

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**O PAPEL DE GALECTINA -3 NA  
MIGRAÇÃO DE MONÓCITOS HUMANOS**

**Cláudia Danella Polli**

**Ribeirão Preto  
2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**CLÁUDIA DANELLA POLLI**

**O PAPEL DE GALECTINA -3 NA  
MIGRAÇÃO DE MONÓCITOS HUMANOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Gabriela Silva Bisson

**Ribeirão Preto  
2008**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA  
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,  
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Polli, Cláudia Danella

O papel de galectina-3 na migração de monócitos humanos

Cláudia Danella Polli; orientador(a): Gabriela Silva Bisson

Ribeirão Preto-SP, 2008. 54p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

**1.** Monócitos. **2.** Galectina-3. **3.** Haptotaxia. **4.** Glicoproteínas da matriz extracelular

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo.

Apoio financeiro: CNPq e Fapesp

## **Dedico:**

*Aos grandes amores da minha vida,  
meus pais e minha irmã Renata por  
serem a base da minha vida. Pelo  
constante apoio, incentivo, confiança  
e amor incondicional.*

*Ao meu querido Gustavo, pelo  
companheirismo, ajuda constante,  
paciência e carinho em todos os  
momentos.*

## ***Agradecimentos***

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho, em especial:

À minha querida orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>, Gabriela Silva Bisson, por ter acreditado no meu potencial ao me aceitar como aluna, por todos os ensinamentos que muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para a minha formação. Agradeço também por todas as agradáveis conversas, que resultaram em inspiração e ânimo para continuar meu trabalho.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Cristina Roque Barreira, por ter aberto o seu laboratório para que este projeto pudesse ser realizado, propiciando todas as condições para o seu desenvolvimento.

À dedicada amiga Karina, por todo o auxílio e atenção desprendidos durante todo o desenvolvimento deste trabalho, mesmo que a quilômetros de distância. Além da grande amizade, repleta de momentos agradáveis e muito divertidos!

Ao Leandro (Trança), pela atenção e prontidão em solucionar todos os meus problemas ou em responder minhas dúvidas. Pelas boas risadas também!

Aos meus adoráveis amiguinhos Alan, Aline, Camilinha, Gustavo, Lu Ruas, Marina, Silvia e Vânia, sempre prontos a ajudar. É muito bom trabalhar tendo a agradável presença de pessoas assim, capazes de tornar os meus dias mais felizes e meus problemas menos significantes. Adoro vocês!

À Érica Vandrúsculo, pelo grande auxílio com todas as partes burocráticas.

À Patrícia E. Vandrúsculo e Sandra M.O. Tomás, por toda ajuda na parte técnica.

À Ana Cristine S. Ferreira, pela atenção, competência, dedicação à pós-graduação e à Rosângela C.P. Mesquita, sempre prestativa.

À Maria Inês A. Castania e Lúcia M. Lacerda da Silva, pela limpeza dos materiais e do laboratório e por toda ajuda prestada.

Aos experientes colegas Ebert (Ita), Emerson e Sandro pelas dicas e sugestões na elaboração desse projeto.

Aos colegas Ana Cláudia, Camila, Carla, Fabrícia, Fausto, Fernanda, Fernando, Livia, Marcel, Marina C., Marise, Nerry, pelos agradáveis momentos de amizade e companheirismo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Ensino do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

"Pesquisar é ver o que outros viram, e pensar  
o que nenhum outro pensou."

(Albert Szent-Gyorgyi)

## Resumo

Galectina-3, dentre outras atividades, comporta-se como uma molécula atraente para monócitos e macrófagos. Através de citometria de fluxo e microscopia confocal, observamos que hrGal-3 se liga à superfície de monócitos humanos, via CRD, uma vez que esta interação é inibível por lactose. Através da separação eletroforética de extratos protéicos das porções citoplasmática e de membrana de monócitos, seguida da eletrotransferência para membrana de nitrocelulose e seqüenciamento proteico das bandas obtidas, foram identificadas como moléculas ligantes de galectina-3: integrinas  $\alpha$ IIb e  $\beta$ 3,  $\alpha$ actinina-1 e vinculina. Confirmamos alguns dados anteriores da literatura de que hrGal-3, é capaz de induzir migração de monócitos de maneira dose-dependente, proporcionando uma curva em forma de sino característica de outros atraentes. Com o intuito de melhor caracterizarmos os mecanismos envolvidos na migração de monócitos induzida por galectina-3, avaliamos também se hrGal-3 induz migração de monócitos por mecanismo haptotático. Nossos resultados demonstram que hrGal-3 induz migração de monócitos humanos por haptotaxia, mecanismo viabilizado pela interação da lectina com as glicoproteínas da matriz extracelular, laminina e fibronectina. Os domínios N- e C-terminal de galectina-3 estão envolvidos na interação da lectina com laminina, enquanto na interação com fibronectina está envolvido principalmente o domínio N-terminal.

Palavras-chave: Monócitos; galectina-3; haptotaxia; glicoproteínas da matriz extracelular.

## Abstract

Galectin-3, among other activities, behaves itself as an attractant molecule for monocytes and macrophages. Using flow cytometry and confocal microscopy, we observed that hrGal-3 binds to the surface of human monocytes, through its CRD, since this interaction can be inhibited by lactose. Following electrophoretic separation of cytoplasmic and membrane portions of monocyte protein extracts, electrotransference to nitrocellulose membrane and protein sequencing of the obtained bands, we identified as ligands for galectin-3:  $\alpha$ IIb and  $\beta$ 3 integrins,  $\alpha$ actinin-1 and vinculin. We corroborated some data of literature that hrGal-3 is able to induce monocyte migration in a dose-dependent manner, resulting in a bell-shaped curve as seen with other known attractants. To better characterize the mechanisms involved in galectin-3 induced monocyte migration, we also evaluated if hrGal-3 induced monocyte migration by a haptotactic mechanism. Our results showed that hrGal-3 induces monocyte migration by haptotaxis, through the interaction between the lectin and extracellular matrix glycoproteins, laminin and fibronectin. The galectin-3 N- and C-terminal domains are involved in the interaction between such lectin and laminin, while the N-terminal is the mainly involved domain in the interaction between the lectin and fibronectin.

Keywords: Monocytes; galectin-3; haptotaxis; extracellular matrix glycoproteins.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Análise eletroforética das preparações de hrGal-3.....	23
<b>Figura 2.</b> Ligação de hrGal-3 exógena à superfície de monócitos humanos.....	26
<b>Figura 3.</b> Ligação de hrGal-3 exógena à superfície de monócitos humanos.....	27
<b>Figura 4.</b> Identificação eletroforética de componentes de monócitos ligantes de galectina-3.....	29
<b>Figura 5.</b> Migração de monócitos induzida por hrGal-3.....	31
<b>Figura 6.</b> Haptotaxia de monócitos humanos induzida por hrGal-3.....	32
<b>Figura 7.</b> Haptotaxia de monócitos em resposta à hrGal-3 associada a glicoproteínas da matriz extracelular.....	34
<b>Figura 8.</b> Envolvimento do N- e do C-terminal de hrGal-3 na haptotaxia de monócitos humanos.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

BCA: Bicinchoninic acid

BSA: Albumina de soro bovino

C5a: Componente do sistema complemento 5a

CAM: Moléculas de adesão celular

CD62-L: Molécula de adesão celular de leucócitos

CRD: Domínio de reconhecimento de carboidrato

CCR1: Receptor de quimiocina 1

CCR2: Receptor de quimiocina 2

CCR5: Receptor de quimiocina 5

CX3CL1: Ligante 1 de quimiocina

CX3CR1: Receptor quimiocina

CXCR2: Receptor  $\beta$  de interleucina-8

CXCR4: Receptor específico para SDF-1 (CXCL12)

ECM: Matriz extracelular

ELISA: “Enzyme Linked Immunosorbent assay” (ensaio imunoenzimático)

FITC: Fluorescein isothiocyanate

fMLP: Formol-Metionina-leucina-fenilalanina

GPCR: Receptores acoplados à proteína G

HEMA-3: Kit de coloração

ICAM: Molécula de adesão intercelular

IPTG: Isopropiltio-b-D-Galactosídeo

KO: “Knock Out”, nocaute

LAL: Lisado de amebócito de *Limulus sp*

LAMP1 : Proteína de membrana associada ao lisossomo 1

LAMP2: Proteína de membrana associada ao lisossomo 2

LB: Meio de cultura Luria-Bertani

LPS: Lipopolissacaríseo

LTB4: Leucotrieno B4

MCP-1: Proteína-1 quimioatraente de monócitos

NBT-BCIP: Nitro blue tetrazolium-5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

PBS: Salina tamponada com fosfato

PTx: Toxina pertussis

RGD: Sequência de aminoácidos arg-gly-asp

RPMI: Meio de cultura celular

SDS: Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis

TEM: Migração transendotelial

Tween 20: Polioxietileno sorbitan mono-laurate

VCAM-1: Molécula de adesão celular vascular 1

VLA-4: Integrina  $\alpha 4\beta 1$

# SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
1. Monócitos.....	1
2. Migração celular.....	2
3. Glicoproteínas da Matriz extracelular.....	6
4. Galectina-3: um mediador inflamatório.....	8
OBJETIVOS.....	13
MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
1. Reagentes.....	14
2. Purificação de hrGal-3.....	14
3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	15
4. Biotinilação de hrGal-3.....	15
5. Obtenção de monócitos humanos.....	16
6. Citometria de fluxo.....	16
7. Microscopia confocal.....	17
8. Western blot.....	17
9. Quimiotaxia e Haptotaxia.....	18
RESULTADOS.....	20
1. hrGalectina-3 purificada e depletada de LPS apresenta banda única de 26 kDa....	20
2. Galectina-3 se liga a componentes glicosilados da superfície de monócitos humanos.....	22
3. Galectina-3 induz migração de monócitos humanos de maneira dose dependente.....	28
4. Galectina-3 induz haptotaxia de monócitos humanos.....	29

5. Associação entre hrGal-3 e glicoproteínas da matriz extracelular na haptotaxia de monócitos humanos.....	31
6. O N- e o C-terminal de hrGal-3 estão envolvidos na haptotaxia de monócitos humanos.....	33
DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

## 1. Monócitos.

A resposta inflamatória pode ser dividida em dois tipos: aguda e crônica. A inflamação aguda é limitada à uma resposta particularmente benéfica durante os desafios infecciosos, enquanto a inflamação crônica é um fenômeno persistente, que pode progredir para doenças inflamatórias. Uma característica da inflamação aguda é o infiltrado inicial composto de neutrófilos que, após 24 a 48h passa a ser predominantemente composto de células monocíticas (Kaplanski *et al.*, 2003). Monócitos possuem um importante papel tanto nas respostas imunes inatas quanto adaptativas, eliminando patógenos microbianos e células tumorais, e exercendo funções imunoregulatórias através da produção de citocinas e do processamento e apresentação de antígenos para linfócitos.

Monócitos originam-se na medula óssea a partir de progenitores mielóides comuns, que também dão origem aos neutrófilos. Após saírem da medula óssea, as células monocíticas indiferenciadas se mantêm circulantes na corrente sanguínea por volta de 3 dias, em seguida penetram o tecido repovoando a população de macrófagos teciduais (Volkman and Gowans, 1965). Essa curta meia-vida tem sustentado o conceito de que os monócitos circulantes devem repovoar continuamente a população de macrófagos e células dendríticas, mantendo a homeostase e, durante processos inflamatórios desempenham papéis críticos nas respostas imunes (Ziegler-Heitbrock, 2000).

A população de monócitos humanos constitui de 5 a 10% dos leucócitos do sangue periférico, sendo que sua morfologia é bastante heterogênea. Há variação entre as células quanto ao tamanho, aos diferentes graus de granulosidade e à morfologia nuclear (Gordon and Taylor, 2005).

Em humanos, os monócitos circulantes se dividem em dois subtipos baseados na expressão de CD14, componente do complexo receptor de lipopolissacarídeo (LPS), e de CD16, receptor de imunoglobulina FC $\gamma$ RIII, sendo que essas populações celulares são

ativadas por diferentes estímulos. As células CD14<sup>+</sup> compõem 80% a 90% da população monocítica. Em geral são células um pouco maiores, expressam altos níveis de CCR1, CCR2, CXCR2, CD62-L e CD11-b, e respondem ao MCP-1 em ensaios de migração celular. Já as células CD16<sup>+</sup> expressam altos níveis de CX3CR1 e em ensaios de migração respondem a CX3CL1 (Serbina *et al.*, 2008).

É notável a grande capacidade de monócitos circulantes se diferenciarem em uma ampla variedade de células fagocíticas, incluindo macrófagos, células dendríticas, osteoclastos, microglia no sistema nervoso central, e células de Kupfer no fígado. Além disso, em situações específicas, como na presença de estímulos, pode haver a diferenciação de monócitos em células não fagocíticas (Seta and Kuwana, 2007).

## **2. Migração celular**

Um evento fundamental para que ocorra a resposta inflamatória e a defesa do organismo contra agentes infecciosos é a migração direcionada de leucócitos do interior dos vasos sanguíneos para os tecidos perivasculares. Esse processo complexo e precisamente regulado ocorre devido a múltiplas interações adesivas dos leucócitos com as células endoteliais e componentes do tecido perivascular, estando envolvidas diferentes famílias de moléculas, como selectinas e integrinas (Butcher, 1991; Luster, 1998; Springer, 1995). Esta migração pode se dar por mecanismo quimiotático ou haptotático. No primeiro caso o quimioatraente atua em sua forma solúvel, enquanto no segundo, ele se encontra ligado a um substrato sólido, como os componentes da matriz extracelular, da superfície das células endoteliais ou do tecido conjuntivo perivascular (Qi *et al.*, 2001; Rot, 1992).

O modelo de quimiotaxia encontra algumas dificuldades para se concretizar. A viabilidade do gradiente solúvel estaria atrelada a uma reposição contínua, já que as condições locais de fluxo sanguíneo ou plasmático constantes não favorecem a

manutenção de um gradiente de substâncias solúveis (Rot, 1992; Tanaka *et al.*, 1993). Por outro lado, a hipótese de haptotaxia parece ser mais realística, tendo sido fundamentada por vários estudos *in vitro*. Através deste mecanismo, o leucócito, seletivamente ativado por quimiocinas ligadas à membrana basal e/ou matriz extracelular do endotélio, passa a aderir firmemente às células endoteliais através da ação de selectinas, inicialmente, e integrinas, subseqüentemente. O modelo de haptotaxia também seria importante no direcionamento da migração do leucócito no tecido perivascular em direção ao local de inflamação ou infecção (Acker *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1993).

