vias intracelulares que controlam esses eventos. Nesse sentido, visto as diversas funções reguladoras da galectina-3 no sistema imunológico e nas células de tumor originados de células B, faz-se necessário estudo aprofundado desta lectina no desenvolvimento dos

linfócitos B. É por isso que nos propusemos a estudar o papel da gal-3 na linfopoese B, utilizando como principal ferramenta animais *gal-3<sup>-/-</sup>*.

Por fim, vale ressaltar que nossa estratégia de estudo, os animais *gal-3<sup>-/-</sup>*, são viáveis, podendo sobreviver sob condições convencionais. Sua disponibilidade nos permite estudar o papel da galectina-3 usando diferentes estímulos, como um modelo de infecção longa, como é o caso da infecção por *S. mansoni* estudada anteriormente pelo nosso grupo. Esta técnica de inibição da galectina-3 ganha vantagem sobre outras, como, por exemplo, a estratégia de bloqueio por oligonucleotídeos anti-senso, pois inibe completamente a expressão de galectina-3, pois os tecidos em geral se formam na ausência desta proteína.

## II) Objetivos

- **Objetivo Geral**

Este trabalho teve como objetivo estudar a linfopoese B na ausência de galectina-3, usando como ferramenta principal animais *knockout* para a proteína (*gal-3<sup>-/-</sup>*).

- **Específicos**

1. Avaliar as subpopulações de linfócitos B na medula óssea dos animais *gal-3<sup>-/-</sup>*, utilizando marcadores fenotípicos específicos e analisando através de citometria de fluxo.
2. Quantificar os precursores linfóides *in vitro*, usando como ferramenta a técnica de cultivo celular em metilcelulose, a partir de células obtidas da medula óssea dos animais *gal-3<sup>-/-</sup>* e controles.
3. Estudar a linfopoese B *in vitro* em um sistema de co-cultivo com células mononucleares de medula óssea *gal-3<sup>-/-</sup>* sobre a linhagem estromal OP9, comparando com as células mononucleares controles também cultivadas neste mesmo estroma.

### III) Metodologia

#### 1) Animais

Foram utilizados camundongos das linhagens C57/Bl6, como controles e galectina-3-deficientes (*gal-3<sup>-/-</sup>*) com o mesmo *background* da linhagem controle (C57/Bl6). Estes animais foram mantidos no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia, localizado no Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os animais *gal-3<sup>-/-</sup>* foram cedidos pelo professor Roger Chammas, do Departamento de Radiologia, disciplina Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) e pela Dra. Déa Villa-Verde, do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Esta linhagem geneticamente alterada foi gerada pelo grupo do professor Fu-Tong Liu, do Instituto de Alergia e Imunologia, da Universidade de San Diego na Califórnia, EUA (Hsu e cols., 2000).

A utilização dos animais foi regulamentada pelo protocolo **DAHEICB009**, da Comissão de Ética do CCS, UFRJ.

#### 2) Obtenção das células da medula óssea

Para obtenção das células de medula óssea, foram retirados os fêmures de animais selvagens e *gal-3<sup>-/-</sup>*. Após a remoção do tecido muscular adjacente ao osso, as epífises foram cortadas e então, realizou-se o “flushing” da medula óssea, pelo qual o conteúdo medular é extravasado com o auxílio de uma seringa de 5mL e agulha de 0,70 x 25 mm contendo meio:

RPMI-1640 (Sigma Bioscience) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Cutilab), 2 mM de l-glutamina,  $5 \times 10^{-5}$   $\mu$ M de 2-mercaptoetanol, 50 UI/mL de Penicilina e 50 mg/mL de estreptomicina.

O aspirado medular foi dissociado com o auxílio de pipeta Pasteur, até se tornar uma suspensão celular homogênea. Em seguida, as células foram utilizadas para as outras técnicas (citometria de fluxo, culturas e co-culturas).

### **3) Citometria de fluxo**

#### **3.1) Preparo da suspensão celular**

Após a obtenção da suspensão celular, as células foram transferidas para uma placa de 96 poços, num volume máximo de 200  $\mu$ L por poço. Após centrifugação de 5 minutos, a 259 g, o sobrenadante foi desprezado. Os receptores de imunoglobulinas (Igs) presentes na membrana celular foram saturados com bloqueador da fração Fc destas Igs, produzidos pela linhagem 24G2 (obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ). Passado o tempo de incubação, as placas foram centrifugadas a 259 g por 5 minutos. Os anticorpos foram adicionados, sendo previamente diluídos em PBS, e incubados por 30 minutos. Em seguida, a placa foi novamente centrifugada, o sobrenadante desprezado e o “pellet” ressuspensão em PBS. As suspensões foram recolhidas em PBS, em tubos específicos de citometria para aquisição no citômetro.

Neste trabalho utilizamos os anticorpos anti-galectina-3 (sobrenadante da linhagem M3/38), anti-B220 FITC, anti-CD19 PE, anti-IgM PE, anti-ckit APC (Pharmingen, San Diego, CA, EUA).

### **3.2) Ajuste do citômetro, aquisição e análise de dados**

As amostras foram preparadas de modo que o citômetro pudesse ser padronizado: para isso, foi necessária uma amostra sem anticorpos (controle negativo), e outras contendo células marcadas com um dos anticorpos citados (um para FITC, outro para PE e outro para APC). Estas amostras são relativas aos controles, permitindo que se faça a retirada de interferência entre as cores e também da auto-fluorescência das células. Fez-se primeiramente o ajuste do tamanho e densidade das células (*Forward scatter* - FSC x *Side scatter* - SSC) e depois, analisando as amostras marcadas com apenas um dos anticorpos, ajustou-se a interferência de uma cor na outra. Os parâmetros de voltagem e amperagem também foram estabelecidos e definidos para cada um dos experimentos. Após os ajustes feitos e com o citômetro calibrado, o aparelho ainda foi ajustado de maneira que se detectasse apenas as células desejadas – linfócitos – através da definição de uma região (*gate*) plotada no gráfico FSC x SSC.

A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo (FACScalibur, BD Biosciences, San Jose, Califórnia, EUA) do Banco de Células do Rio de Janeiro, utilizando o programa CELL QUEST e as análises foram feitas utilizando o software WinMDI 2.9 (<http://en.bio-soft.net/other/WinMDI.html>).

### **4) Ensaio de formação de colônias pré-B em metilcelulose**

A obtenção das células segue o protocolo descrito no item 2, com exceção do meio que é utilizado: DMEM (Sigma-Aldrich) sem soro. Após a contagem, ajustou-se o volume de maneira que se tivesse  $5 \times 10^4$  células

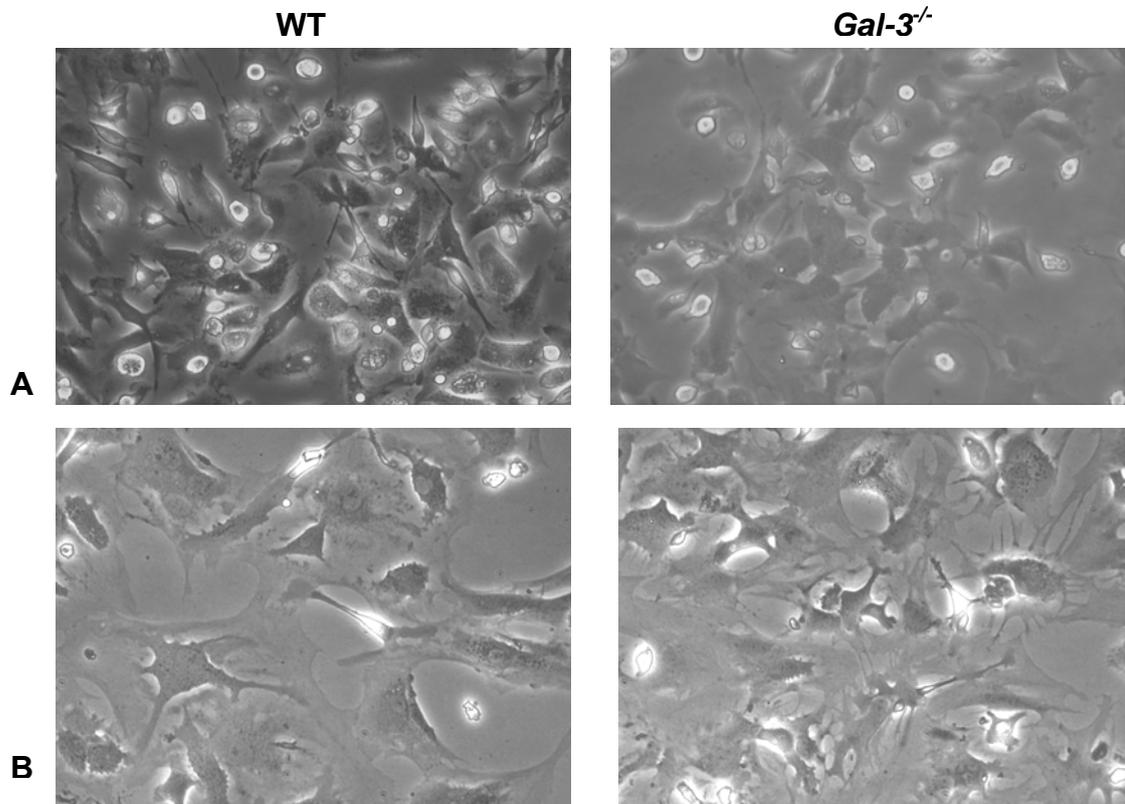
para cada 1,1 mL de meio de metilcelulose cujo único estímulo adicionado é a citocina IL-7 (Methocult M3630, StemCell Technologies). As células foram adicionadas ao tubo que continha o meio; esta suspensão foi bem homogeneizada. Aguardou-se de 2 a 3 minutos para que as bolhas formadas pela homogeneização subissem ao topo do tubo. Em cada placa de cultura de 35 mm (Corning), colocou-se 1,1 mL da suspensão utilizando-se uma seringa. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

As colônias foram quantificadas e analisadas no sétimo dia de cultivo. A quantificação foi realizada no microscópio óptico invertido Leica, considerando como colônias, os aglomerados celulares com mais de 50 células, e clusters, aqueles formados por até 50 células. As fotos foram obtidas através da câmera Leica acoplada ao microscópio.

### **5) Culturas para obtenção de células estromais da medula óssea**

As células de medula óssea foram obtidas como descrito no item 2. A partir de então, as células foram contadas em câmara de Neubauer, previamente diluídas em azul de Tripán numa diluição de 1:20. Por fim,  $1 \times 10^7$  células/ml foram plaqueadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> (TPP), com meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Cutilab, Campinas/SP), 2 mM de l-glutamina,  $5 \times 10^{-5}$  μM de 2-mercaptoetanol, 50 UI/mL de Penicilina e 50 mg/mL de estreptomicina. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi trocado duas vezes por semana até a obtenção do estroma, com 7 (figura 8A) e 14 dias (figura 8B). Nestes pontos adicionou-se Trizol (Invitrogen Life

Technologies, Calsbad, CA, USA) às garrafas e o conteúdo foi transferido para um microtubo e levado para o procedimento de RT-PCR.



**Figura 9:** Foto das células estromais após 7 (figura 9 A) e 14 (figura 9B) dias de cultivo.

## 6) RT-PCR em tempo real

Os resultados obtidos pela técnica de RT-PCR em tempo real foram realizados no laboratório de Glicobiologia e Imunoquímica, no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, na Faculdade de Medicina da USP, Ribeirão Preto.

### 6.1) Extração de RNA e transcrição reversa

A extração de RNA total das amostras foi feita com *Trizol Reagent* (Invitrogen Life Technologies, Calsbad, CA, USA), segundo o protocolo do fabricante. Para a síntese de cDNA, primeiramente, 2 µg de RNA e 20 pmol

de Oligo dT (Invitrogen Life Technologies, Calsbad, CA, USA) foram incubados a 70°C por 5 minutos e, em seguida, mantidos em gelo por mais 5 minutos. Após esse tempo, foram adicionados às amostras uma mistura contendo 0,5 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (100mM dNTP Set, PCR Grade, Invitrogen), 20 unidades de inibidor de RNase (RNaseOut Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen life Technologies), 1 µL de transcriptase reversa (ImProm-II Reverse Transcriptase, Promega Corporation, Madison, WI, EUA), 3 mM de MgCl<sub>2</sub> e 4 µL de tampão da reação. A reação de transcrição reversa foi feita segundo instruções do fabricante, num volume final de 20 µL. A mistura foi incubada por 5 minutos a 25°C, seguida de 60 minutos a 42°C e 15 minutos a 70°C. As amostras foram então tratadas com 10 µg de RNase (Gibco, Grand Island, NY, EUA), por 30 minutos a 37°C.

## **6.2) PCR em tempo real**

As reações de PCR em Tempo Real foram preparadas em volume final de 25 µL, contendo 20 ng de DNA ou 2 µL de cDNA, 5 pmol de cada *primer* e 12,5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), contendo 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dATP, dCTP e dGTP, 400 µM de dUTP, 1,25 unidades de AmpliTaq GoldR DNA polimerase e 0,5 unidades de AmpEraseR uracil-N-glicosilase (UNG). Foi utilizado o Sistema de PCR em tempo real da Applied Biosystems 7500 para detectar e quantificar a amplificação do DNA com SYBR Green (2x). Os parâmetros de ciclagem termal foram feitos de acordo com as instruções do fabricante. A mistura foi incubada a 50°C por 2 minutos, seguida de 10 minutos a 95°C, para ativar a enzima AmpliTaq Gold. Seguiram-se 40 ciclos de incubação a

95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto. Como controle endógeno da reação utilizou-se a  $\beta$ -actina. A expressão relativa foi calculada pelo método de comparação dos valores de CT (limiar de detecção), através da fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### 6.3) Primers utilizados na PCR em Tempo Real

As seqüências de RNA mensageiro para as citocinas foram retiradas do banco de dados do website NCBI. Todos os primers foram desenhados com o programa Primer Express (v2.0, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os pares de primers (Erviergas, São Paulo, SP, Brasil) constituíam-se de 19-22 pares de bases, possuíam temperatura de *melting* de 58°C e amplificavam fragmentos de cerca de 100 pares de bases. A Tabela 1 abaixo resume as seqüências dos primers específicos.

Gene Primer <sup>1</sup>	Seqüência
<b><math>\beta</math>-actina</b> S AS	5'- CCTAAGGCCAACCGTGAAAA -3' 5'- GAGGCATACAGGGACAGCACA -3'
<b>IL-7</b> S AS	5'- CTTGCTTTTTCCAGCCACGT -3' 5'- AGGCATGGCTACCACACATG -3'
<b>GM-CSF</b> S AS	5'- CCTGGGCATTGTGGTCTACAG -3' 5'- GGTTCAGGGCTTCTTTGATGG -3'

<sup>1</sup> S: *primer sense*; AS: *primer anti-sense*

**Tabela 1:** Seqüência de nucleotídeos dos primers utilizados para a realização de RT-PCR em tempo real.

## 7) Co-cultura

O princípio desta técnica é conjugar dois tipos celulares numa mesma cultura, a fim de observar interações que possam ocorrer entre eles. No caso deste trabalho, o objetivo foi cultivar células estromais derivadas da linhagem

estromal murina OP9 (Nakano e cols., 1994) com células hematopoéticas não-aderentes de animais controles e gal-3<sup>-/-</sup>.

