

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
LABORATÓRIO DE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR

***Galectina-3 regula a plasmocitogênese nos
tecidos linfóides primários, secundários e
celomáticos***

Felipe Leite de Oliveira

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, vinculado ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências

Orientadora: Prof^{fa} Márcia Cury El-Cheikh

Novembro, 2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
LABORATÓRIO DE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR

***Galectina-3 regula a plasmocitogênese nos
tecidos linfóides primários, secundários e
celomáticos***

Felipe Leite de Oliveira

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, vinculado ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências

Orientadora: Prof^{fa} Márcia Cury El-Cheikh

Novembro, 2008

FELIPE LEITE DE OLIVEIRA

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, vinculado ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências

EXAMINADO E APROVADO POR:

Dra. Maria Isabel Doria Rossi

Instituto de Ciências Biomédicas – CCS - UFRJ

Dr. Alberto Félix Antonio da Nóbrega

Instituto de Microbiologia e Imunologia – CCS – UFRJ

Dr. Wilson Savino

Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ

Dra. Déa Maria Serra Villa-Verde

Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ

Suplente externa

Dra. Valéria de Mello Coelho

Instituto de Ciências Biomédicas – CCS –UFRJ

Revisora e Suplente interna

Dra. Márcia Cury El-Cheikh

Instituto de Ciências Biomédicas – CCS – UFRJ

Orientadora

Rio de Janeiro

Novembro de 2008

OLIVEIRA, FELIPE LEITE DE

Galectina-3 regula a plasmocitogênese nos tecidos linfóides primários, secundários e celomáticos /

Felipe Leite de Oliveira.

Rio de Janeiro: UFRJ/ICB/PCM, 2008

XIV, 133 f.: il.

Orientadora: Prof^a Márcia Cury El-Cheikh

Dissertação de Doutorado – UFRJ/ICB/PCM, 2008/11/28

Referências Bibliográficas: f.105 - 117

1. Galectina-3; 2. Linfócitos B; 3. Plasmocitogênese; 4. Esquistossomose

I – El-Cheikh, Márcia Cury; II – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas; III – Galectina-3 regula a plasmocitogênese nos tecidos linfóides primários, secundários e celomáticos

AGRADECIMENTOS:

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me guiado por um caminho de vitórias e conquistas. Apesar das pedras e espinhos que surgem como obstáculos, as estradas da vida ficam firmes e floridas, quando acreditamos e contamos com a presença Dele. Obrigado, meu Deus, que é Pai, Filho e Espírito Santo. Amém.

Agradeço aos meus pais Ademir e Maria Rosa, pelas oportunidades que criaram para que eu pudesse desenvolver minha vida acadêmica. Foram vários conselhos, críticas, idéias, e principalmente, experiência de vida. Obrigado pelo suporte familiar, a base que todas as pessoas deveriam ter, para construirmos um mundo melhor. E toda minha família, meu irmão Alexandre; meus sobrinhos Ana Carolina, Arthur e Leandro Jr; meus avós vivos e já falecidos; tios e primos, que sempre me incentivaram nesta longa jornada e foram compreensivos na minha ausência, devido aos compromissos. Amo todos vocês.

À Mara Fernandes Ribeiro. Minha noiva. Pelo amor, carinho, respeito, admiração, luta e compreensão pela ausência. Acompanha-me desde o início do doutorado. Sem dúvida, a maior incentivadora! Escuta, observa, estuda, critica, questiona, argumenta, explica...Pelo lado profissional, uma grande colaboradora. Pelo lado pessoal, minha amiga, companheira fantástica! Formamos uma base sólida, cada dia mais fortalecida. Fundamental para o amadurecimento e estabelecimento de um homem e uma família. Talvez, ela não tenha a exata noção do quanto me ajudou nesta jornada, apesar das minhas declarações da importância que ela tem na minha vida pessoal e profissional. Muito obrigado, Linda! Eu te amo!

À Prof^a Márcia Cury El-Cheikh pela oportunidade de trabalhar e, principalmente, aprender com sua experiência e sabedoria. Sem dúvida, a pessoa que mais me ensinou e me incentivou a pesquisar sempre, desistir jamais. Desde quando cheguei no laboratório, querendo aprender hematopoese até hoje, quase 9 anos depois, a mesma profissional. Exemplar ! Foi e será uma honra poder trabalhar e aprender sempre com ela.

Ao Prof. Radovan pelo acolhimento em seu laboratório, sempre oferecendo as melhores condições de trabalho, dentro da realidade econômica do país. Com

muito orgulho, direi que fiz parte da equipe formada por ele, com professores e alunos responsáveis, profissionais e muito competentes. É unanimidade no campo científico.

Ao Prof. Roger Chammas pela confiança em começar um projeto (do ponto zero mesmo!) comigo, sob orientação em conjunto com a Prof^a Márcia Cury. Um profissional “fora-de-série”. Agradeço a oportunidade de iniciar os primeiros experimentos com células isoladas por citometria de fluxo, no seu laboratório em São Paulo, em 2004. Os 30 dias contínuos e os outros dias avulsos no seu laboratório me renderam resultados incríveis e principalmente me fizeram ver a ciência de forma mais ampla. Espero continuar colaborando com suas pesquisas. Sua ética e o respeito pelos colegas são admiráveis, tanto pelo âmbito profissional quanto pelo ser humano.

À Lauremília Ricon, meu braço direito nas bancadas experimentais. Obrigado pelas críticas e sugestões que enriqueceram nosso trabalho. Sua dedicação, disposição e vontade de trabalhar contribuíram muito para o desenvolvimento do grupo que nomeamos “Galectina-3”. Você assumiu todos os estagiários que fizeram ou fazem parte deste grupo, além de uma líder na organização do laboratório.

Aos componentes do Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular: Silvio e Roberto pelo suporte técnico, Gorete, Edna e Luiz Gustavo pelo suporte administrativo, Professores Radovan Borojevic, Márcia Cury, Kátia Arcanjo, Cristiano Coutinho e Valéria Coelho (do Laboratório de Imunofisiologia) pelos ensinamentos didáticos e práticos, e a todos os alunos que formam uma equipe séria e profissional. O trabalho coletivo sempre vai render bons frutos. Essa mensagem foi passada. Nós temos obrigação de mantê-la e reenviar para os alunos novos, que chegam a cada semestre.

Aos alunos de iniciação científica: Bruno Cabelinho, Léo do Anderson, Claudio, Marcos, Fernando, Natália, Sara e Camila, esta ingressando no grupo “Galectina-3”; aos mestrados, doutorandos, mestres e doutores: Guilherme Maia, Leonardo Boldrini, Anderson Teodoro, Daniel Escorsim, Lígia Paiva, Sabrina Dick, Michel Gantus, Alex Balduino, Hamilton Silva e Adelzon de Paula, um quase-

membro oficial do grupo “galectina-3” que sempre contribuiu com ótimas idéias para o desenvolvimento dos projetos do grupo, apesar da distância física que o separa do laboratório.

Aos amigos irrestritos ao laboratório e de longa data: Osama, HP, Wolly, Gaúcho, Cara-feia, Vovô, Fiocruz, Taxista, Teddy, Tio João, Paulista, Itaperuna. Esses caras sabem a hora de trabalhar e se divertir, com responsabilidade e respeito. Somos irmãos. Valeu ! Vocês me ajudaram, e ajudam muito.

RESUMO

Galectina-3 é uma proteína que possui alta afinidade por β -galactosídeos, potencialmente capaz de reconhecer N-acetilactosaminas presentes na maioria das células e tecidos. No meio extracelular, galectina-3 regula interações célula/célula e célula/matriz extracelular e sua localização intracelular está relacionada a controle de expressão gênica, apoptose, proliferação e diferenciação celular em processos fisiológicos, imunológicos, inflamatórios e tumorais. Animais galectina-3-deficientes (galectina-3^{-/-}) têm sido utilizados como ferramentas biológicas competentes para avaliar o envolvimento desta lectina na homeostase sistêmica e nas respostas inflamatórias.

Algumas células hematopoéticas, como neutrófilos, monócitos e macrófagos, expressam galectina-3 constitutivamente. Durante um processo patológico, estas células passam a expressar alta concentração desta lectina, que interage com determinados ligantes presentes na superfície dos patógenos. O helminto *Schistosoma mansoni* expressa uma quantidade significativa de ligantes de galectina-3 e a presença de seus ovos no parênquima hepático elicitava uma resposta inflamatória granulomatosa dependente de ativação macrofágica local. Os antígenos, derivados dos vermes adultos e de seus ovos, estimulam uma resposta imunológica sistêmica aguda e crônica.

Animais galectina-3^{-/-} infectados pelo *S.mansoni* apresentaram desordens na organização dos granulomas periovulares intra-hepáticos, retardo na diferenciação de monócitos em macrófagos, intensa eosinofilia medular e extramedular, além de uma plasmocitogênese significativa na medula óssea, baço e linfonodos mesentéricos. Devido à redução no número de linfócitos B-2 (B220^{high} CD5^{neg}) nos tecidos linfóides periféricos e ao aumento de imunoglobulinas séricas, foi sugerido que a falta de galectina-3 deve acelerar o programa de diferenciação dos linfócitos B convencionais em plasmócitos. A infecção esquistossomótica amplificou esses fenômenos, já observados nos animais não-infectados.

Os linfócitos B-1, residentes nas cavidades celomáticas, apresentaram maior potencial para realizarem mudança de classe de imunoglobulinas IgM para IgE na ausência de galectina-3. Células B-1a e B-1b dos animais galectina-3^{-/-}

infectados pelo *S.mansoni* apresentaram maiores expressões de IgA e apenas B-1a expressou maiores níveis de IgE. Ambas as subpopulações celulares dos animais galectina-3^{-/-} diminuíram a expressão de IgM de superfície, quando comparados com os animais selvagens (*Wild Type* – WT). A adição de IL-5 no sistema de cultivo de células e o aumento na transcrição do RNAm de IL-5 podem ter sido responsáveis pelo aumento da expressão de B220 e redução da expressão de CD43 na superfície dos linfócitos B-1 peritoneais. Os animais galectina-3^{-/-} não infectados também apresentaram estas características fenotípicas, além de um intenso número de plasmócitos aderidos nas membranas mesentéricas. A falta de galectina-3 induziu um aumento na expressão de Blimp-1, um fator transcricional repressor crítico para a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos, nas células B-1a. Já os linfócitos B-1b expressaram cerca de 2 a 3 vezes mais IL-5 *in vivo* e não alteraram a expressão de Blimp-1, quando comparados com os controles. Esses processos imunológicos indicam um estado de ativação e diferenciação específico para cada tipo celular, que podem ser dependentes de IL-5 e Blimp-1.

A inibição da galectina-3 extracelular *in vitro* e *in vivo* com anticorpos específicos e os ensaios quiméricos utilizando animais WT, galectina-3^{-/-} e GFP⁺, demonstraram que galectina-3 extracelular interfere no fenótipo dos linfócitos B. Em conjunto, nossos resultados sugerem um novo papel para galectina-3 na fisiologia das células B-1 e B-1, através da modulação de B220, CD43, IL-5, Blimp-1 e do programa de plasmocitogênese. Em conclusão, galectina-3 é capaz de regular a homeostase de tecidos linfóides primários, secundários e celomáticos.

ABSTRACT

Galectin-3 is a β -galactoside binding protein that recognizes N-acetylgalactosamine molecules found in several cell types and tissues. In extracellular environment, galectin-3 regulates cell/cell and cell/extracellular matrix interactions. Inside of the cells, this lectin is related to gene expression regulation, control of apoptosis and cellular proliferation and differentiation during physiological, immune, inflammatory and tumoral processes. Galectin-3-knock out mice (galectin-3^{-/-}) have been used as biological tools to evaluate precisely the role of this protein in homeostasis and inflammatory responses.

Some hematopoietic cells constitutively express galectin-3, such neutrophils, monocytes and macrophages. During a pathological process, these cells express higher concentration of this lectin and they can interact with several ligands in pathogen surface. The worm *Schistosoma mansoni* and its eggs display a large amount of the galectin-3 ligands on their surface and they elicit a well characterized granulomatous inflammatory reaction, by macrophage-dependent pathways. The antigens derived from adult parasites and eggs also promote an acute and chronic systemic immune response.

Galectin-3^{-/-} mice infected with *S.mansoni* had remarkable changes in hepatic periportal granulomatous fibers, delay in the monocyte/macrophage differentiation, intense medullary and extramedullary eosinophilia, and a significant plasmacytogenesis in bone marrow, spleen and mesenteric lymph nodes. Due to a decrease of B-2 lymphocyte absolute numbers (B220^{high}CD5^{neg} cells) in peripheral lymphoid tissues and an increase of immunoglobulin concentrations in the serum, it was suggested that the absence of galectin-3 might accelerate the B cell differentiation program into functional plasma cells. Interestingly, the murine schistosomiasis amplified these phenomena because non-infected mice also presented a significant plasmacytogenesis.

Resident splenic B-1 lymphocytes were potentially capable to perform immunoglobulin class switch from IgM to IgE in the absence of galectin-3. B-1a and B-1b cells of galectin-3^{-/-} infected mice express high concentration of surface

IgA and only B-1a express high concentration of surface IgE, in parallel with the reduction of surface IgM in both subpopulations. The addition of IL-5 in cell culture system and the increase of IL-5 RNAm transcription might up-regulate B220 and down-regulate CD43 surface expression in B-1 cells. Galectin-3^{-/-} non-infected mice also presented a phenotypic pattern similar to infected galectin-3^{-/-} mice and a significant plasmacytogenesis in mesenteric membranes. The lack of galectin-3 induced the Blimp-1 expression in B-1a cells, an important repressor transcriptional factor that regulates B lymphocyte differentiation into plasma cells. The B-1b lymphocytes expressed approximately 2 or 3 fold IL-5 *in vivo* and they did not modify the Blimp-1 expression, compared to WT cells. These immunological processes indicate a progressive cell activation and differentiation state which can be dependent of IL-5 and Blimp-1.

The inhibition of extracellular galectin-3 *in vitro* and *in vivo* with specific antibodies and chimeric essays with WT, galectin-3^{-/-} and GFP⁺ mice demonstrated that extracellular galectin-3 interferes in B cell phenotype. Together, our results suggest a new role of galectin-3 in B-1 and B-2 cell physiology modulating B220, CD43, IL-5, Blimp-1 expression and amplifying the plasmacytogenesis program. In conclusion, galectin-3 is able of regulating primary, secondary and celomatic lymphoid tissues homeostasis.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES:

ACK: solução de lise celular, a base de cloreto de amnio e bicarbonato de potssio (Ammonium-Chloride-Potassium).

APC: fluorocromo denominado alofococianina (Allophycocyanin)

ATCC: Banco de células americano com atendimento universal (American Type Culture Collection)

Bcl-6: gene denominado "B cell lymphoma-6"

BCR: receptor de células B (B cell receptor)

Blimp-1: Proteína indutora da diferenciação terminal dos linfócitos B (B lymphocyte induced maturation protein-1)

BSAP: Proteína ativadora específica da linhagem B (B-cell lineage-specific activator protein)

CCl₄ : tetracloreto de carbono

CD: *clusters of differentiation*

CD45RA: isoforma do antígeno comum leucocitário (CD45), contendo 220 KDa de peso molecular

C/EBP: CCAAT/enhancer-binding protein (cytidine-cytidine-adenosine-adenosine-thymidine)

c-Kit: Proteína tirosina quinase contendo 45 kDa (CD117)

CpG: Grupos repetidos de nucleotídeos citosina/guanina unidos por fosfodiéster (p)

CRD – reconhecimento a carboidratos (carbohydrate-recognition domain)

CXCL-12: Quimiocina CXC ligante – 12 (Chemokine [C-X-C motif] ligand - 12)

CXCR-4: receptor de quimiocina CXC-4 (CXC chemokine Receptor - 4)

CY: fluorocromo Cy-Chrome

DAHEICB: D.A.H.E. do Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ

DNA: Ácido Desoxirribonucléico (Deoxyribonucleic acid)

E2A: fator de transcrição que controla etapas iniciais da linfopoesse B (enhancer 2-alfa)

EBF: Fator primário da diferenciação das células B (early B cell factor)

FACS: Isolamento de células marcadas por fluorescência (Fluorescence Activated Cell Sorter)

FCS: soro fetal bovino (fetal calf serum)

FITC: fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (fluorescein isothiocyanate)

Galectina-3^{-/-}: camundongos deficientes para galectina-3

GFP: proteína fluorescente verde (Green Fluorescence Protein)

GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (granulocyte macrophage – colony stimulating factor)

GR-1: marcador de granulócitos (Granulocytes-1)

ICAM-1: molécula de adesão intercelular - 1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule–1)

Ig: imunoglobulina

IL: interleucina

IL-R: receptor de interleucina

INF- γ : interferon – gama

LacNac: resíduos de N-acetil-glicosaminas contendo grupamentos LacdiNac ou Gal β 1-4GlcNac terminais

LacdiNac: N-N'-diacetil-lactose-diamina (N-N' diacetyllactosediamine)

LPS: lipopolissacarídeo

mAB: anticorpo monoclonal (monoclonal antibody)

Mac-1: antígeno de diferenciação de macrófagos - 1 (Macrophages-1)

MHC II: complexo principal de histocompatibilidade classe II (Major histocompatibility complex class II)

NF- κ B: fator amplificador das cadeias pesada e leve das células B ativadas (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

Pax-5: fator de transcrição gênica da família Box (paired box gene 5)

PBS: solução tampão-fosfato (phosphate buffer solution)

PE: fluorocromo ficoeritrina (Phycoeritrina)

PTLN: linfonodos paratímicos (parathymic lymph nodes)

RAG : proteínas ativadoras de recombinação (recombination activation proteins)