As moléculas de adesão celular (CAM) são receptores de superfície que medeiam as interações célula-célula e célula-matriz extracelular. A expressão das moléculas de adesão pelos diferentes tipos de leucócitos é variável e, em algumas situações, está associada ao estado de ativação da célula.

A adesão inicial dos leucócitos ao endotélio vascular, no processo de migração celular, é mediada por glicoproteínas denominadas selectinas, expressas na superfície de leucócitos (selectina-L), plaquetas (selectina-P) e células endoteliais (selectinas-E e P) (Lasky, 1992). A selectina-L é de expressão constitutiva na superfície de leucócitos, participando na adesão de linfócitos às vênulas endoteliais altas (HEVs- *high endothelial venules*) dos linfonodos periféricos e, na adesão de neutrófilos e monócitos ao endotélio vascular nos sítios de inflamação (Gallatin *et al.*, 1983; Lasky, 1992; Lewinsohn *et al.*, 1987).

Através das interações fracas estabelecidas pelas selectinas e seus ligantes glicosilados, os leucócitos realizam vários contatos reversíveis com o endotélio vascular (*tethering* ou *tateamento*). Estabelecem-se, então, novas interações adesivas, sob condições de fluxo sanguíneo, que resultam no movimento de deslizamento (*rolling* ou *rolamento*) dos leucócitos ao longo da superfície endotelial. Esse movimento leucocitário permite a

análise da superfície endotelial, na tentativa de encontrar quimiotraentes e receptores de integrina. As interações mediadas pelas selectinas são fundamentais para que a próxima etapa, a firme adesão dos leucócitos, ocorra (Lasky, 1992; Rossiter *et al.*, 1997).

Integrinas, glicoproteínas constituídas por duas subunidades transmembrânicas não covalentemente associadas ( $\alpha$  e  $\beta$ ), também participam do *rolling* e, em adição, medeiam a adesão firme dos leucócitos ao endotélio, através de interações estabelecidas com seus ligantes expressos na superfície das células endoteliais como as moléculas ligantes da superfamília das imunoglobulinas - ICAM-1, ICAM-2 e VCAM-1 (revisto por Wagner and Roth, 2000; revisto por Ley *et al.*, 2007). O *rolling* dependente de VLA-4 (integrina  $\alpha 4\beta 1$ ) tem sido descrito para monócitos e linhagens celulares monocíticas (Chan *et al.*, 2001; Huo *et al.*, 2000). Além da função adesiva, as integrinas apresentam funções de sinalização.

A maioria dos leucócitos circulantes mantém as integrinas em um estado de baixa afinidade (da Costa Martins *et al.*, 2007). Para apresentarem uma alta avidéz por seus ligantes endoteliais e estabelecerem uma firme adesão dos leucócitos ao endotélio, as integrinas devem ser moduladas. Quimioatraentes clássicos e quimiocinas são os mais potentes ativadores fisiológicos da adesão mediada por integrinas. Particularmente as quimiocinas são capazes de regular rapidamente a avidéz de integrinas, de maneira célula-específica, através do aumento, tanto da afinidade, quanto da valência dessas moléculas (Constantin *et al.*, 2000; Laudanna *et al.*, 2002; Shamri *et al.*, 2005). A ligação de GPCRs (G-protein coupled receptors) heterotriméricos específicos pelas quimiocinas leva a ativação das integrinas através da indução de uma complexa cascata de sinalização intracelular. A sinalização ativada por quimiocinas pode regular diferentes integrinas em subtipos distintos de leucócitos, o que demonstra a existência de diferentes módulos de sinalização, integrina e célula-específicos (revisto por Ley *et al.*, 2007).

Integrinas ativadas por GPCRs necessitam estar propriamente ancoradas ao citoesqueleto de actina para estabelecerem adesão sob condições de fluxo. Nesse sentido, moléculas adaptadoras do citoesqueleto como a paxilina exercem papéis importantes (Hyduk *et al.*, 2004).

Além de mediar as interações célula-célula, as integrinas constituem a principal família de receptores que medeiam a ligação de células à matriz extracelular, através do reconhecimento da RGD (Arg-Gly-Asp), presente em muitas glicoproteínas da matriz (fibronectina, laminina, colágeno, trombospodina, vitronectina, entactina, tenascina) (Ruoslahti, 1991; Ruoslahti and Pierschbacher, 1987).

Uma vez estabelecida no endotélio a firme adesão dos leucócitos, essas células sofrem uma alteração morfológica denominada polarização. A polarização é induzida principalmente por quimiocinas e envolve a reorganização do citoesqueleto de actina, do Golgi, do centro organizador de microtúbulos, assim como a redistribuição de moléculas da superfície celular (Arnaout *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2003; Shamri *et al.*, 2005). Subseqüentemente, os leucócitos migram sobre a superfície apical do endotélio em direção às junções interendoteliais, pelas quais podem transmigrar para o tecido subendotelial (Rose *et al.*, 2007). Após penetrarem a barreira composta pelas células endoteliais os leucócitos precisam, então, migrar através da membrana basal (Ley *et al.*, 2007).

As várias etapas do processo de migração transendotelial (TEM) de leucócitos ocorrem de uma maneira dinâmica, havendo a participação de várias moléculas de adesão. Sugere-se que em monócitos há a participação de integrinas  $\beta 3$  na TEM, uma vez que, em ensaios de TEM *in vitro*, células de linhagem monocítica deficientes desta integrina apresentaram uma menor capacidade migratória quando comparadas com células de linhagem monocítica que expressam a molécula. A transfecção da cadeia  $\beta 3$  para as células deficientes conferiu às mesmas um aumento na capacidade migratória. Além disso,

observou-se que as células de linhagem monocítica transmigraram preferencialmente através de monocamadas celulares que expressam ICAM-1 (Weerasinghe *et al.*, 1998).

Vencida a barreira endotelial, o leucócito passa a se mover em direção de ao gradiente de atraente, estabelecido no espaço subendotelial. O atraente pode dirigir o movimento do leucócito, ainda localizado na junção endotelial, desde que se difunda e estabeleça um gradiente juncional, a partir do sub-endotélio (Zocchi *et al.*, 1996).

### **3. Glicoproteínas da matriz extracelular**

A função considerada básica da matriz extracelular é conferir sustentação e firmeza aos tecidos e órgãos. Entretanto, componentes da matriz estão envolvidos em processos de diferenciação, proliferação, polarização, sinalização e migração celular (Har-el and Tanzer, 1993; Schuppan and Rühl, 1994). A matriz extracelular corresponde a um conjunto de moléculas de tecido conjuntivo compreendendo colágeno, laminina, fibronectina, trombospondina, vitronectina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos (ácido hialurônico) (Schuppan and Rühl, 1994).

A laminina é uma glicoproteína predominante na membrana basal composta por três diferentes cadeias polipeptídicas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) unidas por pontes dissulfeto, arranjadas em uma estrutura cruciforme. Existem pelo menos 5 tipos de cadeia  $\alpha$ , que diferem no tamanho e na estrutura. A combinação das cadeias  $\alpha$  com diferentes cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  resulta em diferentes isoformas de laminina (Ferletta and Ekblom, 1999; Timpl, 1996). A isoforma mais estudada é a clássica laminina isolada de tumor Elgelbreth-Holm-Swarm (EHS) de camundongo (~900 kDa), a qual é constituída por uma cadeia  $\alpha$  (400-440 kDa) associada às cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  (cada uma 200-220 kDa) (Timpl, 1989; revisto por Beck e colaboradores (1990). Análises da composição de glicanas em laminina purificada de sarcoma Elgelbreth-Holm-Swarm (EHS) de camundongo revelaram um padrão de N-

glicosilação bastante heterogêneo, apresentando oligossacarídeos do tipo-complexo bi- tri- e tetra-antênários com cadeias laterais contendo unidades repetitivas de  $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3$  ligadas ao *core* trimanosídeo, com ou sem ácido siálico terminal e oligossacarídeos do tipo *high-mannose* (Arumugham *et al.*, 1986; Fujiwara *et al.*, 1988; Knibbs *et al.*, 1989). Essa glicoproteína participa de várias atividades biológicas, incluindo adesão, crescimento e diferenciação de vários tipos celulares.

Fibronectina desempenha função fundamental na adesão entre células e matriz extracelular. Elas são encontradas no sangue como glicoprotéínas solúveis, no tecido conjuntivo frouxo e na maioria das matrizes extracelulares mesenquimais. Coágulos também apresentam grandes quantidades de fibronectina associada com fibrina, que servem como substrato para células migratórias durante o remodelamento tecidual. Fibronectina é formada por duas cadeias polipeptídicas idênticas e compostas por três tipos de unidades repetitivas (tipo I, II e III), sendo que a maior parte da molécula consiste de repetições tipo III. Vários domínios nessas moléculas apresentam determinantes de ligação específicos para fibrina, heparina, colágeno, integrinas e outras moléculas. Muitas células aderem à fibronectina através do domínio central que apresenta a sequência de reconhecimento RGD (Har-el and Tanzer, 1993). Análises da composição de glicanas em fibronectina humana de placenta revelaram que esta glicoproteína contém nove cadeias de açúcar, sendo (1) resíduos de galactose contendo ácido siálico em suas posições C-3; (2) oligossacarídeos bi- e tetra-antênários tendo como cadeia principal  $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4(\alpha\text{Fuc} 1-6)\text{GlcNAc}$ , e (3) repetitivos grupamentos de N-acetilglicosamina e  $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1$  (Takamoto *et al.*, 1989).

Vitronectina é uma glicoproteína monomérica de 75 kDa encontrada no plasma e na matriz extracelular, que pode mediar adesão celular, proteger células da destruição por complexos formados pela ativação do complemento e proteger a trombina da inativação

pela antitrombina III (Tomasini and Mosher, 1991). A ligação de células à vitronectina ocorre através da sequência RGD, reconhecida por integrinas (Suzuki *et al.*, 1985). Os complexos receptor-vitronectina localizam-se em regiões de adesão focal das células, em associação com elementos do citoesqueleto intracelular (vinculina, talina, paxilina e as extremidades de microfilamentos de actina).

#### **4. Galectina-3: um mediador inflamatório**

Lectinas são todas as proteínas que possuem pelo menos um domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) e que se ligam especificamente a açúcares, de maneira reversível (VAN-DAMME, E. Resumo apresentado no 20<sup>th</sup> International Lectin Meeting - Copenhagen - Dinamarca, maio de 2002). As lectinas são capazes de se ligar seletivamente a glicanas da superfície de muitas células. Essa ligação modifica a fisiologia da membrana e/ou induz sinalização celular de maneira a induzir diversas respostas bioquímicas celulares, através da decodificação da informação biológica contida nas células (Sharon and Lis, 1993).

As lectinas animais fazem parte de um importante grupo de moléculas que participam da defesa imunitária, especialmente da imunidade inata, atuando na primeira linha de defesa (Gabius and Wu, 2007).

Galectina-3, uma proteína ligante de  $\beta$ -galactosídeo pertencente à família das galectinas animais, está envolvida em vários processos biológicos. Sua estrutura é formada por (A) um domínio carboxi-terminal que corresponde ao sítio de ligação com carboidrato (CRD); e por (B) um pequeno domínio amino-terminal de ligação protéica, que contém seqüências repetidas em *tandem* ricas em prolina, tirosina e glicina (Liu, 1990).

Galectina-3 é encontrada no núcleo, no citoplasma e na superfície de muitas células. Recebendo a denominação Mac-2, foi descrita como expressa na superfície de

macrófagos elicitados com tioglicolato (Ho and Springer, 1982). Foi posteriormente identificada, em vários níveis de expressão, numa grande variedade de tipos celulares, tais como eosinófilos, neutrófilos, células dendríticas, mastócitos, linfócitos, células de Langerhans e células epiteliais (Flotte *et al.*, 1983; Foddy *et al.*, 1990; Haines *et al.*, 1983; Nabarra and Papiernik, 1988; Truong *et al.*, 1993). Uma vez liberada, essa lectina pode funcionar como uma molécula extracelular que ativa diferentes células. As características de galectina-3 e sua capacidade de induzir a ativação de mastócitos, monócitos/macrófagos, neutrófilos e linfócitos, sugere uma possível participação dessa molécula na modulação de interações imunes e respostas inflamatórias (Hsu *et al.*, 2000; Rabinovich *et al.*, 2004; Rubinstein *et al.*, 2004).

As funções biológicas da galectina-3 incluem a regulação do crescimento celular, apoptose, transformações neoplásicas e respostas inflamatórias (Hsu *et al.*, 2000). Os papéis exercidos pela galectina-3 na inflamação envolvem suas funções intra e extracelulares e a sua expressão aumenta durante este processo, assim como na proliferação e diferenciação celulares (Sano *et al.*, 2000). Em camundongos geneticamente deficientes em galectina-3 (gal3-KO) observou-se redução significativa no acúmulo de células inflamatórias (macrófagos e neutrófilos) no modelo de peritonite aguda, reforçando a idéia de que galectina-3 exerça importante papel neste processo (Hsu *et al.*, 2000).

Outro fenômeno demonstrado foi a atividade anti-apoptótica da galectina-3 exógena. Sua porção carboxi-terminal apresenta uma seqüência altamente conservada encontrada em Bcl-2, que tem atividade supressora de apoptose (Akahani *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1996). Portanto, é possível que a expressão de galectina-3 em células inflamatórias possa também prolongar a sobrevivência dessas células, e assim contribuir para a persistência da inflamação, sustentando sua função pró-inflamatória (Hsu *et al.*, 2000).