### **7.1) Estabelecimento de estroma**

A linhagem OP9 foi cedida pelo dr. Hamilton da Silva Júnior (*Excellion Serviços Biomédicos*). Esta linhagem de células estromais é bastante utilizada nos estudos de linfopoese B, pois é originada da calvária de animais que não possuem o fator M-CSF funcional, devido a uma mutação no seu gene. O M-CSF é um fator importante para a diferenciação preferencial das células-tronco hematopoéticas na linhagem monocítica-macrofágica (Nakano e cols., 1994). Esta linhagem expressa Flt-3L, SCF e IL-7 (Cho e cols., 1999), além da proteína verde fluorescente (GFP).

As células foram descongeladas e expandidas em meio  $\alpha$ -MEM (*Minimum Essential Medium Eagle alpha modification*; Sigma-Aldrich) suplementado com 20% de SFB (Cutilab). Para cada 5 mL de meio, foram colocadas  $5 \times 10^4$  células, cultivadas em garrafa de 25 cm<sup>2</sup>. Após 7 dias de cultivo, as células chegavam a cerca de 75% de confluência, quando então eram adicionadas as células não-aderentes obtidas da medula óssea.

### **7.2) Obtenção de células mononucleares da medula óssea**

Após a obtenção das células da medula óssea, como explicado anteriormente (item 2), fez-se a separação de subpopulações celulares por gradiente de densidade, utilizando o Percoll (Sigma-Aldrich). O Percoll foi diluído em NaCl 1,5M, formando a solução SIP, que ainda foi diluído em solução salina (BSS), numa concentração de 60%. Num tubo de 15 mL, colocou-se 5 mL de SIP 60% e 5 mL de meio contendo as células. O material

foi centrifugado por 25 minutos a 405 g, à temperatura de 25°C. Após a centrifugação, retirou-se apenas o material que se encontrava na interface meio-percoll, onde se encontram as células mononucleares. Essa suspensão foi colocada em outro tubo contendo BSS e centrifugou-se 3 vezes a 1500 rpm e 25°C. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em meio suplementado. Ao final da terceira centrifugação as células foram colocadas para aderir numa placa de Petri por 60 minutos em 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C. A seguir, as células não-aderentes foram retiradas e novamente centrifugadas. Em cada garrafa de 25 cm<sup>2</sup> com o estroma estabelecido foram colocadas 1x 10<sup>6</sup> células mononucleares não-aderentes.

A co-cultura foi mantida em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cutilab), 2 mM de l-glutamina, 5 x 10<sup>-5</sup> μM de 2-mercaptoetanol, 50 UI/mL de Penicilina e 50 mg/mL de estreptomicina, em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

As avaliações foram feitas no sétimo dia de cultivo. Para analisar as células do sobrenadante (fração não-aderente), o meio foi retirado da garrafa e transferido para um tubo. A fim de analisar as células que possivelmente poderiam estar aderidas ao estroma, retirou-se a fração aderente da garrafa com tripsina. As células foram transferidas para um outro tubo e foram lavadas 2 vezes com meio suplementado com soro fetal bovino. Ambas as frações, não-aderente e aderente, foram analisadas por citometria de fluxo, técnica descrita anteriormente.

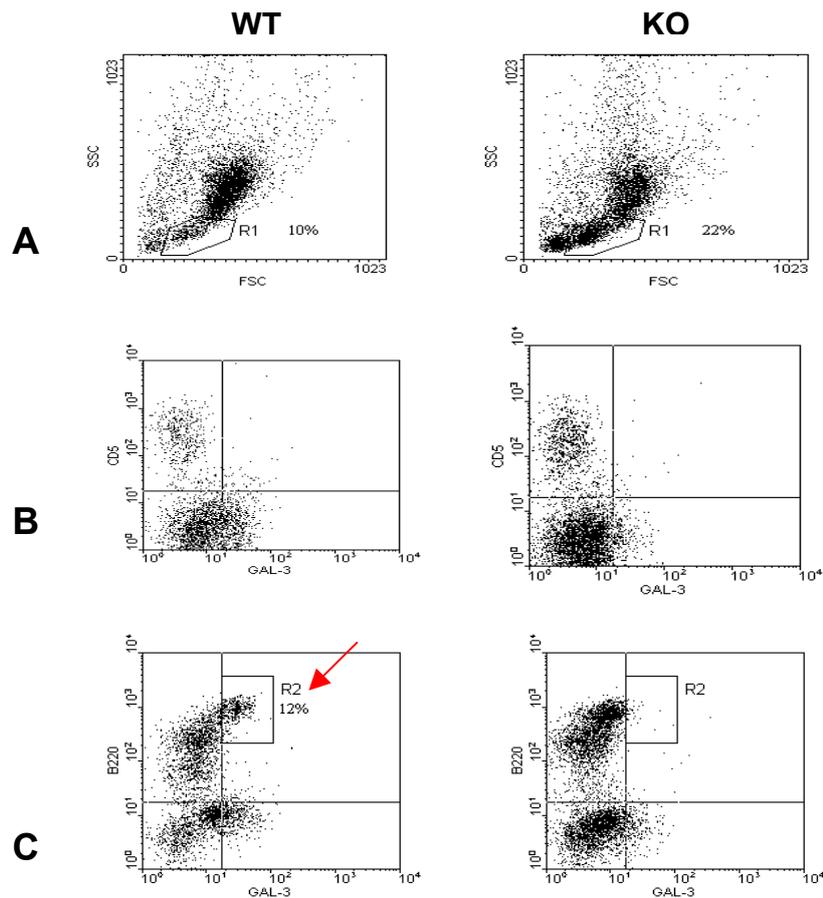
#### **IV) Resultados**

A primeira vez em que se demonstrou algum papel da galectina-3 na biologia de linfócitos B foi no trabalho de Acosta-Rodriguez e colaboradores (2004). Seus resultados mostraram que a galectina-3 é expressa em células B ativadas e expostas a diferentes estímulos, tais como LPS e IL-4. O grupo mostrou ainda que esta lectina apresentava um importante papel na diferenciação e sobrevivência de linfócitos B induzida por IL-4 em camundongos infectados por *T. cruzi*. A inibição da galectina-3, por estratégia anti-senso, favoreceu um aumento na diferenciação de plasmócitos, ao invés de geração de células de memória, e este aumento resultou em maiores níveis séricos de imunoglobulinas (IgM e IgG).

Utilizando outra estratégia para tirar a galectina-3 do sistema – animais *knockout* para esta proteína, submetidos à infecção pelo *S. mansoni*, nosso grupo demonstrou um aumento na população de linfócitos B220<sup>high</sup>, fração correspondente às células B maduras, na medula óssea destes animais (Oliveira e cols., 2007). Em paralelo, havia também um aumento de plasmócitos na medula óssea de animais *gal-3*<sup>-/-</sup>. Nos órgãos periféricos (baço e linfonodos mesentéricos), em contrapartida, observou-se diminuição de linfócitos B220<sup>+</sup>, e aumento de plasmócitos.

Dessa maneira, os dados obtidos utilizando estratégia antisenso (Acosta-Rodriguez e cols., 2004) foram confirmados com os resultados obtidos no modelo *in vivo* (Oliveira e cols., 2007), com animais *gal-3*<sup>-/-</sup>. Em ambos, ficou demonstrado que a galectina-3 é uma importante molécula para a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos.

Partindo destes resultados prévios, começamos a estudar as etapas iniciais da diferenciação de linfócitos B, cujo sítio é a medula óssea, também utilizando animais *gal-3<sup>-/-</sup>*. Primeiramente, analisamos se as células B apresentariam galectina-3 na sua superfície. Marcamos as células obtidas da medula óssea de animais controles e *gal-3<sup>-/-</sup>*, com anticorpo anti-B220 (uma das isoformas de CD45, conhecida como marcador de desenvolvimento de linfócitos B), anti-CD5 (molécula marcadora de linfócitos T) e anti-galectina-3. Na Figura 9A, observamos o gráfico da distribuição das células hematopoéticas, por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). A partir deste gráfico, selecionamos uma região (R1), onde as células são pequenas e possuem baixa granulosidade, correspondente à região onde se concentram linfócitos. Como podemos observar, neste caso, a R1 corresponde a 10% das células totais nos animais controles (WT) e 22% nos animais *gal-3<sup>-/-</sup>*. A partir da região R1 analisamos a marcação para os anticorpos desejados. Marcamos linfócitos T e B a fim de averiguar quais das populações poderiam apresentar galectina-3 na superfície. Na Figura 9B observamos que os linfócitos T não possuem marcação para galectina-3. Por outro lado, observando a Figura 9C, vemos que a galectina-3 se encontra na superfície de linfócitos B220<sup>high</sup>, fração esta correspondente aos linfócitos B maduros prontos para sair da medula óssea para os órgãos periféricos, onde completarão seu desenvolvimento. Estes mesmos resultados foram obtidos por Oliveira e cols. (2007), que observaram a presença de galectina-3 na superfície de linfócitos B maduros também no baço e em linfonodos mesentéricos.



**Figura 9:** Imunofenotipagem das células da medula óssea de animais selvagens (esquerda- WT) e *knockout* (direita- KO) por citometria de fluxo. (A) Identificação da população linfóide (R1) de acordo com tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). (B) Análise da marcação de CD5 e Gal-3 na superfície de linfócitos. (C) Análise da marcação de B220 e gal-3 na superfície da população linfóide (seta vermelha indica a população B220<sup>high</sup> positiva para gal-3). Resultado representativo de 3 experimentos diferentes com 3 camundongos controles e gal-3<sup>-/-</sup>.

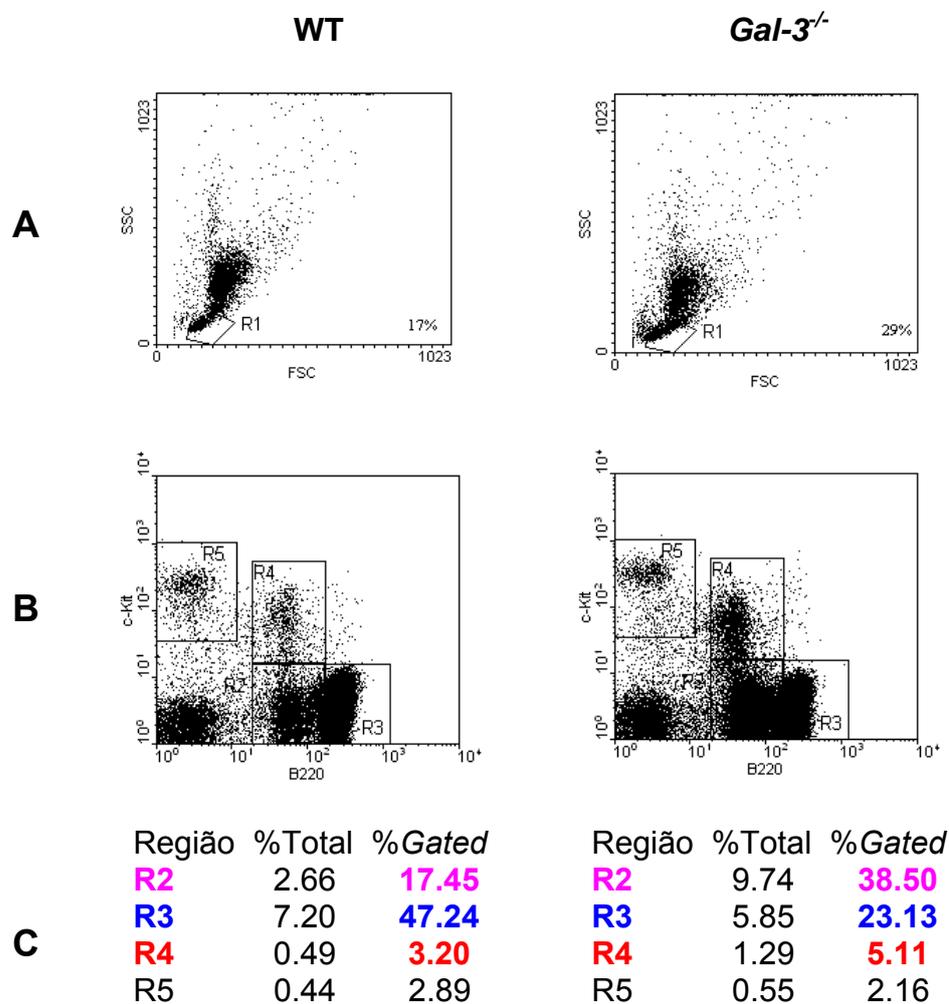
A partir de então, passamos a caracterizar cada subpopulação de linfócitos B com base em diferentes marcadores fenotípicos. Dentre muitos marcadores, como podemos observar na Figura 5 (introdução), escolhemos o B220, o primeiro marcador de desenvolvimento de células B, cuja intensidade de marcação aumenta na superfície celular durante as etapas de diferenciação na medula óssea; o CD19, uma glicoproteína da superfamília de Ig e também marcador de desenvolvimento de linfócitos B, que, segundo a

literatura aparece posteriormente ao B220; o c-Kit, uma tirosina-quinase que marca progenitores hematopoéticos e está presente até o progenitor linfóide se tornar uma célula pré-B; e a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-7, que está presente até a etapa pré-B, e cujo principal ligante é a citocina IL-7 que, como descrito anteriormente, é uma importante citocina de diferenciação e proliferação nas etapas iniciais da diferenciação de linfócitos B.

Para iniciar as análises de caracterização de subpopulações de linfócitos B, definimos a região de linfócitos (R1, Figura 10A) dentro da população de células de medula óssea no gráfico de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC). Corroborando com a Figura 9A, observa-se aumento na população onde se concentram os linfócitos (R1) nos animais *gal-3<sup>-/-</sup>*, de 17% das células totais obtidas de animais controles para 29% das células obtidas de animais *gal-3<sup>-/-</sup>*. Observamos as células marcadas com anti-B220 e anti-cKit (Figuras 10B) dentro dessa região. Na Figura 10B, verificamos que há um aumento na subpopulação B220<sup>low</sup>/cKit<sup>-</sup> (R2), de 17,45% dos linfócitos (R1) nos animais controles para 38,5% nos *gal-3<sup>-/-</sup>* (Figura 10C em rosa). Também é observado aumento na fração B220<sup>low</sup>/cKit<sup>+</sup> (R4 na Figura 10B), de 3,2% nos controles para 5,11% nos animais *gal-3<sup>-/-</sup>* (Figura 10C em vermelho) em relação à região R1. Ambas as populações estão aumentadas da mesma maneira quando analisamos a partir da população de linfócito R1 (%gated), assim como em relação às células totais (% total) como podemos ver na Figura 10C.