Real Time PCR: reação de polimerização em cadeia em tempo real (real time polymerase chain reaction)

RNA_m: Ácido Ribonucléico mensageiro (mesenger Ribonucleic Acid)

STAT-3: ativador de transcrição e transdutor de sinal - 3 (signal transducer and activator of transcription-3)

TdT: transferase deoxinucleotidil-terminal (terminal deoxynucleotidyl transferase)

Ter119: Termicina 119, antígeno eritróide (termicin 119)

TLR: receptor emelhante a Toll (Toll-like receptor)

TNF- α : fator de necrose tumoral – alfa (tumor necrosis factor – alfa)

WT: selvagens; não alterados geneticamente (wild type)

Xbp-1: fator de transcrição denominado proteína-1 ligadora de X-box (X-box binding protein 1)

Índice:

Agradecimentos	V
Resumo	VII
Abstract	X
Lista de Abreviações	XII
1 – Introdução	1
1.1 – Galectinas	1
1.2 – Galectina-3	3
1.2.1 – O envolvimento da galectina-3 na diferenciação mielóide	5
1.2.2 - O envolvimento da galectina-3 na diferenciação linfóide	6
a) Linfócitos T	6
b) Linfócitos B-2 ou convencionais	7
c) Linfócitos B-1	11
d) Plasmócitos	15
1.2.3 - O envolvimento da galectina-3 no decorrer de um processo inflamatório	19
1.2.4 – Reação fibrogranulomatosa	20
2 – Objetivos	24
3 – Resultados	25
3.1 – Cinética da mobilização e diferenciação das células linfo-hematopoéticas durante a esquistossomose experimental murina em camundongos galectin-3 ^{-/-}	25
3.2 – Expressão de IgE na superfície dos linfócitos B-1 e B-2 peritoneais na esquistossomose experimental murina	37
3.3 – Regulação da diferenciação e mudança de classe de imunoglobulinas em linfócitos B-1a e B-1 em animais infectados pelo <i>S.mansoni</i>	48
3.4 – Galectina-3, um regulador de de-adesão de linfócitos B-1 ao mesentério, controla a plasmocitogênese	58
4 – Discussão	89
5 – Referências	103

1- INTRODUÇÃO:

1.1 - Galectinas

As galectinas possuem afinidade por glicoconjugados localizados na superfície celular e na matriz extracelular em diversos tecidos animais, estando envolvidas em uma ampla variedade de processos celulares (*Zanetta e cols.*, 1994). São lectinas extremamente conservadas no reino animal, encontradas em várias espécies de mamíferos, aves, anfíbios, peixes, vermes e esponjas (*Cooper e Barondes, 1999*). Até o momento, foram descritos 15 tipos de galectinas em mamíferos (revisado por *Farmer e cols, 2008*).

Pesquisas recentes indicam que as galectinas participam de diversos fenômenos fisiopatológicos, incluindo respostas imunológicas e inflamatórias, desenvolvimento e progressão tumoral, neuro-degeneração, aterosclerose, diabetes e reparo tecidual. Camundongos geneticamente modificados ou deficientes para uma galectina em particular têm demonstrado a relevância destas moléculas, inclusive como potenciais alvos terapêuticos contra doenças inflamatórias e cânceres (revisado por *Yang e cols.*, 2008).

Uma das principais características das galectinas consiste na capacidade de ligação a determinadas regiões de oligossacarídeos, presentes em glicoproteínas ou glicolipídios em vários tecidos animais (*Barondes e cols., 1994*). Duas propriedades bioquímicas são fundamentais para a identificação destas moléculas: (I) seqüências conservadas de aminoácidos nos sítios de ligação aos carboidratos (CRD – *carbohydrate-recognition domain*) (revisado por *Liu e cols.*, 2002); e (II) alta afinidade por β -galactosídeos, especificamente, nas unidades N-acetilactosaminas (Gal β 1,4GlcNAc; LacNAc) ou nos complexos N- ou O-glicanos (revisado por *Rabinovich e cols.*, 2008).

As galectinas são classificadas de acordo com suas propriedades bioquímicas (Figura 1): **galectinas “proto-type”**, as quais contêm um CRD por unidade e dimerizam-se através de ligações não-covalentes (galectina-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15); **galectina “chimera-type”**, a qual possui um CRD C-

terminal e exibe um domínio N-terminal que favorece interações com outras proteínas(galectina-3); e **galectinas “tandem-repeat”**, as quais possuem dois domínios CRDs conectados por um peptídeo, que reconhecem carboidratos diferentes (galectinas -4, -6, -8, -9 e -12) (Hirabayashi e Kasai, 1993 e Farmer e cols., 2008).

a) Galectinas

tipo	estrutura	galectina
1 CRD		1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 15
quimera		3
2 CRD		4, 6, 8, 9, 12

b) Galectina-3

Interações
cél-cél e célula-matriz

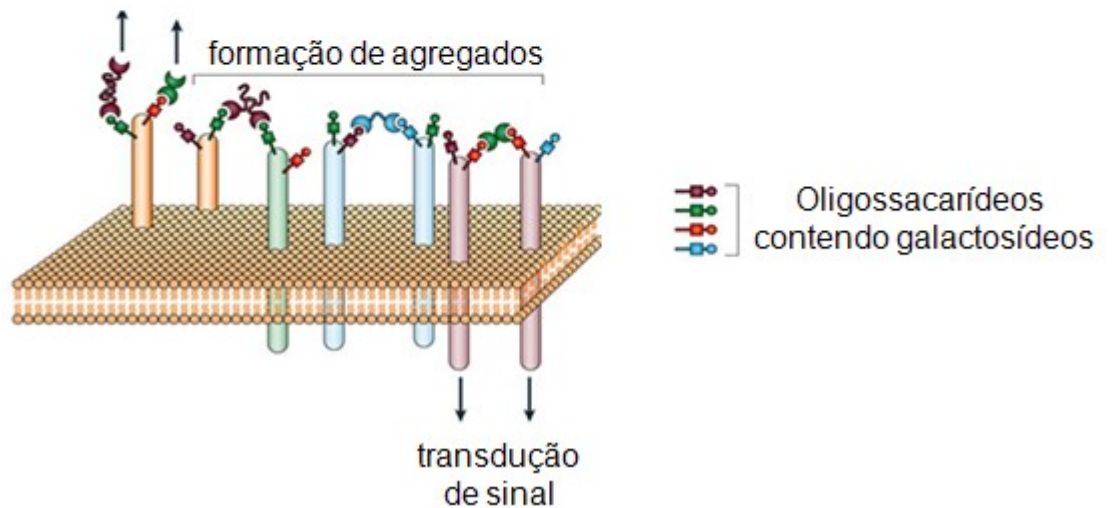


Figura 1: Galectinas são proteínas pertencentes à família de lectinas, caracterizadas por possuírem domínios de reconhecimento a carboidratos (CRDs). A) São 15 tipos de galectinas descritos, até o momento, e classificados de acordo com suas propriedades bioquímicas e funcionais. B) As galectinas podem interagir com gliconjugados e regular eventos de sinalização transmembranares. Figura adaptada de Liu FT e Rabinovich G; Nature Reviews Câncer 2005; 5: 29-41.

As galectinas podem exercer funções extracelulares, regulando interações

célula-célula e célula-matriz extracelular. No meio intracelular, estas moléculas regulam o processamento pós-transcricional de RNAm (*Dagher e cols., 1995*), têm atividade pró-apoptótica (*Yu e cols., 2002*), e anti-apoptótica (*Kuwabara e cols., 2002*), regulam a proliferação e a sobrevivência de linfócitos T CD4⁺ ativados e inibem a secreção de INF- γ e TNF- α (*Rabinovich e cols., 2002*). Dentre os grupos de galectinas, a galectina-3 tem sido relacionada a vários processos fisiológicos e/ou patológicos, como ativação, proliferação, diferenciação, migração e morte celular, além de patologias relacionadas à progressão de tumores.

1.2 - Galectina-3

A galectina-3 foi descrita em 1982 (*Ho e Springer, 1982*) e sua função começou a ser estudada após sua identificação na superfície de células mielóides em diferenciação (*Nibbering e cols., 1987*). Anteriormente, foi denominada: “proteína ligante de IgE – ePB” (*Albrandt e cols., 1987*), “proteína ligante de carboidratos em células 3T3” (*Jia e cols., 1988*) e “Mac-2” (*Cherayil e cols., 1989*). Pode ser encontrada nos compartimentos intracelulares e extracelulares. Nos espaços extracelulares, associa-se a carboidratos e participa de interações célula/célula e célula/matriz extracelular (*Perillo e cols., 1998*). Sua localização nuclear está relacionada à regulação da transcrição de alguns genes, como IL-1 e IL-5 (*Moutsatsos e cols., 1987; Liu e cols., 2002*) e ao controle da proliferação (*Moutsatsos cols., 1987*). No citoplasma, sua concentração está associada ao estado quiescente das células (*Craig e cols., 1995*).

Galectina-3 é expressa constitutivamente por alguns tipos de células, como monócitos e macrófagos (*Liu e cols., 1995*), células endoteliais (*Lotan e cols., 1994*), células epiteliais renais, intestinais e mamárias (*Bao e Hugues, 1995; Lotz e cols., 1993; Castronovo e cols., 1996*). Além disso, esta lectina é expressa durante a progressão de alguns tumores, de acordo com a capacidade proliferativa, invasiva e metastática (*Takenaka e cols., 2004*), como ocorre nos casos de carcinomas mamários (*Shekhar e cols., 2004*), tireoideanos (*Weinberger, 2007*), digestivos (*Castronovo e cols., 1996*), hepáticos (*Hsu e*

cols., 1999), prostáticos (Van den Brûlen, 2000), renais (Francois e cols., 1999), vesicais (Sakaki e cols., 2008), melanomas (Vereecken e cols., 2006; Prieto e cols., 2006), tumores colorretais (Nakamura e cols., 1999), de cabeça e pescoço (Choufani e cols., 1999), uterinos (Shwarz e cols., 1999) e adenocarcinomas pancreáticos (Shimamura e cols., 1999).

A galectina-3 possui atividade anti-adesiva sob diferentes condições fisiopatológicas, principalmente em determinados processos metastáticos. Outras lectinas, como as selectinas, também são consideradas críticas para a modulação da adesão e do tráfego de células tumorais pelo organismo (Rossiter e cols., 1997). Vários estudos relacionam estes efeitos na adesão celular com a progressão tumoral e metástase (revisado por Danguy e cols., 2002). O uso de camundongos galectina-3-deficientes (galectina-3^{-/-}) tem permitido avaliar o envolvimento da galectina-3 na homeostase sistêmica e nas respostas inflamatórias (Figura 2).

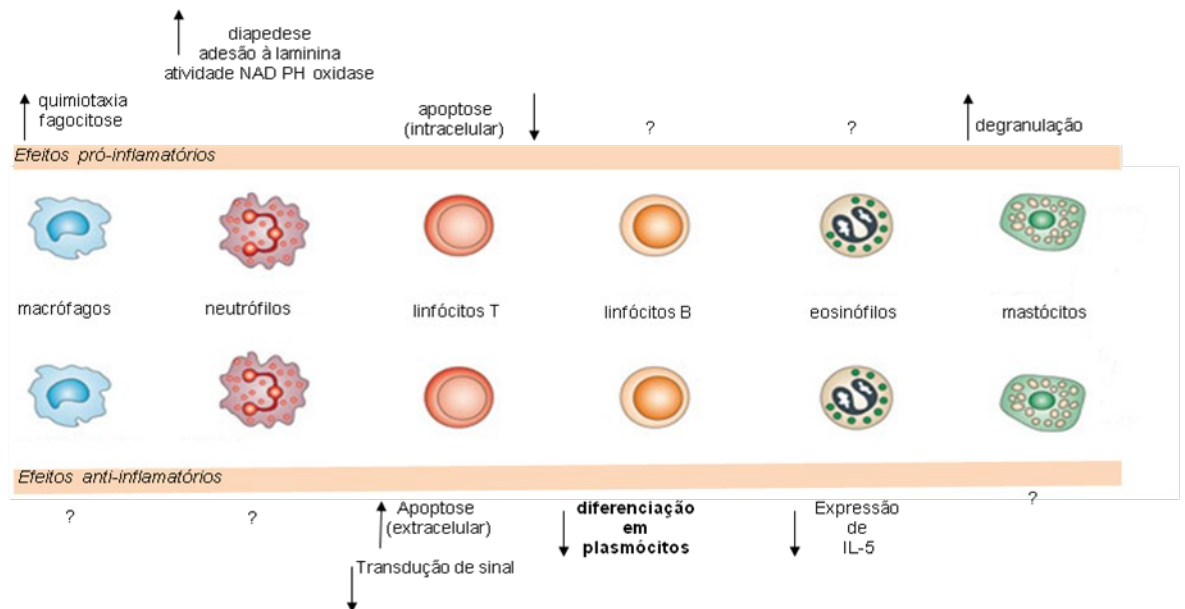


Figura 2: As galectinas participam de diversos processos anti e pró-inflamatórios. Em destaque nos retângulos vermelhos, as principais funções da galectina-3 regulando a atividade de algumas células hematopoéticas e tumorais. Figura adaptada de Liu FT e Rabinovich G; Nature Reviews Câncer 2005; 5: 29-41.

1.2.1 - O envolvimento da galectina-3 na diferenciação mielóide:

As células mielóides são produtos da diferenciação de progenitores mielóides comuns, gerados de células-tronco hematopoéticas pluripotentes mantidas na medula óssea. Estes progenitores têm alto potencial para originarem eritrócitos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos, mastócitos, células dendríticas mielóides e plaquetas (revisado por *Kondo e cols., 2003*).

A mielopoese é regulada pelas interações entre citocinas/receptores e subseqüentes sinalizações intracelulares que estimulam a proliferação e diferenciação dos progenitores (revisado por *Miranda e Johnson, 2007*). Dois fatores de transcrição são críticos para o comprometimento das células-tronco hematopoéticas com a linhagem mielóide: PU.1 e C/EBP, que são reguladores cruciais das etapas iniciais da mielopoese. Camundongos C/EBP- $\alpha^{-/-}$ ou PU.1 $^{-/-}$ têm número reduzidos de granulócitos e monócitos. C/EBP- α ativa a transcrição do gene PU.1, que regula a proliferação e diferenciação dos precursores de granulócitos/macrófagos (*Friedman, 2007*), através da expressão de genes notavelmente envolvidos com a mielopoese, como os receptores de M-CSF, GM-CSF e G-CSF (*DeKoter e cols., 1998*).

A galectina-3 está envolvida na adesão e diferenciação de monócitos, macrófagos e neutrófilos (*Truong e cols., 1993*), regulando a expressão gênica de GM-CSF (*Krugluger e cols., 1997*). Primeiramente detectada na superfície de macrófagos peritoneais murinos estimulados com tioglicolato (*Ho e Springer, 1982*), a galectina-3 foi observada na superfície de monócitos e sua expressão era diretamente proporcional ao estágio de diferenciação em macrófagos (*Liu e cols., 1995*). Entretanto, a expressão de galectina-3 é reduzida à medida que as células dendríticas diferenciam (*Dietz e cols., 2000*). Recentemente, a galectina-3 tem sido utilizada como marcador de diferenciação macrofágica, estando envolvida na formação de policárions (*Le Marer, 2000; Helming e Gordon, 2007*), além de ser essencial para a fagocitose de eritrócitos opsonizados com IgG e de células apoptóticas *in vitro* e *in vivo* (*Sano e cols., 2003*).

Neutrófilos circulantes participam da resposta imune, sendo recrutados para sítios inflamatórios a fim de eliminarem agentes infecciosos através de

mecanismos imunes inatos (*Borregaard e cols., 2001*). Galectina-3 interage com CD66b, presente na membrana destas células, induzindo agregação celular (*Feuk-Lagerstedt e cols., 1999*), adesão à laminina de matriz extracelular (*Kuwabara e Liu, 1996*) e diapedese nos sítios pulmonares infectados por *Streptococcus pneumoniae* (*Sato e cols., 2002*). Durante respostas inflamatórias agudas, a ausência de galectina-3 provoca um retardo no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal, após estímulo com tioglicolato (*Colnot e cols., 1998; Hsu e cols., 2000*).

Os eosinófilos atuam freqüentemente nas inflamações alérgicas e helmínticas, secretando mediadores inflamatórios, como IL-5, que estimula a proliferação e diferenciação destas células (*Owen e cols., 1991*). Processos patológicos caracterizados por alta secreção de IL-5 favorecem uma eosinofilia medular e sistêmica (*El-Cheikh e cols., 1991*). Galectina-3 foi detectada na superfície de eosinófilos provenientes de pacientes com eosinofilia (*Truong e cols., 1993*). No núcleo de algumas linhagens eosinofílicas, age como um repressor da transcrição gênica de IL-5 (*Cortegano e cols., 1998*).

1.2.2 - O envolvimento da galectina-3 na diferenciação linfóide

a) Linfócitos T

Galectina-3 regula apoptose em linhagens celulares derivadas de linfócitos T de forma distinta, dependendo da sua localização (*Yang e cols., 1996*). Galectina-3 intracelular tem função anti-apoptótica, mantendo a integridade da membrana mitocondrial, inibindo a liberação de citocromo c (*Matarrese e cols., 2000 e Yu e cols., 2002*). Em contrapartida, galectina-3 extracelular induz diretamente a morte de linhagens de células T, estimulando a liberação de citocromo c e ativação de caspase-3 (*Fukumori e cols., 2003*). Na superfície das células, galectina-3 interage com receptores contendo um alto grau de glicosilação, como CD45 e CD71, iniciando uma cascata de sinalização que resulta na morte programada. Já os receptores CD29 e CD43, embora

interajam com galectina-3 extracelular, não estão envolvidos na regulação de apoptose dependente desta lectina (Stillman e cols., 2003). Citocinas correlacionadas com ativação e proliferação de Linfócitos T, como IL-2, IL-4 e IL-7, induzem uma alta expressão de galectina-3 intracelular, sugerindo um papel no controle da taxa de proliferação dessas células (Joo e cols., 2001).