Galectina-3 tem a capacidade de se autossociar funcionando de maneira multivalente, em certas condições. Isso a torna adequada para o exercício da função de adesão celular, tanto célula-célula quanto célula-matriz extracelular (Kuwabara and Liu, 1996). Esta lectina promove a adesão de neutrófilos humanos a superfícies revestidas com laminina de modo dependente do CRD. Alternativamente, galectina-3 induz a adesão de neutrófilos a superfícies revestidas com fibronectina de modo dependente da expressão de integrinas  $\beta_2$  (Kuwabara and Liu, 1996). Essas observações sugerem que galectina-3 possa mediar a adesão de neutrófilos através de dois mecanismos: (1) a lectina medeia a adesão de neutrófilos à laminina de modo independente de integrinas  $\beta_2$ , mas dependente do reconhecimento de carboidrato; (2) a lectina induz a ativação de neutrófilos, de modo dependente do CRD, resultando na expressão de outras moléculas de adesão.

Em linhagens celulares de carcinoma mamário, a super expressão de galectina-3 leva a uma série de modificações, como um significativo aumento da adesão à laminina, fibronectina e vitronectina, ocorrido de maneira direta ou através do aumento da expressão de integrinas específicas. O aumento da adesão das células tumorais à matriz extracelular, induzido pela galectina-3, pode ter um papel importante no mecanismo de invasão e metástase tumorais (Matarrese *et al.*, 2000).

Em sítios inflamatórios, juntamente com outras moléculas de adesão, galectina-3, liberada por células epiteliais ou inflamatórias, pode exercer um papel importante na promoção da transmigração de neutrófilos através da membrana basal (CARON and SÈVE, 2000).

KM<sup>+</sup> de *A. integrifolia* é outra lectina dotada de capacidade de induzir a migração de neutrófilos, através de mecanismo haptotático. Esta lectina tetramérica interage, de modo dependente dos CRDs, tanto com os componentes glicosilados da superfície do neutrófilo, quanto os da matriz extracelular. A sua interação com o neutrófilo é

estabelecida pelo reconhecimento de glicanas do receptor CXCR2 (Pereira-da-Silva *et al.*, 2006), enquanto a interação com o endotélio vascular e/ou matriz extracelular envolve a ligação a glicanas de laminina (Ganiko *et al.*, 1998; Ganiko *et al.*, 2005).

Além da participação da galectina-3 na migração de neutrófilos, foi comprovado em ensaios *in vitro* que galectina-3 recombinante (rGal-3) induz a migração de monócitos de forma passível de inibição por lactose, e também atrai macrófagos do sangue periférico e alveolares. Essa atividade parece ser dependente de ambos os domínios, amino e carboxi terminais. A migração de monócitos humanos induzida por galectina-3 ocorre de maneira dose-dependente; em altas concentrações a lectina é quimiotática, enquanto em baixas concentrações, quimiocinética. Galectina-3 também induz a produção de superóxido por monócitos (Sano *et al.*, 2000).

A potência de galectina-3 como quimioatraente de monócitos e macrófagos humanos é muito maior do que a clássica proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) (Almkvist and Karlsson, 2002). A quimioatração de macrófagos é muito relevante, já que existem poucos quimioatraentes para macrófagos maduros. A migração de monócitos induzida por galectina-3 pode ser parcial ou totalmente inibida por toxina pertussis (PTx), dependendo da concentração de galectina. No entanto, a migração induzida por MCP-1 é totalmente inibida por PTx, independentemente da concentração do atraente. Um receptor sensível a PTx é considerado ser acoplado à proteína G, e esse tipo de receptor parece estar envolvido na migração de monócitos induzida por galectina-3. Em ensaios com camundongos deficientes de galectina-3 também se observou a redução na concentração de macrófagos peritoneais exsudados em resposta à injeção de tioglicolato, reforçando a idéia de que galectina-3 tenha atividade quimioatraente sobre essas células (Sano *et al.*, 2000).

A migração de monócitos induzida por galectina-3 pode ocorrer por diversos mecanismos. No entanto, tem-se na haptotaxia um importante e eficiente mecanismo para

induzir células do sistema imune a se movimentarem em direção ao sítio inflamatório. Sendo galectina-3 um indutor da migração de monócitos e da sua ativação, capaz ainda de se associar com laminina, é plausível considerar que ela possa recrutar monócitos através de mecanismo haptotático. Outra questão a ser respondida refere-se à identificação dos ligantes expressos na superfície de monócitos e na matriz extracelular.

Este trabalho foi delineado com o intuito de:

1. Comprovar a ocorrência de ligação de galectina-3 à superfície de monócitos humanos;
2. Identificar os ligantes de galectina-3 expressos em monócitos humanos;
3. Investigar os mecanismos envolvidos na migração de monócitos humanos induzida por galectina-3, incluindo a participação de glicoproteínas da matriz extracelular.

**Projeto analisado e aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep), processo número 10461/2006.**

### **1. Reagentes**

Laminina, fibronectina, vitronectina,  $\beta$ -lactose e albumina sérica bovina (BSA) utilizados foram de procedência Sigma chemical Co., St Louis, MO, USA. Anticorpo murino anti-CD14 humano (Caltag laboratories, Burlingame, CA). Estreptoavidina-FITC (SA-FITC; Pierce), estreptoavidina-Alexa fluor-594 (Molecular Probes Eugene, Oregon, USA). MCP-1 (Prepo Tech, Rocky Hill, NJ). Meio de cultura RPMI (RPMI-1640; Gibco-BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA).

### **2. Purificação de hrGal-3**

hrGal-3 foi obtida conforme descrito por HSU *et al.* 1992. Resumidamente, bactérias *E. coli* M15 expressando galectina-3 humana recombinante foram cultivadas em 2L de meio Luria-Bertani (LB) broth (Acumedia Manufacturers, Inc. Michigan 48912, USA) suplementado com 100  $\mu$ g/ml de ampicilina (USB Corporation, Cleveland USA). A cultura foi mantida sob agitação constante (200 rpm) durante 4h a 37°C, na presença de 1 mM de IPTG (isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, a cultura foi centrifugada por 20 min, 5000  $xg$  a 4°C e o sobrenadante descartado para submissão do pellet (acrescido de inibidores de proteases) a 5 ciclos de sonicação de 1 min cada. Após nova centrifugação por 45 min, 10000  $xg$  a 4°C o sobrenadante foi coletado e submetido a cromatografia de afinidade em coluna de agarose contendo lactose imobilizada. Durante este procedimento a coluna de lactose foi incubada por 1h com o sobrenadante obtido e o material não ligante, eluído com PBS, pH 7.2. O material retido foi recuperado com a adição de  $\beta$ -lactose 0,1 M a 4°C. O *pool* de frações ligantes à lactose foi submetido à ultradiafiltração em membrana YM-10 (Amicon<sup>®</sup> Division, W. R., Grace

& Co., MA. USA). As amostras foram ainda depletadas de LPS através de cromatografia de afinidade em coluna de polimixina B (Detoxi-gel- Pierce Rockford, IL, USA) e submetidas ao método de BCA (Sigma) para estimar a concentração protéica de cada preparação. A pureza das preparações foi avaliada através de análise eletroforética para constatação de banda única de 26 kDa e do teste de LAL (Limulus Amebocyte Lysate) (Kit QCL-1000- Quantitative Cromogenie- Bio Whittaker- ACAMBREX company) para a detecção de endotoxinas.

### **3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Nossas análises foram realizadas em sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3 Electrophoresis Cell (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Para tanto, géis de poliacrilamida (10 ou 12%) receberam amostras diluídas em tampão de amostra redutor (10 mM Tris/HCl (pH 6.8)/1% (w/v) SDS/25% (v/v) glycerol/0.1 mM 2-mercaptoethanol/0.03% (w/v) Bromophenol Blue) e detergente de carga negativa (dodecil sulfato de sódio, SDS) e foram submetidos a corrida sob 200 volts constantes e corrente em torno de 30 mA durante aproximadamente 45 minutos.

A presença de bandas protéicas foi revelada pela coloração de azul de comassie coloidal, e seus pesos moleculares aparentes determinados com base na migração de proteínas padrões (BIO-RAD; fermentas).

### **4. Biotinilação de hrGal-3**

hrGal-3 foi conjugada com Sulf $\alpha$ -NHS-LC-biotina (Pierce) de acordo com recomendações do fabricante. Amostra de 430  $\mu$ g de galectina foi diluída em 220  $\mu$ l de tampão bicarbonato de sódio 50 mM, pH 8.5, seguindo-se adição de 16  $\mu$ l da solução de biotina (1mg/ml). Após incubação durante 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação

constante, a preparação foi submetida à diafiltração contra PBS utilizando-se sistema Centricon YM10 (Centricon®, Amicon, Inc., Beverly, MA, USA).

### **5. Obtenção de monócitos humanos**

Monócitos humanos foram isolados a partir do sangue periférico de voluntários sadios. Células mononucleares foram adquiridas pela centrifugação (400  $xg$ , 40 min, 20°C) de suspensão de sangue total diluído (1:1), em meio RPMI, em gradiente Ficoll Hypaque Plus (Amersham Biociences, Uppsala, Sweden). O anel de células mononucleares, coletado e lavado em meio RPMI, foi ressuspensão em RPMI acrescido de 5% de soro fetal bovino. Nestas condições foi permitida a adesão celular em garrafas de cultura de 25  $m^2$  (Nunc A/S, Denmark, UK), por 60 minutos em estufa umidecida, 5%  $CO_2$  e 37°C. Após a incubação, as células não-aderentes foram removidas lavando-se a garrafa por 3 vezes com PBS. As células aderentes, monócitos, foram cultivadas, por no máximo 24 horas, em RPMI completo para uso experimental. A preparação de monócitos foi analisada quanto à viabilidade pelo método de exclusão de azul de Trypan.

### **6. Citometria de fluxo**

Monócitos humanos ( $1 \times 10^6$  células) foram incubados com hrGal-3 pré-incubada (16 h, 4°C) ou não com solução 10 mM de  $\beta$ -lactose, numa concentração final de 25  $\mu g/ml$ . Amostras controle receberam apenas meio RPMI incompleto ou hrGal-3 previamente incubada com sacarose (10 mM). Decorridos 60 min de incubação à temperatura ambiente e lavagem por centrifugação (500  $xg$ , 15 min) foi adicionada estreptoavidina- FITC na diluição 1:1000 ou anticorpo murino anti-CD14 humano conjugado a FITC, conforme recomendações do fabricante, e após nova incubação por 45 min a 4°C, no escuro, as células foram lavadas com 2 ml de meio RPMI incompleto e ressuspensas em 300  $\mu l$  de

PBS, contendo 1% de formaldeído, para conservação das células. Foram utilizados como controle negativo de fluorescência, suspensões de células tratadas apenas com o conjugado (SA-FITC) ou isotipo controle (IgG-FITC). As células foram adquiridas por citometria de fluxo em FACSorting (**Becton Dickinson** Immunocytometry Systems, Mountain View, CA), e os dados analisados utilizando-se o programa FlowJo V7.2.5.

## 7. Microscopia confocal

Monócitos humanos em suspensão ( $10^6$  células/ml) foram adicionados a lamínulas localizadas em poços de uma placa de cultura (24 poços), a placa foi mantida em estufa umidecida, 5% CO<sub>2</sub> e 37°C, por 2h para permitir a adesão dos monócitos. As células foram incubadas, por 1 hora a 4°C, com hrGal-3 biotinilada (25 µg/ml), pré-incubada ou não com 10 mM de lactose por 16h a 4°C. Como controle negativo foi utilizado somente meio RPMI ou sacarose (10 mM). Após 3 lavagens com PBS (à segunda foi acrescida glicina 1% - Reagen), os monócitos foram incubados com streptavidina conjugada a Alexa fluor-594 e com anticorpo murino anti-CD14 humano (50 µg/ml), por 40 min. Após 15 lavagens com PBS, as células foram então fixadas com paraformaldeído (Electron Microscopy Sciences, Port Washington) a 4%, por 20 minutos. As lamínulas foram montadas com Fluormount (Fisher) em água deionizada (1:1). Finalmente, os monócitos foram submetidos à análise por microscopia confocal.

## 8. Western blot

Candidatos a ligantes de galectina-3 presentes da superfície e/ou citoplasma de monócitos foram detectados por Western blot, usando-se hrGal-3 biotinilada. Foram obtidos extratos protéicos da membrana e do citoplasma de monócitos humanos preparados por fracionamento subcelular na presença de Triton X-114 (JW Goding - 1996 - Academic

Press). Os extratos foram diluídos em tampão de amostra redutor, fervidos e submetidos a SDS-PAGE em gel contendo 10% de acrilamida. Após separação eletroforética, o material foi eletrotransferido para membrana de nitrocelulose (Millipore, Bedford, MA, USA), a qual foi incubada com solução PBS-gelatina 3%-Tween20 0,05% (tampão de bloqueio), por 16 horas, a 4°C, e na sequência, hrGal-3 biotinizada (5 µg/ml) diluída em tampão de bloqueio, por 2 horas, temperatura ambiente. Seguiram-se lavagens da membrana e nova incubação com conjugado fosfatase-alcalina (Pierce), diluído (1/1000) em tampão de bloqueio, por 60 min à temperatura ambiente. Finalmente, a reação foi revelada usando-se solução de NBT-BCIP (Nitro blue tetrazolium-5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As proteínas visualizadas no gel por coloração com Azul de Coomassie que corresponderam às reveladas na incubação com galectina-3, foram excisadas e submetidas à análise peptídica por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems 4700 MALDI-TOF/TOF Proteomics Analyzer) no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP)