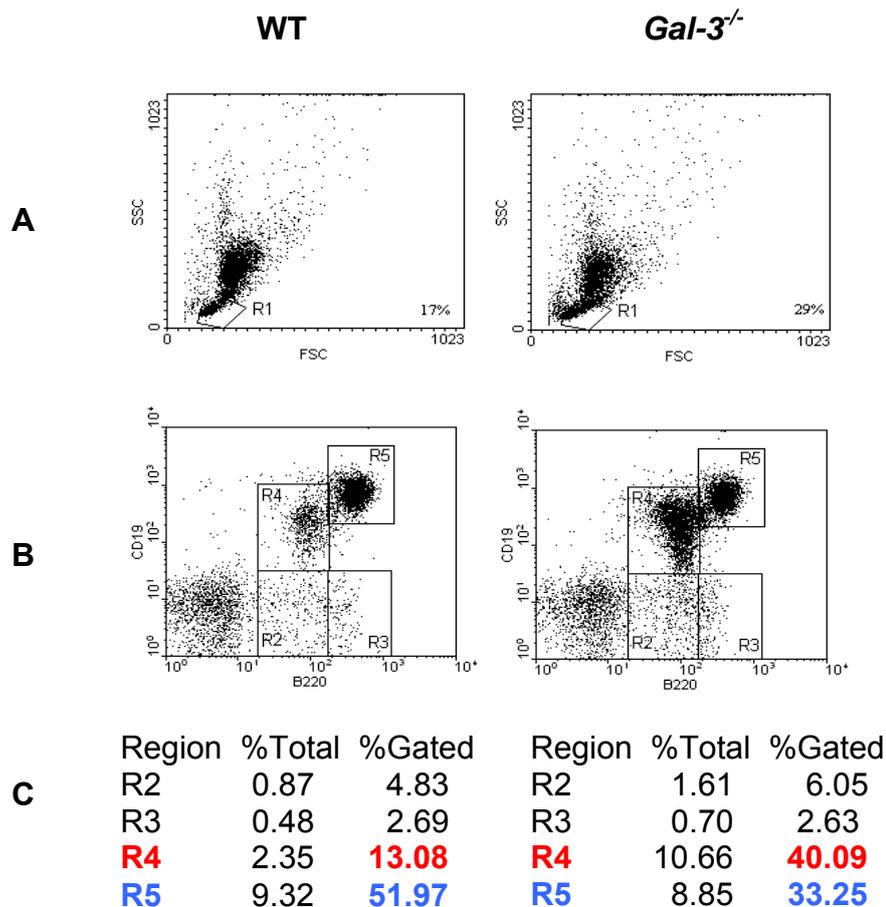
As duas frações que estão aumentadas na marcação com anti-B220 e anti-c-Kit correspondem a linfócitos B jovens, compreendendo as frações pré-pró-B, pró-B e pré-B. Por outro lado, a região R3, que compreende a fração

B220<sup>high</sup> (células B maduras), encontra-se diminuída nos animais *gal-3*<sup>-/-</sup> (Figura 10B). Essa diminuição é de 47,24% em relação à região de linfócitos (R1) nas células controles, para 23,13% nas células *gal-3*<sup>-/-</sup>.



**Figura 10:** Caracterização fenotípica das subpopulações de linfócitos B: marcação com anti-B220 e anti-cKit. (A): Separação da região (R1) de linfócitos no gráfico FSC x SSC. (B): Análise fenotípica das subpopulações de linfócitos B, localizadas em R1, definidas pela marcação com B220 e cKit. (C): Porcentagem de células das regiões em relação às células totais e às células da região R1; em vermelho, destaca-se as células da região R4, células B220<sup>+</sup>/cKit<sup>+</sup>, correspondentes aos linfócitos B jovens (células pro e pré-B). Resultado representativo de 3 experimentos com 3 animais controles e *gal-3*<sup>-/-</sup>.

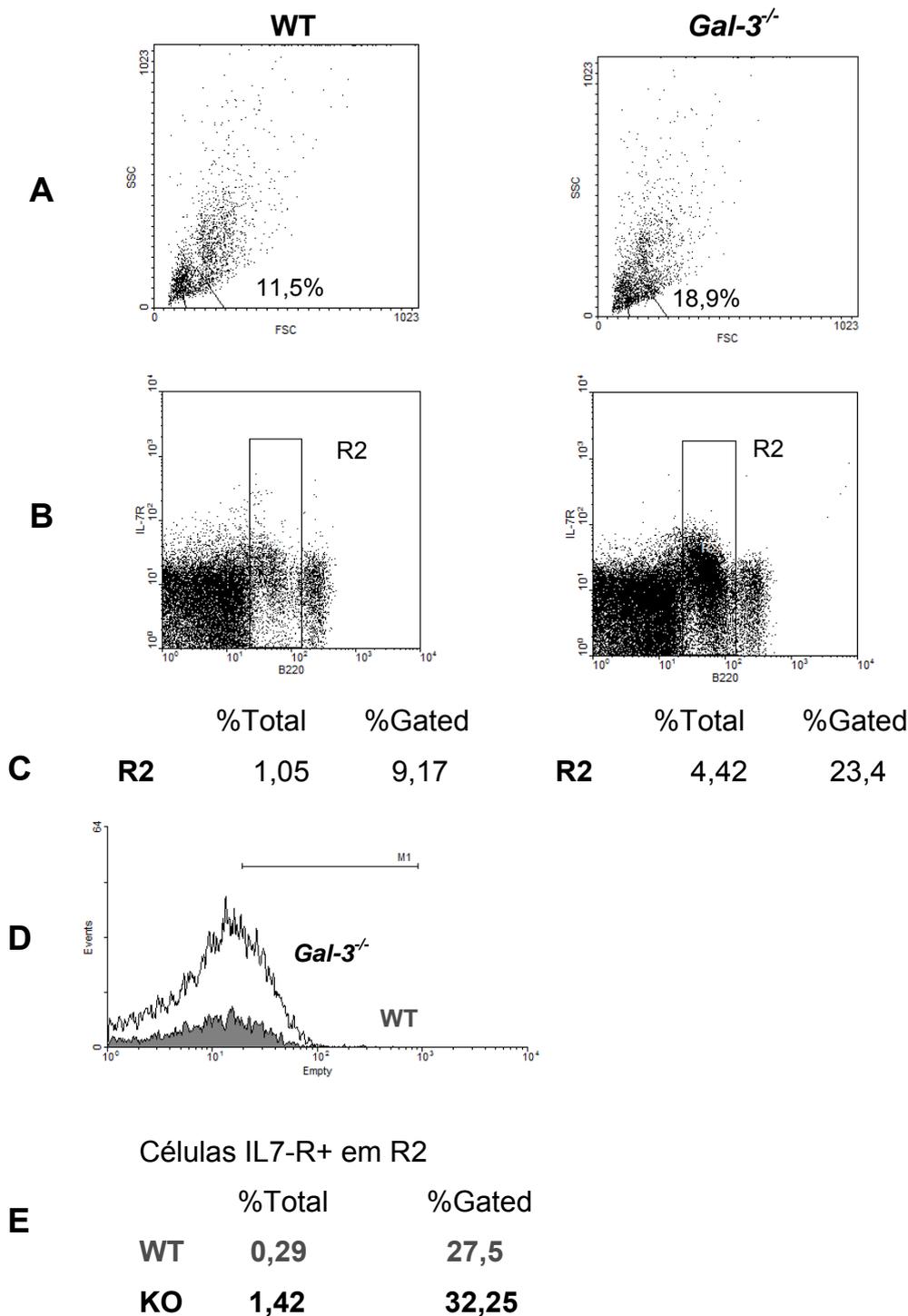
Prosseguindo com a caracterização, quando marcamos com anti-B220 e anti-CD19 (Figura 11B), observamos aumento de 13,08% na fração B220<sup>+/low</sup>/CD19<sup>+/low</sup> (região R4, Figura 11B) de animais controles para 40,09% nos animais *gal-3*<sup>-/-</sup>, com base na região de linfócitos (R1) previamente estabelecida (Figura 11A). Esta fração é caracterizada por células jovens, correspondentes às subpopulações pró-B e pré-B. Em contrapartida, observa-se diminuição na população B220<sup>high</sup>/CD19<sup>+</sup> (região R5 da Figura 11B) nos animais *gal-3*<sup>-/-</sup>. Esta diminuição é de 51,97% nas células controles para 33,25% nas células que não expressam galectina-3 (Figura 11C). Esta população celular compreende células B maduras. Portanto, os resultados obtidos até aqui confirmam que há um aumento nas populações de células B jovens, correspondentes às frações pré-pró-B a pré-B e diminuição na população B madura.



**Figura 11:** Caracterização fenotípica das subpopulações de linfócitos B: marcação com anti-B220 e anti-CD19. (A): Separação da região (R1) de linfócitos no gráfico FSC x SSC. (B): Análise fenotípica das subpopulações de linfócitos B, localizadas em R1, definidas pela marcação com anti-B220 e anti-CD19. (C): Porcentagem de células das regiões em relação às células totais e às células da região R1. Em vermelho, destacam-se as regiões R4, que são as células B220<sup>low</sup>/CD19<sup>+</sup>, correspondentes às células jovens, e, em azul, R5 cujo fenótipo é B220<sup>high</sup>/CD19<sup>+</sup> (células B maduras). Gráfico representativo de 3 experimentos, totalizando 5 animais de cada um dos grupos (WT e *gal-3*<sup>-/-</sup>).

Para complementar a caracterização das subpopulações, realizamos uma marcação para a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-7 (IL-7R $\alpha$ ) e B220. Podemos observar primeiramente o gráfico de tamanho por granulosidade, como descrito anteriormente, separamos uma região onde se concentram linfócitos (Figura 12A). Logo abaixo (Figura 12B), separamos uma região de linfócitos B220<sup>low</sup> e tanto IL-7R<sup>-</sup> como IL-7R<sup>+</sup> (R2), na qual visualizamos um

aumento celular no gráfico *gal-3*<sup>-/-</sup> quando comparado ao controle (WT) (Figura 12C). Para verificar a marcação de IL-7R $\alpha$  fizemos um histograma apenas com as células da região R2 (linfócitos B220<sup>low</sup>). Dessa forma, na Figura 12D, podemos observar que há um aumento no número de células IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> (M1) nos animais *gal-3*<sup>-/-</sup> (linha preta). Na Figura 12E, mostramos que, nos animais controles, 27,5% dos linfócitos são IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>, enquanto que nos animais *gal-3*<sup>-/-</sup>, são 32,25%. Em relação às células totais esse aumento é de 0,29% nas células controles para 1,42% das células *gal-3*<sup>-/-</sup>. As células com esse padrão imunofenotípico (B220<sup>low</sup>/ IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>) correspondem às células B jovens, entre as frações pré-pró-B e pré-B.

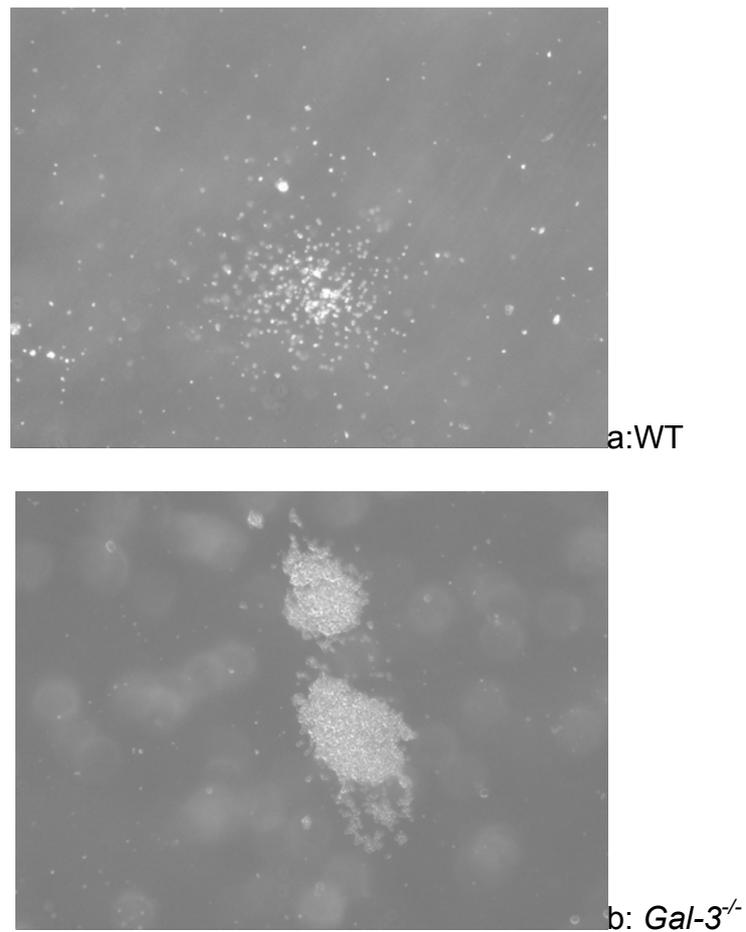


**Figura 12:** Caracterização fenotípica das subpopulações de linfócitos B: marcação com anti-B220 e anti-receptor de IL-7 (IL-7R). (A): Gráfico de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) e separação da região de linfócitos. (B) Análise fenotípica das subpopulações de linfócitos B definidas pela marcação com anti-B220 e anti-IL-7R, R2: células B220<sup>low</sup>. (C): Porcentagem da R2 (células B220<sup>low</sup>); (D) Histograma da marcação fenotípica de IL-7R: linha cinza: células WT; linha preta: células gal-3<sup>-/-</sup>. (E) Porcentagem de células IL-7R<sup>+</sup> (M1) na região R2 em relação às células totais e às células da região R2. Experimento representativo de um total de 3 animais de cada linhagem.

Diante de todas essas combinações de anticorpos utilizadas podemos concluir que há um aumento das subpopulações imaturas, caracterizadas imunofenotipicamente como  $B220^{low}/c\text{-Kit}^+/CD19^{low}/IL\text{-}7R\alpha^+$  e correspondentes às subpopulações pró e pré-B na medula óssea de animais *gal-3<sup>-/-</sup>*. Por outro lado, há uma redução na população madura da medula óssea, subpopulação correspondente a  $B220^{high}/CD19^+/c\text{Kit}^+/IL\text{-}7R\alpha^-$ .