Galectina-3 pode estar envolvida com a homeostase tímica e com o processo de depleção dos timócitos duplo-positivos CD4/CD8, uma vez que esta lectina é expressa de forma constitutiva na superfície destas células. Durante o processo de atrofia tímica nos animais desafiados com *Trypanosoma cruzi*, há uma expressão elevada nos níveis de RNAm para galectina-3 e um acúmulo de desta lectina no citoplasma. Entretanto, camundongos galectina-3^{-/-} infectados pelo *T.cruzi* não apresentaram atrofia tímica durante a resposta inflamatória aguda e os valores percentuais dos timócitos duplo-positivos não foram modificados. Neste modelo, foi proposto que a galectina-3 pudesse participar do processo de atrofia tímica, provavelmente regulando mecanismos de adesão/de-adesão ou apoptose dos timócitos (Silva-Monteiro e cols., 2007).

b) Linfócitos B-2 ou convencionais

Os linfócitos B convencionais (linfócitos B-2) constituem uma população de células que expressa clonalmente diversos receptores de imunoglobulinas de superfície e reconhecem epítomos antigênicos específicos. A linfopoese B ocorre nos tecidos linfóides primários (fígado fetal e medula óssea, dos recém-natos e adultos) e as células tornam-se efectoras nos tecidos linfóides secundários, como baço, linfonodos e placas de Peyer, onde diferenciam-se em células secretoras de imunoglobulinas (revisado por Kondo e cols., 2003). Nos animais adultos, os tecidos linfóides secundários podem sustentar a produção e expansão de linfócitos B de modo fisiológico ou diante de um processo inflamatório, fenômeno denominado linfopoese B extramedular (Rossi e cols., 1999).

Um dos principais eventos na diferenciação dos linfócitos B é a síntese e expressão de receptores antigênicos (imunoglobulinas de superfície), formados

por cadeias leves e pesadas, responsáveis pelo repertório elevado de receptores, altamente específicos aos antígenos. A combinação particular dos segmentos gênicos V (variável), D (diversidade), J (juncional) e C (constante), os quais codificam as cadeias pesada e leve das imunoglobulinas, é essencialmente randômica e ocorre sob influência das enzimas ativadoras de recombinação RAG-1 e RAG-2. Estas enzimas se ligam em seqüências específicas de nucleotídeos no DNA, onde regulam o processamento de determinados segmentos gênicos (revisado por *Fugmann e cols., 2000*).

Além do rearranjo dos segmentos gênicos, a diversidade dos receptores pode ser aumentada pela adição na região N-terminal de nucleotídeos para as junções V-(D)-J, que também ocorre de forma randômica, sob a influência da enzima TdT (transferase deoxi-nucleotidil-terminal). Cada célula B também sintetiza um isotipo de cadeia leve: primeiro o complexo gênico κ rearranja e se houver um resultado produtivo, subseqüentemente o genoma λ é bloqueado. Após a criação das proteínas IgH funcionais e da expressão do pré-receptor de células B, as células B progenitoras passam por vários ciclos de proliferação (*Ghia e Cols., 1996*).

Durante as etapas iniciais da diferenciação dos linfócitos B, os precursores linfóides comuns, definidos pelo fenótipo Lin⁻ (B220⁻ Mac-1⁻ GR-1⁻ Ter119⁻ CD19⁻), c-Kit⁺, AA4.1⁺ e IL-7R⁺, têm plasticidade suficiente para originar todas as células da linhagem linfóide, incluindo os linfócitos T, células dendríticas e células NK, além dos linfócitos B (*Rolink e cols., 2001*). As células recém-comprometidas com a geração de linfócitos B passam ao estágio Pré-Pró-B (B220^{low} CD43⁺ c-Kit⁺ CD19⁻ IL-7R⁺) e possuem plasticidade reduzida. Em seguida, diferenciam-se em células Pró-B (B220^{low} CD43⁺ CD19^{low} c-Kit⁺ IL-7R⁺) e iniciam os rearranjos dos segmentos gênicos V, D e J, pois tornam-se RAG-1⁺, RAG-2⁺ e TdT⁺. Tais enzimas são responsáveis pela formação de parte da cadeia pesada μ . Entretanto, ainda não expressam IgM e IgD na superfície (Figura 3).

Etapas iniciais da Linfopoese B-convencional

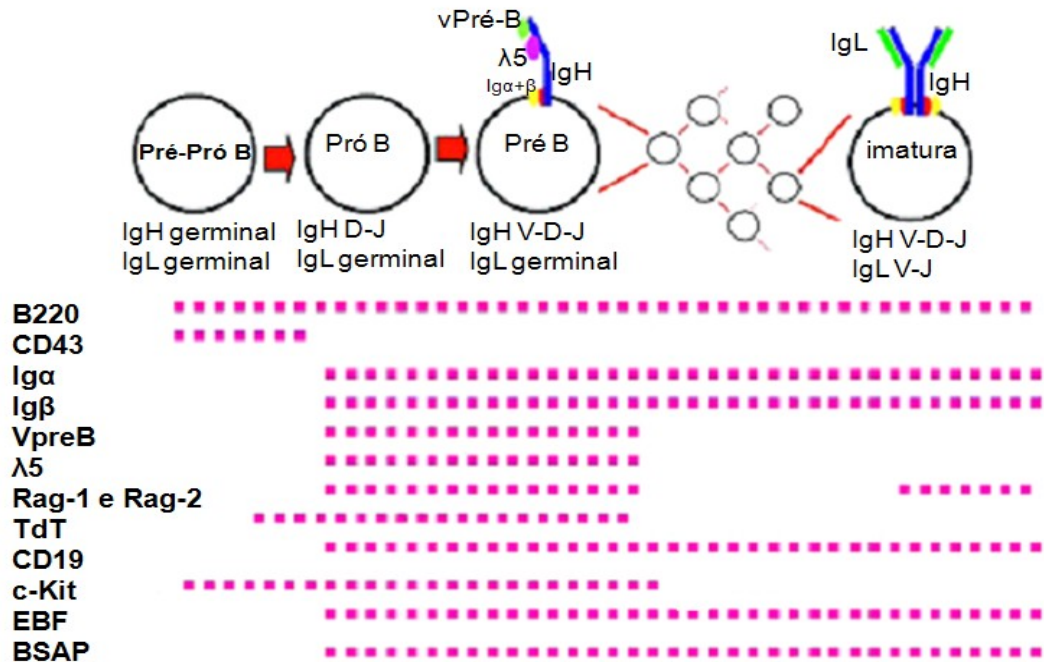


Figura 3: Marcadores de diferenciação dos linfócitos B. Padrão de expressão de genes críticos para as primeiras etapas da linfopoese B, indicando as fases da diferenciação onde o pré-receptor e, posteriormente, o receptor de células B é expresso. Figura adaptada de Smith e Sigvardsson, *Journal of Leukocyte Biology* 2004; 75:973-981.

A especificação dos linfócitos B-2 durante a linfopoese envolve a expressão gênica de componentes do pré-BCR: *VpreB*, $\lambda 5$ e *mb-1*, além dos rearranjos D-J no *locus* IgH. Os fatores de transcrição E2A e EBF são essenciais para ditar a ordem e o ritmo do programa de diferenciação dos linfócitos B. Na ausência de E2A ou EBF, o desenvolvimento dos linfócitos B fica bloqueado antes dos rearranjos dos segmentos D e J da cadeia pesada, pois os genes *RAG-1* e *RAG-2* não são expressos (revisado por Ye e Graf, 2007). Entretanto, a medula óssea destes animais contém células pró-B B220⁺ CD43⁺ (Lin e Grosschedl, 1995).

Outros fatores de transcrição relacionados ao comprometimento com a linhagem linfóide B também se destacam, como Ikaros, PU.1 e Pax-5 (revisado por *Hardy, 2003*). Animais *Ikaros*^{-/-} apresentam um bloqueio completo da linfopoese B (*Wang e cols., 1996*). O fator PU.1, além de controlar a mielopoese, está relacionado com a regulação da expressão do receptor de IL-7 (*DeKoter e cols., 2002*). Animais *Pax-5*^{-/-} apresentam progenitores medulares de células B expressando genes relacionados ao comprometimento com a linfopoese B, como *VpreB* e *Rags*, sem prosseguir da fase pró para a fase pré-B (*Urbanek e cols., 1994*). Esses dados indicam que distintas vias sinalização convergem, no sentido de iniciar e controlar o programa de diferenciação dos linfócitos B (figura 4).

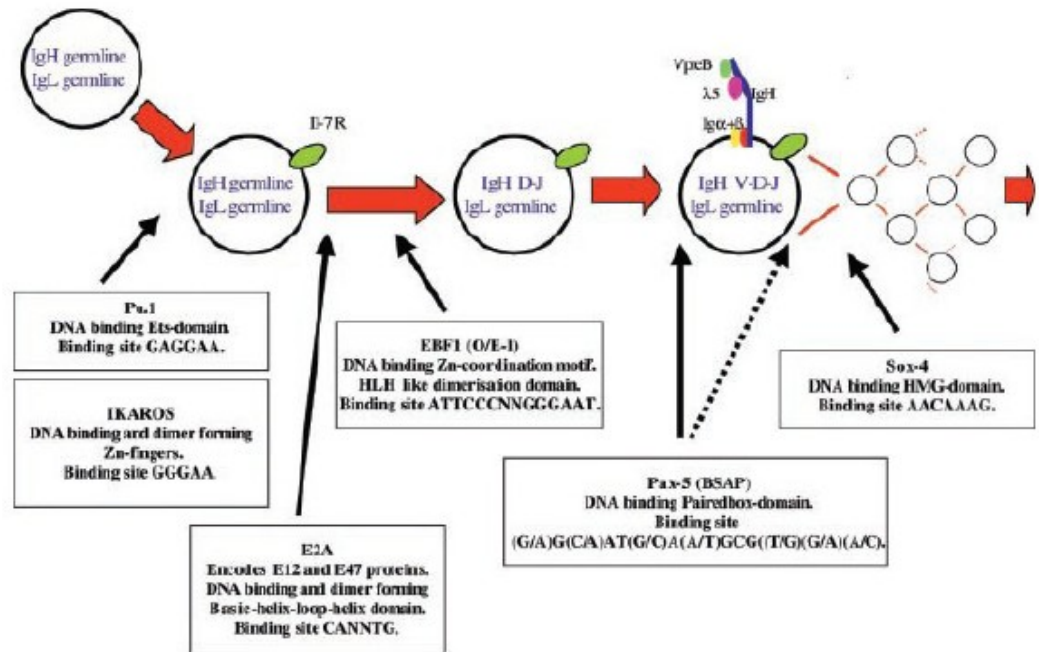


Figura 4: Hierarquia funcional dos fatores de transcrição envolvidos com a linfopoese B. A figura representa um diagrama esquemático, representando as fases que são bloqueadas quando um dos genes listados é inativado. Em destaques nos retângulos, a nomenclatura dos fatores de transcrição. Figura adaptada de Smith e Sigvardsson, *Journal of Leukocyte Biology* 2004; 75:973-981.

Na fase subsequente, as células pré-B (B220^{low} CD43⁻ CD19^{low} IL-7R⁻ c-Kit⁺ CD25⁺ RAG-1⁺ RAG-2⁺ TdT⁺ IgM⁻ e IgD⁻) formam a cadeia pesada de IgM, que permanece intracitoplasmática (pré-IgM) e em seguida, rearranjam os segmentos V e J codificantes das cadeias leves das imunoglobulinas a partir dos complexos gênicos κ e λ (Van Zelm, 2005).

As células chegam à fase imatura (B220^{high} CD43⁻ CD19^{high} c-Kit⁻ IL-7R⁻ RAG-1⁺ RAG-2⁺ IgM⁺ IgD⁻) quando o receptor de células B (BCR – *B cell receptor*) está completamente formado. Saem da medula óssea e via corrente sanguínea, chegam nos tecidos linfóides periféricos e passam a expressar IgD na superfície. A expressão simultânea de IgM e IgD é possível pelo processamento alternativo do RNA e tornam as células aptas a responderem a estímulos antigênicos. Como cada um dos precursores produz um receptor de superfície singular, os linfócitos B-2 maduros passam a ter um repertório muito vasto de receptores antigênicos específicos e compõem a população majoritária de linfócitos B circulantes. Caso encontrem seus respectivos antígenos, proliferam e diferenciam-se em plasmócitos CD138⁺ (revisado por *LeBien e Tedder, 2008*).

Durante as etapas terminais da diferenciação, os linfócitos B-2 periféricos podem passar por processos seletivos ainda na medula óssea e nos tecidos linfóides secundários, especificamente nos centros germinativos. Células dendríticas foliculares, de origem mesenquimal, apresentam antígenos aos linfócitos B (centroblastos ou centrócitos), provavelmente na forma de imunocomplexos. Nesse estágio da diferenciação, as células estão aptas a realizarem hipermutação somática dos genes que codificam as regiões variáveis das moléculas de imunoglobulinas (maturação por afinidade ao antígeno). Sob influência direta dos linfócitos T e/ou de citocinas, os rearranjos gênicos também podem ocorrer nos segmentos codificadores da região constante das cadeias pesadas das imunoglobulinas, resultando na perda de IgM ou IgD e posterior síntese de uma nova classe de imunoglobulina, como IgG, IgA ou IgE (mudança de classe). Esses eventos precedem a diferenciação terminal dos linfócitos B em

plasmócitos secretores de anticorpos (revisado por *LeBien e Tedder, 2008*).

Estudos recentes indicam que a galectina-3 tem participação crítica no processo de diferenciação dos linfócitos B. Quando a transcrição do gene que expressa galectina-3 foi inibida por oligonucleotídeos *antisense*, foram observados aumento no número de células B diferenciadas (plasmócitos) e maior sobrevivência dependente de IL-4, em animais infectados com *T. cruzi* (*Acosta-Rodrigues e cols., 2004*). Concentrações elevadas de galectina-3 em populações específicas de células B têm efeitos anti-apoptóticos durante a transformação ou progressão de certas neoplasias de células B (*Hoyer e cols., 2004*). Entretanto, animais galectina-3^{-/-}, até então, não tinham sido utilizados para estudos que pudessem esclarecer o envolvimento da galectina-3 na linfopoese B e na plasmocitogênese.

c) Linfócitos B-1

Os linfócitos B-1 diferem das células B convencionais (B-2) na origem embrionária, localização anatômica, capacidade de auto-renovação e rearranjo dos segmentos gênicos das cadeias pesada e leve de IgM. São populações celulares residentes e majoritárias nas cavidades celomáticas, como a cavidade peritoneal e a pleural. Localizam-se em menores proporções no baço e são virtualmente ausentes nos linfonodos, placas de Peyer e no sangue periférico em mamíferos roedores (*Kantor e cols., 1991; Hardy e Hayakawa, 1994*).

Os linfócitos B-1 apresentam fenótipo distinto, em relação aos linfócitos B-2. As células B-1 peritoneais são B220^{low} IgM^{high} IgD^{low} CD43⁺ CD23⁻ e Mac-1⁺ (Figura 5), enquanto os linfócitos B-2 são caracterizados pelo fenótipo B220^{high} IgM^{low} IgD^{high} CD43⁻ CD23⁺ e Mac-1⁻. Os linfócitos B-1 são subdivididos em duas subpopulações, de acordo com a presença ou ausência da molécula CD5 na superfície: linfócitos B-1a (CD5⁺) e linfócitos B-1b (CD5⁻) (*Kantor e Herzemberg, 1993*).

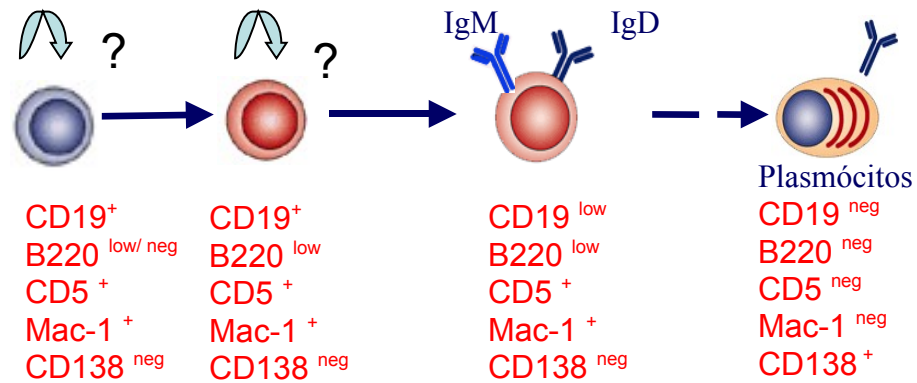


Figura 5: Esquema representativo da diferenciação dos linfócitos B-1a, que são mantidos por auto-renovação na cavidade peritoneal adulta e diferenciam-se em plasmócitos secretores de IgA, principalmente, na mucosa intestinal.

Os linfócitos B-1a originam-se primeiramente no período embrionário e são expandidos a partir de precursores bipotentes presentes no fígado fetal, capazes de gerar tanto linfócitos B-1 quanto macrófagos. Essas células constituem uma população minoritária do total de células B e são mantidas por auto-renovação (Marcos e cols., 1993). As células B-1b são mantidas por progenitores hematopoéticos presentes na medula óssea, identificados pelo fenótipo B220^{low/neg} CD19⁺. São raríssimos no fígado fetal e contribuem para o equilíbrio homeostático dos linfócitos B peritoneais nos animais adultos (Montecino-Rodriguez e cols., 2006) (Figura 6).