## 9. Quimiotaxia e Haptotaxia

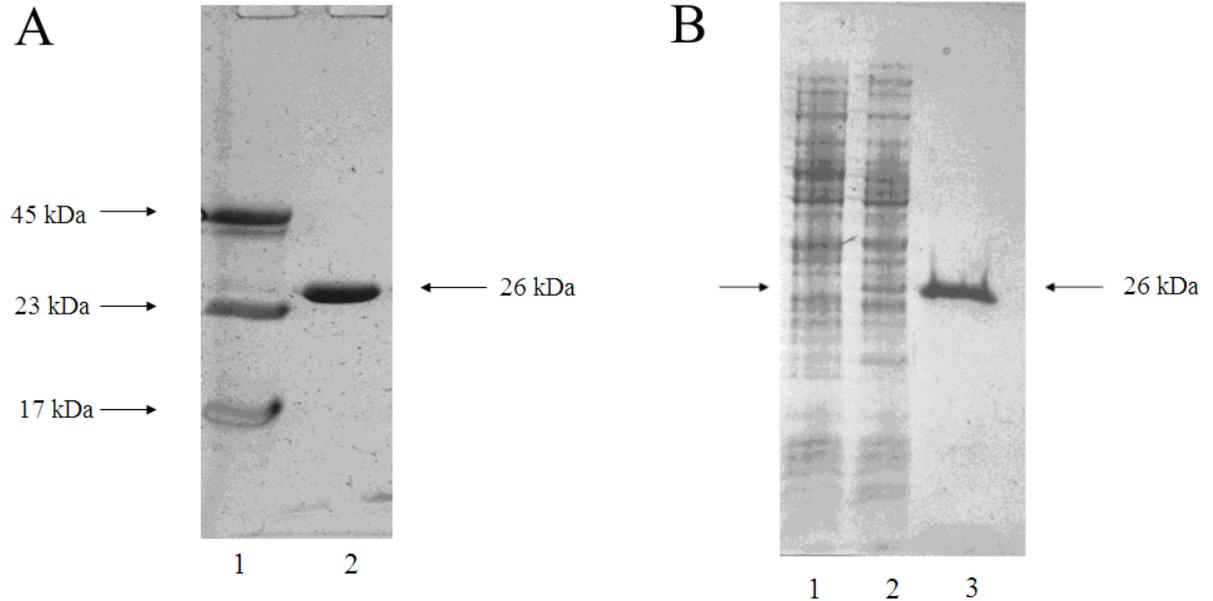
Foi usado sistema Transwell tanto para a quimiotaxia como para a haptotaxia. (Corning Incorporated Costar, NY, USA) em placa de 24 poços *inserts* contendo filtros de policarbonato com poros de 5 µm. Os poços receberam 400 µl dos seguintes estímulos: meio de cultura RPMI acrescido de soro fetal bovino 1%; hrGal-3 em concentrações variadas (0.032-23.4 µg/ml) e MCP-1 (100 ng/ml). Para os ensaios de haptotaxia os *inserts* foram mantidos no interior dos poços, contendo os devidos estímulos, por um período de 90 min a 37°C. Ao término deste intervalo, os *inserts* foram lavados em PBS estéril e secos à temperatura ambiente. De posse dos *inserts* preparados e dos poços preenchidos, os ensaios foram realizados a 37°C, durante 1 hora, partindo de uma solução de 50µl de RPMI

1% contendo  $1 \times 10^5$  monócitos. Ao término da incubação, as células que não migraram foram lavadas dos *inserts*. Células migrantes foram fixadas com metanol 70% (v/v) e coradas com HEMA3 (Biochemical Sciences, Inc., Swedesboro, NJ, USA). A análise dos resultados foi realizada através da contagem dos monócitos que migraram em direção ao compartimento inferior da câmara e foram visualizados na face inferior da membrana.

Alternativamente, para estudar o envolvimento de glicoproteínas da matriz extracelular na haptotaxia de monócitos, induzida por galectina-3, foram utilizados poços preenchidos com meio de cultura RPMI 1%, acrescidos ou não de hrGal-3, e *inserts* tratados com laminina, fibronectina e vitronectina (20  $\mu\text{g/ml}$ ). Ainda, as possíveis interações proteína-carboidrato foram avaliadas através do pré-tratamento ou não de hrGal-3 com solução de sacarose ou lactose (10 mM) por um período de 16h a 4°C.

### 1. hrGalectina-3 purificada e depletada de LPS apresenta banda única de 26 kDa

Amostras, tanto de hrGal-3 purificada e depletada de LPS, quanto do extrato bacteriano (*E. coli* M 15), antes e após a indução com IPTG, foram submetidas à análise por SDS-PAGE. Verificamos que os procedimentos executados para a obtenção da proteína recombinante foram eficientes, já que a coloração com comassie coloidal revelou banda protéica com massa molecular aparente de 26 kDa, tanto em gel de poliacrilamida 12 (**figura 1A, pista 2**), quanto 10% (**figura 1B, pista 3**). Além disso, a análise eletroforética do extrato bacteriano após indução com IPTG (+) mostrou uma banda com peso molecular semelhante ao de hrGal-3 (**figura 1B, pista 2**), inexistente antes da indução com IPTG (-) (**figura 1B, pista 1**). A obtenção de hrGal-3 purificada em quantidades satisfatórias foi uma etapa primordial para o desenvolvimento das etapas seguintes do trabalho.



**Figura 1. Análise eletroforética das preparações de hrGal3.** hrGal-3 e extrato bacteriano, induzido (+) ou não (-) com IPTG, tiveram seu perfil eletroforético analisado por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% (A) e 10% (B). As quantidades de amostra aplicadas aos géis foram 5  $\mu$ g de hrGal-3 (pistas 2A e 3B) e 10  $\mu$ g do extrato bruto bacteriano (pistas 1 e 2B). A migração eletroforética de proteínas de massa molecular conhecida está representada à esquerda do painel A.

## 2. Galectina-3 se liga a componentes glicosilados da superfície de monócitos humanos

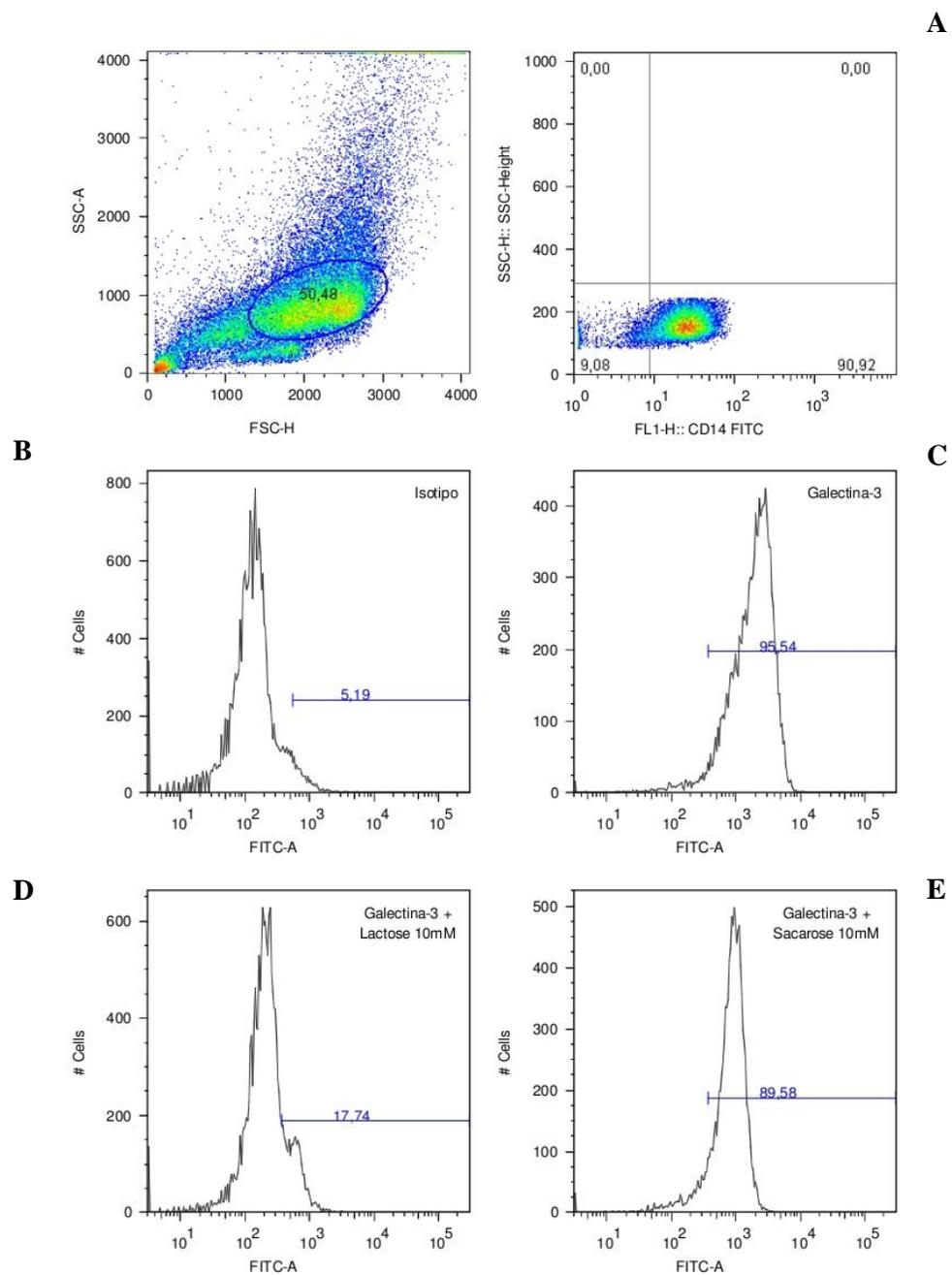
Os monócitos utilizados nos ensaios biológicos foram isolados de sangue periférico humano heparinizado, através de centrifugação em meio de separação apropriado. Foram utilizadas preparações que apresentavam viabilidade celular em torno de 90%, determinada pelo método de exclusão por azul de Trypan.

A ligação de galectina-3 à superfície de monócitos foi ensaiada por citometria de fluxo e microscopia confocal e as análises foram restritas às células positivas para o antígeno CD14 humano, identificadas através de anticorpo específico anti-CD14 conjugado a FITC. Os resultados obtidos são a seguir descritos.

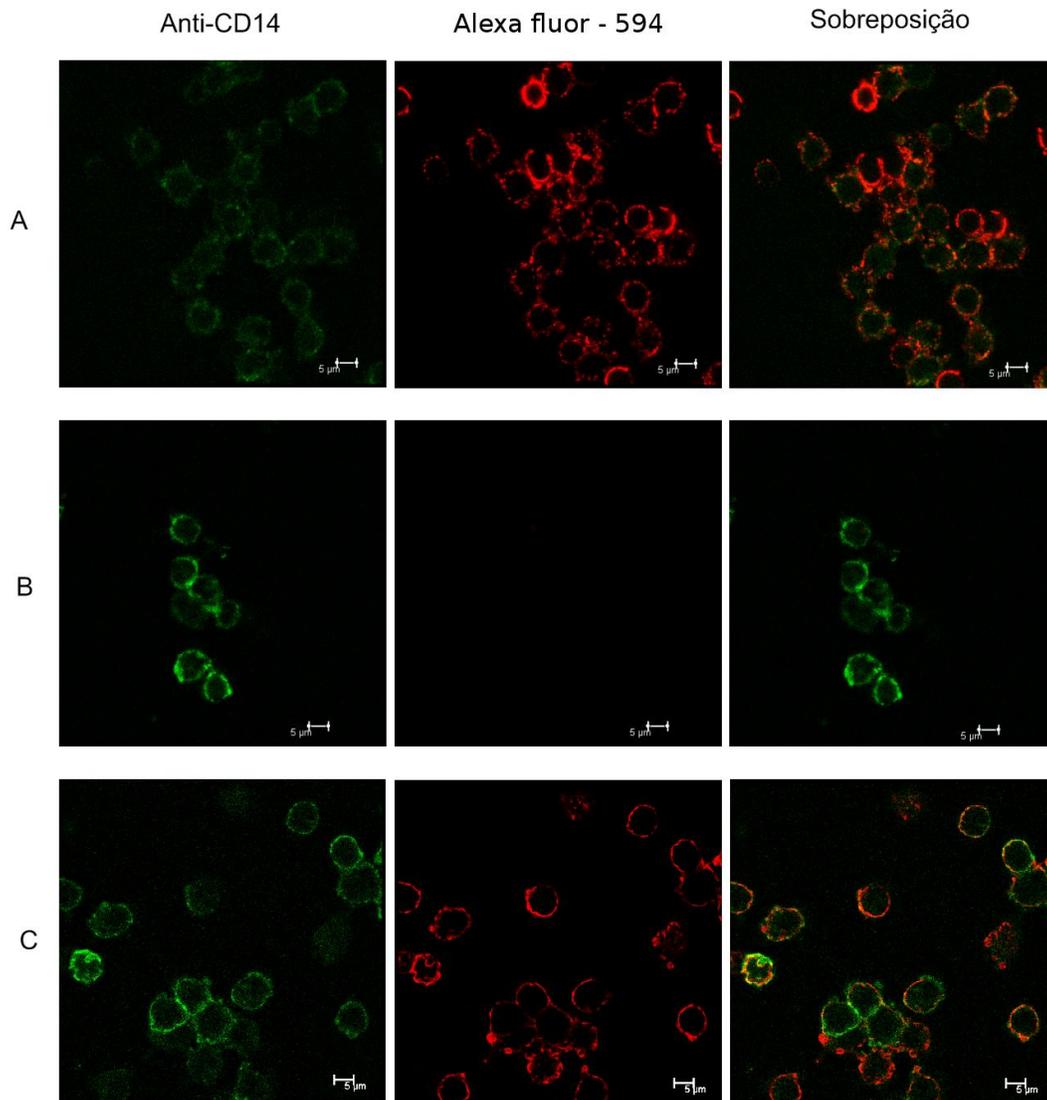
Nos ensaios de citometria de fluxo, as amostras, avaliadas pela incubação das células com o anticorpo anti-CD14, apresentaram uma população composta de aproximadamente 91% de monócitos (**figura 2A**). A interação entre monócitos e galectina-3 foi avaliada através da incubação dessas células com hrGal-3 biotinizada e SA-FITC. Após a incubação dos monócitos, 90,35% das células foram positivas para galectina-3 (**figura 2C**). A interação da lectina com os monócitos foi inibida em cerca de 81,5% na presença de lactose (**figura 2D**, 10 mM lactose), indicando que os ligantes de galectina-3 na superfície destas células são glicosilados. A seletividade do efeito inibitório da lactose é demonstrada quando se verifica que sacarose, na concentração de 10 mM, não foi capaz de inibir a ligação de hrGal-3 à superfície dos monócitos (**figura 2E**, 10 mM sacarose).