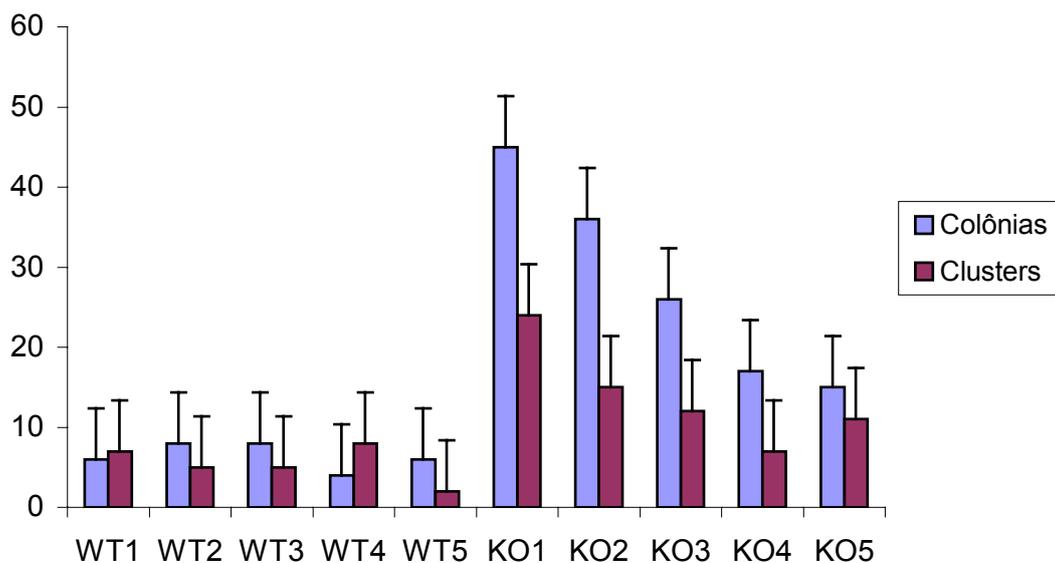
Sabendo-se então que há um aumento nas subpopulações pró e pré-B na medula óssea de animais *gal-3<sup>-/-</sup>*, partimos para um ensaio funcional, no qual cultivamos as células obtidas da medula óssea de animais *gal-3<sup>-/-</sup>* e controles em meio semi-sólido de metilcelulose. O único fator de estímulo presente neste sistema de cultura é a citocina IL-7. Dessa maneira, podemos quantificar o número de precursores de linfócitos B através da contagem das colônias geradas neste ensaio.

As fotos da Figura 13 demonstram uma diferença morfológica entre as colônias que foram obtidas de células de animais controles e as de animais *gal-3<sup>-/-</sup>*, formadas nas culturas em metilcelulose: nas colônias controles, as células se distribuíam a partir de um pequeno aglomerado celular central, já as colônias *gal-3<sup>-/-</sup>* se apresentavam mais compactadas, não sendo possível observar células centrais.



**Figura 13:** Fotos de microscopia óptica de campo claro das colônias formadas após 1 semana de cultivo em Metilcelulose (Methocult™, StemCell Technologies, Vancouver, Canada). a: células obtidas da medula óssea de animais controles; b: células obtidas de animais *gal-3*<sup>-/-</sup>. Aumento: 125x.

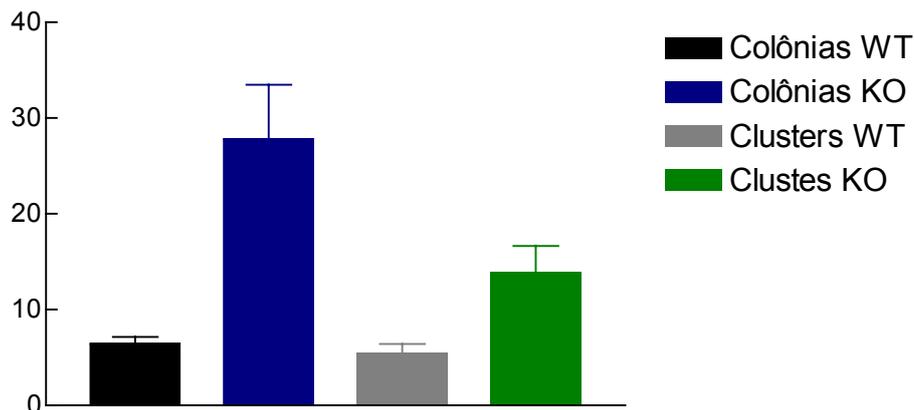
Na Figura 14 podemos observar o gráfico do número de colônias e clusters obtidos após a contagem das culturas de cada um dos experimentos. Percebemos que os animais *gal-3*<sup>-/-</sup> apresentaram um número muito maior de colônias e clusters comparados aos animais controles.



**Figura 14:** Contagem do número de colônias (aglomerados celulares com mais de 50 células) e clusters (aglomerados celulares com até 50 células) após uma semana de cultivo em Metilcelulose (Methocult™, StemCell Technologies, Vancouver, Canada). WT: animais controles KO: animais *gal-3<sup>-/-</sup>*.  $P < 0,05$

O aumento no número de precursores na ausência de galectina-3 é ainda melhor visualizado quando tiramos a média de todos os experimentos e fazemos um outro gráfico (Figura 15). Observamos que as culturas dos animais *gal-3<sup>-/-</sup>* possuem quase 4 vezes mais colônias que as culturas controles e cerca de 2 vezes mais que clusters, em relação às médias obtidas de colônias e clusters. Dessa maneira, mostramos que há um maior número de precursores B em animais *gal-3<sup>-/-</sup>* gerados em resposta ao único estímulo nesse sistema de cultura, a citocina IL-7, comparados aos animais controles.

Os dados obtidos com o ensaio *in vitro* (na cultura de metilcelulose) corroboram aqueles obtidos *ex vivo*: há um aumento de precursores pró e pré-B na medula óssea de animais *gal-3<sup>-/-</sup>*.

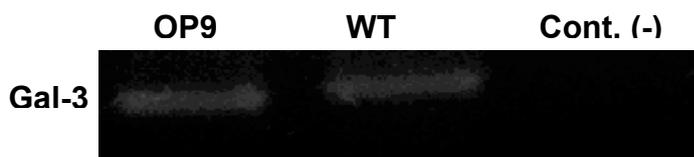


**Figura 15:** Formação de colônias (aglomerados celulares com mais de 50 células) e clusters (aglomerados celulares com até 50 células) após 1 semana de cultivo em Metilcelulose para formação de colônias pré-B (Methocult™, StemCell Technologies, Vancouver, Canada): Gráfico representativo da média dos experimentos (5 animais WT e 5 KO). WT: animais controles; KO: animais *gal-3<sup>-/-</sup>*.  $P < 0,05$ .

As células estromais da medula óssea são o suporte para a hematopoese na medula óssea. Elas produzem diversos fatores que modulam a quiescência, auto-renovação e comprometimento das CTH e a proliferação, maturação e apoptose das células já comprometidas nas diversas linhagens (Dennis e Charbord, 2002). As células que compõem o estroma medular são, portanto, essenciais para o desenvolvimento dos linfócitos B, à medida que produzem diversos fatores que regulam este processo.

Nesse sentido, realizamos um ensaio preliminar de co-cultivo a fim de avaliar a interação entre as células estromais e as células hematopoéticas obtidas de animais controles e *gal-3<sup>-/-</sup>*. Como célula estromal, escolhemos a linhagem OP9, conhecida por favorecer a linfopoese B, já que não produz um importante fator para a linhagem monocítica-macrofágica, o M-CSF (Nakano e cols., 1994). Além disso, vimos através de RT-PCR que essa linhagem

expressa galectina-3, funcionando assim como um estroma controle (Figura 16).

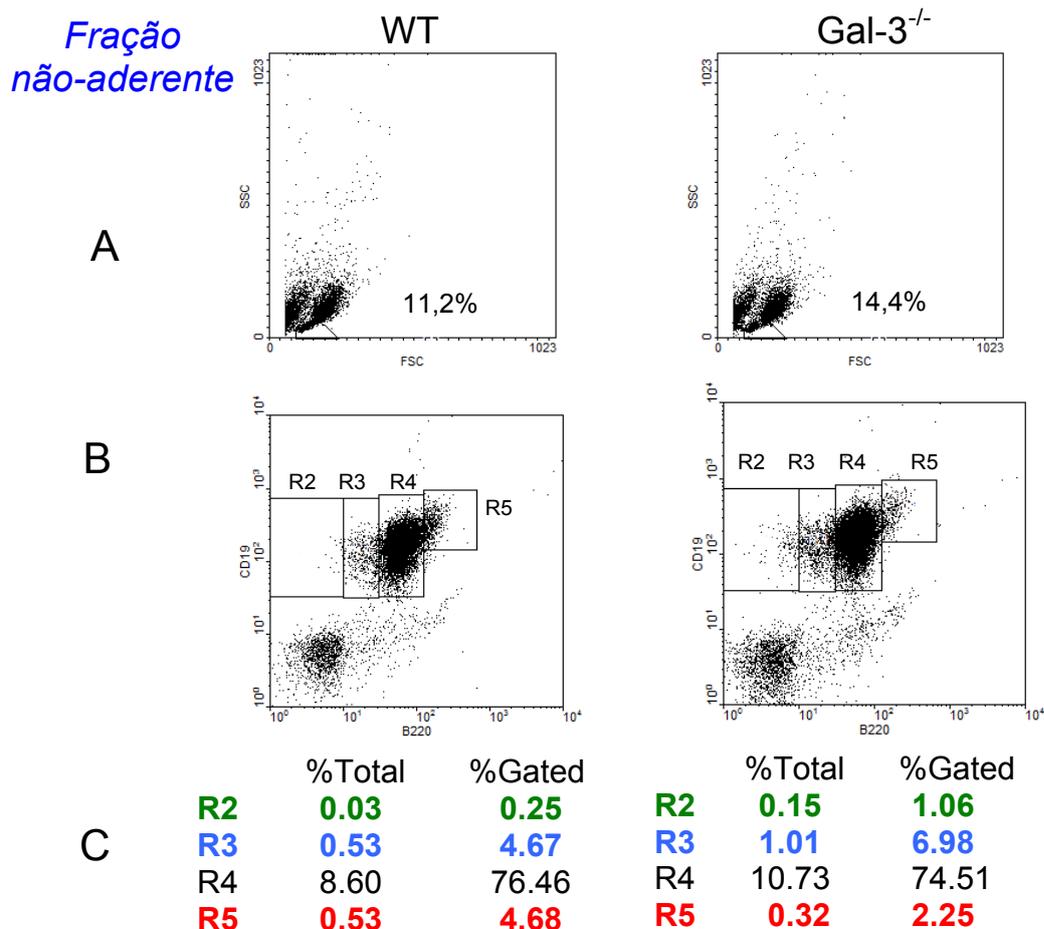


**Figura 16:** Análise da expressão de galectina-3 nas células da linhagem estromal OP9 por RT-PCR. OP9: amostra de cDNA das células estromais da linhagem OP9; WT: amostra de cDNA com células estromais de animais controles; Cont. (-): Controle negativo, reação sem amostra de cDNA.

Para avaliar o desenvolvimento de linfócitos B sobre o estroma, marcamos com anti-B220, anti-CD19 e anti-IgM as células do sobrenadante, que chamamos de fração não aderente, assim como as células aderidas ao estroma (fração aderente). Utilizamos a mesma marcação em ambas as frações, pois se sabe que as células muito jovens são tão dependentes das células estromais que ficam aderidas a elas, então para não perder nenhum tipo celular resolvemos tirar e analisar a fração aderente também.

O gráfico mostrado a seguir, Figura 17, nos mostra a análise por citometria de fluxo da fração não-aderente das co-culturas. Assim como nas citometrias já mostradas, obtivemos primeiramente um gráfico com a distribuição das células em tamanho (FSC) por granulosidade (SSC), a partir do qual definimos uma região onde se concentram os linfócitos (R1), caracterizados por células pequenas e com pouca granulosidade (Figura 17A). A partir da região R1, verificamos uma diminuição no percentual de células B220<sup>high</sup>/CD19<sup>+</sup> nas culturas derivadas de células mononucleares *gal-3*<sup>-/-</sup> (Figura 17B), de 4,68% nas culturas controles para 2,25% nas *gal-3*<sup>-/-</sup> (Figura 17C em vermelho). Podemos também observar que as células B220<sup>low/+</sup>/CD19<sup>low/+</sup> (R3, Figura 17C em azul) tiveram um ligeiro aumento na

subpopulação caracterizada por R4, que expressa maior intensidade de ambos os marcadores (Figura 17C em preto). Estes resultados mostram que a subpopulação jovem de linfócitos B encontra-se ligeiramente aumentada enquanto a subpopulação madura continua diminuída mesmo quando temos um estroma produtor de galectina-3.



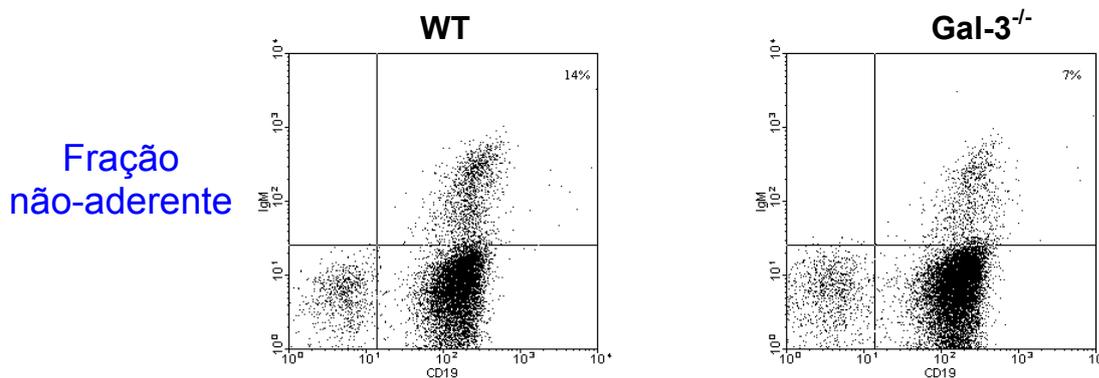
**Figura 17:** Análise fenotípica das células obtidas do sobrenadante (fração não-aderente) após 7 dias de co-cultivo entre a linhagem estromal OP9 e células mononucleares de medula óssea de animais controles (WT) e *gal-3<sup>-/-</sup>*. (A) Gráfico com a distribuição celular da fração não-aderente no gráfico de tamanho por granulosidade (FSC x SSC) e separação da região R1, onde se concentram os linfócitos. (B) Marcação com anticorpos anti-B220 e anti-CD19 nas células do sobrenadante. (C) Porcentagem das regiões correspondentes às subpopulações celulares em relação ao total de células e às células da região R1 (% gated). R2: B220<sup>-/low</sup>/CD19<sup>+</sup>; R3: B220<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>; R4: B220<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>, R5: B220<sup>high</sup>/CD19<sup>+</sup>.

O grupo de Montecino-Rodriguez, 2001, caracterizou um progenitor bipotente que daria origem a linfócitos B e macrófagos, cuja marcação fenotípica seria  $CD45R (B220)^{-}/CD19^{+}$ . Esse resultado foi surpreendente, pois a molécula CD19 é um marcador específico da linhagem B que, tradicionalmente, é expresso depois da molécula B220. As propriedades incomuns desta subpopulação, associada à possível relação de desenvolvimento entre os progenitores célula B-macrofágicos e as células B1, levaram o mesmo grupo a estudar o fenótipo e o desenvolvimento *in vivo* dessa população. Em 2006, esse grupo publicou um trabalho caracterizando essa população como  $Lin^{-}/B220^{-/low}/CD19^{+}$  e mostrando que estas células eram capazes de gerar células B1 funcionais na cavidade peritoneal de camundongos receptores do transplante celular. Estes resultados são muito importantes, pois suportam a idéia de que existe um progenitor restrito a células B1 na medula óssea.