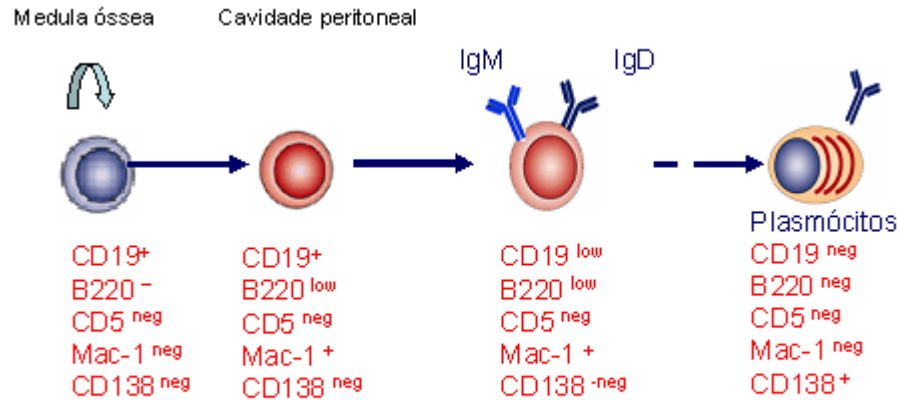


Figura 6: Esquema representativo da diferenciação dos linfócitos B-1b, que são mantidos por progenitores presentes na medula óssea adulta e migram para a cavidade peritoneal continuamente. Posteriormente diferenciam-se em plasmócitos secretores de IgM, gG, IgE e IgA.

Os linfócitos B-1 peritoneais secretam a maior parte dos anticorpos IgM naturais, geralmente produzidos contra lipopolissacarídeos de parede celular bacteriana (LPS), estabelecendo uma das primeiras linhas de proteção contra bactérias encapsuladas, como *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Salmonella spp*, por exemplo. Além disso, os linfócitos B-1 originam a maioria dos plasmócitos secretores de IgA presentes na mucosa intestinal, interagindo com os antígenos bacterianos derivados da microbiota local, aparentemente através de uma via dependente de IL-5 e TGF- β (Kroese e Bos, 1999; Martin and Kearney, 2001; Baumgarth cols., 2005).

O receptor de IL-5 (IL-5R) é expresso em todos os subtipos de células B-1, e em uma pequena população (2 a 4%) das células B-2 esplênicas (Takatsu e cols., 1994). Linfócitos T_H2 e mastócitos peritoneais produzem níveis elevados de IL-5, induzindo a proliferação e a diferenciação em células produtoras de IgA (Mita e cols., 1989). O receptor completo de IL-5 consiste de duas proteínas de membrana distintas, alfa (IL-5R- α) e beta (IL-5- β). A ligação de IL-5 ocorre diretamente na cadeia alfa, e a forma beta aumenta a afinidade do receptor com

o ligante, gerando sinais que são transduzidos até o núcleo (*Ogata cols., 1998; Kikuchi cols., 2000*).

A cavidade peritoneal é uma região peculiar que agrega linfócitos e outras células do sistema imunológico. Entretanto, ao contrário da distribuição celular organizada dos órgãos linfóides primários e secundários, as células mielóides e linfóides presentes na cavidade peritoneal ficam dispersas no fluido peritoneal e aderidas às estruturas mesentéricas, como o omento (*Solvason e cols., 1991; Pinho e cols., 2005*) e o mesentério. Ambos os sítios são compostos por células mesoteliais que expressam algumas moléculas de adesão, como ICAM-1 (*Intercellular Cell Adhesion Molecule-1*), sugerindo um papel na regulação da homeostase da cavidade peritoneal, pois estes tecidos originam ou mantêm células do sistema imune peritoneal, como os macrófagos residentes e os linfócitos B-1. Esses dados são de extrema importância e permitem propor questões relacionadas à proliferação, adesão e diferenciação das células presentes neste microambiente.

Pouco se sabe sobre os mecanismos que regulam a entrada, a saída e o acúmulo das células nas cavidades celomáticas. Dentre as moléculas envolvidas no controle da ativação, migração e diferenciação das células B peritoneais, duas são intensamente glicosiladas e provavelmente são importantes sítios de ligação da galectina-3: CD43 e B220 (CD45RA). Recentemente, foi demonstrado que alguns ligantes de CD43 compreendem membros da família das galectinas (*revisado por Yang e cols., 2008*) que interagem com resíduos polilactosamínicos encontrados nos domínios extracelulares da molécula CD43 (*Hernandez e cols., 2006*). O fato de CD43 ter um alto grau de sialilação favorece uma função anti-adesiva e uma alta capacidade de ligação a lectinas, como descrito para galectina-1 e galectina-3 (*Stillman e cols., 2006*). Esta sialoglicoproteína é expressa na superfície das células B na medula óssea, durante as fases de diferenciação dependentes de estroma, bem como na superfície dos linfócitos B-1 peritoneais (*Smith e Sigvardsson, 2004*).

A molécula CD43 está envolvida com o processo de migração dos leucócitos peritoneais. Quando sua síntese é inibida, o egresso das células peritoneais fica prejudicado (*Woodman e cols., 1998*). Além disso, a não-exposição de CD43 na membrana de neutrófilos interfere na migração dessas células (*Lopez e cols., 1998*). Contudo, o papel de CD43 na regulação do tráfego de células B-1 peritoneais é pouco conhecido. Uma molécula de adesão expressa pelas células mesoteliais (*mesothelial cell intercellular adhesion molecule-1*), foi descrita como um potente ligante de CD43 (*Ziprin e cols., 2004*). Estas moléculas poderiam regular ciclos de adesão e de-adesão, e conseqüentemente, influenciarem na fisiologia dos linfócitos B-1 na cavidade peritoneal.

Para se diferenciarem em plasmócitos secretores, como as células B-2, os linfócitos B-1 necessitam da expressão de Blimp-1 (*B lymphocyte induced maturation protein-1*), um fator transcricional crítico na orquestração do programa de diferenciação em plasmócitos secretores de imunoglobulinas (*Savitsky and Calame, 2006*).

d) Plasmócitos

Os plasmócitos representam menos de 1% do total de células presentes nos órgãos linfóides. São responsáveis pela produção de todos os anticorpos circulantes. Apesar desse crítico papel na imunidade, a plasmocitogênese e o desenvolvimento destas células ainda são pouco esclarecidos. Embora seja sabido que as subpopulações de linfócitos B maduros sejam aptas a diferenciarem em plasmócitos, as alterações fenotípicas não têm sido suficientes para distinguir a origem destas células efetoras. Durante o processo de diferenciação, os linfócitos B modificam o perfil de expressão das moléculas de superfície, tornando-se negativas para imunoglobulinas de superfície CD19, B220, MHC II, CD5 e Mac-1 (*revisado por Hayakawa e Hardy e cols., 2000*) (Figura 7).

ectópica, em clones leucêmicos e em células B esplênicas, é suficiente para induzir a secreção de IgM nessas células (*Piskurich e cols., 2000*). Caso seja expresso numa fase inapropriada do desenvolvimento, o linfócito B entra em apoptose (*Messika e cols., 1998*).

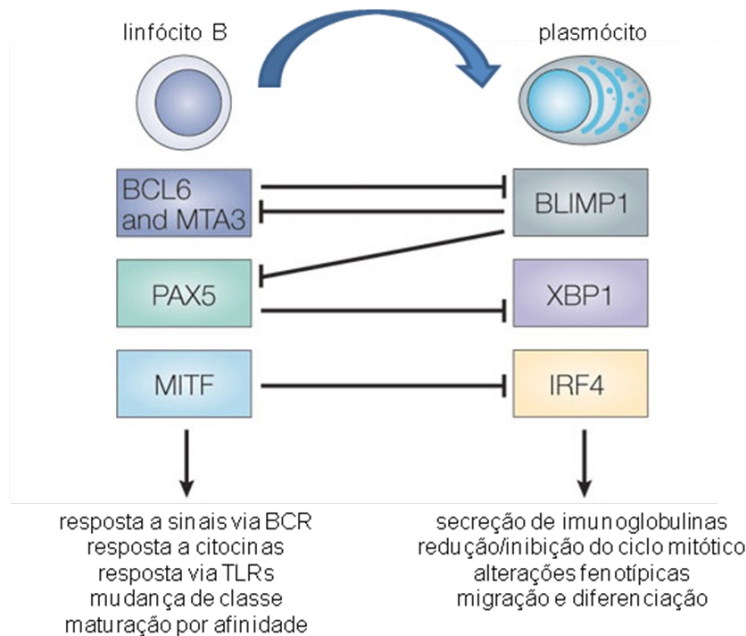


Figura 8: Esquema representativo da ativação e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos. Os fatores transcricionais BCL-6 (B-cell lymphoma 6), MTA3 (metastasis-associated 1 family, member 3), MITF (microphthalmia-associated transcription factor) e PAX5 (paired box protein 5) reprimem a plasmocitogênese, inibindo a expressão de Blimp-1 (B-lymphocyte-induced maturation protein 1), XBP1 (X-box-binding protein 1) e IRF4 (interferon-regulatory factor 4). Nos plasmócitos, Blimp-1 reprime a expressão de genes associados com a linhagem B, prevenindo uma provável de-diferenciação dos plasmócitos. Figura publicada por Shapiro-Shelef e Calame em 2005; *Nature Reviews Immunology*.

Em condições fisiológicas, Blimp-1 é expresso em plasmócitos secretores de imunoglobulinas e em um subgrupo de células B de centros germinativos com fenótipo parcial de plasmócitos (provavelmente, plasmablastos), mas não é detectado em células B de memória (*Angelin-Duclos e cols., 2000*). Nos linfócitos B maduros, Blimp-1 reprime a expressão de Pax-5 porque se liga diretamente no seu promotor, e essa repressão dependente de Blimp-1 é crucial para a diferenciação dos plasmócitos (*Lin e cols., 2002*).

O RNAm de Blimp-1, assim como a proteína Blimp-1, são produtos encontrados em plasmablastos, plasmócitos secretores de imunoglobulinas e em uma subpopulação de células B presentes nos centros germinativos (*Angelin-Duclos e cols., 2000*). A regulação da expressão de Blimp-1 tem sido alvo de freqüentes estudos. Algumas citocinas, como IL-2, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-21 induzem a expressão do RNAm de Blimp-1 (*Ozaki e cols., 2004*), provavelmente via STAT-3 (*signal transducer and activator of transcription-3*) que é um fator de transcrição ativado pela maioria destas citocinas (*Reljic e cols., 2000*). Além disso, células B estimuladas com LPS via TLR4 e com CpG via TLR9, também induzem a transcrição do RNAm de Blimp-1 (*Schliephake e Schimpl, 1996*).

Células B-1 peritoneais de animais Blimp-1^{-/-} apresentaram problemas para secretarem imunoglobulinas, cuja produção chegou a ser 14 vezes menor do que nos animais controles, provavelmente devido às falhas na repressão de Pax-5. Assim, foi sugerido que o programa de diferenciação de plasmócitos é dependente de Blimp-1 tanto nos linfócitos B-2 quanto nos linfócitos B-1 (*Stavisky e Calame, 2006*).

Estudos em camundongos Blimp-1/GFP+ têm permitido identificar, quantificar e isolar plasmócitos para avaliações específicas. Os autores subdividiram as populações de plasmócitos de acordo com os níveis de expressão de Blimp-1. Cerca de 50% dos plasmócitos esplênicos de camundongos adultos não-estimulados apresentaram alta expressão de Blimp-1 (Blimp-1^{high}) e a outra metade apresentava uma expressão intermediária (Blimp-1^{int}). Na medula óssea, virtualmente todos os plasmócitos apresentaram fenótipo Blimp-1^{high}, enquanto no sangue, os raríssimos plasmócitos detectados foram Blimp-1^{int}. Quanto ao fenótipo, as células Blimp-1^{int} ainda mantêm alguma expressão de B220, CD19, CD43, CD22 e MHC classe II, enquanto as células Blimp-1^{high} foram essencialmente negativas para esses marcadores. Outros marcadores fenotípicos apareceram nas células Blimp-1^{int} e foram mantidos nas células Blimp-1^{high}, como sindecan-1 (CD138) e CXCR4 (receptor de CXCL12). Esses autores não revelaram o perfil de expressão de Blimp-1 de acordo com o

fenótipo e estágio de diferenciação dos linfócitos B-1 (*Fairfax e cols, 2007*).

Para uma resposta imune inata ou adaptativa ser bem sucedida, é necessário que a superfície dos microorganismos seja reconhecida pelas células do sistema imunológico, através de estruturas moleculares específicas. Dentre as principais interações, podemos destacar proteínas que se associam a carboidratos de membrana, como por exemplo, as lectinas. Estas moléculas interagem com polissacarídeos presentes na superfície dos patógenos e os discriminam das moléculas próprias do organismo (*Ofek e cols., 2000*). Geralmente, tais interações resultam em uma cascata de sinalização intracelular que regula uma atividade funcional. Além disso, formam um complexo patógeno-receptor que é reconhecido por fagócitos. Como resultado, ocorre fagocitose ou ativação do sistema complemento (*Holers e cols., 2003*).

A restrição da atividade de galectina-3 endógena *in vitro* aumentou o tempo de sobrevivência dos linfócitos B, que não modularam a produção de Blimp-1, após terem sido estimulados com IL-4. Estes eventos favoreceram a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos secretores de imunoglobulinas e a resolução da infecção por *T. cruzi*, evidenciando um provável envolvimento da galectina-3 na geração de plasmócitos ou de células de memória (*Acosta-Rodrigues e cols., 2004*)

1.2.3 - O envolvimento da galectina-3 no decorrer de um processo inflamatório

Na última década, os animais galectina-3^{-/-} têm sido utilizados como uma potente ferramenta biológica para estudos que relacionam a galectina-3 com mecanismos moduladores das respostas inflamatórias. Primeiramente, foram demonstradas alterações na dinâmica de granulócitos peritoneais recrutados após a injeção intraperitoneal de tioglicolato, um estímulo inflamatório agudo e de curta duração (*Colnot e cols., 1998*). Em seguida, o mesmo modelo de inflamação aguda com tioglicolato foi utilizado por outros pesquisadores, que observaram alterações morfológicas nos macrófagos peritoneais dos animais galectina-3^{-/-}, sugerindo uma menor capacidade de ativação destes macrófagos,

níveis de resposta via NF- κ B reduzidas e maior taxa de sobrevivência após estímulo pró-apoptóticos. Foi concluído que a galectina-3 age como um regulador positivo das respostas inflamatórias agudas na cavidade peritoneal (Hsu e cols., 2000). Outros modelos de infecções agudas demonstraram a participação da galectina-3 na modulação destas respostas, principalmente regulando os mecanismos inatos que envolvem ativação e migração de granulócitos e macrófagos (Zuberi e cols., 1994; Yamaoka e cols., 1995; Kubawara e cols., 1996; Karlsson e cols., 2000; Sano e cols., 2000; Sato e cols., 2002).

Modelos de inflamação aguda, que envolvem resposta imune adquirida, também têm revelado que a galectina-3 pode ter papel-chave nestes mecanismos. Linfócitos B ativados pelo *T. cruzi* aumentam a expressão de galectina-3 intracelular e este fenômeno está associado a um atraso na diferenciação destas células em plasmócitos devido à inibição da expressão de Blimp-1 (Acosta-Rodrigues e cols., 2004). Nos últimos anos, alguns autores têm proposto um novo papel para galectina-3, regulando a interface entre a imunidade inata e adaptativa (Bernardes e cols., 2006).

Como a inibição da atividade da galectina-3 alterou o programa de diferenciação dos linfócitos B em animais infectados pelo *T. cruzi* (Acosta-Rodrigues e cols., 2004), foi sugestivo avaliar o envolvimento desta lectina na linfopoese B e na plasmocitogênese em animais desafiados com uma infecção crônica que causasse uma ativação policlonal das células B, como a esquistossomose experimental murina. Assim, foi possível investigar o papel da galectina-3 na ativação, migração e diferenciação dos linfócitos B.

1.2.4 - Reação fibrogranulomatosa

Em doenças parasitárias que induzem uma reação granulomatosa complexa, como a esquistossomose (*Schistosoma mansoni*), a participação de galectina-3 é controversa. Esta patologia é caracterizada por uma contínua mobilização de células linfóides e mielóides para os tecidos comprometidos com

o processo infeccioso (*El-Cheikh cols., 1991; Borojevic, 1992 e Dutra cols., 1997*). Esse modelo de infecção é considerado um excelente modelo *in vivo* para estudar processos inflamatórios crônicos, pois é caracterizado pela presença permanente de vermes adultos no sistema venoso mesentérico e por ovos embolizados em pequenos vasos, que induzem uma reação granulomatosa intra-hepática e nas paredes intestinais (*Philips e Colley, 1978; El-Cheikh e Borojevic, 1990; Borojevic, 1992*).

O início da postura dos ovos de *S. mansoni* no sistema mesentérico ocorre por volta de 40 dias após a infecção e a fase inicial da resposta inflamatória granulomatosa periovular é dependente de macrófagos residentes, como as células de Kupffer (*Domingo e cols. 1968*). A ativação local destes macrófagos induz a secreção de citocinas e de fatores quimiotáticos fundamentais para a mobilização e ativação de outras populações celulares, estabelecendo a fase aguda (*Borojevic e cols., 1984; Boros e cols., 1994*) (Figura 9).