A análise por microscopia de fluorescência, ilustrada na figura 3, evidenciou a distribuição de galectina-3 marcada com Alexa-594 na superfície de monócitos CD14<sup>+</sup> (**figura 3A**). Os monócitos incubados com galectina-3 biotinizada, na presença de lactose (10 mM), não apresentaram marcação positiva na superfície (**figura 3B**), contrariamente àqueles incubados com a lectina na presença de sacarose, mesmo em altas concentrações

(50 mM) (**figura 3C**), que apresentaram marcação semelhante à proporcionada por galectina-3, na ausência de açúcar (**figura 3A**).



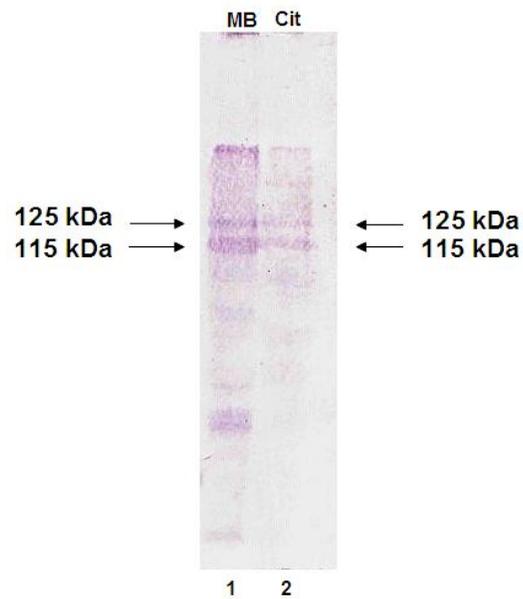
**Figura 2. Ligação de hrGal-3 exógena à superfície de monócitos humanos.** Monócitos humanos incubados com hrGal-3 biotilada (25  $\mu\text{g/ml}$ ), na presença ou na ausência de 10 mM de lactose ou sacarose, foram analisados por citometria de fluxo. A detecção de hrGal-3 foi evidenciada através da incubação das células com estreptoavidina-FITC. Os resultados, representativos de três ensaios independentes, são expressos como porcentagem de monócitos hrGal3<sup>+</sup>.



**Figura 3. Ligação de hrGal-3 exógena à superfície de monócitos humanos.** Monócitos humanos incubados com hrGal-3 biotinizada (25 µg/ml), na ausência (**3A**) ou presença de lactose (**3B**, 10 mM) ou sacarose (**3C**, 50 mM), foram selecionados através da ligação de anticorpo murino anti-CD14 humano conjugado a FITC e analisados por microscopia confocal. A detecção de hrGal-3 foi evidenciada através da incubação das células com estreptoavidina-Alexa fluor-594. O resultado é representativo de três ensaios independentes.

Os resultados obtidos anteriormente, sugestivos de que hrGal3 se liga a componentes glicosilados da superfície de monócitos, motivou-nos a investigar a identidade desses ligantes. Para tanto, extratos protéicos das porções citoplasmática e de membrana de monócitos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e transferidos para membrana de nitrocelulose para posterior incubação com hrGal-3 biotinilada e conjugado fosfatase alcalina. Após incubação com NBT-BCIP, na pista correspondente aos extratos protéicos da porção de membrana, foram visualizadas bandas com massas moleculares aparentes variáveis: 130kDa, 95kDa, 84kDa, 60kDa, 35kDa e 20kDa (**figura 4, pista 1**). Já na pista correspondente aos extratos protéicos da porção citoplasmática foram visualizadas bandas com massas moleculares aparentes de 130kDa, 115kDa, 95kDa e 87kDa (**figura 4, pista 2**).

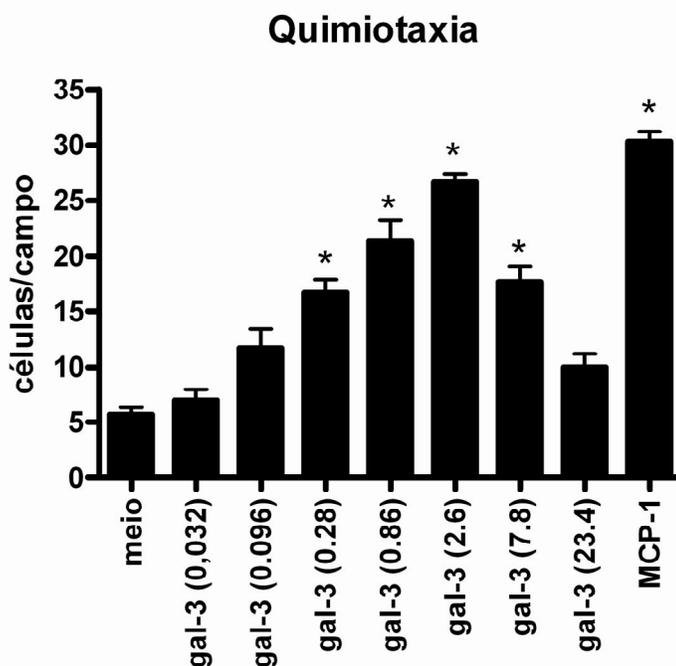
As proteínas visualizadas no gel por coloração com Azul de Coomassie que corresponderam às reconhecidas por galectina-3 após transferência à membrana de nitrocelulose, foram excisadas e submetidas à análise peptídica por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems 4700 MALDI-TOF/TOF Proteomics Analyzer) no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP). As sequências obtidas foram identificadas mediante utilização das bases de dados do Swissprot (<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>). Dentre as proteínas de membrana de monócitos foram identificadas integrinas  $\alpha$ IIb e  $\beta$ 3 (CI=100%) (massas moleculares 124 e 111, respectivamente) e dentre as proteínas citoplasmáticas,  $\alpha$ actinina-1 (CI=100%) e vinculina (CI=99,5) (massas moleculares 111 e 124, respectivamente).



**Figura 4. Identificação eletroforética de componentes de monócitos ligantes de galectina-3.** Monócitos humanos foram lisados na presença de Triton X-114 e as porções de membrana (**MB; pista 1**) e citoplasmática (**Cit; pista 2**) foram isoladas. As proteínas componentes destas porções foram submetidas a SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose. Após incubação com hrGal-3 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) e conjugado fosfatase alcalina, os componentes que se ligaram a hrGal-3 foram visualizados pela revelação com NBT-BCIP.

### 3. Galectina-3 induz migração de monócitos humanos de maneira dose dependente

Para testar a atividade atraente das nossas preparações de hrGal-3 sobre monócitos humanos, foram realizados ensaios de migração em sistema Transwell. Para tanto, concentrações de 0,032 a 23,4 µg/ml de hrGal-3 foram testadas. Os controles negativos e positivos foram, respectivamente, meio RPMI e MCP-1. hrGal-3 foi capaz de induzir migração dos monócitos de maneira dose-dependente e a concentração de 2,6 µg/ml determinou a resposta máxima, semelhante à observada para o quimioatraente MCP-1 e correspondente a uma migração de monócitos cerca de 5 vezes superior à migração randômica, quando apenas RPMI foi aplicado nos poços inferiores da microcâmara (**figura 5**). As doses de 0,28; 0,86 e 7,8 µg/ml de hrGal-3 proporcionaram menores respostas, cerca de 3 a 4 vezes a migração randômica, enquanto que as doses de 0,096 e 23,4 apresentaram indução de migração não significativa e 0,032 µg/ml não foi indutora de migração.



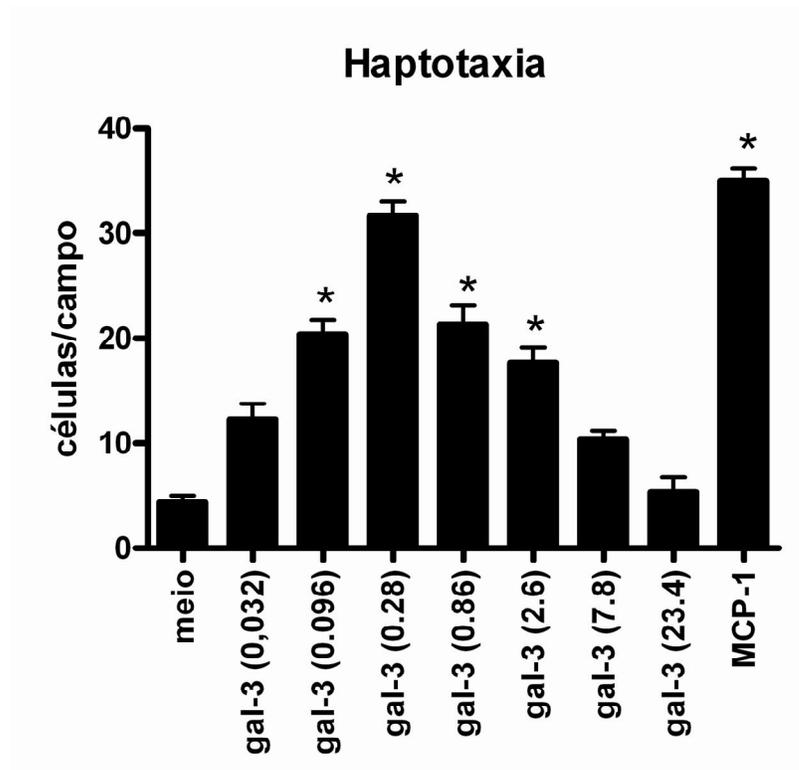
**Figura 5. Migração de monócitos induzida por hrGal-3.** hrGal-3, nas concentrações de 0,032 a 23,4  $\mu\text{g/ml}$ , foi adicionada aos poços inferiores de um sistema Transwell. RPMI foi utilizado como controle negativo e MCP-1 (100ng/ml) como positivo. Em seguida,  $5 \times 10^4$  monócitos foram adicionados aos *inserts*. Os resultados, representativos de 3 experimentos independentes, foram determinados através da contagem do número de monócitos migrantes, em 5 campos para cada amostra, ensaiada em triplicata, e expressos como média  $\pm$  SD. \*  $P < 0,0001$  em relação ao meio.

#### 4. Galectina-3 induz haptotaxia de monócitos humanos

A haptotaxia de monócitos humanos foi também avaliada em sistema Transwell. Para tanto, os filtros de polycarbonato foram tratados ou não com diferentes concentrações de hrGal-3.

Conforme se observa na figura 6, hrGal-3 induziu haptotaxia de monócitos de maneira dose-dependente e a concentração de 0,28  $\mu\text{g/ml}$ , fraca indutora de quimiotaxia, determinou a resposta máxima, semelhante à determinada pelo controle positivo, MCP-1, e

cerca de 7,5 vezes superior à migração randômica. As doses de 0,096; 0,86 e 2,6  $\mu\text{g/ml}$  de hrGal-3 proporcionaram menores respostas, cerca de 5 vezes a migração randômica. hrGal-3, nas concentrações de 0,032 e 7,8  $\mu\text{g/ml}$  apresentou indução de migração não significativa e 23,4  $\mu\text{g/ml}$  não induziu migração celular.



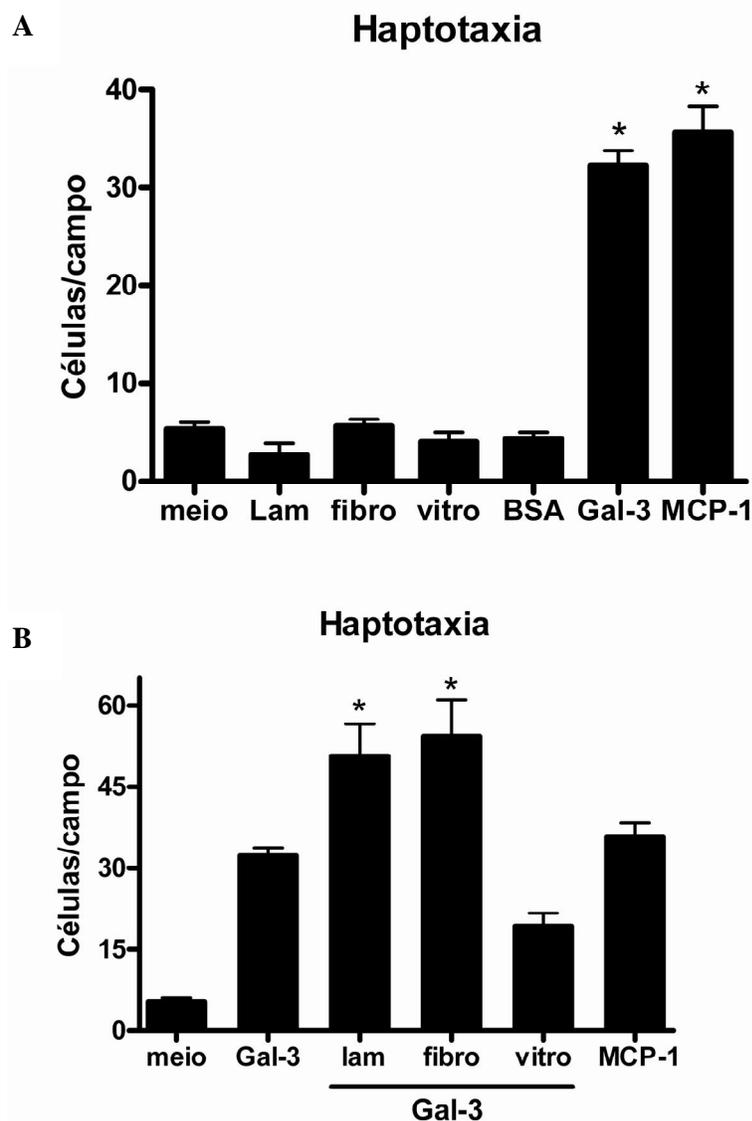
**Figura 6. Haptotaxia de monócitos humanos induzida por hrGal-3.** Filtros de policarbonato foram tratados com hrGal-3 nas concentrações 0,032 a 23,4  $\mu\text{g/ml}$ , ou com 100 ng/ml de MCP-1. Os poços foram preenchidos com meio (poços com filtro tratado) e no interior do *insert* foram adicionadas  $5 \times 10^4$  células. Os resultados, representativos de 3 experimentos independentes, foram determinados através da contagem do número de monócitos migrantes, em 5 campos para cada amostra, ensaiada em duplicata, e expressos como média  $\pm$  SD. \*  $P < 0,0001$  em relação ao meio.