Na Figura 17B, podemos observar que há na fração não-aderente das culturas, uma população  $B220^{-/low}/CD19^{+}$  (R2), que inclusive está aumentada na cultura derivada de células *gal-3<sup>-/-</sup>* com relação à cultura controle. Esse aumento corresponde a 0,25% nas culturas controles para 1,06% nas culturas *gal-3<sup>-/-</sup>*, em relação à região de linfócitos (Figura 17 B em verde). Ou seja, nesse nosso sistema *in vitro*, observamos a presença de uma subpopulação celular com o mesmo fenótipo que o progenitor descrito por Montecino-Rodriguez e cols. (2006), e seu aumento na ausência de galectina-3. Além disso, nosso grupo já observou a presença destes precursores na medula óssea de camundongos controles, assim como um

aumento desta fração celular em animais *gal-3<sup>-/-</sup>* *ex vivo* (dados ainda não publicados).

Uma vez que observamos uma redução significativa da subpopulação madura de linfócitos B ( $B220^{\text{high}}/CD19^+$ ) recorremos à análise fenotípica de IgM e CD19, como confirmação do resultado anterior. Como podemos observar na Figura 18, a subpopulação  $CD19^+/IgM^+$  está reduzida a cerca da metade nas células obtidas das culturas derivadas de animais *galectina-3<sup>-/-</sup>*, comparadas às controles. Na fração não-aderente das células controles, tem-se 14% das células da região R1 positivas para CD19 e IgM, enquanto que na das células *galectina-3<sup>-/-</sup>* encontramos 7%.



**Figura 18:** Marcação fenotípica para CD19 e IgM em células da fração não-aderentes obtidas das co-culturas de células mononucleares de medula óssea de animais controles e *gal-3<sup>-/-</sup>* em células da linhagem estromal OP9.

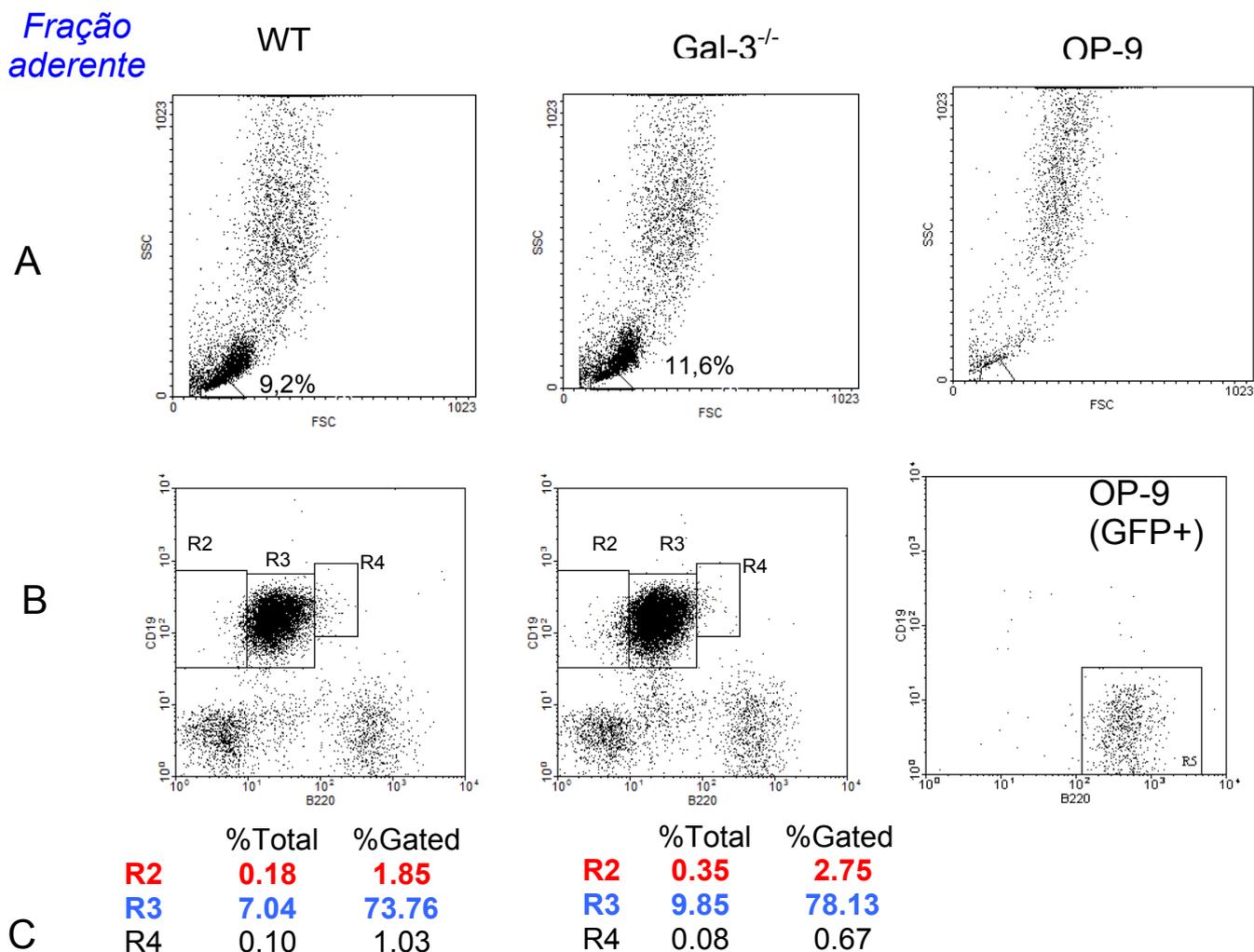
Como explicado anteriormente, fizemos as análises também nas células que se encontravam aderidas ao estroma - fração aderente. Primeiramente, analisamos o gráfico FSC x SSC, no qual definimos uma região (R1), onde se concentram os linfócitos (Figura 19A). A partir de então,

analisamos a marcação para B220 e CD19 (Figura 19B). O gráfico da marcação da OP9 foi colocado como controle, pois essa linhagem celular expressa a proteína verde fluorescente (GFP), que é capturada pelo mesmo laser da fluorescência do FITC, que neste caso é o fluorocromo conjugado ao anti-B220. Nesse gráfico podemos observar que a fluorescência é bem alta e não interfere na análise do B220.

Comparando-se os gráficos WT e *gal-3<sup>-/-</sup>*, observa-se um ligeiro aumento B220<sup>low/+</sup>/CD19<sup>low/+</sup> (Figura 19B), visto que nas culturas controles há 73,76% na região de linfócitos controles e 78,13% da região de linfócitos *gal-3<sup>-/-</sup>* (Figura 19C em azul).

Em 7 dias de co-cultivo, observou-se um ligeiro aumento de precursores, caracterizados fenotipicamente como B220<sup>low/+</sup>/CD19<sup>low/+</sup> nas culturas realizadas com células hematopoéticas originadas de animais *gal-3<sup>-/-</sup>*. É importante que se repita este experimento acompanhando a cinética de diferenciação dos linfócitos B e que se faça uma co-cultura com estroma do próprio animal controle.

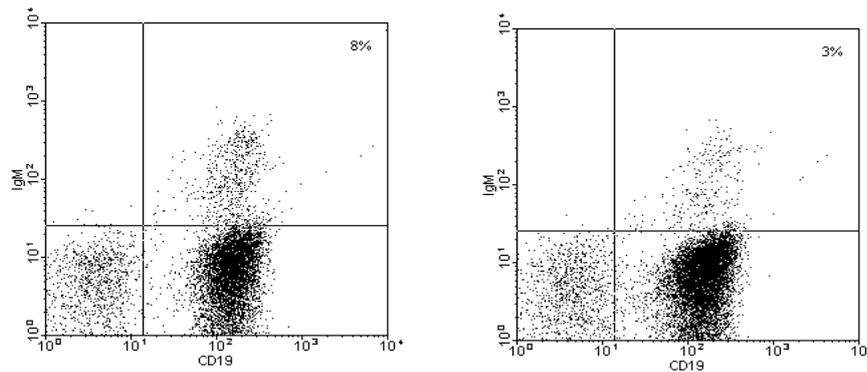
Fração aderente



**Figura 19:** Imunofenotipagem das células da fração aderente – células da linhagem estromal e possíveis células hematopoéticas que estejam aderidas ao estroma – obtidas das mesmas co-culturas de onde se obtiveram a fração não-aderente (Figura 15). Esta fração de células foi obtida com adição de tripsina à garrafa de cultivo, das quais o material solto foi recolhido, lavado 2 vezes para total retirada de tripsina, e então processadas para citometria de fluxo. (A) Distribuição das células da fração aderente das culturas pelo gráfico FSC x SSC e separação da região R1 de linfócitos. (B) Marcação com anticorpos anti-B220 e anti-CD19 nas células da região R1. (C) Porcentagens de cada uma das subpopulações celulares, onde R2 são as células B220<sup>-low</sup>/CD19<sup>+</sup>, R3: B220<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>, R4: B220<sup>high</sup>/CD19<sup>+</sup>.

Assim como marcamos na fração não-aderente CD19 e IgM para confirmar os dados de diminuição de células B220<sup>high</sup>/CD19<sup>+</sup>, recorreremos a mesma marcação na fração aderente (figura 20). Nesta também se observa redução da fração celular B220<sup>high</sup>/IgM<sup>+</sup>, com 8% da região R1 controle para 3% da *gal-3*<sup>-/-</sup>.

Fração aderente

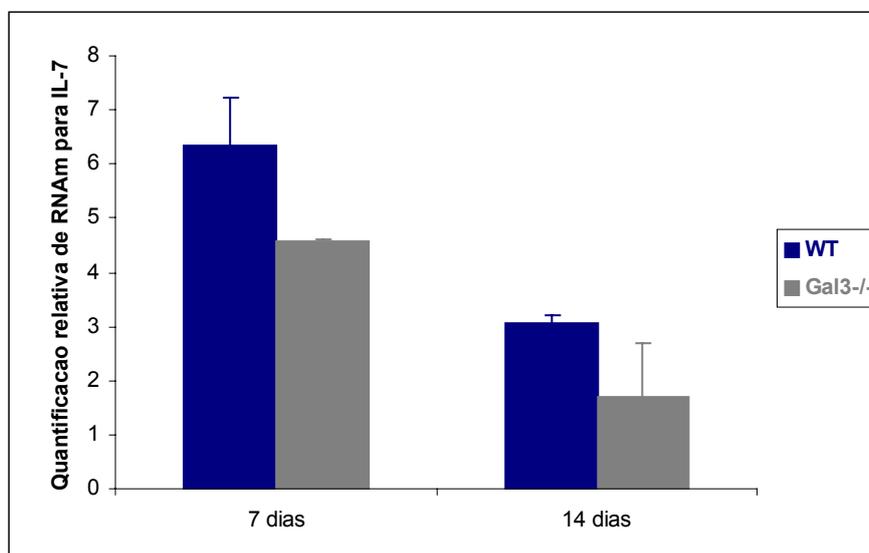


**Figura 20:** Marcação fenotípica para CD19 e IgM em células da fração aderentes obtida das co-culturas de células mononucleares de medula óssea de animais controles e  $gal-3^{-/-}$  em células da linhagem estromal OP9.

Sabe-se que a diferenciação de linfócitos B, principalmente nas etapas iniciais, requer a presença da citocina IL-7 que é produzida pelas células estromais da medula óssea. Esta citocina é muito importante para a diferenciação dos CLPs para pró-B; promove a sobrevivência, proliferação e diferenciação da fração pró-B; além de participar na proliferação das células pré-B (Milne e Paige, 2006) .

Foi demonstrado que há um aumento das frações pró e pré-B na medula óssea *ex vivo* de animais  $gal-3^{-/-}$  e que este resultado se repete *in vitro* (no ensaio de metilcelulose) através do maior número de precursores pró e pré-B formados nas culturas de células que não expressam galectina-3. Nos ensaios de co-cultura, observou-se que o estroma poderia estar participando no controle da diferenciação e/ou proliferação das etapas iniciais do desenvolvimento das células B. A partir desses dados e das informações da literatura à cerca da importância da citocina IL-7 nas etapas iniciais da linfopoese B, fomos investigar se havia alguma alteração na expressão desta citocina no estroma medular de camundongos  $gal-3^{-/-}$ . Para isso, realizamos um RT-PCR em tempo real.

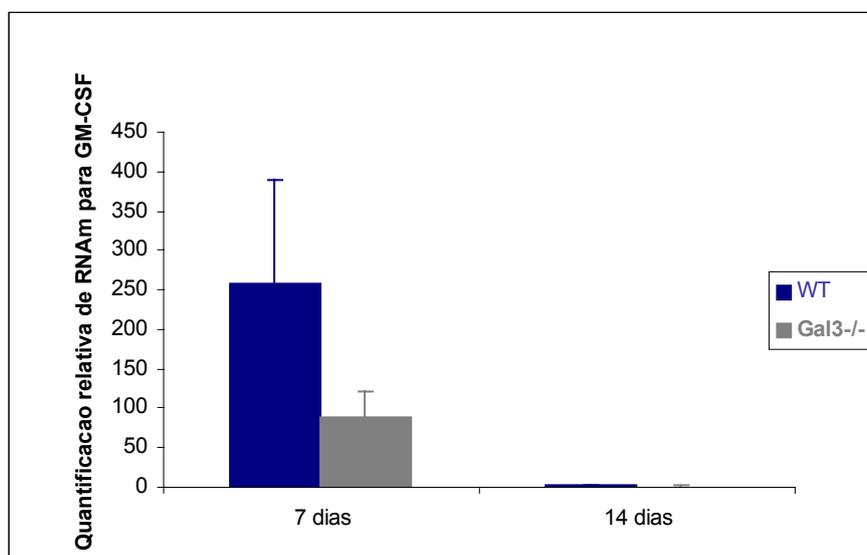
Podemos observar, no gráfico a seguir (Figura 21), que as células estromais de medula óssea obtidas de animais *gal-3<sup>-/-</sup>*, quando cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, sem adição de nenhum estímulo, por 7 dias apresentaram menor expressão relativa de IL-7 comparadas às células obtidas de animais controles cultivadas nas mesmas condições. Com 14 dias de cultivo, tanto as células controles como as *gal-3<sup>-/-</sup>* tiveram redução da expressão relativa de IL-7. Observa-se ainda que as células *gal-3<sup>-/-</sup>* expressam menos IL-7 que as células controles.



**Figura 21:** Avaliação da expressão relativa de IL-7 em células do estroma de medula óssea em 7 e 14 dias em cultura através de RT-PCR em tempo real. WT: animais controles; Gal-3<sup>-/-</sup>: animais *gal-3<sup>-/-</sup>*. Resultado representativo de 2 experimentos (2 animais WT e 2 *gal-3<sup>-/-</sup>*).

Outro resultado importante obtido através da técnica de RT-PCR em tempo real foi a análise da expressão relativa de GM-CSF, um fator de crescimento muito importante para a diferenciação e proliferação de células mielóides. Este fator é produzido por linfócitos T, macrófagos, células endoteliais e pelas células estromais da medula óssea.