Embora haja uma estimulação contínua pelos antígenos derivados do parasita, a reação granulomatosa é modulada e a resposta inflamatória torna-se crônica (*Stadecker e cols., 1992*), caracterizada por uma intensa reatividade macrofágica peritoneal associada a uma hiperplasia das linhagens mielóides e linfóides (*Lenzi e cols., 1996*). Nesta fase, ocorre uma esplenomegalia estabelecida pela intensa ativação e proliferação policlonal de linfócitos B nos centros germinativos (*El-Cheikh e cols., 1994*), associada à regulação dos isótipos de imunoglobulina, principalmente IgE (*Lopes e cols., 1990; El-Cheikh e cols., 1991*). Além disso, há um remodelamento da reação granulomatosa, passando da fase exudativa para um perfil fibrótico (*Boros, 1982*).

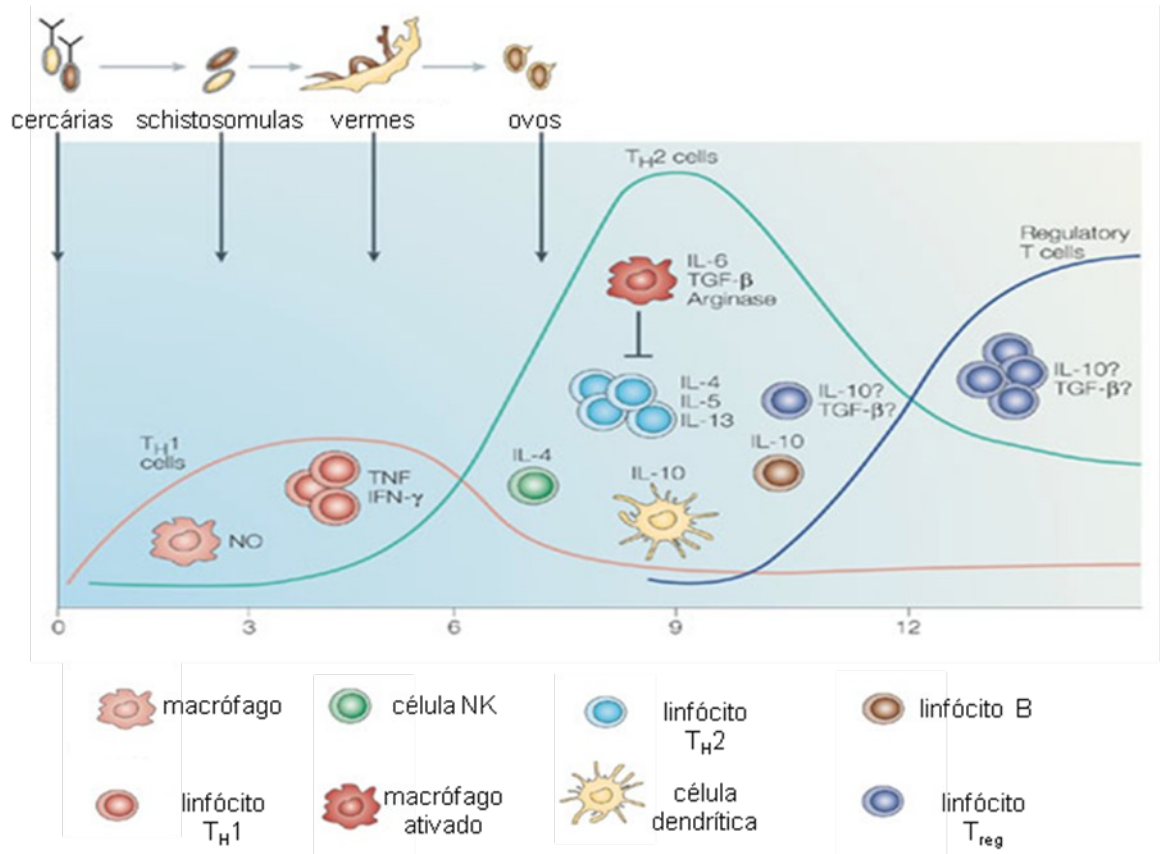


Figura 9: A infecção esquistossomótica é iniciada pela ativação de macrófagos residentes, que desenvolvem uma resposta imunológica TH1. Após o amadurecimento dos vermes e a ovoposição, células NK são ativadas, assim como células dendríticas, que secretam mais IL-10 e menos IL-12, modulando a resposta para a via Th2. Os linfócitos B-1 e B-2 produzem IL-10, em resposta aos antígenos derivados dos ovos do parasita e dos vermes adultos, sendo estimulados a se diferenciarem em plasmócitos. Figura publicada por Dunne e Cooke em 2005; *Nature Reviews Immunology* 5, 420-426.

O *S. mansoni* é um helminto que sintetiza diferentes glicoconjugados derivados de estruturas N-acetil-galactosamina 1-4 N-acetil-glicosaminas, como GalNAc1-4(Fuc1-3) GlcNAc (LacDiNAc), que podem elicitar uma resposta imune humoral contra o parasita e são importantes ligantes de galectina-3 extracelular (Nyame e cols., 2003; van den Berg e cols., 2004). A expressão progressiva desta lectina está relacionada temporal e espacialmente com a indução e resolução da fibrose hepática. Animais galectina-3^{-/-} desafiados com CCl₄ apresentaram fibrose hepática reduzida e a inibição da transcrição de galectina-3

bloqueou a ativação de miofibroblastos e a síntese de pró-colágeno *in vitro* e *in vivo*, sugerindo uma participação crítica da galectina-3 na ativação dos miofibroblastos e na produção de componentes da matriz extracelular (Henderson e cols., 2006).

Recentemente foi demonstrado que durante a fase aguda da esquistossomose murina, a ausência de galectina-3 não interferiu com a estrutura dos granulomas peri-ovulares, formados a partir da deposição de ovos no parênquima hepático (Bickle e Helmbly, 2007). Subseqüentemente, foi observado que células dendríticas poderiam estar envolvidas na modulação das respostas Th1 e Th2, bem caracterizadas nesta infecção. A ausência de galectina-3 não causou impacto direto na fisiologia destas células, mas revelou que esta lectina é um importante modulador das respostas inflamatórias durante tal infecção helmíntica (Breuilh e cols., 2007).

Portanto, pode-se afirmar que a esquistossomose experimental murina, cuja resposta inflamatória granulomatosa é modulada inicialmente por macrófagos residentes no parênquima hepático, representa um interessante modelo para estudar a mobilização de células inflamatórias. Há um intenso recrutamento celular para a região abdominal, a partir de precursores mielóides e linfóides existentes na medula óssea e no timo. Assim, com animais galectina-3^{-/-}, nosso grupo se dispôs a estudar a importância desta lectina nos principais fenômenos biológicos envolvidos com as respostas inflamatórias, bem como os aspectos fisiológicos que regulam o processo de plasmocitogênese.

Resultados preliminares observados em nosso laboratório revelaram que a reação granulomatosa periovular nos animais galectina-3^{-/-} possuíam características morfo-fisiológicas diferentes, daquelas observadas nos animais selvagens. Estas variações tornaram-se mais acentuadas quando a reação fibrótica periovular foi caracterizada pela coloração com Picro-Sirus Red modificado (Dolber e Spach, 1993), durante evolução da fase crônica da doença. Nos animais selvagens, a reação fibrogranulomatosa apresentou depósitos densos e concêntricos de colágeno ao redor dos ovos, contendo poucas células inflamatórias. Nos animais galectina-3^{-/-}, a fibrose apresentou-se muito menos

acentuada e foi essencialmente limitada à região mais central do granuloma, imediatamente adjacente aos ovos.

As análises qualitativas e quantitativas, após a digestão enzimática dos granulomas deficientes de galectina-3, revelaram diferenças fundamentais entre os dois grupos de animais, como maior quantidade de eosinófilos e células mononucleares (monócitos e linfócitos), além de reduzido número de macrófagos ativadas, caracterizados pela diminuição na expressão de Mac-1. Esses parâmetros são indicativos de alterações na maturação e diferenciação das células dos animais galectina-3^{-/-} no sítio inflamatório.

É importante ressaltar que os antígenos dos vermes adultos secretados na corrente sanguínea são continuamente drenados para os gânglios mesentéricos, fazendo com que estas estruturas sejam permanentemente estimuladas durante a infecção. Por outro lado, ocorre uma estimulação proveniente de antígenos derivados dos ovos nos tecidos hepáticos e na cavidade peritoneal, concomitante com a ativação de células esplênicas por antígenos sistêmicos.

De acordo com as análises estruturais dos granulomas e em função do comprometimento contínuo das estruturas linfo-hematopoéticas, foi proposto estudar o envolvimento da galectina-3 na mobilização de linfócitos B e sua participação na plasmocitogênese sistêmica e peritoneal, comparando os animais selvagens (*wild type* - WT) e galectina-3^{-/-}.

2 - OBJETIVOS:

2.1 - Investigar o envolvimento da galectina-3 na mobilização das células inflamatórias nos animais WT e galectina-3^{-/-} infectados pelo *S.mansoni*

2.2 – Analisar a influência da galectina-3 na regulação da mudança de classe de imunoglobulinas nos linfócitos B-1a e B-1b dos animais WT e galectina-3^{-/-} infectados pelo *S. mansoni*.

2.3 – Avaliar o envolvimento da galectina-3 em ativação, diferenciação e homeostasia dos linfócitos B-1a e B-1b peritoneais, nos animais WT e galectina-3^{-/-}, independente de infecção.

3 - RESULTADOS:

Parte 1: Cinética da mobilização e diferenciação das células linfopoiéticas durante a esquistossomose experimental murina em camundongos galectin-3^{-/-}. Oliveira et al., 2007. *Journal of Leukocyte Biology*. 82:300-310.

Galectina-3 regula interações célula-célula e célula-matrix extracelular. No ambiente extracelular, esta lectina modula migração e adesão celular em vários processos fisiológicos e patológicos. Galectina-3 é altamente expressa em macrófagos, um tipo celular crítico na iniciação da resposta inflamatória granulomatosa causada pela presença de ovos liberados por *S.mansoni* no parênquima hepático, um helminto que sintetiza alta quantidade de ligantes desta lectina. Fundamentados nestes argumentos, nosso grupo investigou a dinâmica das células inflamatórias no decorrer das fases aguda e crônica da infecção esquistossomótica.

Animais galectina-3^{-/-} apresentaram granulomas de fase crônica com diâmetros reduzidos e fibras colágenas difusas, pouco ordenadas, comparados com animais WT infectados. Além disso, a ausência de galectina-3 induziu uma eosinofilia medular e extramedular, e um retardo na diferenciação de monócitos em macrófagos. Nos tecidos linfóides primários e secundários, estes animais galectina-3^{-/-} apresentaram uma plasmocitogênese significativa e redução no número de células B220⁺. Esse aumento no número de plasmócitos corroborou com a concentração elevada de IgG e IgE no sangue.

Em conclusão, demonstramos que a galectina-3 participa diretamente da organização e distribuição das fibras colágenas peri-ovulares granulomatosas, bem como regula a mobilização de células inflamatórias para nichos extramedulares durante a infecção esquistossomótica, interferindo com a diferenciação de monócitos em macrófagos e com o programa de geração de plasmócitos.

Kinetics of mobilization and differentiation of lymphohematopoietic cells during experimental murine schistosomiasis in galectin-3^{-/-} mice

F. L. Oliveira,* P. Frazão,* R. Chammas,^{†,1} D. K. Hsu,[‡] F. T. Liu,[‡] R. Borojevic,* C. M. Takiya,* and M. C. El-Cheikh^{*,1,2}

*Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

[†]Laboratório de Oncologia Experimental, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, and Center for Cell-Based Therapy, CEPID-FAPESP, São Paulo, Brazil; and [‡]Department of Dermatology, School of Medicine, University of California, Davis, Sacramento, California, USA

Abstract: Galectin-3 (gal-3), a β -galactoside-binding animal lectin, plays a role in cell-cell and cell-extracellular matrix interactions. Extracellular gal-3 modulates cell migration and adhesion in several physiological and pathological processes. Gal-3 is highly expressed in activated macrophages. *Schistosoma mansoni* eggs display a large amount of gal-3 ligands on their surface and elicit a well-characterized, macrophage-dependent, granulomatous, inflammatory reaction. Here, we have investigated the acute and chronic phases of *S. mansoni* infection in wild-type and gal-3^{-/-} mice. In the absence of gal-3, chronic-phase granulomas were smaller in diameter, displaying thinner collagen fibers with a loose orientation. Schistosoma-infected gal-3^{-/-} mice had remarkable changes in the monocyte/macrophage, eosinophil, and B lymphocyte subpopulations as compared with the infected wild-type mice. We observed a reduction of macrophage number, an increase in eosinophil absolute number, and a decrease in B lymphocyte subpopulation (B220^{+/high} cells) in the periphery during the evolution of the disease in gal-3^{-/-} mice. B lymphopenia was followed by an increase of plasma cell number in bone marrow, spleen, and mesenteric lymph nodes of the infected gal-3^{-/-} mice. The plasma IgG and IgE levels also increased in these mice. Gal-3 plays a role in the organization, collagen distribution, and mobilization of inflammatory cells to chronic-phase granulomas, niches for extramedullary myelopoiesis, besides interfering with monocyte-to-macrophage and B cell-to-plasma cell differentiation. *J. Leukoc. Biol.* 82: 300–310; 2007.

Key Words: *Schistosoma mansoni* · plasma cells · macrophages · granuloma

INTRODUCTION

Galectins are a family of conserved, β -galactoside-binding animal lectins. Galectins play crucial roles in cell-matrix in-

teractions, signaling, and inflammation [1, 2]. So far, 15 distinct members have been described in the galectin family. These molecules are classified according to their architecture in three distinct groups: proto, which has a single carbohydrate recognition domain (CRD); tandem, lectins with two CRD; and chimera. Galectin-3 (gal-3) is unique among galectins, as it is the only member of the chimeric group [1].

Gal-3 is found in the nucleus, cytoplasm, and on the cell surface of a variety of normal cells (e.g., inflammatory cells) and tumor cells [3, 4]. Gal-3 secretion follows a nonconventional pathway of exocytosis, and once secreted, extracellular gal-3 may function as a cytokine or as a modulator of cytokine function [5]. In the inflammatory process, such as in acute and allergic inflammation, extracellular gal-3 has been proposed to be a powerful, proinflammatory molecule, stimulating the superoxide production from neutrophils [6, 7], potentiating LPS-induced IL-1 production by monocytes, and promoting chemotaxis of this cell population [8–10]. In addition, in lymphoid differentiation, intracellular gal-3 was detected in activated T cells, and its nuclear accumulation was associated with cell proliferation and survival [11, 12]. In B cell development, down-regulation of gal-3 gene expression using antisense oligonucleotides led to an increase in the number of plasma cells in the inflammatory process caused by *Trypanosoma cruzi* [13].

Besides its potential role in leukocyte biology, extracellular gal-3 also binds to glycoconjugates synthesized by different parasites, such as *Schistosoma mansoni*, which is responsible for one of the most prevalent, infectious diseases in the world. The main structures produced by *S. mansoni*, which interact with gal-3 residues, are GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc (Lac-DiNAc) structures (*N*-acetylgalactosamine β 1-4 *N*-acetylglucosamine) [14], eliciting a well-characterized, humoral immune response toward the parasite [15]. In this regard, gal-3 has

¹ These authors share senior authorship.

² Correspondence: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Pau-Brasil, s/n, 21949-900 Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: marcia@histo.ufrj.br

Received December 21, 2006; revised March 26, 2007; accepted March 30, 2007.

doi: 10.1189/jlb.1206747

been implicated as a pathogen-associated molecular pattern receptor.

Murine schistosomiasis is an excellent model of a long-term, inflammatory process as a result of the following reasons: the permanent presence of worm antigens secreted in the mesenteric blood flow, continuously drained into the mesenteric lymph nodes (MLN) from the intestines; the presence of the egg antigens, which diffuse into liver tissue inducing the formation of hepatic granulomas; and the involvement of the spleen by the permanent stimulation of the immune system at the systemic level [16, 17].

Adult worms live in the mesenteric venous system, depositing their eggs in submucosal venules of the intestine. Part of the eggs elicits abscesses in the intestinal wall, part is expelled into the intestinal lumen, and a part is trapped in the mesenteric vessels or washed through the portal blood flow into the liver, where they elicit a well-characterized, macrophage-dependent, granulomatous, inflammatory reaction [18, 19]. The acute phase of the disease (from 45 to 50 days postinfection) is characterized by a typical Th2 response with high levels of IL-4 and IL-5. The evolution toward the chronic phase (from 85 to 95 days postinfection) is associated with a modified pattern of cytokine secretion, including down-regulation of IL-4 and IL-5 [17, 20] and remodeling of the granulomatous reaction, which shifts from an exudative to a fibrotic pattern, leading to a progressive decrease in the granuloma diameter [19]. Splenomegaly is observed frequently in all stages of the disease, and it is characterized by the activation of germinative centers and enhancement of antibody production with polyclonal B cell activation. A robust, humoral response is initiated after 40 days of infection, reaching the highest levels of Ig production in the chronic phase of the disease [21, 22]. The involvement of coelome-associated lymphoid tissues is also observed, and it is characterized by exacerbated macrophage reactivity and by extensive hyperplasia of myeloid and lymphoid lineages [23, 24].

Considering that granulomas represent a tissue reaction, which is orchestrated essentially by monocyte-macrophage activation; *S. mansoni* antigens bear glycosylation patterns, which are recognized by gal-3; studies of gal-3^{-/-} mice have provided a significant support for the proinflammatory role of this lectin [9, 25, 26]; and evidence has been provided for a role of gal-3 in the interface of innate and acquired immunity [27], a role for gal-3 in the course of *S. mansoni* infection is anticipated. As an initial characterization of this problem, here, we described the dynamics of inflammatory cell mobilization in the course of a *S. mansoni* infection, comparing wild-type and gal-3^{-/-} mice. Although no clinical-pathological, striking differences were observed in the course of infection between wild-type and the gal-3^{-/-} mice, a remarkable plasmacytogenesis took place in extramedullary compartments, including the MLN, intrahepatic granuloma, and the hepatic extramedullary haematopoiesis foci. Histological analysis of the hepatic granuloma in gal-3^{-/-} mice showed a decrease in periovular granuloma diameter and fibrosis deposition and depicted further an enhanced eosinophil recruitment and/or in situ proliferation.