## 5. Associação entre hrGal-3 e glicoproteínas da matriz extracelular na haptotaxia de monócitos humanos

Diante das evidências de que hrGal-3 induz migração de monócitos humanos por mecanismo haptotático e de que a lectina interage com glicoproteínas da matriz extracelular, laminina, fibronectina e vitronectina, passamos a avaliar a possível participação dessas moléculas na haptotaxia de monócitos induzida por galectina-3.

Primeiramente, observamos em sistema Transwell que monócitos humanos não migram em resposta a gradientes de laminina, fibronectina, vitronectina ou BSA (controle negativo). Os gradientes destas moléculas foram mantidos e, nessas condições, hrGal-3 solúvel, na concentração de 0,28 µg/ml, foi adicionada aos poços inferiores. A associação entre hrGal-3 e as glicoproteínas laminina ou fibronectina resultou na potencialização da migração celular induzida pela lectina, uma vez que o número de células migrantes foi cerca de 1,6 vezes superior quando comparados com o número de células migrantes nos poços contendo apenas hrGal-3, na mesma concentração, imobilizada na membrana. Os resultados indicam a possibilidade de não haver associação entre hrGal-3 e vitronectina durante o mecanismo de haptotaxia de monócitos, uma vez que nessas condições houve diminuição da migração de monócitos, se comparado à resposta proporcionada por hrGal-3 imobilizada (**Figura 7**).

O conjunto destes resultados sugere que glicoproteínas da matriz extracelular, laminina e fibronectina, sejam substratos para hrGal-3, uma vez que o gradiente desta lectina formado sobre laminina e fibronectina proporciona haptotaxia de monócitos humanos *in vitro*.

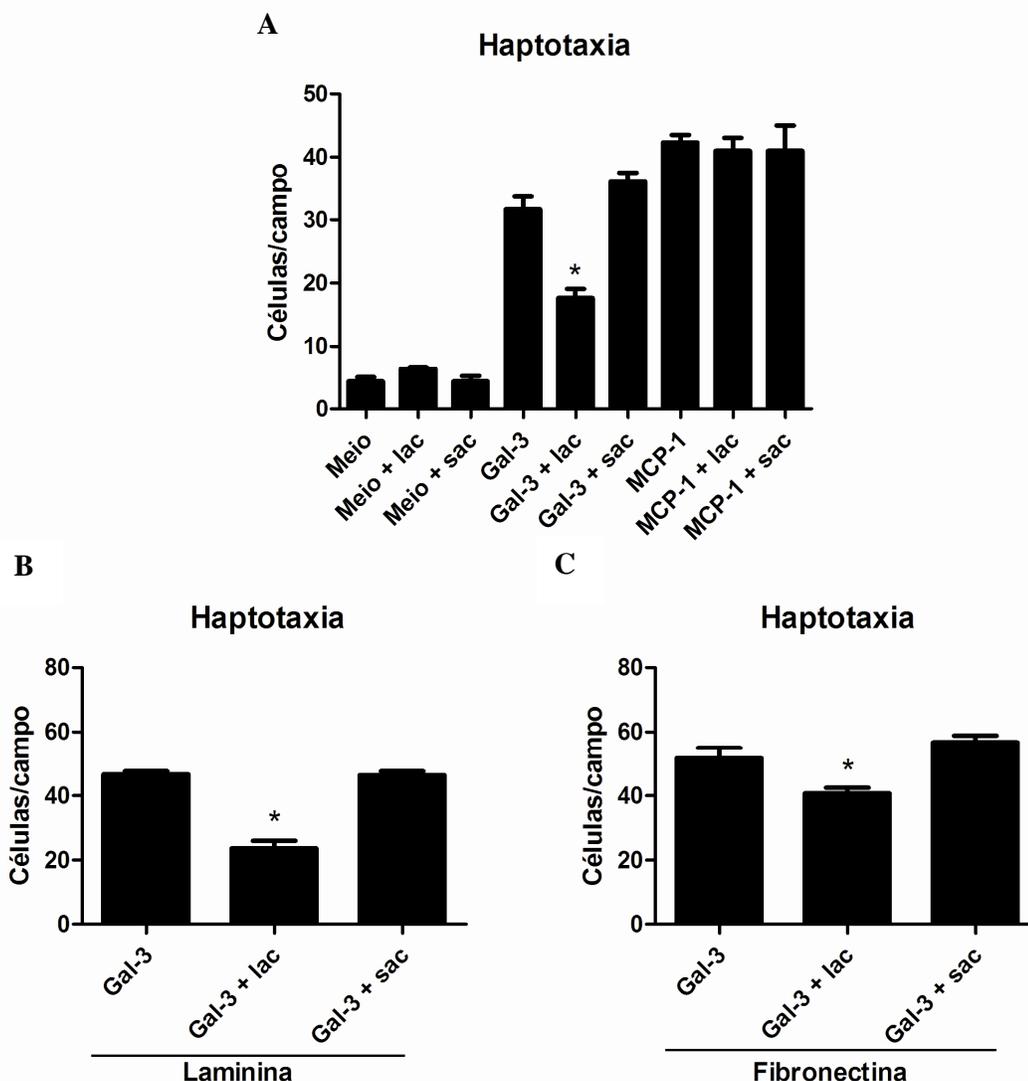


**Figura 7. Haptotaxia de monócitos em resposta à hrGal-3 associada a glicoproteínas da matriz extracelular.** Filtros de polycarbonato foram tratados com laminina, fibronectina, vitronectina ou BSA (20  $\mu\text{g/ml}$ ), ou com hrGal-3 (0,28  $\mu\text{g/ml}$ ) ou MCP-1 (100ng/ml). Os poços foram preenchidos com meio ou hrGal-3 e no interior do *insert* foram adicionadas  $5 \times 10^4$  células. Os resultados, representativos de 3 experimentos independentes, foram determinados através da contagem do número de monócitos migrantes, em 5 campos para cada amostra, ensaiada em duplicata, e expressos como média  $\pm$  SD. A \*  $P < 0,0001$  em relação ao meio. B \*  $P < 0,05$  em relação à Gal-3.

## **6. O N- e o C-terminal de hrGal-3 estão envolvidos na haptotaxia de monócitos humanos.**

Visto que laminina e fibronectina participam da haptotaxia de monócitos humanos passamos, então, a avaliar se a interação entre hrGal-3 e essas glicoproteínas depende do domínio de reconhecimento de carboidratos da lectina. Para tanto, os ensaios de haptotaxia foram repetidos utilizando-se amostras de hrGal-3 pré-incubadas com 10 mM do açúcar específico -lactose – ou com 10 mM de sacarose. Os resultados ilustrados pela figura 8A demonstram que a incubação prévia da hrGal-3 com lactose reduziu em cerca de duas vezes a haptotaxia de monócitos induzida pela lectina, o que não foi observado quando hrGal-3 foi incubada com sacarose

Ao analisarmos a participação de laminina e fibronectina na migração monocítica induzida por hrGal-3, observamos que, na presença de gradiente de laminina, a pré-incubação da lectina com lactose resultou em redução da migração celular de aproximadamente 2 vezes, o que indica que a interação entre hrGal-3 e a glicoproteína laminina ocorra tanto de maneira dependente, quanto independente de carboidratos (**figura 8B**). Na presença de gradiente de fibronectina, por outro lado, a incubação prévia de hrGal-3 com o mesmo açúcar reduziu somente 1,2 vez a migração de monócitos, indicando a ocorrência de uma interação entre essas moléculas majoritariamente independente do CRD da lectina (**figura 8C**).



**Figura 8. Envolvimento do N- e do C-terminal de hrGal-3 na haptotaxia de monócitos humanos.** Filtros de polycarbonato foram tratados com laminina ou fibronectina (20  $\mu\text{g/ml}$ ), ou com hrGal-3 (0,28  $\mu\text{g/ml}$ ) ou MCP-1 (100 ng/ml), pré-incubados ou não com 10 mM de lactose ou sacarose. Os poços foram preenchidos com meio (A) ou hrGal-3 (B e C) pré-incubada ou não com 10 mM de lactose ou sacarose, e no interior do *insert* foram adicionadas  $5 \times 10^4$  células. Os resultados, representativos de 3 experimentos independentes, foram determinados através da contagem do número de monócitos migrantes, em 5 campos para cada amostra, ensaiada em duplicata, e estão expressos como média do número de monócitos por campo  $\pm$  SD. A e C \*  $P < 0,005$  em relação à Gal-3. B \*  $P < 0,0001$  em relação à Gal-3.

No presente trabalho, estudamos a ligação de galectina-3 a componentes glicosilados da superfície de monócitos humanos. Algumas proteínas, de membrana e citoplasmáticas, foram identificadas como prováveis ligantes da lectina nessas células. Caracterizamos, em ensaios *in vitro*, o mecanismo de haptotaxia de monócitos induzido por galectina-3, o qual envolve a participação das glicoproteínas laminina e fibronectina. Além disso, avaliamos a participação das regiões N- e C-terminais da molécula de galectina-3 na haptotaxia.

Galectina-3 é uma lectina ligante de  $\beta$ -galactosídeos que, em diversas circunstâncias, age como molécula pró-inflamatória (Hsu *et al.*, 2000). Devido a sua propriedade indutora de migração de monócitos/macrófagos e a sua atividade anti-apoptótica, tem-se nessa lectina uma possível molécula reguladora da resposta imune e/ou da resposta inflamatória (Rabinovich *et al.*, 2004; Rubinstein *et al.*, 2004). SANO *et al.* (2000) demonstraram que galectina-3 induz migração de monócitos *in vitro* de uma maneira dose-dependente e que essa é quimiotática em altas concentrações e quimiocinética em baixas concentrações.

A descrição de moléculas atraentes para monócitos e macrófagos é muito relevante, já que existem poucos quimioatraentes descritos para essas células. Além disso, fisiologicamente, sugere-se que galectina-3 expressa e/ou secretada por células epiteliais (Nio *et al.*, 2005) e por monócitos e macrófagos possa contribuir para a atração de diferentes tipos celulares durante o processo inflamatório. A ação atraente de galectina-3 sobre monócitos tem se mostrado célula-específica, já que essa mesma lectina não induz migração de outros tipos celulares como linfócitos e eosinófilos (Sano *et al.*, 2000).

O conjunto dessas constatações nos levou a avaliar o mecanismo que estaria envolvido na migração de monócitos humanos induzida por galectina-3, incluindo a possível participação de glicoproteínas da matriz extracelular neste processo.

Quando ainda era denominada Mac-2, galectina-3 foi descrita como expressa na superfície de macrófagos elicitados com tioglicolato, mas não em macrófagos residentes (Ho and Springer, 1982). Galectina-3 está presente de forma abundante no citosol, sendo encontrada também na superfície de células e/ou secretada no fluido extracelular (Lindstedt *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1993).

Os resultados que obtivemos com os ensaios de citometria de fluxo e de microscopia confocal demonstraram que hrGal-3 biotinizada reconhece e se liga a componente(s) da superfície de monócitos humanos. Sugere-se que tais ligantes sejam glicosilados, pois a interação foi parcialmente inibida na presença do açúcar lactose. Estes dados reforçam a hipótese de que o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) de hrGal-3 esteja envolvido no reconhecimento e na interação dessa lectina com glicoconjugados da superfície de monócitos humanos. A confirmação de que hrGal-3 possui glicoligantes na superfície de monócitos nos motivou a buscar a identidade de tais receptores.

A leitura de trabalhos anteriormente publicados pode nos fornecer algumas pistas quanto à identidade dos receptores de galectina-3 da superfície de monócitos. Por exemplo, a migração de monócitos e macrófagos induzida por galectina-3 é sensível ao tratamento com toxina pertussis, fato que indica que galectina-3 ativa receptores acoplados à proteína-G (GPCR), semelhantes àqueles reconhecidos por quimiocinas, fMLP, C5a e LTB<sub>4</sub>, dentre outros (Baggiolini, 1998; Sallusto *et al.*, 1998). Embora galectina-3 não tenha similaridade estrutural com nenhum agonista que se liga a GPCR, é possível que a lectina reconheça porções glicosiladas desses receptores. No entanto, até o presente momento essas alternativas não passam de especulações, já que, por exemplo, nenhum dos receptores de quimiocinas presentes na superfície de monócitos (CCR1, CCR2, CCR5 e CXCR4) (Baggiolini, 1998; Sallusto *et al.*, 1998) foi identificado como receptor de galectina-3.

Especulações outras se estendem a moléculas tais como CD11b, LAMP1, LAMP2, Mac-3 e CD98, porém todas sem confirmação até o presente momento (Sano *et al.*, 2000). As informações, por nós obtidas, das seqüências peptídicas de ligantes de galectina-3 da membrana e do citoplasma de monócitos, levaram à identificação das integrinas  $\alpha$ IIb e  $\beta$ 3,  $\alpha$ -actinina-1 e vinculina como candidatos a receptores de galectina-3 nessas células.

As integrinas constituem a principal família de receptores celulares para as proteínas da matriz extracelular (ECM). A partir da combinação de 18 tipos de cadeias  $\alpha$  com 8 de cadeias  $\beta$  são geradas 24 heterodímeros distintos de integrinas (Erik Hj Danen, 2003; Hynes, 2002). Ao se ligar à ECM, as integrinas desempenham um papel direto na adesão celular e também medeiam a migração celular promovendo, por meio de adaptadores, a ligação da ECM ao sistema de microfilamentos de actina. Cada integrina tem um modelo de expressão única, possuindo diferentes especificidades para a ligação com componentes da ECM e distinta capacidade de transdução de sinal bi-direcional (Erik Hj Danen, 2003; Haines *et al.*, 1983). Importante função das integrinas é a capacidade de gerar sinais em cascatas a partir da ECM para o interior da células, tornando-a uma molécula chave no controle das funções celulares como proliferação, diferenciação, sobrevivência e migração.

Dois membros da família das integrinas  $\beta$ 3,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 e  $\alpha$ v $\beta$ 3, reconhecem um grande número de proteínas da matriz extracelular como fibronectina, vitronectina e trombospondina (Switala-Jelen *et al.*, 2004). As integrinas  $\beta$ 3 podem mediar a migração de várias células em diferentes substratos como vitronectina, fibronectina, fibrinogênio, laminina e colágeno (Marshall and Hart, 1996). A integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 é um receptor expresso principalmente na superfície de plaquetas e de seus precursores (megacariócitos). No entanto, também foi demonstrado que  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 é expressa na superfície de monócitos humanos, granulócitos e linfócitos (Burns *et al.*, 1986). Faull *et al.*, (1996) ao estudar a

expressão de moléculas adesivas em monócitos, observaram que a expressão da cadeia  $\beta 3$  ocorria especificamente associada à cadeia  $\alpha \text{IIb}$ .