O resultado do RT-PCR em tempo real das células estromais de medula óssea derivadas de animais controles e *gal-3<sup>-/-</sup>* mostraram uma redução na expressão relativa de GM-CSF proporcional ao tempo de cultivo, ou seja, com 14 dias há menor expressão deste fator do que com 7 dias. As células obtidas de animais *gal-3<sup>-/-</sup>* apresentaram menor expressão relativa desse fator que as células controles no 7º dia de cultivo (Figura 22).



**Figura 22:** Avaliação da expressão relativa de GM-CSF em células estromais da medula óssea obtidas de animais controles e *gal-3<sup>-/-</sup>*, cultivadas por 7 e 14 dias, por RT-PCR em tempo real. WT: células controles; *Gal-3<sup>-/-</sup>*: células de animais *gal-3<sup>-/-</sup>* para galectina-3. Resultado representativo de 2 experimentos (2 animais WT e 2 *gal-3<sup>-/-</sup>*).

## V) Discussão

As galectinas pertencem à família de lectinas animais com afinidade por  $\beta$ -galactosídeos. Elas são expressas por uma variedade de tipos celulares do sistema imune. Podem interagir com glicoconjugados (glicolipídeos e glicoproteínas) da superfície celular e matriz extracelular através das interações lectinas-carboidratos. Dessa maneira, podem participar do crescimento celular, afetar a sobrevivência das células, modular adesão e migração celular. Recentemente, pesquisadores têm mostrado os papéis importantes das galectinas no sistema imune regulando a homeostase e as funções de suas células (Revisado por Liu, 2005).

A gal-3 é membro dessa família protéica e participa de mecanismos envolvidos na resposta inflamatória. Dentre algumas dessas funções, foi descrito que potencializa a produção de IL-1 por macrófagos induzidos com LPS e inibe a expressão gênica de IL-5 nos eosinófilos; tem atividade anti-apoptótica em células T; pode potencializar ou inibir as interações célula-célula e célula-matriz extracelular em diversos tipos celulares. Em neutrófilos, por exemplo, promove adesão destas células à laminina. Em dois modelos de estudo, na infecção por *S. mansoni* e *T. gondii* os animais gal-3<sup>-/-</sup> desenvolveram maior resposta TH1, com maior produção de citocinas relacionadas a esta fase, como IL-12 e IFN- $\gamma$ , mostrando que a galectina-3 está envolvida no balanço das respostas TH1 e TH2 (Bernardes e cols., 2006 e Breuilh e cols, 2007). No entanto, pouco se sabe acerca do papel da galectina-3 no compartimento das células B (revisado por Rabinovich e cols., 2002).

Acosta-Rodriguez e cols. (2004) mostraram pela primeira vez que a galectina-3 é um sinal muito importante na sobrevivência, diferenciação e comprometimento para um fenótipo de célula B de memória. O grupo demonstrou que inibindo a galectina-3 através de estratégia anti-senso, havia uma maior expressão de Blimp-1 em células B esplênicas de camundongos infectados por *T. cruzi*. O aumento deste fator de transcrição promovia a diferenciação de células B em plasmócitos e poderia ser responsável pelo aumento destas células na medula óssea dos animais infectados (Acosta-Rodriguez e cols., 2004). Utilizando outro tipo de estímulo, a infecção pelo *S. mansoni*, e animais *knockout* para galectina-3, nosso grupo observou aumento de linfócitos B durante a fase crônica da infecção na medula óssea de animais gal-3<sup>-/-</sup> assim como no sangue periférico, e por outro lado, diminuição nos órgãos periféricos (baço e linfonodos mesentéricos) (Oliveira e cols., 2007). Dessa maneira, este último trabalho, utilizando como estratégia de estudo para inibir a galectina-3, animais geneticamente modificados que não expressam a proteína, confirmou a observação feita anteriormente por Acosta-Rodriguez e cols. (2004), cuja estratégia foi a inibição, quase que completa, com oligonucleotídeos anti-senso: a galectina-3 é uma importante molécula regulatória envolvida na biologia de células B.

A marcação fenotípica através de citometria de fluxo realizada por Oliveira e cols. (2007) e também no trabalho desta dissertação, demonstrou que a gal-3 encontra-se na superfície da membrana de células da fração B220<sup>high</sup>, subpopulação esta que corresponde aos linfócitos B maduros e circulantes, ou seja, aqueles capazes de sair da medula óssea para a corrente sanguínea e daí para os órgãos periféricos (Figura 9). Nós não

podemos afirmar se esta lectina está sendo produzida pelos próprios linfócitos B, ou se é produzida por alguma outra célula, é secretada e posteriormente se liga a algum receptor na membrana da célula B. Acosta-Rodriguez e cols. (2004) mostraram que células B originadas dos animais infectados expressavam galectina-3, mas as células obtidas de camundongos normais não expressavam, a não ser quando eram colocadas em cultura com estímulos mitógenos, como o LPS, ou com estímulos de diferenciação/ativação, como IL-4 e CD-40 (Acosta-Rodriguez e cols., 2004).

Hoyer e cols. (2004) observaram que células B humanas presentes no centro germinativo das tonsilas e plasmócitos expressavam baixo nível de galectina-3, enquanto células B naive e de memória expressam maiores níveis. Estes dados demonstram que há uma regulação estágio-específica na expressão desta lectina. Além disso, observa-se um aumento na expressão de galectina-3 em linfomas originados destas células, que associado com a atividade anti-apoptótica desta lectina sugere uma ligação à linfomagênese e à manutenção das células transformadas. Estes dados reunidos comprovam que a galectina-3 possui um importante papel na diferenciação dos linfócitos B.

Com base nesses resultados, mostrando que a galectina-3 tem um papel crucial na diferenciação de linfócitos B, fomos estudar a linfopoese B na ausência desta proteína, utilizando como ferramenta animais *gal-3<sup>-/-</sup>*. Estes animais são viáveis e são uma importante ferramenta de estudo à medida que não possuem qualquer expressão da proteína estudada desde a sua formação embrionária. Dessa maneira, ganha vantagem sobre outras técnicas de inibição da proteína.

A fim de estudar a linfopoese B nesses animais, buscamos primeiramente caracterizar as subpopulações de células B na medula óssea, cada uma das quais representando uma etapa do desenvolvimento da célula B; cada etapa, por sua vez, é caracterizada por um grupo de marcadores fenotípicos já descritos na literatura (Figura 5). Neste trabalho selecionamos as moléculas B220, CD19, cKit, cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-7 e IgM como tais marcadores e as analisamos através da técnica de citometria de fluxo. Observamos que há um aumento na subpopulação B220<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>/cKit<sup>+</sup>/IL-7R<sup>+</sup> no compartimento medular de animais *gal-3*<sup>-/-</sup> (Figuras 10, 11 e 12). Esse dado, portanto, nos leva a sugerir que na ausência da galectina-3 há um acúmulo das subpopulações pró e pré-B na medula óssea.

Para confirmar a desregulação observada na formação de precursores linfóides na ausência da proteína estudada *in vivo*, realizamos um ensaio *in vitro*, no qual as células da medula óssea foram plaqueadas num meio semi-sólido que favorece o crescimento de colônias constituídas por precursores linfóides, principalmente pró e pré-B, e cujo único estímulo presente é a citocina IL-7. Após 7 dias de cultivo, realizamos as contagens das colônias e observamos que os animais *gal-3*<sup>-/-</sup> apresentaram um número muito maior de precursores que os animais controles. Esse aumento foi no mínimo o dobro do número de colônias controles. Este resultado nos confirmou os dados anteriores obtidos *in vivo*: na ausência de gal-3 há uma maior formação de precursores pró e pré-B durante a diferenciação de linfócitos B.

Sabe-se que na medula óssea coexistem dois sistemas diferentes e interdependentes: o sistema hematopoético e o sistema estromal, composto por diversos tipos celulares. As células estromais da medula óssea regulam a

hematopoese através da secreção de variados fatores solúveis e pela própria interação celular com as células hematopoéticas. Devido a essa grande importância, fomos estudar a interação entre as células estromais e as células hematopoéticas obtidas de animais controles e animais *gal-3<sup>-/-</sup>*. Como célula estromal, escolhemos a linhagem OP9, que é bastante utilizada nos estudos de linfopoese B, pois é originada da calvária de animais que não possuem o fator M-CSF funcional, devido a uma mutação no seu gene.

Através da análise das marcações realizadas após 1 semana de co-cultivo, observamos uma diminuição na população B220<sup>high</sup>/CD19<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup> nas culturas de células mononucleares *gal-3<sup>-/-</sup>* (Figuras 17, 18, 19 e 20). Esta população corresponde às células da fração madura que está pronta para sair da medula óssea. Esta redução foi observada tanto nas células que retiramos do sobrenadante (fração não-aderente) como nas células retiradas da parte aderida. Esperava-se que não houvesse célula nesse estágio de amadurecimento na fração mais próxima ao estroma, pois células maduras *in vivo* já estão perdendo o contato com as células estromais para facilitar a saída para a corrente sanguínea. Como estamos tratando de um sistema *in vitro*, pode ser que tenhamos retirado células tornando-se maduras ou até já maduras, mas que ainda não perderam completamente a ligação com as células estromais. Contudo, o que é realmente relevante, é o fato de reproduzir a redução de células com aquele fenótipo num sistema de cultivo onde há galectina-3, que é expressa pela linhagem estromal.

Observamos um ligeiro aumento na fração não-aderente da subpopulação B220<sup>low/+</sup>/CD19<sup>low/+</sup> (R3, Figura 17) nas culturas com células *gal-3<sup>-/-</sup>*, que apresentaram cerca de 1,5 vezes mais destas células na região

de linfócitos (R1) que as células controles. Na fração aderente, também observamos este aumento (R3 da Figura 20). A presença de galectina-3 na célula estromal que está sustentando o desenvolvimento de células mononucleares *gal-3<sup>-/-</sup>*, pode não ser fator crucial para que estas células se desenvolvam normalmente (como as células mononucleares de animais controles), já que o aumento de células B precursoras observado nas células obtidas da medula óssea dos animais *gal-3<sup>-/-</sup> ex vivo* não é revertido quando cultivamos estas células sobre células estromais que expressam gal-3. Provavelmente, a presença da galectina-3 nas células hematopoéticas é que regule o desenvolvimento dos linfócitos B.

É preciso realizar experimentos futuros, com prévio estabelecimento de um estroma de medula óssea obtido de animais controles e *gal-3<sup>-/-</sup>*, a fim de estudar as interações entre as células mononucleares controles e o estroma sem galectina-3. Realizando este experimento poderemos verificar se a linfopoese B ocorre da mesma maneira que nas culturas onde serão adicionadas células *gal-3<sup>-/-</sup>*. Assim como estudar, se as células *gal-3<sup>-/-</sup>* sobre o estroma obtido da medula óssea do animal controle, se comportam da mesma maneira que as próprias células controles e se repetem os dados obtidos aqui, quando se utilizou uma linhagem estromal.

Embora tenhamos observado que a galectina-3 expressa pela linhagem estromal sobre a qual cultivamos as células mononucleares de medula óssea não é suficiente para reverter o aumento de precursores e a diminuição das células maduras, não podemos descartar a importância do estroma na linfopoese B, especialmente no que diz respeito à produção de fatores essenciais para este processo.

O estroma medular secreta diversos fatores que favorecem a linfopoese e outros que são específicos para diferenciação mielóide. Dentre os fatores que favorecem a linfopoese está a interleucina-7 (IL-7), uma citocina crucial para a geração e proliferação de precursores linfóides durante o desenvolvimento das células B. Ela atua na diferenciação do precursor linfóide comum para células pró-B e na proliferação das frações pró e pré-B (revisado por Taguchi e cols., 2007). Através da técnica de RT-PCR em tempo real, analisamos a expressão da IL-7 pelas células estromais obtidas da medula óssea de animais controles e *gal-3<sup>-/-</sup>*, que foram cultivadas por 7 e 14 dias (Figura 21). Verificamos que as células estromais *gal-3<sup>-/-</sup>* expressam menos IL-7 do que as células controles, tanto com 7 como com 14 dias. Durante a cultura a expressão desta proteína pelas células de animais *gal-3<sup>-/-</sup>* parece seguir a mesma cinética que das células controles: a expressão de IL-7 diminui do 7º para o 14º dia.

Não sabemos de que maneira a ausência de gal-3 interfere na produção de IL-7. Esta citocina é muito importante para a biologia das células B, como explicado anteriormente; no entanto, a redução na expressão de IL-7 não bloqueia a geração de células B nos animais *gal-3<sup>-/-</sup>*. A quantidade disponível de IL-7 *in vivo* deve ser menor nesses animais, visto que as células estromais desses animais, em 1 semana, expressam menos IL-7 que as controles. Através da citometria de fluxo podemos analisar se as células *gal-3<sup>-/-</sup>* apresentariam maior quantidade de receptores de IL-7 na superfície celular, pois a intensidade de fluorescência do anticorpo utilizado para marcar o receptor é proporcional ao número de moléculas na superfície dessas células; dessa maneira, quanto mais receptor de IL-7 na superfície celular,

maior será a intensidade de fluorescência observada. Quando analisamos os dados obtidos *ex vivo*, observamos aumento no número de células IL-7R<sup>+</sup> e não na intensidade de fluorescência do anticorpo utilizado para sua marcação, ou seja, não há diferença na quantidade de receptor na superfície celular dos linfócitos B. Estes resultados nos levam a sugerir que a diferenciação e/ou proliferação dos linfócitos B em animais *gal-3<sup>-/-</sup>*, não está diretamente ligada à sinalização IL-7/IL-7R. Devemos realizar novos ensaios para confirmar esses dados, além de estudar outras vias de sinalização importantes na diferenciação e proliferação de células B.

Analisou-se também por RT-PCR em tempo real uma citocina produzida pelas células estromais importante para a diferenciação mielóide, o GM-CSF. O resultado mostra que as células *gal-3<sup>-/-</sup>* expressam menos GM-CSF que as células controles no 7<sup>o</sup> dia de cultivo. No 14<sup>o</sup> dia, a expressão em ambas as células é mínima (figura 22). Este resultado é importante porque complementa o trabalho anterior do nosso grupo, no qual se observou uma diferenciação retardada de monócitos em macrófagos, além de intensa eosifilia nos animais *gal-3<sup>-/-</sup>*. A galectina-3 está envolvida também na biologia das células mielóides, interferindo na sua diferenciação e proliferação. No entanto, é necessário ainda que esses experimentos sejam repetidos, já que se observa um desvio padrão alto, o que muito provavelmente se deve ao número reduzido de amostras.

A galectina-3 parece ser uma importante molécula no processo de diferenciação de ambos os compartimentos (linfóide e mielóide), nem que seja em algum determinado momento do desenvolvimento.