MATERIALS AND METHODS

Schistosomal infection

Inbred C57/bl6 and gal-3^{-/-} mice [26] (backcrossed to C57BL/6 for 10 generations) of both sexes were obtained from the colony bred at the Federal University of Rio de Janeiro (Brazil) and infected by transcutaneous penetration of ca. 40 *S. mansoni* cercariae (BH strain, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil). Mice were killed after 40–50 and 90–95 days after infection, corresponding to the acute and the beginning of the chronic phase of the disease, respectively. Uninfected age- and sex-matched mice were used as controls.

Preparation of cell suspensions of spleen, MLN, and bone marrow

Cell suspensions from uninfected and infected mice were obtained *ex vivo* by standard mechanical dissociation from bone marrow, spleen, and MLN. Blood was obtained from cardiac puncture and stored in contact with EDTA solution. RBC and red splenic cells were lysed using Gey's solution. After lysis, the cell suspensions were washed twice with PBS, pH 7.2, containing 3% FBS and quantified, and their concentration was adjusted to 1×10^6 cells/mL.

Flow cytometry

To flow cytometry, these cells were incubated with Fc blocker (Clone 2.4G2) for 10 min before adding mAb. The cells were labeled with fluorescent mAb, anti-B220 FITC, anti-membrane-activated complex 1 (Mac-1), anti-B220 PE, anti-CD5 Cy-chrome, and unlabeled anti-gal-3, obtained from the M3/38 hybridoma (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). The secondary antibody was anti-rat IgG FITC. The sample was acquired in a flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and analyzed using two specific softwares, CellQuest and WinMDI 2.8. Unless otherwise specified, all the antibodies were purchased from PharMingen (San Diego, CA, USA).

Cell suspension

Hepatic granulomas were obtained by homogenization of liver tissue, followed by repeated sedimentation. Granulomas were submitted to digestion with collagenase 1A (1 mg/ml in DMEM, 10% FBS) [28]. Cells were harvested after each digestion period, layered over a discontinuous Percoll gradient (25% and 70%), and centrifuged. The cells were harvested from the layer formed on the top of 70% Percoll.

Cytosmears and optical microscopy

The cell suspensions were adjusted to 2.0×10^4 cells/ml. The samples were centrifuged at 36 *g* during 3 min. The material was fixed in absolute methanol by 24 h. The samples were stained using the May-Grünwald Giemsa method, as described elsewhere [16]. The differential count was done in the high-power field by optical microscopy. For each experiment, samples of five animals/group were analyzed in triplicates.

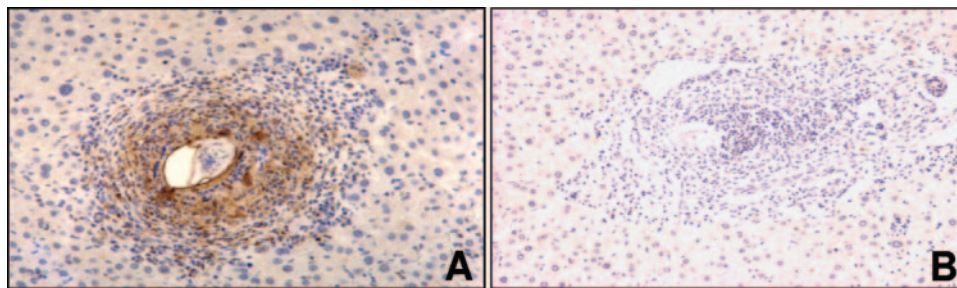
Histological preparations

For histological analyses, animals were killed after 60 days ($n=10$) and 90 days of infection ($n=10$) concomitantly with sex- and age-matched, uninfected, wild-type and knockout animals (10 animals per group). Uninfected age- and sex-matched mice were killed at the same time and used as controls. Sacrifice was performed under anesthesia given *i.p.* (ketamine, 35 mg/kg; xylazine, 9 mg/kg, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Liver was removed, cut into 0.5 mm-thick slices, washed in cold saline, and fixed in Bouin's fixative. After 6 h of fixation, specimens were dehydrated in alcohol and embedded in paraffin. Sections of 5 μ m were obtained and stained with H&E, Masson's trichrome staining, Sirius red technique for eosinophils, and a modified Sirius red technique for collagen [29].

Immunohistochemistry for gal-3

The anti-gal-3 mAb produced by hybridoma M3/38 was used to detect gal-3-expressing cells in wild-type animals. Paraffin-embedded sections were de-

Fig. 1. Detection of gal-3 by immunoenzymatic reaction in *S. mansoni*-infected, wild-type and gal-3^{-/-} mice. (A) In wild-type mice, immunoreactivity for gal-3 was observed in macrophages of granulomas around schistosomal eggs. (B) Complete absence of gal-3 reactivity in infected gal-3^{-/-} mice. (A and B, Original magnification, ×100.)

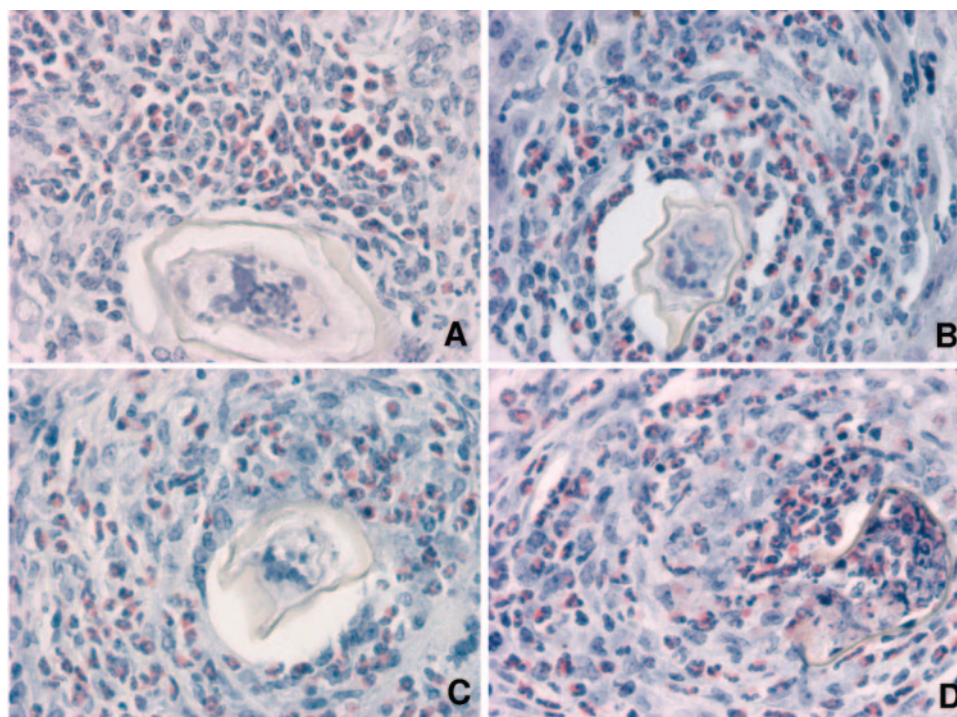


waxed and hydrated. After inhibition of endogenous peroxidase, sections were incubated for 1 h with 0.01 M PBS containing 5% BSA, 4% skim milk, 0.1% Triton X-100 (Sigma Chemical Co.), 0.05% Tween-20, and 10% normal goat serum, followed by incubation of M3/38 (1:10 in PBS, -3% BSA, 1% normal goat serum) overnight at 4°C in a humid chamber. M3/38 was detected with a biotinylated anti-rat IgG (BA-4001, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and developed with avidin-peroxidase (1:50 in PBS, Sigma Chemical Co.; E-8386), using diaminobenzidine as chromogen. Sections were counterstained with Harris' hematoxylin. As negative controls, sections of wild-type and knockout mice tissues were incubated with nonimmune rat serum instead of anti-gal-3 antibody.

Histological analysis of liver granuloma

Periovarian granulomas are cell-mediated granulomas having epithelioid and giant multinucleated cells. Depending on the degree of maturation/death of *S. mansoni* eggs, periovarian granulomas were classified as necrotic-exsudative, exsudative-productive, and involutinal. Necrotic-exsudative granulomas were those with a central zone of necrosis associated with neutrophils, and eosinophils, although exsudative-productive ones, were characterized by the presence of some fibroblastoid cells concentrically arranged and with a reticular fibers network circumscribing granulomas. Involutinal granulomas were the fibrotic ones, with concentric deposition of collagen fibers. The collagen network of periovarian granulomas was observed in a laser confocal microscope (LSM 410, Zeiss) [30, 31]. Granuloma measurements and characterization of the collagen network were done with three animals per group at least three times.

Fig. 2. Representative photomicrographs of eosinophils stained with Sirius red in *S. mansoni*-infected, wild-type and gal-3^{-/-} mice. (A) Exsudative granuloma showing eosinophils around the schistosomal egg in infected wild-type mice (acute phase). (B) Granuloma from an infected gal-3^{-/-} mice (acute phase) exhibiting a great amount of eosinophils circumscribing the schistosomal egg. (C) Eosinophils present in a schistosomal granuloma of chronic phase of infection in wild-type mice. (D) Abundant eosinophils are present around and inside the schistosomal egg; chronic phase of infection of gal-3^{-/-} mice. (A–D, Original magnification, ×200.)



Serum Ig dose

Approximately 1 ml blood was obtained by cardiac puncture from each animal. Sera Igs (IgM, IgG, and IgE) were quantified by ELISA "sandwich" assay [32]. ELISA plates (Corning, Corning, NY, USA) were coated with mAb anti-mouse-Ig (R35-72, PharMingen) diluted in PBS. The presence of Igs was measured by addition of biotin-labeled anti-Ig (R35-92, PharMingen), followed by addition of streptavidin-conjugated alkaline phosphatase (PharMingen). The antibody interactions were determined by addition of *p*-nitrophenylphosphate (Sigma Chemical Co.). The samples were acquired in an ELISA reader (BioRad, Boston, MA, USA) using a 405-nm filter.

Statistical analysis

The statistical tests were accomplished using the Tukey's multiple comparison test (*t*-test); significance threshold was fixed for $\alpha = 0.05$.

RESULTS

Gal-3 is involved in the recruitment of inflammatory cells induced by acute stimuli [33], allowing the fine-tuning of innate immunity. Here, we exploited a long-lasting infection model to characterize the role of gal-3 in the chronic inflam-

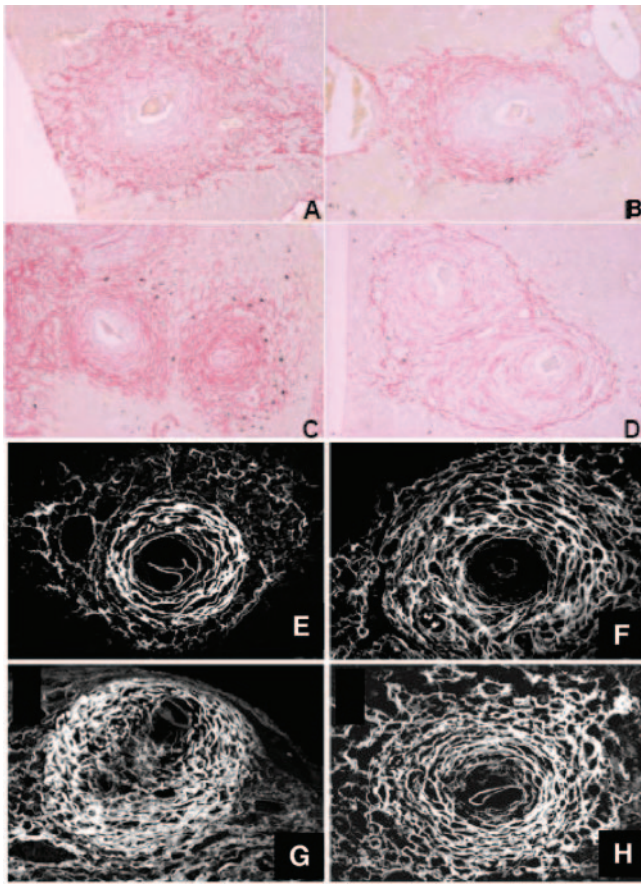


Fig. 3. Collagen network detection in infected wild-type and $gal-3^{-/-}$ mice using Sirius red staining and observed in light microscopy and confocal laser microscopy. (A) Sirius red staining depicting rare fibers at the periphery of an exudative granuloma of acute phase (wild-type animal). Collagen fibers of the portal space are present around granuloma. (B) Relative absence of collagen fibers in an exudative granuloma of infected $gal-3^{-/-}$ mice (acute phase). (C) Exudative-productive and a productive-involutive granuloma exhibiting collagen fibers inside granulomas in an infected, wild-type animal (chronic phase). (D) Two exudative-productive granulomas of infected $gal-3^{-/-}$ mice (chronic phase) showing rare collagen fibers inside granulomas. (E) Confocal image of Sirius red-stained sections of an involutive granuloma of infected, wild-type mice (acute phase). Collagen fibers were disposed as a parallel network circumscribing the egg. (F) Confocal image of an exudative-productive granuloma of an infected $gal-3^{-/-}$ animal (acute phase) showing collagen fibers disposed sparsely inside the granuloma. (G) Confocal image of a productive-involutive schistosomal granuloma of chronic phase (wild-type mice) exhibiting a densely packed collagen network. (H) Confocal image of an involutive granuloma of an infected $gal-3^{-/-}$ animal (chronic phase) showing a network of collagen fibers circumscribing the egg. In the periphery, collagen fibers were disposed loosely and oriented in several directions. (A–D, Original magnification, $\times 100$; E–H, original magnification, $\times 400$.)

matory response induced by *S. mansoni*. Gal-3 was detected in some cells of granulomas, including giant and epithelioid cells, as well as in extramedullary myelopoietic foci and Kupffer cells of wild-type-infected animals. Gal-3 immunoreactivity was absent in $gal-3^{-/-}$ mice, as expected (**Fig. 1, A and B**).

Livers of wild-type and $gal-3^{-/-}$ animals with acute infection showed periovular granulomas, which contained cells of the monomacrophagic lineage in heterogeneous patterns. Granulomas in wild-type and $gal-3^{-/-}$ -infected animals showed the presence of macrophages, giant multinucleated and epithelioid cells. Although in acutely infected, wild-type mice, granulomas were predominantly of the necrotic-exudative pattern with some exudative-productive ones, $gal-3^{-/-}$ animals showed a majority of the productive type. In the chronic stage of infection, granulomas were smaller in wild-type and $gal-3^{-/-}$ (data not shown). In the former group, they were predominantly of the productive and productive-exudative type and in the latter one, of the involutive type. In addition, the granulomas in $gal-3^{-/-}$ mice were less cellular and smaller than those in wild-type, infected animals (**Fig. 2, A–D**). Chronically infected $gal-3^{-/-}$ animals had granulomas, which apparently were structured loosely, and inflammatory cells were interspersed among fibroblastoid cells in the exudative-productive ones. However, eosinophils were more abundant than in wild-type animals in exudative granulomas around schistosomal eggs (**Fig. 2, A–D**).

The fibrotic evolution was impaired in $gal-3^{-/-}$ animals. This aspect was observed predominantly in chronically infected animals. Granulomas from $gal-3^{-/-}$ -infected mice had less collagen depicted by Sirius red staining (**Fig. 3, A–D**) arranged in a loose pattern (**Fig. 3, E–H**), as could be seen clearly in confocal images.

During the chronic phase of infection, medullary mobilization is replaced gradually by in situ production of myeloid cells [34]. Therefore, granulomas elicited by *S. mansoni* are specialized microenvironments for sustained extramedullary myelopoiesis [24, 35, 36]. Here, we have followed the dynamics of production and mobilization of inflammatory cells in medullary and extramedullary compartments (spleen, MLN, and hepatic granulomas) in the course of *S. mansoni* infection in wild-type and $gal-3^{-/-}$ mice.