Durante as adesões focais, as integrinas  $\beta 1$  e  $\beta 3$  estão ligadas a moléculas de  $\alpha$ -actinina (Otey *et al.*, 1990). As  $\alpha$ -actininas compõem uma família de proteínas ligantes de actina que consiste de quatro membros, incluindo as  $\alpha$ -actininas 2 e 3 músculo específicas e as  $\alpha$ -actininas 1 e 4 que são expressas de maneira ubíqua (Carol A. Otey, 2004). A molécula  $\alpha$ -actinina-1 está localizada na região final das fibras de actina e nas junções aderentes, onde desenvolve um importante papel na formação das fibras de stress, na promoção de adesão e regulação do formato celular e na motilidade (Gluck and Ben-Ze'ev, 1994; Knudsen *et al.*, 1995; Otey *et al.*, 1990).

Vinculina é uma proteína que se localiza nos contatos focais e nas junções aderentes intercelulares (BurrIDGE *et al.*, 1988; Jockusch and Isenberg, 1981). Em ambos os contatos, vinculina forma complexos com outros componentes, permitindo o ancoramento dos filamentos de actina à membrana. Nas adesões focais, a molécula vinculina liga-se à talina (BurrIDGE and Mangeat, 1984),  $\alpha$ -actinina (Wachsstock *et al.*, 1987), paxilina (Turner *et al.*, 1990), actina (Johnson and Craig, 1994), além de formar dímeros (Johnson and Craig, 1995). Ezzell *et al.*, (1997) demonstraram que vinculina controla a adesão, o remodelamento do citoesqueleto e o espalhamento celular pela estabilização mecânica da ligação molecular entre actina e integrinas, que forma o centro da adesão focal e, dessa forma, aumenta tanto a habilidade de transmissão, quanto a resistência às tensões do citoesqueleto.

Baseado nas características funcionais das integrinas que, juntamente com as moléculas  $\alpha$ -actinina e vinculina, participam e controlam a migração celular, é plausível que ocorra a ligação de galectina-3 a essas moléculas durante a indução de migração de monócitos humanos por essa lectina.

Como mencionado anteriormente (*item Introdução*), tem-se na quimiotaxia (gradiente solúvel) a primeira hipótese para o mecanismo de migração leucocitária em direção ao sítio inflamatório. Entretanto, condições hidrodinâmicas na região da vênula pós-capilar não favorecem a manutenção de um gradiente de substâncias solúveis, pois esse gradiente seria “lavado”, difundir-se-ia e teria que ser repostado continuamente (Rot, 1992; Tanaka *et al.*, 1993). Portanto, a hipótese de um gradiente formado a partir da ligação de quimioatraentes ligados a substratos sólidos (gradiente haptotático) parece ser mais realística. Isso ocorre com os atraentes C5a (Webster *et al.*, 1980), IL-8 (Rot, 1992), a lectina KM<sup>+</sup> (Ganiko *et al.*, 1998a; Santos-de-Oliveira *et al.*, 1994) e a lectina animal de rato MNCF (Dias-Baruffi *et al.*, 1995).

A partir de ensaios *in vitro* em sistema Transwell, demonstramos que hrGal-3, além de induzir quimiotaxia de monócitos humanos, induz haptotaxia dessas mesmas células em diferentes concentrações (0,032 a 23,4 µg/ml). Essa haptotaxia mostrou ser dose dependente. Obtivemos um resultado que reforça o mecanismo haptotático em detrimento do quimotático, a concentração de 0,28 µg/ml, fraca indutora de quimiotaxia, mostrou ser a concentração ótima para o mecanismo haptotático. Ganiko *et al.*, (1998) e Santos-de-Oliveira *et al.*, (1994), demonstram que concentrações de KM<sup>+</sup> solúveis que não induziam migração de neutrófilos, quando imobilizadas no filtro de policarbonato passavam a apresentar essa atividade.

Recentemente, demonstrou-se que o gradiente haptotático de KM<sup>+</sup> para recrutamento de neutrófilos é viabilizado pela ligação da lectina à laminina, cujas glicanas são reconhecidas pela lectina na membrana basal do endotélio (Ganiko *et al.*, 2005). MNCF, uma lectina de mamífero ligante de D-galactose, interage com laminina de matriz

extracelular (de Toledo *et al.*, 2007; Dias-Baruffi *et al.*, 2003) e apresenta atividade indutora de migração neutrofílica via mecanismo haptotático (Dias-Baruffi *et al.*, 1993).

Neste trabalho testamos se as glicoproteínas laminina, fibronectina e vitronectina, uma vez que interagem com galectina-3, poderiam servir de substrato para que as moléculas de galectina-3 pudessem formar um gradiente estável para indução de migração de monócitos humanos. As glicoproteínas aqui estudadas por si só não induzem quimiotaxia/haptotaxia de monócitos humanos em sistema Transwell. A adição de galectina-3 solúvel ao substrato de matriz extracelular promove haptotaxia de monócitos humanos. Esse fenômeno biológico é potencializado quando o gradiente formado por laminina ou fibronectina é comparado ao gradiente estável formado apenas por hrGal-3 imobilizada nos poros do filtro de policarbonato. Parece não haver associação entre vitronectina e hrGal-3 no processo de haptotaxia estudado. O conjunto destes resultados indica que as glicoproteínas da matriz extracelular, laminina e fibronectina, atuam como substratos para galectina-3 durante o processo de migração de monócitos humanos.

Segundo Kuwabara e Liu, (1996), galectina-3 é adequada para a função de adesão celular, tanto célula-célula quanto célula matriz extracelular, devido a sua capacidade de se auto-associar, funcionando de maneira multivalente, em certas condições. Uma das funções da matriz extracelular é a migração celular (Har-el and Tanzer, 1993; Schuppan and Rühl, 1994). Dentre os seus componentes a laminina é a glicoproteína predominante, um conhecido ligante de galectina-3 (Kuwabara and Liu, 1996). Esses autores mostraram que a galectina-3 medeia a adesão de neutrófilos à laminina por um mecanismo dependente de CRD e medeia a adesão de neutrófilos a fibronectina por mecanismo dependente da expressão de integrinas  $\beta 2$ .

Além do envolvimento do CRD de galectina-3 em sua atividade atraente sobre monócitos, acredita-se que o domínio N-terminal também esteja envolvido. A ação de

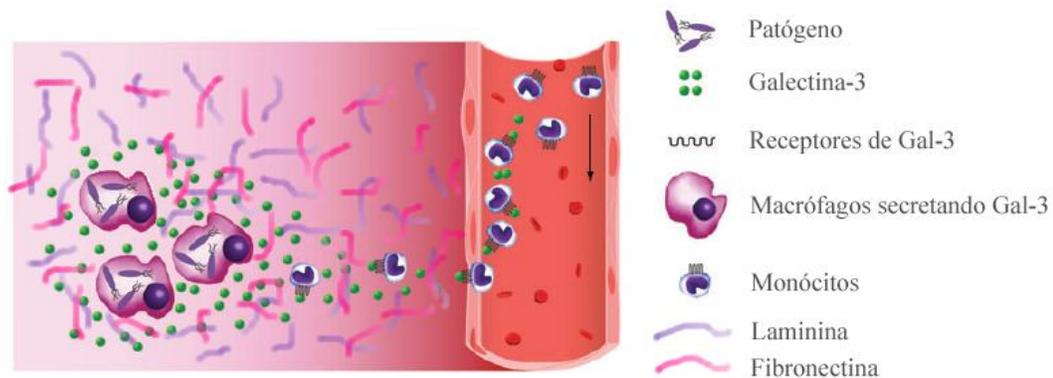
ambos os domínios, amino e carboxi terminais, de galectina induz ainda a produção de superóxido por monócitos (Sano *et al.*, 2000).

A última etapa do trabalho foi avaliar, então, se a região CRD de galectina-3 estava envolvida no processo de haptotaxia de monócitos humanos. Para tanto foram repetidos os ensaios em sistema Transwell utilizando-se hrGal-3 pré-incubada com o açúcar específico - lactose. A inibição da migração celular foi mais acentuada quando o substrato era formado pela glicoproteína laminina, demonstrando que a interação de galectina-3 com essa glicoproteína na haptotaxia de monócitos ocorre tanto via CRD, quanto através de interação proteína-proteína. Diferentemente, no caso da glicoproteína fibronectina, a pré-incubação da lectina com lactose resultou em uma pequena inibição, o que sugere que a interação entre galectina-3 e fibronectina, na haptotaxia de monócitos, ocorra majoritariamente via domínio N-terminal.

Huber *et al.*, (1991) e Tanaka *et al.*, (1993) sugerem que um bom indutor de migração leucocitária deva interagir com proteoglicanas do endotélio/matriz extracelular, proporcionando a adesão de leucócitos e estimulando a migração leucocitária.

Finalmente, elegemos galectina-3 uma lectina haptotática para monócitos humanos, com a participação de glicoproteínas da matriz extracelular. A transposição deste conhecimento para modelos inflamatórios *in vivo* sugere que a haptotaxia induzida por galectina-3 seja viabilizada pela interação da lectina com as glicoproteínas laminina e fibronectina. Tais interações promovem a formação de gradiente estável da lectina galectina-3, necessário para induzir haptotaxia de monócitos humanos a partir do interior do vaso sanguíneo para o tecido inflamado.

O modelo proposto de haptotaxia de monócitos humanos, induzida por galectina-3, é demonstrado resumidamente no esquema abaixo, onde:



Durante uma infecção macrófagos residentes são ativados e secretam diversos mediadores inflamatórios, incluindo galectina-3 (●). A lectina (Gal-3) seria difundida pelo tecido perivascular até atingir os vasos sanguíneos, local onde iniciaria a sua participação no recrutamento de leucócitos. A ativação e adesão de monócitos ao endotélio, permitindo que essas células atravessem a barreira endotelial, é mediada pela interação de galectina-3 com seus receptores (⌚) presentes nesses monócitos. No interior do tecido perivascular, a interação de galectina-3 com laminina (⌚) e fibronectina (⌚), componentes da matriz extracelular, dá origem ao gradiente haptotático. A formação desse gradiente haptotático direciona os monócitos até o sítio inflamatório para que então possam exercer suas funções efetoras.

Neste estudo foi avaliado o mecanismo de migração de monócitos induzido por galectina-3 e a participação de glicoproteínas da matriz extracelular neste processo. Os resultados obtidos demonstram que:

- 1) hrGal-3 se liga a componentes glicosilados da superfícies de monócitos humanos;
- 2) As proteínas integrinas  $\alpha$ IIb e  $\beta$ 3,  $\alpha$ actinina-1 e vinculina são prováveis ligantes de hrGal-3 em monócitos humanos;
- 3) hrGal-3 induz migração de monócitos através de mecanismo haptotático e a associação entre a lectina e as glicoproteínas laminina e fibronectina, que resulta na formação de um substrato de hrGal-3, potencializa a atividade indutora de migração da lectina;
- 4) A associação entre hrGal-3 e laminina, que ocorre durante o mecanismo haptotático, envolve ambas as regiões N e C-terminal da lectina. Já a associação de hrGal-3 com fibronectina ocorre principalmente via região N- terminal da lectina.

Acker, F.A., Voss, H.P., and Timmerman, H. (1996). Chemokines: structure, receptors and functions. A new target for inflammation and asthma therapy? *Mediators Inflamm* 5, 393-416.

Akahani, S., Nangia-Makker, P., Inohara, H., Kim, H.-R.C., and Raz, A. (1997). Galectin-3: A Novel Antiapoptotic Molecule with A Functional BH1 (NWGR) Domain of Bcl-2 Family. *Cancer Res* 57, 5272-5276.

Almkvist, J., and Karlsson, A. (2002). Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconjugate Journal* 19, 575-581.

Arnaout, M.A., Mahalingam, B., and Xiong, J.P. (2005). Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, 381-410.

Arumugham, R.G., Hsieh, T.C., Tanzer, M.L., and Laine, R.A. (1986). Structures of the asparagine-linked sugar chains of laminin. *Biochim Biophys Acta* 883, 112-126.

Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565-568.

Burns, G.F., Cosgrove, L., Triglia, T., Beall, J.A., López, A.F., Werkmeister, J.A., Begley, C.G., Haddad, A.P., d'Apice, A.J., Vadas, M.A, and al., e. (1986). The IIbIIIa glycoprotein complex that mediates platelet aggregation is directly implicated in leukocyte adhesion. *Cell* 45, 269-280.

Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., and Turner, C. (1988). Focal Adhesions: Transmembrane Junctions Between the Extracellular Matrix and the Cytoskeleton. *Annual Review of Cell Biology* 4, 487-525.

Burridge, K., and Mangeat, P. (1984). An interaction between vinculin and talin. *Nature* 308, 744-746.

Butcher, E.C. (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67, 1033-1036.

Carol A. Otey, O.C. (2004). alpha-actinin revisited: A fresh look at an old player. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 58, 104-111.

CARON, M., and SÈVE, A.-P. (2000). *Lectins and Pathology.* , 1 edn (Amsterdam).

Chan, J.R., Hyduk, S.J., and Cybulsky, M.I. (2001). Chemoattractants Induce a Rapid and Transient Upregulation of Monocyte  $\alpha_4$  Integrin Affinity for Vascular Cell Adhesion Molecule 1 Which Mediates Arrest: An Early Step in the Process of Emigration. *J. Exp. Med.* 193, 1149-1158.

Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J.Y., Butcher, E.C., and Laudanna, C. (2000). Chemokines Trigger Immediate  $\beta_2$  Integrin Affinity and Mobility Changes: Differential Regulation and Roles in Lymphocyte Arrest under Flow. *Immunity* 13, 759-769.

da Costa Martins, P., Garcia-Vallejo, J.-J., van Thienen, J.V., Fernandez-Borja, M., van Gils, J.M., Beckers, C., Horrevoets, A.J., Hordijk, P.L., and Zwaginga, J.-J. (2007). P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Is Expressed on Endothelial Cells and Mediates Monocyte Adhesion to Activated Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1023-1029.

de Toledo, K.A., Bernardes, E.S., Baruffi, M.D., and Roque-Barreira, M.C. (2007). Neutrophil haptotaxis induced by mouse MNCF: interactions with extracellular matrix glycoproteins probably contribute to overcoming the antiinflammatory action of dexamethasone. *Inflamm Res.* 56, 368-376.