O desenvolvimento de linfócitos B requer a presença de vários fatores de transcrição, tais como: E2A e EBF, importantes para o início do comprometimento (especificação) com a linhagem B; o Pax5 como um determinante secundário (comprometimento); FLK2R, cuja sinalização inicia a especificação do precursor multipotente na via de linfócitos B; IL-7R, cuja expressão é ativada pela sinalização FLK2/FLT3 e parece ser crucial no comprometimento dos precursores linfóides, através da regulação da expressão de EBF; PU.1, que está implicado na regulação da expressão do IL-7R, mas não na sua manutenção a partir da etapa pró-B, cuja função é do E2A e do EBF (Matthias e Rolink, 2005; Medina e Singh, 2005). Dessa maneira, podemos perceber que há uma rede de fatores interligada que promove a diferenciação dos linfócitos B e que podem estar desregulados na ausência de galectina-3, como observado pelos resultados mostrados até aqui. Nesse sentido, nos propomos a fazer um mapeamento de alguns destes fatores para ver se há alguma mudança na expressão diante da ausência de galectina-3, o que pode estar diretamente ligado à desregulação da linfopoese B nos animais *gal-3<sup>-/-</sup>*.

Além destes fatores de transcrição envolvidos diretamente na linfopoese B, nos propomos a estudar também a sinalização Wnt na ausência de galectina-3. As proteínas Wnt representam uma família de moléculas sinalizadoras secretadas que são expressas em diversos tecidos e tem-se mostrado que influenciam em diversos processos no desenvolvimento de invertebrados e vertebrados. Resumidamente, a sinalização Wnt envolve a ligação de uma proteína Wnt a um receptor da família *frizzled* (Fzd), inativação da atividade de GSK-3 $\beta$  (*glycogen-synthase kinase 3 $\beta$* ), e

estabilização de  $\beta$ -catenina no citoplasma. O acúmulo e a translocação nuclear de  $\beta$ -catenina permite a associação com as proteínas LEF1/TCF e ativação de genes- alvos (revisado por Staal e Clevers, 2005).

Dosen e cols., em 2006, mostraram que vários ligantes de Wnt e receptores Fzd são expressos em células B progenitoras e células estromais de medula óssea humana. Além disso, mostraram a expressão de LEF-1 e TCF-4. Dessa maneira, sugere-se que a expressão dessas proteínas durante a diferenciação de linfócitos B suporta a hipótese de que a sinalização Wnt está ativa na linfopoese B medular (Dosen e cols., 2006). No entanto, pouco se sabe sobre o papel desta sinalização no desenvolvimento de células B. Camundongos que não expressam LEF-1 (LEF-1<sup>-/-</sup>) morrem pouco após o nascimento. Embora estes animais não apresentem defeito no desenvolvimento de linfócitos, uma análise cuidadosa do compartimento de células B nestes animais mostrou que há uma redução de células B220<sup>+</sup> no fígado fetal e na medula óssea perinatal. Essa redução foi causada tanto por aumento de apoptose como por diminuição da proliferação. Além disso, Wnt3A parece estimular a proliferação de células pró-B murinas (Reya e cols., 2000).

Em 2004 e 2005 foram publicados dois trabalhos de um grupo que mostraram a possível participação da galectina-3 nessa via de sinalização. Primeiramente, Shimura e cols., mostraram que a galectina-3 se liga a  $\beta$ -catenina. Em ensaio de imunocitoquímica, observou-se que, em células que não expressavam galectina-3, a  $\beta$ -catenina encontrava-se no citoplasma e na membrana, enquanto que em células que expressavam tal proteína, a  $\beta$ -catenina estava distribuída, assim como a galectina-3, pelo citoplasma e

núcleo, e que no núcleo se colocalizavam. Além disso, células que não expressam gal-3 transfectadas com esta proteína apresentaram a atividade *repórter* do TCF-4 aumentada (Shimura e cols., 2004). No trabalho seguinte, o grupo mostrou que a galectina-3 era fosforilada pelas mesmas proteínas que a  $\beta$ -catenina: GSK-3 $\beta$  e CKI. E que a galectina-3 estaria ligada a uma outra proteína do complexo multiprotéico presente no início da cascata de sinalização Wnt, a AXIN (*axis inhibitor*) (Shimura e cols., 2005).

A desregulação da sinalização Wnt pode ser um dos mecanismos para a geração de leucemias, assim como a galectina-3 também está envolvida em processos tumorais de linfócitos. Nesse sentido, é importante estudar a sinalização Wnt em animais que não expressam gal-3, para conhecermos o papel de ambos na linfopoese B medular. Este trabalho já começa a ser desenvolvido, primeiramente estudando a distribuição de  $\beta$ -catenina em células de baço e medula óssea na ausência de gal-3 em animais gal-3<sup>-/-</sup> e a interação de ambas nestas células obtidas de animais controles, pela técnica de imunofluorescência, em colaboração com a profa. Cláudia Mermelstein. O próximo passo será estudar através de biologia molecular algumas proteínas da sinalização Wnt na ausência de gal-3, tais como a própria  $\beta$ -catenina.

Como descrito anteriormente, dados obtidos por Oliveira e cols. (2007) mostram que os animais gal-3<sup>-/-</sup> possuem menos linfócitos B na periferia (baço e linfonodos mesentéricos) e concomitante aumento de plasmócitos. Isso nos sugeriu que há uma aceleração na diferenciação de linfócitos em células secretoras de anticorpos, os plasmócitos. Nesse sentido, estamos começando a estudar a diferenciação tardia da célula B, quando ela chega nos órgãos periféricos e se torna plasmócito. Uma aluna do projeto está

estudando a morfologia destes órgãos, através de imunohistoquímica, nos animais *gal-3<sup>-/-</sup>* para ver se há alguma diferença na própria morfologia do órgão e na distribuição celular em relação aos dos animais controles, pois a localização da célula no nicho correspondente ao seu estágio de desenvolvimento é crucial para a sua correta diferenciação, já que aí se encontram os fatores necessários para tanto.

Nosso grupo também observou que há uma desregulação no compartimento de células B1. Estas células são encontradas nas cavidades peritoneal e pleural e diferem dos linfócitos B convencionais pela ontogenia, pelo repertório de anticorpos, pelo tamanho e pela caracterização fenotípica: as B2, são B220<sup>high</sup>, CD5<sup>-</sup>, IgM<sup>low</sup>, IgD<sup>high</sup>, Mac-1<sup>-</sup> e CD23<sup>+</sup> e as células B1 foram descritas como B220<sup>low</sup>, CD5<sup>+</sup>, IgM<sup>high</sup>, IgD<sup>low</sup>, Mac-1<sup>+</sup> e CD23<sup>-</sup> (revisado por Fagarasan e cols, 2000). Em dados preliminares, observamos que a população B220<sup>low</sup> na cavidade peritoneal (linfócitos B1) estão diminuídos nos animais *gal-3<sup>-/-</sup>*. Estas células podem ser ainda subdivididas em duas populações: B1a (B220<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup>) e B1b (B220<sup>+</sup>/CD5<sup>-</sup>). Discute-se muito a origem destes linfócitos. Em 2006, o grupo de Montecino-Rodriguez demonstrou que há precursores de linfócitos B1 na medula óssea, caracterizados fenotipicamente como B220<sup>-low</sup>/CD19<sup>+</sup>, que são capazes de reconstituir todas as células B1 peritoneais. Resultados dentro do projeto do nosso grupo mostram que, nos animais *gal-3<sup>-/-</sup>*, há aumento no número destes precursores presentes na medula óssea, comparado com os animais WT. Em paralelo, observou-se que as células B220<sup>-low</sup>/CD19<sup>+</sup> na cavidade peritoneal dos animais *gal-3<sup>-/-</sup>* encontram-se numericamente reduzidas, comparadas com esta mesma população presente nos animais WT. E, neste

trabalho, observamos aumento numa população celular com o mesmo fenótipo desse precursor quando analisamos, com 1 semana de cultivo, as células do sobrenadante das co-culturas nas quais foram adicionadas células mononucleares *gal-3*<sup>-/-</sup>. Dessa maneira, podemos verificar que a galectina-3 interfere na diferenciação de linfócitos B, tanto convencionais, como nos linfócitos B1.

Visto esse aumento no número de precursores linfóides na ausência de galectina-3, tanto em B1 como em B convencional, o projeto vai ser estendido para o estudo da linfopoese no fígado fetal, sítio importante para a produção e expansão dos primeiros progenitores linfóides de ambas as linhagens.

Diante dos resultados apresentados, das perspectivas e dos resultados obtidos pelo nosso grupo em outros projetos, podemos perceber que há muito para estudar quanto ao papel da galectina-3 na diferenciação de linfócitos B. As perspectivas aumentam se ainda buscamos entender o seu papel na diferenciação mielóide.

A *gal-3* participa de vários processos biológicos e o nosso modelo de estudo, utilizando animais que não expressam tal proteína, pode ser considerado como uma metodologia excelente para caracterizar o papel fisiológico dessa proteína em linfócitos B e também em outros tipos celulares. Nosso grupo vem enfocando o trabalho com estas células à medida que há pouquíssima literatura acerca do assunto. Este estudo é bastante importante, pois a desregulação da diferenciação dos linfócitos B causada pela ausência de *gal-3* pode ser um dos fatores que pode levar a uma doença auto-imune, à medida que pode atrapalhar a verificação de auto-reação dos anticorpos

produzidos por estas células antes que saiam da medula, ou a processos tumorais, como leucemias.

Os processos moleculares envolvidos na regulação da proliferação, diferenciação, circulação, ativação e morte celular são, portanto, de extrema importância para entendermos possíveis alterações que podem levar a doenças auto-imunes, leucemias, falências imunológicas inatas e adquiridas e a partir daí podem contribuir para a criação de alternativas para sanar tais alterações, como terapias gênicas, celulares e anti-tumorais.

## **VI) Conclusões**

- 1) Os animais *gal-3<sup>-/-</sup>* apresentam aumento de precursores de linfócitos B na medula óssea *in vitro* e *ex vivo*, quando comparados aos animais controles. Estes precursores representam as subpopulações pró e pré-B *ex vivo*.
- 2) A presença da linhagem estromal OP9, que expressa galectina-3, não foi suficiente para reverter o aumento de precursores de linfócitos B em co-cultivos com células mononucleares obtidas de medula óssea de animais *gal-3<sup>-/-</sup>*.
- 3) A expressão da citocina IL-7 (importante para a geração de células pró-B e proliferação de células pré-B) nas células estromais *gal-3<sup>-/-</sup>* foi menor que nas células controles.
- 4) As células estromais *gal-3<sup>-/-</sup>* *in vitro* expressam menos GM-CSF que as células estromais normais.

## **VI) Perspectivas**

- 1) Repetir os experimentos de RT-PCR em tempo real para confirmar se as células estromais de medula óssea de animais *gal-3<sup>-/-</sup>* expressam menos IL-7 que as células controles e se possuem menor expressão de GM-CSF.
- 2) Isolar estroma de animais *gal-3<sup>-/-</sup>* e controles para realização de co-culturas, avaliando a cinética de diferenciação de células B sobre esses estromas, a fim de confirmar se o aumento de precursores de linfócitos B em animais *gal-3* não depende diretamente da presença de galectina-3 no estroma.
- 3) Analisar a expressão de fatores de transcrição envolvidos na linfopoese B medular em células obtidas de animais *gal-3<sup>-/-</sup>*, tais como Pax-5, PU.1, EBF e E2A.
- 4) Estudar a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina nos linfócitos B obtidos da medula óssea de animais *gal-3<sup>-/-</sup>*.
- 5) Estudar a morfologia da medula óssea de animais *gal-3<sup>-/-</sup>* utilizando técnicas de imunohistoquímica, para avaliar possíveis diferenças estruturais no microambiente medular quando comparados às medulas controles.
- 6) Estudar a linfopoese no fígado fetal a fim de verificar se a desregulação observada na linfopoese B medular de animais *gal-3<sup>-/-</sup>* acontece também no início do processo linfopoético neste sítio.

## VII) Referências Bibliográficas

- Abbas, A.K. e Lichtman, A.H. (tradução de Claudia Reali). **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro. Elsevier. 5<sup>a</sup> ed., cap.7: 149-156 (2005)
- Acosta-Rodríguez, E.V.; Montes, C.L.; Motrán, C.C.; Zuniga E.I.; Liu F.T.; Rabinovich, G.A.; Gruppi, A. **Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Tripanosoma cruzi* Infection**. *The Journal of Immunology* 2004 Jan 1; 172: 493-502.
- Akashi, K.; Traver, D.; Miyamoto, T.; Weissman, I.L. **A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages**. *Nature* 2000 Mar 9; 404: 193-197.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. and Walter P. **Molecular Biology of the Cell**. New York. Garland Publishing 4<sup>a</sup> ed., pg. 1290 (2002).
- Bao, Q.; Hughes, R.C. **Galectin-3 and polarized growth within collagen gels of wild-type and ricin-resistant MDCK renal epithelial cells**. *Glycobiology* 1995; 9(5): 489-95.
- Barondes, SH; Cooper, D.N.; Gitt, M.A.; Leffler, H. **Galectins. Structure and Function of a Large Family of Animal Lectins**. *The Journal of Biological Chemistry* 1994 Aug 19; 269 (33): 20807-20810.

- Bernardes, E.S.; Silva, N.M.; Ruas, L.P; Mineo, J.R.; Loyola, A.M.; Hsu, D.K.; Liu., F.T.; Chammas, R.; Roque-Barreira, M.C. ***Toxoplasma gondii* Infection Reveals a Novel Regulatory Role for Galectin-3 in the Interface of Innate and Adaptative Immunity.** *American Journal of Pathology* 2006 Jun; 168 (6): 1910-1920.
- Bianco, P.; Riminucci, M.; Gronthos, S.; Robey, P.G. **Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications.** *Stem Cells* 2001; 19: 180-192.
- Boileau, F.; Poirier, E.; Pelletier, J.P.; Guévremont, M.; Duval, N.; Martel-Pelletier, J.; Reboul, P. **Intracellular localisation of galectin-3 has a protective role in chondrocyte survival.** *Ann Rheum Dis* 2008 Feb; 67 (2): 175-181.
- Breuilh, L.; Vanhoutte F.; Fontaine, J.; van Stijn, C.M.; Tillie-Leblond, I.; Capron, M.; Faveeuw, C.; Jouault, T.; van Die, I.; Gosset, P.; Troffein, F. **Galectin-3 modulates immune and inflamatory responses during Helminthic infection: Impact of Galectin-3 deficiency on the functions of dendritic cells.** *Infection and Immunity* 2007 Nov; 75 (11): 5148-5157.
- Castronovo, V.; Van Den Brûle, F.A.; Jackers, P.; Clause, N.; Liu, F.T.; Gillet, C.; Sobel, M. E. **Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer.** *The Journal of Pathology* 1996 May; 179 (1): 43-48.
- Cho, S.K.; Webber, T.D.; Carlyle, J.R.; Nakano, T.; Lewis, S.M.; Zúñiga-Pflücker, J.C. **Functional characterization of B lymphocytes generated**

- in vitro* from embryonic stem cells.** *Proceedings of the National Academy of Science of United State of America* 1999 Aug 17; 96 (17): 9797-9802.
- Colnot, C.; Ripoche, M.A.; Milon, G.; Montagutelli, X.; Crocker, P.R.; Poirier, F. **Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3- null mutant mice.** *Immunology* 1998 Jul; 94 (3): 290-296.
  - Cortegano, I.; del Pozo, V.; Cárdbaba, B.; de Andrés, B.; Gallardo, S.; del Amo, A.; Arrieta, I.; Jurado, A.; Palomino, P.; Liu, F.T.; Lahoz, C. **Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expresión on different cell types.** *The Journal of Immunology*, 1998 Jul 1; 161 (1): 385-389.
  - Cumano, A.; Godin, I. **The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race.** *Nature Reviews. Immunology.* 2002 Aug; 2 (8): 593-604.
  - Cumano, A.; Godin, I. **Ontogeny of the hematopoietic system.** *Annual Review of Immunology.* 2007; 25: 745-785.
  - Danguy, A.; Camby, I.; Kiss, R. **Galectins and cancer.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2002 Sep 19; 1572 (2-3): 285-93.
  - Dennis, J.E.; Charbord, P. **Origin and Differentiation of Human and Murine Stroma.** *Stem Cells* 2002; 20 (3): 205-214.
  - Døsen, G.; Tenstad, E.; Nygren, M.K.; Stubberud, H.; Funderud, S.; Rian, E. **Wnt expression and canonical Wnt signalling in human bone marrow B lymphopoiesis.** *BMC Immunology* 2006 Jun 29; 7: 13.