We did not observe any significant differences in the total leukocyte number from uninfected, wild-type and $gal-3^{-/-}$ mice in all of the analyzed compartments. However, comparing the wild-type and $gal-3^{-/-}$ -infected mice, we observed a sig-

TABLE 1. Cellularity of Spleen and MLN from Wild-Type and $Gal-3^{-/-}$ Mice

Spleen	Wild-type mice	$Gal-3^{-/-}$ mice
Noninfected	7.2×10^7 cells/ml \pm 1.9	8.6×10^7 cells/ml \pm 2.5
Acute phase	38.2×10^7 cells/ml \pm 8.8	25.5×10^7 cells/ml \pm 3.8
Chronic phase	51.5×10^7 cells/ml \pm 10.8	31.2×10^7 cells/ml \pm 1.7
MLN	Wild-type mice	$Gal-3^{-/-}$ mice
Noninfected	31.1×10^6 cells/ml \pm 6.05	45.7×10^7 cells/ml \pm 6.45
Acute phase	94.2×10^6 cells/ml \pm 9.25	83.6×10^6 cells/ml \pm 8.28
Chronic phase	76.6×10^6 cells/ml \pm 9.42	57.2×10^6 cells/ml \pm 6.35

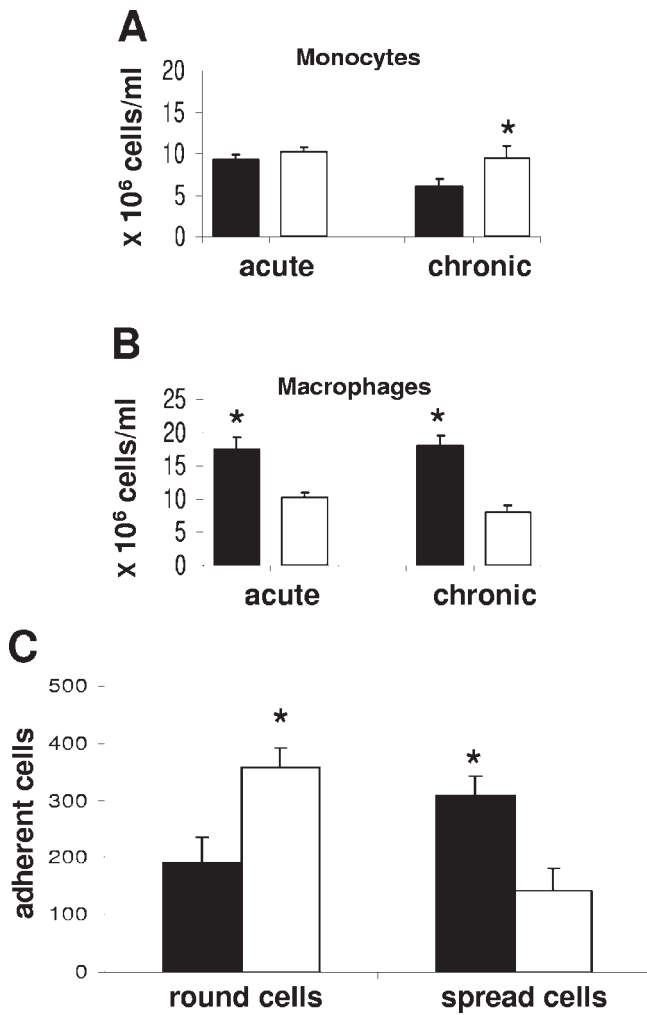


Fig. 4. Differential account of monocyte/macrophages obtained after enzymatic dissociation of hepatic granulomas. (A and B) We compared cells recovered from granulomas obtained from acute and chronic phases of infection by cytosmears (May-Grunwald Giemsa staining). The solid bars indicate the wild-type mice, whereas the open bars represent the gal-3^{-/-} mice. (C) The mononuclear cells from chronic-phase granulomas from wild-type (solid bars) and gal-3^{-/-} mice (open bars) were then plated and evaluated using an adherence assay. Round cells represent monocytes, whereas spread cells represent macrophages. Data are reported as means ± SEM and are representative of five independent experiments, each carried out in three normal mice, five mice with acute infection, and five with chronic infection. Statistical analysis: Tukey's multiple comparison test (*, $P < 0.05$).

nificant decrease in the total leukocyte number in the spleen and MLN of gal-3^{-/-} mice during the acute and chronic phases of the disease (Table 1).

We quantified the cells obtained from the granulomas from acute and chronic phases of the disease and observed an increase of monocytes (Fig. 4A) and eosinophils (Fig. 5) in the infected gal-3^{-/-} mice, as compared with the wild-type, infected mice. The increase of monocyte numbers was concomitant with a drastic reduction of macrophages in granulomas (Fig. 4, A and B).

The fact that an increased number of monocytes observed in the circulation and within the granulomas of gal-3^{-/-} was not followed by a proportional increase in the population of mac-

rophages suggested a delay in the monocyte-macrophage differentiation in the absence of gal-3. Indeed, we observed that the mononuclear fraction from the granulomas of infected gal-3^{-/-} had little capacity to spread on the plastic flasks, and the majority stayed as rounded, attached cells in contrast to the wild-type cells, which spread efficiently on the plastic substrate (Fig. 4C). These data suggest that gal-3 plays a role in monocyte-macrophage differentiation and activation.

We observed an increase in the number of mature eosinophils in the bone marrow of the noninfected and infected gal-3^{-/-} mice (Fig. 5A). It is interesting to note that gal-3^{-/-}

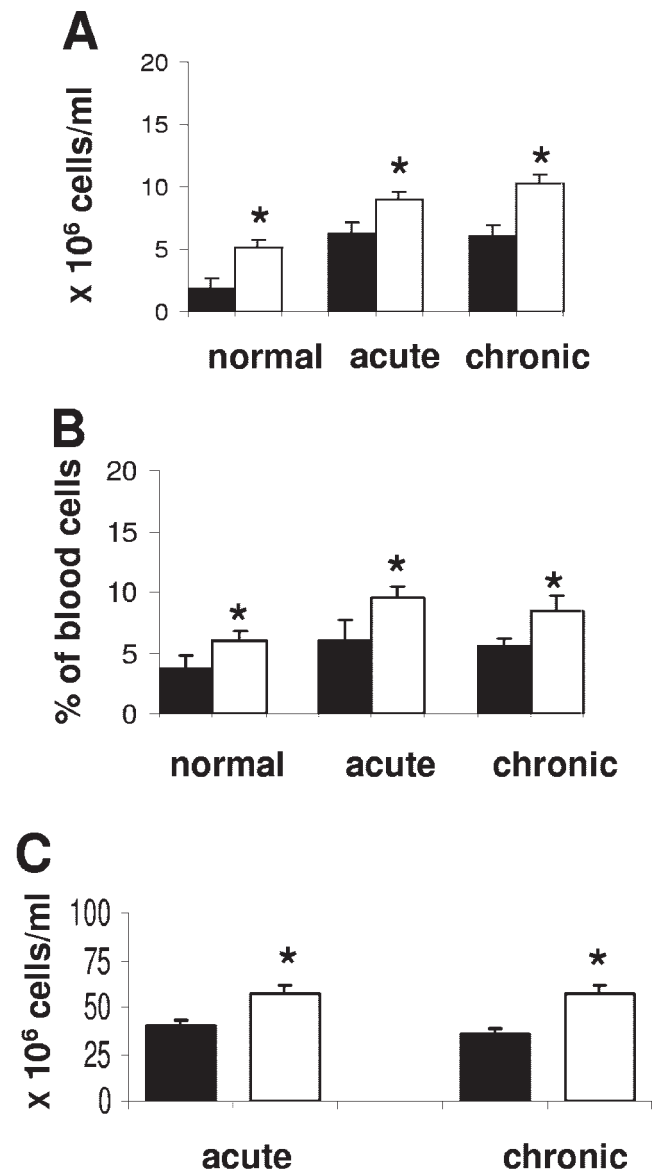


Fig. 5. Gal-3^{-/-} mice are eosinophilic. Eosinophil counts in bone marrow (A), peripheral blood (B), and *S. mansoni*-induced granuloma (C) from wild-type (solid bars) and gal-3^{-/-} mice (open bars). We compared the noninfected group (normal) with both infected groups of mice (acute and chronic phases). Data are reported as means ± SEM and are representative of five independent experiments, each carried out in three normal mice, five mice with acute infection, and five with chronic infection. Statistical analysis: Tukey's multiple comparison test (*, $P < 0.05$).

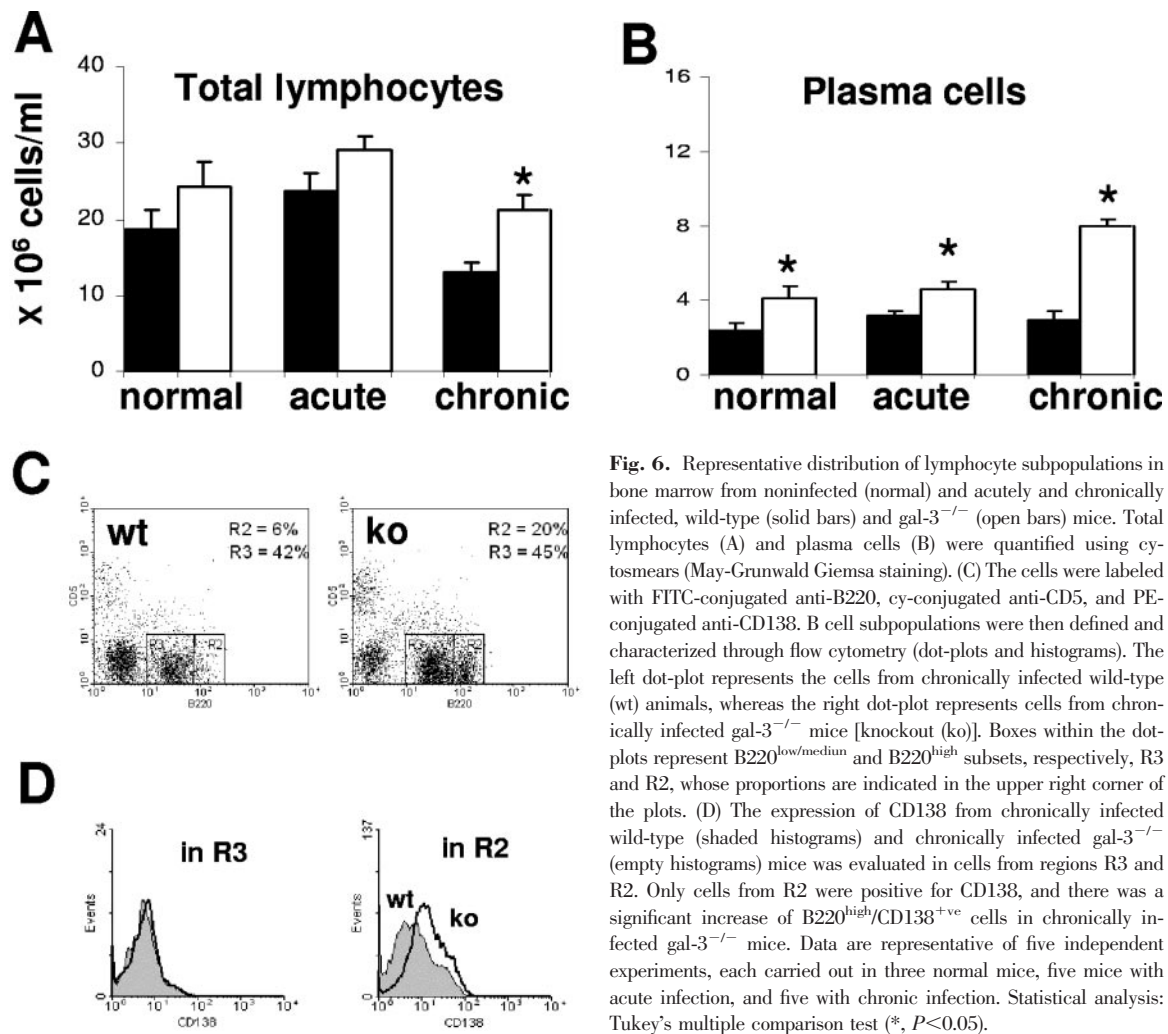


Fig. 6. Representative distribution of lymphocyte subpopulations in bone marrow from noninfected (normal) and acutely and chronically infected, wild-type (solid bars) and $gal-3^{-/-}$ (open bars) mice. Total lymphocytes (A) and plasma cells (B) were quantified using cytospreads (May-Grunwald Giemsa staining). (C) The cells were labeled with FITC-conjugated anti-B220, cy-conjugated anti-CD5, and PE-conjugated anti-CD138. B cell subpopulations were then defined and characterized through flow cytometry (dot-plots and histograms). The left dot-plot represents the cells from chronically infected wild-type (wt) animals, whereas the right dot-plot represents cells from chronically infected $gal-3^{-/-}$ mice [knockout (ko)]. Boxes within the dot-plots represent $B220^{low/medium}$ and $B220^{high}$ subsets, respectively, R3 and R2, whose proportions are indicated in the upper right corner of the plots. (D) The expression of CD138 from chronically infected wild-type (shaded histograms) and chronically infected $gal-3^{-/-}$ (empty histograms) mice was evaluated in cells from regions R3 and R2. Only cells from R2 were positive for CD138, and there was a significant increase of $B220^{high}/CD138^{+ve}$ cells in chronically infected $gal-3^{-/-}$ mice. Data are representative of five independent experiments, each carried out in three normal mice, five mice with acute infection, and five with chronic infection. Statistical analysis: Tukey's multiple comparison test (*, $P < 0.05$).

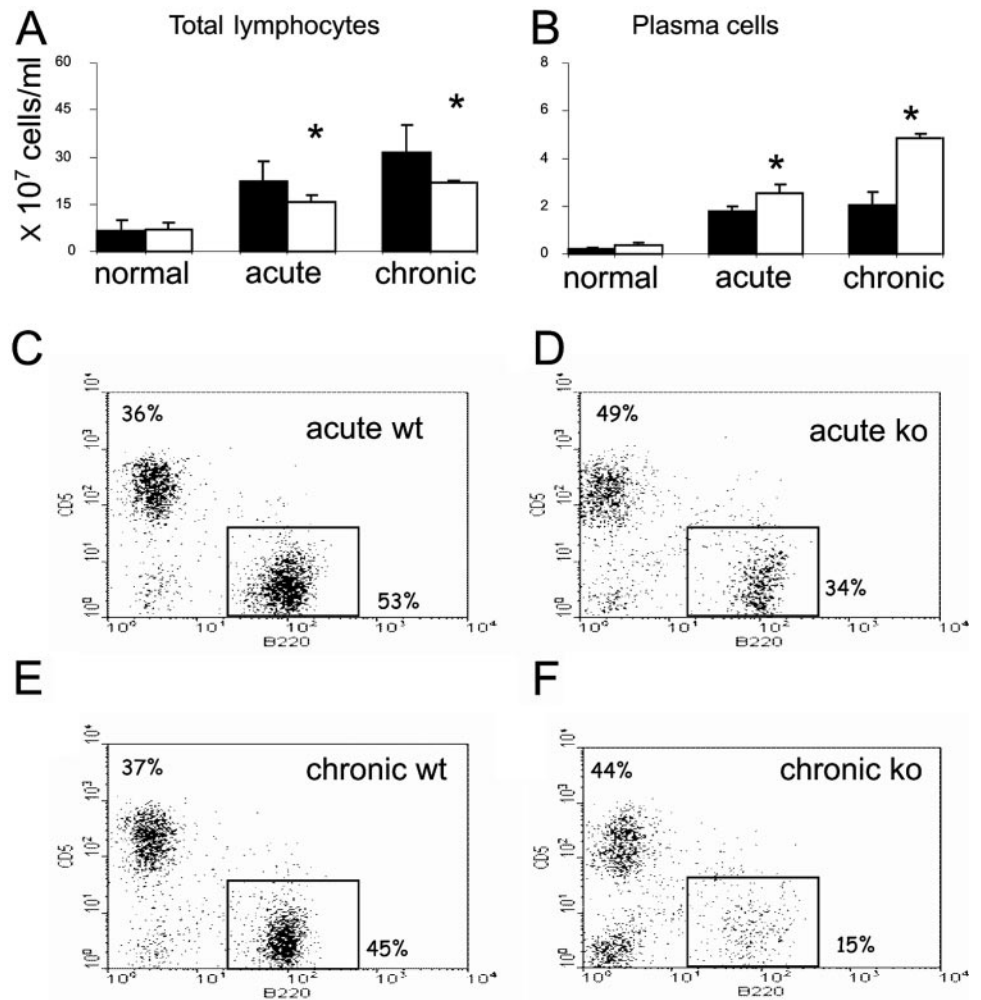
animals already presented an increased production of eosinophils and that upon infection, there was further amplification of this phenomenon. The same pattern was found in peripheral blood (Fig. 5B). Eosinophils were also increased in the infected $gal-3^{-/-}$ mice as compared with the wild-type-infected mice (Fig. 5C).

Lymphocytes are largely involved in the chronic inflammatory reactions at the systemic and local levels. In this study, we observed an increase in the total number of lymphocytes in the bone marrow harvested from $gal-3^{-/-}$ mice in the chronic phase of the disease (Fig. 6A) as well as in the blood of the same animals (data not shown). Phenotypic analysis of lymphocytes from chronically infected, wild-type (on the left) and $gal-3^{-/-}$ (on the right) mice is shown in Figure 6C. Region R3 depicts the immature B cells, and Region R2 depicts the mature B cells. The increase in bone marrow-derived lymphocytes was specifically a result of the B lymphocyte subsets characterized as $B220^{high}$ and therefore, mature B cells (Fig. 6C in R2, region at the right in both dot-plots). In parallel to the increase of $B220^{high}$ lymphocytes, there was also a remarkable increase of plasma cells in uninfected and infected $gal-3^{-/-}$ mice (Fig. 6B). The morphological analysis was confirmed by flow cytometry after labeling lymphocytes from chronically

infected $gal-3^{-/-}$ mice with anti-CD138 and -B220 antibodies (Fig. 6D). The $B220^{high}$ (cells from Region R2), but not the $B220^{low/medium}$ (cells from Region R3) subset, expressed measurable amounts of CD138. Taken together, these results suggest the differentiation of B cells to plasma cells in the $gal-3^{-/-}$ mice in the bone marrow microenvironment. The same pattern was observed in the noninfected $gal-3^{-/-}$ mice (data not shown), although it was exacerbated upon infection. These results suggest that in the absence of gal-3, the bone marrow compartment harbored an increased number of B lymphocytes and plasma cells, which in turn, were associated with an increase in these cells in the periphery (see Figs. 7B and 8B).