Dias-Baruffi, M., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., and Roque-Barreira, M.C. (1993). Macrophage-released neutrophil chemotactic factor (MNCF) induces PMN-neutrophil migration through lectin-like activity. *Agents Actions.* 38.

Dias-Baruffi, M., Roque-Barreira, M.C., Cunha, F.Q., and Ferreira, S.H. (1995). Biological characterization of purified macrophage-derived neutrophil chemotactic factor. *Mediators Inflamm.* 4, 263-269.

Dias-Baruffi, M., Zhu, H., Cho, M., Karmakar, S., McEver, R.P., and Cummings, R.D. (2003). Dimeric Galectin-1 Induces Surface Exposure of Phosphatidylserine and Phagocytic Recognition of Leukocytes without Inducing Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 41282-41293.

Erik Hj Danen, A.S. (2003). Integrins in regulation of tissue development and function. *The Journal of Pathology* 200, 471-480.

Ezzell, R.M., Goldmann, W.H., Wang, N., Parasharama, N., and Ingber, D.E. (1997). Vinculin promotes cell spreading by mechanically coupling integrins to the cytoskeleton. *Exp Cell Res.* 231, 14-26.

Faull, R.J., Wang, J., and Stavros, W. (1996). Changes in the expression of adhesion molecules as peripheral blood monocytes differentiate into peritoneal macrophages. *Nephrol. Dial. Transplant.* 11, 2037-2044.

Ferletta, M., and Ekblom, P. (1999). Identification of laminin-10/11 as a strong cell adhesive complex for a normal and a malignant human epithelial cell line. *J Cell Sci* 112, 1-10.

Flotte, T.J., Springer, T., and Thorbecke, G.J. (1983). Dendritic cell and macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal sheets. *Am J Pathol.* 111, 112-124.

Foddy, L., Stamatoglou, S.C., and Hughes, R.C. (1990). An endogenous carbohydrate-binding protein of baby hamster kidney (BHK21 C13) cells. Temporal changes in cellular expression in the developing kidney. *J Cell Sci* 97, 139-148.

Fujiwara, S., Shinkai, H., Deutzmann, R., Paulsson, M., and Timpl, R. (1988). Structure and distribution of N-linked oligosaccharide chains on various domains of mouse tumour laminin. *Biochem J* 252, 453-461.

- Gabius, H.J., and Wu, A.M. (2007). The emerging functionality of endogenous lectins: A primer to the concept and a case study on galectins including medical implications. *Chang Gung Med J* 29, 37-62.
- Gallatin, W.M., Weissman, I.L., and Butcher, E.C. (1983). A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 304,30-34.
- Ganiko, L., Martins, A., Espreáfico, E., and Roque-Barreira, M. (1998a). Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM+. *Glycoconj J.* 15, 527-530.
- Ganiko, L., Martins, A., Freymüller, E., Mortara, R., and Roque-Barreira, M. (2005). Lectin KM+-induced neutrophil haptotaxis involves binding to laminin. *Biochim Biophys Acta* 1721, 152-163.
- Gluck, U., and Ben-Ze'ev, A. (1994). Modulation of alpha-actinin levels affects cell motility and confers tumorigenicity on 3T3 cells. *J Cell Sci* 107, 1773-1782.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964.
- Haines, K.A., Flotte, T.J., Springer, T., Gigli, I., and Thorbecke, G.J. (1983). Staining of Langerhans cells with monoclonal antibodies to macrophages and lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80, 3448-3451.
- Har-el, R., and Tanzer, M.L. (1993). Extracellular matrix. 3: Evolution of the extracellular matrix in invertebrates. *FASEB J.* 7, 1115-1123.
- Herrmann, J., Turck, C.W., Athison, R.E., Huflejt, M.E., Poulter, L., Gitt, M.A., Burlingame, A.L., Barondes, S.H., and Leffler, H. (1993). Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous proline-, glycine-, tyrosine-rich sequence with bacterial and tissue collagenase. *J. Biol. Chem.* 268, 26704-26711.

Ho, M.K., and Springer, T.A. (1982). Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* *128*, 1221-1228.

Hsu, D.K., Yang, R.Y., Pan, Z., Yu, L., Salomon, D.R., Fung-Leung, W.P., and Liu, F.T. (2000). Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol.* *156*, 1073-1083.

Huber, A., Kunkel, S., Todd, R.F., and Weiss, S. (1991). Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science.* *254*, 99-102.

Huo, Y., Hafezi-Moghadam, A., and Ley, K. (2000). Role of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Fibronectin Connecting Segment-1 in Monocyte Rolling and Adhesion on Early Atherosclerotic Lesions. *Circ Res* *87*, 153-159.

Hyduk, S.J., Oh, J., Xiao, H., Chen, M., and Cybulsky, M.I. (2004). Paxillin selectively associates with constitutive and chemoattractant-induced high-affinity  $\alpha_4\beta_1$  integrins: implications for integrin signaling. *Blood* *104*, 2818-2824.

Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673-687.

Jockusch, B.M., and Isenberg, G. (1981). Interaction of alpha-actinin and vinculin with actin: opposite effects on filament network formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *78*, 3005-3009.

Johnson, R.P., and Craig, S.W. (1994). An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding. *J. Biol. Chem.* *269*, 12611-12619.

Johnson, R.P., and Craig, S.W. (1995). F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and tail domains. *Nature* *373*, 261-264.

- Kaplanski, G., Marin, V., Montero-Julian, F., Mantovani, A., and Farnarier, C. (2003). IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.* *24*, 25-29.
- Kim, M., Carman, C.V., and Springer, T.A. (2003). Bidirectional Transmembrane Signaling by Cytoplasmic Domain Separation in Integrins. *Science* *301*, 1720-1725.
- Knibbs, R.N., Perini, F., and Goldstein, I.J. (1989). Structure of the major concanavalin A reactive oligosaccharides of the extracellular matrix component laminin. *Biochemistry* *28*, 6379-6392.
- Knudsen, K.A., Soler, A.P., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (1995). Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J. Cell Biol.* *130*, 67-77.
- Kuwabara, I., and Liu, F.T. (1996). Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol* *156*, 3939-3944.
- Lasky, L.A. (1992). Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* *258*, 964-969.
- Laudanna, C., Kim, J.Y., Constantin, G., and Butcher, E.C. (2002). Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunological Reviews* *186*, 37-46.
- Lewinsohn, D.M., Bargatze, R.F., and Butcher, E.C. (1987). Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and other leukocytes. *J Immunol* *138*, 4313-4321.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* *7*, 678-689.
- Lindstedt, R., Apodaca, G., Barondes, S.H., Mostov, K.E., and Leffler, H. (1993). Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for

polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 268, 11750-11757.

Liu, F.T. (1990). Molecular biology of IgE-binding protein, IgE-binding factors and IgE receptors. *CRC Crit Rev Immunol* 10, 289-306.

Liu, F.T., Hsu, D.K., Zuberi, R.I., Kuwabara, I., Chi, E.Y., and Henderson, W.R.J. (1995). Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol* 147, 1016-1028.

Luster, A.D. (1998). Chemokines -- Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. *N Engl J Med* 338, 436-445.

Marshall, J.F., and Hart, I.R. (1996). The role of alpha v-integrins in tumour progression and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 7, 129-138.

Matarrese, P., Tinari, N., Semeraro, M.L., Natoli, C., Iacobelli, S., and Malorni, W. (2000). Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis. *FEBS Lett.* 473, 311-315.

Nabarra, B., and Papiernik, M. (1988). Phenotype of thymic stromal cells. An immunoelectron microscopic study with anti-IA, anti-MAC-1, and anti-MAC-2 antibodies. *Lab Invest.* 58, 524-531.

Nio, J., Kon, Y., and Iwanaga, T. (2005). Differential Cellular Expression of Galectin Family mRNAs in the Epithelial Cells of the Mouse Digestive Tract. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 1323-1334.

Otey, C.A., Pavalko, F.M., and Burridge, K. (1990). An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *J. Cell Biol.* 111, 721-729.

Pereira-da-Silva, G., Moreno, A., Marques, F., Oliver, C., Jamur, M., Panunto-Castelo, A., and Roque-Barreira, M. (2006). Neutrophil activation induced by the lectin KM+ involves binding to CXCR2. *Biochim Biophys Acta* 1760, 86-94.

Qi, M., Ikematsu, S., Maeda, N., Ichihara-Tanaka, K., Sakuma, S., Noda, M., Muramatsu, T., and Kadomatsu, K. (2001). Haptotactic Migration Induced by Midkine. involvement of protein-tyrosine phosphatase zeta , ntógen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 15868-15875.

Rabinovich, G.A., Toscano, M.A., Ilarregui, J.M., and Rubinstein, N. (2004). Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: novel regulators of innate and adaptive immune responses. *Glycoconjugate Journal* 19, 565-573.

Rose, D.M., Alon, R., and Ginsberg, M.H. (2007). Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunological Reviews* 218, 126-134.

Rossiter, H., Alon, R., and Kupper, T.S. (1997). Selectins, T-cell rolling and inflammation. *Mol Med Today.* 3, 214-222.

Rot, A. (1992). Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunol Today.* 13, 291-294.

Rubinstein, N., Ilarregui, J.M., Toscano, M.A., and Rabinovich, G.A. (2004). The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue Antigens* 64, 1-12.

Ruoslahti, E. (1991). Integrins. *J Clin Invest* 87, 1-5.

Ruoslahti, E., and Pierschbacher, M.D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238, 491-497.

Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Mackay, C. (1998). Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today*. *19*, 568-574.

Sano, H., Hsu, D.K., Yu, L., Apgar, J.R., Kuwabara, I., Yamanaka, T., Hirashima, M., and Liu, F.T. (2000). Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol*. *165*, 2156-2164.

Santos-de-Oliveira, R., Dias-Baruffi, M., Thomaz, S.M., Beltramini, L.M., and Roque-Barreira, M.C. (1994). A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. *J Immunol* *153*, 1798-1807.

Sato, S., Burdett, I., and Hughes, R.C. (1993). Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Exp Cell Res*. *207*, 8-18.

Schuppan, D., and Rühl, M. (1994). Matrix in signal transduction and growth factor modulation. *Braz J Med Biol Res*. *27*, 2125-2141.

Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annual Review of Immunology* *26*, 421.

Seta, N., and Kuwana, M. (2007). Human circulating monocytes as multipotential progenitors. *Keio J Med*. *56*, 41-47.

Shamri, R., Grabovsky, V., Gauguet, J.M., Feigelson, S., Manevich, E., Kolanus, W., Robinson, M.K., Staunton, D.E., von Andrian, U.H., and Alon, R. (2005). Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat Immunol*. *6*, 497-506.

Sharon, N., and Lis, H. (1993). Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am*. *268*, 82-89.

Springer, T.A. (1995). Traffic Signals on Endothelium for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration. *Annual Review of Physiology* *57*, 827.

- Suzuki, S., Oldberg, A., Hayman, E.G., Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E. (1985). EMBO J. Complete amino acid sequence of human vitronectin deduced from cDNA. Similarity of cell attachment sites in vitronectin and fibronectin *4*, 2519-2524.
- Switala-Jelen, K., Dabrowska, K., Opolski, A., Lipinska, L., Nowaczyk, M., and Gorski, A. (2004). The biological functions of beta3 integrins. *Folia Biol (Praha)* *50*, 143-152.
- Takamoto, M., Endo, T., Isemura, M., Koehibe, N., and Kobata, A. (1989). Structures of Asparagine-Linked Oligosaccharides of Human Placental Fibronectin. *J Biochem* *105*, 742-750.
- Tanaka, Y., Adams, D.H., and Shaw, S. (1993). Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol Today*. *14*, 111-115.
- Timpl, R. (1989). Structure and biological activity of basement membrane proteins. *European Journal of Biochemistry* *180*, 487-502.
- Timpl, R. (1996). Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol*. *8*, 618-624.
- Tomasini, B.R., and Mosher, D.F. (1991). Vitronectin. *Prog Hemost Thromb*. *10*, 269-305.
- Truong, M.J., Gruart, V., Liu, F.T., Prin, L., Capron, A., and Capron, M. (1993). IgE-binding molecules (Mac-2/epsilon BP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. *Eur J Immunol*. *23*, 3230-3235.
- Turner, C.E., Glenney, J.R., Jr., and Burridge, K. (1990). Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J. Cell Biol.* *111*, 1059-1068.
- Volkman, A., and Gowans, J.L. (1965). The origin of macrophages from human bone marrow in the rat. *Br. J. Exp. Pathol* *46*, 62 - 70.
- Wachsstock, D.H., Wilkins, J.A., and Lin, S. (1987). Specific interaction of vinculin with alpha-actinin. *Biochem Biophys Res Commun*. *146*, 554-560.

Wagner, J.G., and Roth, R.A. (2000). Neutrophil Migration Mechanisms, with an Emphasis on the Pulmonary Vasculature. *Pharmacol Rev* 52, 349-374.

Webster, R.O., Zanolari, B., and Henson, P.M. (1980). Neutrophil chemotaxis in response to surface-bound C5A. *Exp Cell Res.* 129, 55-62.

Weerasinghe, D., McHugh, K.P., Ross, F.P., Brown, E.J., Gisler, R.H., and Imhof, B.A. (1998). A Role for the alpha vbeta 3 Integrin in the Transmigration of Monocytes. *J. Cell Biol.* 142, 595-607.

Yang, R.Y., Hsu, D.K., and Liu, F.T. (1996). Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 6737-6742.

Ziegler-Heitbrock, H.W. (2000). Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol* 67, 603-606.

Zocchi, M.R., Ferrero, E., Leone, B.E., Rovere, P., Bianchi, E., Toninelli, E., and Pardi, R. (1996). CD31/PECAM-1-driven chemokine-independent transmigration of human T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 26, 759-767.

# 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](#)