- Douagi, I.; Vieira, P.; Cumano, A. **Lymphocyte commitment during embryonic development, in the mouse.** *Seminars in Immunology* 2002 Dec; 14 (6): 361-369.
- Domic, J.; Dabelic, S.; Flögel, M. **Galectin-3: an open-ended story.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2006 Apr; 1760 (4): 616-635.
- Dzierzak, E. ; Medvinsky, A. **Mouse embryonic hematopoiesis.** *Trends in Genetics* 1995 Sep; 11(9):359-66.
- Dzierzak, E.; Medvinsky, A.; Bruijn, M. **Qualitative and quantitative aspects of haematopoietic cell development in the mammalian embryo.** *Immunology Today* 1998 May; 19 (5): 228-236.
- Fagarasan, S.; Watanabe, N.; Honjo, T. **Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells** *Immunology Reviews* 2000 Aug; 176: 205-15.
- Fukumori, T.; Kanayama, H.O.; Raz, A. **The role of galectin-3 in cancer drug resistance.** *Drug Resistance Updates* 2007 Jun; 10 (3): 101-108.
- Godin, I.; Dieterlen-Lièvre, F.; Cumano, A. **Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus.** *Proceedings of National Academy of Science of the United State of America* 1995 Jan 31; 92(3): 773-777.
- Godin, I.; Garcia-Porrero, J.A.; Dieterlen-Lièvre, F.; Cumano, A. **Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse**

- intraembryonic sites.** *The Journal of Experimental Medicine* 1999 Jul 5; 190 (1): 43-52.
- Hardy, R.R., Hayakawa, K. **B Cell Development Pathways.** *Annual Review of Immunology* 2001 19: 595-621.
  - Henderson, N.C.; Mackinnon, A.C.; Farnworth, S.L.; Poirier, F.; Russo, F.P.; Iredale, J.P.; Haslett, C.; Simpson, K.J.; Sethi, T. **Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis.** *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America* 2006 Mar 28; 103 (13): 5060-5065.
  - Ho M.K.; Springer, T.A. **Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies.** *Journal of Immunology* 1982 Mar; 128(3): 1221-8.
  - Hoyer, K.K.; Pang, M.; Gui, D.; Shintaku, I.P.; Kuwabara, I.; Liu, F.T.; Said, J.W.; Baum, L.G.; Teitell, M.A. **An Anti-Apoptotic Role for Galectin-3 in Diffuse Large B-Cell Lymphomas.** *American Journal of Pathology* 2004 Mar; 164 (3): 893-902.
  - Hsu, D.K.; Yang, R.Y.; Pan, Z.; Yu, L.; Salomon, D.R.; Fung-Leung, W.P.; Liu, F.T. **Target Disruption of the Galectin-3 Gene Results in Attenuated Peritoneal Inflammatory Responses.** *American Journal of Pathology* 2000 Mar; 156 (3): 1073-1083.
  - Huflejt, M.E.; Turck, C.W.; Lindstedt, R.; Barondes, S.H.; Leffler, H. **L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and**

- serine 12 *in vivo* by caseine kinase I.** *The Journal of Biological Chemistry* 1993 Dec 15; 268 (35): 26712-8.
- Jeng, K.C.; Frigeri, L.G.; Liu, F.T. **An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes.** *Immunology Letters* 1994 Oct; 42 (3): 113-116.
  - Joo, H.G.; Goedegebuure, P.S.; Sadanaga, N.; Nagoshi, M.; von Bernstorff, W.; Eberlein, T.J. **Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes.** *Journal of Leukocyte Biology* 2001 Apr; 69 (4): 555-564.
  - Karlsson, A.; Follin, P.; Leffler, H.; Dahlgren, C. **Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils.** *Blood* 1998 May 1; 91 (9): 3430-8.
  - Kee, B.L.; Murre, C. **Transcription factor regulation of B lineage commitment.** *Current Opinion in Immunology* 2001 Apr; 13 (2): 180-185.
  - Kincade, Paul W. **B lymphopoiesis: Global factors, local control.** *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America* 1994 Apr 12; 91 (8): 2888-2889.
  - Kondo, M.; Weissman, I.L.; Akashi, K. **Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow.** *Cell* 1997 Nov 28; 91 (5): 661-672.
  - Kondo, M.; Scherer, D.C.; King, A.G.; Manz, M.G.; Weissman, I.L. **Lymphocyte development from hematopoietic stem cells.** *Current Opinion in Genetics & Development* 2001 Oct; 11 (5): 520-526.

- Krzeslak, A.; Lipinska, A. **Galectin-3 as a multifunctional protein.** *Cellular and Molecular Biology Letters* 2004; 9 (2): 305-328.
- Le Marer, N. **Galectin-3 expression in differentiating human myeloid cells.** *Cell Biology International* 2000; 24 (4): 245-251.
- Ling, K.; Dzierzak, E. **Ontogeny and genetics of the hemato/lymphopoietic system.** *Current Opinion in Immunology* 2000 Apr; 14 (2):186–191.
- Liu, F.T.; Hsu, D.K.; Zuberi, R.I.; Kuwabara, I.; Chi, E.Y.; Henderson Jr, W.R. **Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macophages.** *The American Journal of Pathology* 1995 Oct; 147(4): 1016-28.
- Liu F.T.; Patterson, R.J.; Wang, J.L. **Intracellular functions of galectins.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2002 Sep 19; 1572 (2-3): 263-273.
- Liu, F.T. **Regulatory roles of galectins in the immune response.** *International Archives of Allergy and Immunology* 2005 Apr; 136 (4): 385-400.
- Lotan, R.; Belloni, P.N.; Tressler, R.J.; Lotan, D.; Xu, X.C.; Nicolson, G.L. **Expression of galectins on microvessel endothelial cells and their involvement in tumor cell adhesion.** *Glycoconjugate Journal* 1994 Oct; 11 (5): 462-468.
- Lotz, M.M.; Andrews Jr, C.W.; Korzelius, C.A.; Lee, E.C.; Steele Jr., G.D.; Clarke, A.; Mercurio, A.M. **Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 31) and loss of its nuclear localization are associated**

**with neoplastic progression of colon carcinoma.** *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America* 1993 Apr 15; 90 (8): 3466-3470.

- Manz, M.G.; Traver, D.; Miyamoto, T.; Weissman, I.L.; Akashi, K. **Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors.** *Blood* 2001 Jun 1; 97 (11): 3333-3341.
- Matthias, P.; Rolink, A.G. **Transcriptional networks in deceloping and mature B cells.** *Nature Reviews Immunology* 2005 Jun; 5 (6): 497-508.
- Medina, K.L.; Singh, H. **Genetic Networks that controls B Lymphopoiesis.** *Current Opinion of Hematology* 2005 May; 12 (3): 203-9.
- Milne, C.D.; Paige, C.J. **IL-7: A key regulator of B lymphopoiesis** *Seminars in Immunology* 2006 Feb; 18 (1): 20-30.
- Montecino-Rodriguez, E.; Leathers, H.; Dorshkind, K. **Bipotential B-macrophage progenitors are present in adult bone marrow** *Nature Immunology* 2001 Jan; 2 (1): 83-8
- Montecino-Rodriguez, E.; Leathers, H.; Dorshkind, K. **Identification of a B1 B cell-specified progenitor.** *Nature Immunology* 2006 Mar; 7 (3): 293-301.
- Moutsatsos, I.K.; Wade, M.; Schindler, M.; Wang, J.L. **Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts.** *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America* 1987 Sep; 84 (18): 6452- 6456.

- Nagasawa, T. **Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development.** *Nature Review Immunology* 2006 Feb 6 (2): 107-116.
- Nakano, T.; Kodama, H.; Honjo, T. **Generation of Lymphohematopoietic Cells from Embryonic Stem Cells in Culture.** *Science* 1994 Aug 19; 265 (5175): 1098-1101.
- Nibbering, P.H., Leijh, P.C., van Furth, R. **Quantitative immunocytochemical characterization of monuclear phagocytes. I. Monoblasts, promonocytes, monocytes, and peritoneal and alveolar macrophages.** *Cellular Immunology* 2001 Apr 1; 105 (2): 374-385.
- Oliveira, F.L., Frazão, P., Chammas, R., Hsu, D.K., Liu, F.T., Borojevic, R., Takya, C.M., El Cheikh, M.C. **Kinetics of mobilization and differentiation of lympho-hematopoietic cells during experimental murine shistosomiasis in galectin<sup>-/-</sup> mice.** *Journal of Leucocyte Biology* 2007 Aug 82, 300-310.
- Perillo, N.L.; Marcus, M.E.; Baum, L.G. **Galectin: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death.** *Journal of Molecular Medicine* 1998 May; 76 (6): 402-412.
- Rabinovich, G.A.; Baum, L.G.; Tinari, N.; Paganelli, R.; Natoli, C.; Liu, F.T.; Iacobelli, S. **Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or turners of the inflammatory responses?** *Trends in Immunology* 2002 Jun; 23 (6): 313-320.

- Rao, S.P.; Wang, Z.; Zuberi, R.I.; Sikora, L.; Bahaie, N.S.; Zuraw, B.L.; Liu, F.T.; Sriramarao, P. **Galectin-3 Functions as an Adhesion Molecule to Support Eosinophil Rolling and Adhesion under Conditions of Flow.** *The Journal of Immunology* 2007 Dec 1; 179: 7800-7807.
- Reya, T.; O'Riordan, M.; Okamura, R.; Devaney, E.; Willert, K.; Nusse, R.; Grosschedl, R. **Wnt signalling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism.** *Immunity* 2000 July; 13:15-24.
- Sánchez, M.J.; Holmes, A.; Miles, C.; Dzierzak, E. **Characterization of the first definitive hematopoietic stem cell in the AGM and liver of the mouse embryo.** *Immunity* 1996 Dec; 5 (6):513-525.
- Sano, H.; Hsu, D.K.; Yu, L.; Apgar, J.R.; Kuwabara, I.; Yamanaka, T.; Hirashima, M.; Liu, F.T. **Human Galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages.** *Journal of Immunology* 2000 Aug 15; 165 (4): 2156-64.
- Sato, S., Hugues, R.C. **Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages.** *The Journal of Biological Chemistry* 1994 Feb 11; 269 (6): 4424-4230.
- Sato, S.; Ouellet, N.; Pelletier, I.; Simard, M.; Rancourt, A.; Bergeron, M.G. **Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during *Streptococcal pneumonia*.** *The Journal of Immunology* 2002 Feb 15; 168: 1813-1822.

- Shimura, T.; Takenaka, Y.; Tsutsumi, S.; Hogan, V.; Kikuchi, A.; Raz, A. **Galectin-3, a novel binding partner of  $\beta$ -catenin.** *Cancer Research* 2004 Sep 15; 64: 6363-6367.
- Shimura, T.; Takenaka, Y.; Fukumori, T.; Tsutsumi, S.; Okada, K.; Hogan, V.; Kikuchi, A.; Kuwano, H.; Raz, A. **Implication of Galectin-3 in Wnt Signalling.** *Cancer Research* 2005 May 1; 65 (9): 3535-3537.
- Silva-Monteiro, E.; Reis Lorenzato, L., Kenji Nihei, O.; Junqueira, M.; Rabinovich, G.A.; Hsu, D.K.; Liu, F.T.; Savino, W.; Chammas, R.; Villa-Verde, D.M. **Altered Expression of Galectin-3 Induces Cortical Thymocyte Depletion and Premature Exit of Immature Thymocytes during *Trypanosoma cruzi* Infection.** *The American Journal of Pathology* 2007 Feb; 170 (2): 546-556.
- Socolovsky, M.; Lodish, H.F.; Daley, G.Q. **Control of hematopoietic differentiation: Lack of specificity in signaling by cytokine receptors.** *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America* 1998 Jun 9; 95 (12): 6573-6575.
- Staal, F.J.T.; Clevers, H.C. **Wnt signalling and haematopoiesis: A Wnt-Wnt Situation.** *Nature Review. Immunology.* 2005 Jan; 5: 21-30.
- Taguchi, T.; Takenouchi, H.; Shiozawa, Y.; Matsui, J.; Kitamura, N.; Miyagawa, Y.; Katagiri, Y.U.; Takahashi, T.; Okita, H.; Fujimoto, J.; Kiyokawa, N. **Interleukin-7 contributes to human pro-B-cell development in a mouse stromal cell-dependent culture system.** *Experimental Hematology* 2007 Sep; 35 (9): 1398-1407.

- Traver, D.; Akashi, K.; Manz, M.; Merad, M.; Miyamoto, T.; Engleman, E.G.; Weissman, I.L. **Development of CD8 $\alpha$ -positive dendritic cells from a common myeloid progenitor.** *Science* 2000 Dec 15; 290 (5499): 2152-2154.
- Truong, M.J.; Gruart, V.; Kusnierz, J.P.; Papin, J.P.; Loiseau, S.; Capron, A.; Capron, M. **Human neutrophils express immunoglobulin E (IgE)-binding proteins (Mac-2/epsilon BP) of the S-type lectin family: role in IgE- dependent activation.** *The Journal of Experimental Medicine* 1993 Jan 1; 177 (1): 243-248.
- Villa-Verde D.M.; Silva-Monteiro, E.; Jasiulionis, M.G.; Farias-De-Oliveira, D.A.; Brentani, R.R.; Savino, W.; Chammas, R. **Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment.** *European Journal of Immunology* 2002 May 32(5): 1434-44.
- Yamaoka, A.; Kuwabara, I.; Frigeri, L.G.; Liu, F.T. **A human lectin, galectin-3 ( epsilon BP/ Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils.** *Journal of Immunology* 1995 Apr 1; 154 (7): 3479-3487.
- Zon L.I. **Developmental biology of hematopoiesis.** *Blood* 1995 Oct 15; 86 (8): 2876-91.
- Zuberi, R.I.; Frigeri, L.G.; Liu, F.T. **Activation of rat basophilic leukemia cells by epsilon BP, an IgE-binding endogenous lectin.** *Cellular Immunology* 1994 Jun; 156 (1): 1-12.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)