Considering that the spleen is the most important site of activation and differentiation of B lymphocytes into plasma cells and that it is continuously stimulated by *S. mansoni* antigens, we analyzed the distribution of the lymphocyte subpopulations in this organ. In contrast to the bone marrow, we detected a reduction in total lymphocyte counts in the $gal-3^{-/-}$ mice in the acute and chronic phases of the disease (Fig. 7A). By flow cytometry, we have demonstrated that the T lymphocyte pool ($CD5^{+}$ cells) was not modified upon infection, whereas the B lymphocyte pool, defined as $B220^{+}$ cells, was largely altered. In $gal-3^{-/-}$ -infected mice in acute and chronic

Fig. 7. Representative distribution of lymphocyte subpopulations from spleen from noninfected (normal) and acutely and chronically infected, wild-type (solid bars) and gal-3^{-/-} (open bars) mice. Total lymphocytes (A) and plasma cells (B) were quantified using cytosmears. (C–F) Spleen cells from infected animals were labeled with FITC-conjugated anti-B220 and cy-conjugated anti-CD5. The splenic B cell population was defined and characterized through flow cytometry. Boxes in each dot plot circumscribe the region of B220^{high}-CD5^{ve} cells in all experimental groups indicated. Numbers indicate the relative proportion of the lymphocytes. Data are reported as means ± SEM and are representative of five independent experiments, each carried out in three normal mice, five mice with acute infection, and five with chronic infection. Statistical analysis: Tukey's multiple comparison test (*, *P*<0.05).



phases, we have observed a more than twofold decrease in the B220⁺ lymphocyte population as compared with the wild-type, infected mice (Fig. 7, C–F). This decrease was concomitant with an increase of plasma cells within the spleen in both phases of the disease (Fig. 7B).

The same pattern of lymphocytes distribution was observed in MLN (Fig. 8A). There was an approximate twofold decrease in the number of B cells (Fig. 8, C–F), followed by an increase in the number of plasma cells harvested from gal-3^{-/-}-infected mice (Fig. 8B). No changes were observed in the T cell compartment, similar to the splenic compartment.

Our results demonstrated a possible acceleration in B cell differentiation to plasma cells in bone marrow, spleen, and MLN of *S. mansoni*-infected gal-3^{-/-} mice. It is interesting to point out that this increase in plasma cells in the periphery was accompanied by higher levels of seric IgG and IgE, but not IgM, in the course of infection (Fig. 9). Gal-3 was found on the surface of the B220^{high} subset but not on the B220^{low} cells harvested from bone marrow (Fig. 10A), spleen (Fig. 10B), and MLN (Fig. 10C) from wild-type mice. Negative controls included the staining of cells from gal-3^{-/-} mice (Fig. 10).

DISCUSSION

Gal-3^{-/-} mice are viable, they have no overt abnormalities, and they can survive under conventional conditions [25, 26]. The availability of the gal-3^{-/-} mice permits us to study the role of this lectin using different stimuli. In the acute inflammatory process, mutant mice had a greatly reduced number of granulocytes on day 4 after thioglycolate injection, but no differences were observed at earlier time-points, and the mutant granulocytes did not exhibit an accelerated rate of apoptosis nor an increased clearance by inflammatory macrophages. These data indicate that gal-3 can play a role in the maintenance of the granulocyte number in the inflamed peritoneal cavity or in the extravasation of granulocytes in inflamed tissues [25]. We have taken advantage of the availability of gal-3^{-/-} mice to investigate the role of this molecule in a model of a long-lasting, inflammatory reaction [16, 35, 37]. In this work, we have challenged the animals with *S. mansoni*, as the host response to the eggs of this worm involves monocyte/macrophage-centered reactions, leading to the formation of granulomas [19, 38]. Furthermore, *S. mansoni* produces high amounts of LacDiNAc-containing antigens, which are ligands for gal-3 [14]. It is interesting that beads coated only with

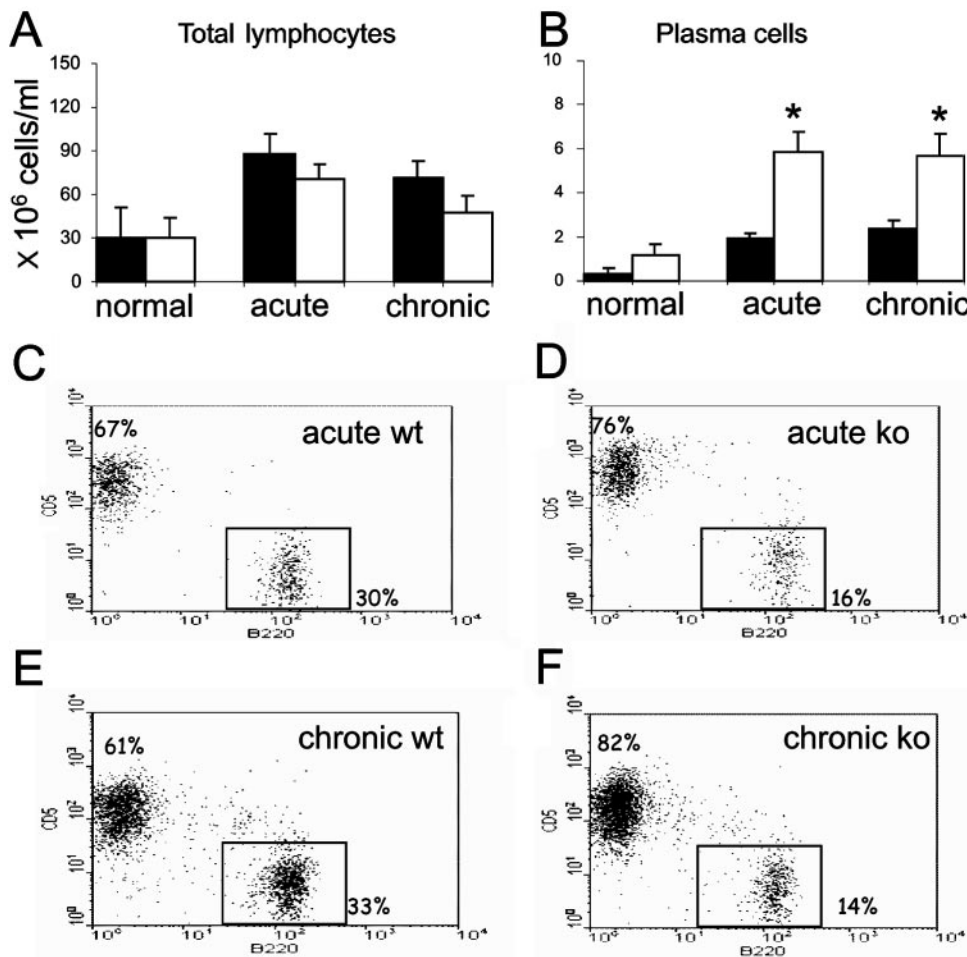


Fig. 8. Representative distribution of lymphocyte subpopulations from MLN from noninfected (normal) and acutely and chronically infected, wild-type (solid bars) and gal-3^{-/-} (open bars) mice. Total lymphocytes (A) and plasma cells (B) were quantified using cytosmears. (C–F) Cells from infected animals were labeled with FITC-conjugated anti-B220 and cy-conjugated anti-CD5. The LN B cell population was defined and characterized through flow cytometry. Boxes in each dot-plot circumscribe the region of B220^{high}CD5⁺ve cells in all experimental groups indicated. Numbers indicate the relative proportion of the lymphocytes. Data are reported as means ± SEM and are representative of five independent experiments, each carried out in three normal mice, five mice with acute infection, and five with chronic infection. Statistical analysis: Tukey's multiple comparison test (*, $P < 0.05$).

LacDiNAc structures are sufficient stimuli for the mobilization of inflammatory cells and can induce a granulomatous reaction around the coated bead in liver parenchyma [39]. As depicted in Figure 1 and discussed in the literature, the granulomas formed in response to *S. mansoni* eggs accumulate high amounts of gal-3 [39].

Gal-3 expression is highly up-regulated when monocytes differentiate into macrophages [40] and is down-regulated when these cells differentiate into dendritic cells [41], suggesting that this protein has a role in distinct stages of monocytic differentiation. Accordingly, our results showed a deficient monocytes/macrophage activation and differentiation, as measured by adherence assays, in gal-3^{-/-} mice. Gal-3 plays an important role in critical macrophage functions, such as phagocytosis, and participates in innate and adaptive immunity through clearance of microorganisms and apoptotic cells [42].

Our histological analysis demonstrated that although gal-3 is considered an important molecule for several macrophage functions, knockout mice are still able to form periovular granulomas, a cell-mediated, hypersensitivity response. It has been demonstrated already that some schistosome glycoconjugates, specifically those containing terminal LacNAc or LacDiNAc, are able to induce formation of granulomas [39]. Our results indicate that granuloma formation in schistosomiasis is quite complex and that immunological activation per se is capable of inducing granuloma, even in the absence of gal-3

binding. These results corroborate the notion suggested by Van de Vijver and colleagues [39] that other lectins, e.g., Gal/GalNAc-binding lectins, of the host may be involved in hepatic granuloma formation. The positive identification of the animal lectin involved in the initial steps of granuloma formation needs to be addressed. These studies certainly will be useful for the rational design of drugs, which may control granulomagenesis.

Recently, Bickle and Helmbly [43] reported similar findings, focusing their analysis in granulomas formed at 8 weeks postinfection, which corresponds to the acute phase of *S. mansoni* infection. Furthermore, formed granulomas presented giant multinucleate cells or epithelioid cells, indicating that macrophages in gal-3^{-/-} mice were still capable of responding to cytokines involved in their differentiation [44].

The increased bone marrow and liver eosinopoiesis seen in knockout animals could explain the increase in this population inside the granulomas. Eosinophils are the key cells involved in egg death [45], and that is involved in granulomas size reduction as a result of the involution with rapid collagen deposition [46]. In fact, this was evident in our infected gal-3^{-/-} animals. Even in acute phase, the predominant granulomas are the productive and involutinal ones, suggesting that eggs are killed rapidly by the increased amount of eosinophils of granulomas. Recent evidence points to a critical role of gal-3 in the regulation of myofibroblast activation, which is a central

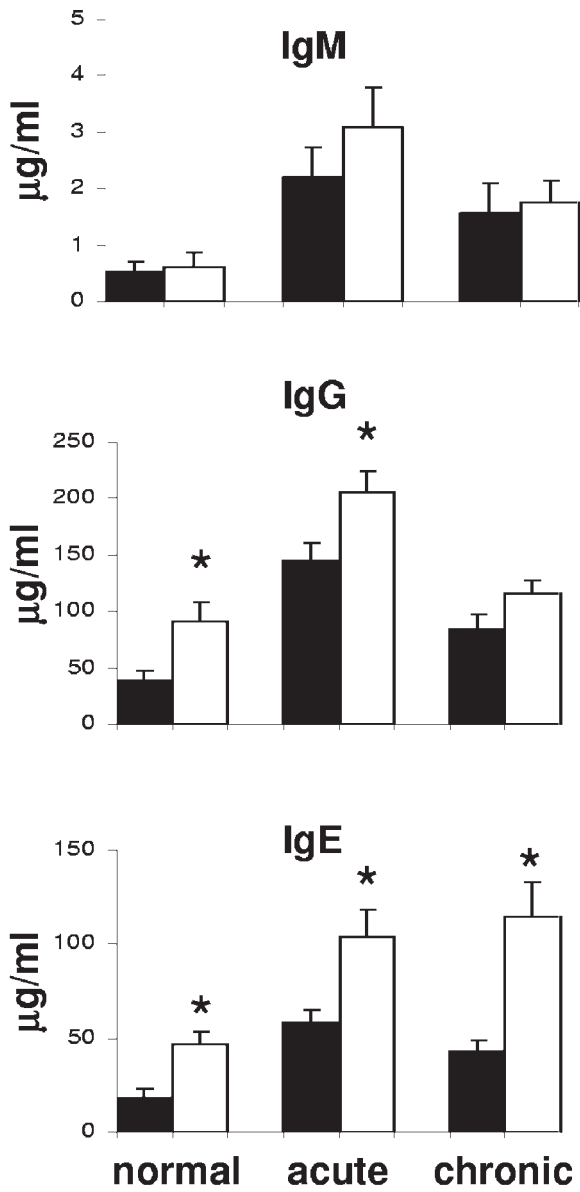


Fig. 9. The Ig levels were determined by ELISA. IgM, IgG, and IgE. The solid bars indicate the wild-type mice, whereas the open bars represent the $gal-3^{-/-}$ mice. We compared the noninfected group (normal) with both infected groups of wild-type and $gal-3^{-/-}$ mice (acute and chronic phases). Data are reported as means \pm SEM and are representative of five independent experiments, each carried out in three normal mice, five mice with acute infection, and five with chronic infection. Statistical analysis: Tukey's multiple comparison test (*, $P < 0.05$).

control of hepatic fibrogenesis [47] and was also altered in the granuloma of $gal-3^{-/-}$ mice. Our data raise a potentially antiapoptotic effect of gal-3. Chronic-phase granulomas from wild-type mice were significantly larger in size than those obtained from $gal-3^{-/-}$ animals. Size reduction was not dependent on the degree of organization of the extracellular matrix but apparently, on the number of infiltrating, viable cells present in the granuloma.

Although the total number of myeloid precursors was not modified in noninfected and infected knockout mice, a significant increase in bone marrow-derived and circulating eosin-

ophils was observed in the course of the disease, as expected for *S. mansoni* infection [16, 37]. In the absence of gal-3, this response was amplified. The high level of IgE in the blood of the noninfected and infected knockout mice, associated with eosinophilia, suggests to us a predominant pattern of Th2 responses, in contrast to the exacerbated Th1 responses observed in the asthma model [10] and *Toxoplasma gondii* infection [27]. These results may indicate that gal-3 does not shift the character of Th1/Th2 responses but controls the intensity of a programmed response. It has been demonstrated that gal-3 acts in the nucleus inhibiting IL-5 transcription [48], the main cytokine involved in eosinophil proliferation and differentiation [49]. The high level of IL-5 production at the systemic and local levels possibly could explain the increased number of eosinophils in the granulomatous inflammatory reaction. The stroma of fibrogranulomatous-hepatic tissue, which produces cytokines such as stem cell factor, IL-5, and GM-CSF, maintains at least part of the production of myeloid cells, besides serving as a maturation site of bone marrow-derived myeloid precursors [50, 51]. The inflammatory hepatic stromal cells of $gal-3^{-/-}$ mice would produce larger amounts of IL-5, thus serving as an even more appropriate niche for eosinopoiesis.

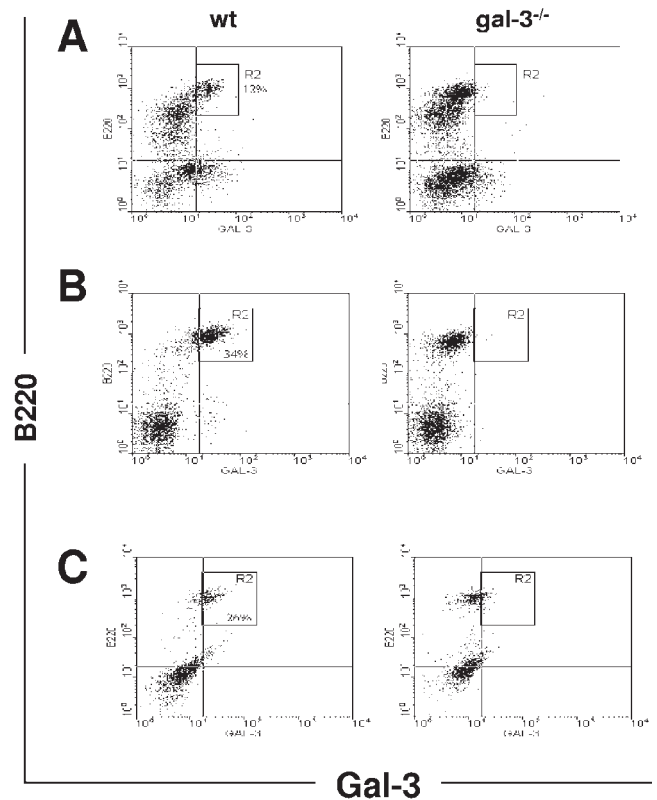


Fig. 10. Surface expression of B220, CD5, and gal-3 on cells from bone marrow (A), spleen (B), and MLN (C). Only cells with forward-scatter versus side-scatter parameters compatible with lymphocytes were selected for analysis. The R2 region represents mature B cells, which express gal-3 on the cell surface. The left dot-plots represent the wild-type mice, whereas the right dot-plots represent the $gal-3^{-/-}$ mice. Data are reported as means and are representative of three independent experiments, each carried out in three normal mice, five mice with acute infection, and five with chronic infection. Statistical analysis: Tukey's multiple comparison test.

Besides its involvement with the myeloid cell population, our results suggest an important role for gal-3 in B cell differentiation. In gal-3^{-/-} mice, the accelerated process of plasma cell generation was concomitant with the reduction of B220⁺ cells (B lymphocytes) in secondary lymphoid tissues, such as spleen and MLN. Activation of plasma cells was functionally confirmed by the higher levels of serum IgE and total IgG in infected knockout mice. Bickle and Helmby [43] had shown recently that soluble egg antigen-specific IgG1 levels were significantly higher in the acute phase of infection in gal-3^{-/-} mice. Their finding would justify the increase of IgE levels in the chronic phase of the disease, as IgG1 production precedes IgE class-switch [52].

We observed an increase of a CD138⁺/B220^{low} subpopulation in the spleen but not in MLN of gal-3^{-/-} mice. The results of Acosta-Rodriguez et al. [13], using the acute phase of *T. cruzi* infection as a model of an extensive polyclonal B cell activation, strongly suggest that gal-3 is a critical signal for B cell survival, differentiation, and commitment to a memory cell phenotype, modulating the blimp-1 transcription factor, essential for plasma cell commitment [53, 54]. The results obtained by the authors using the antisense strategy were confirmed by the gal-3^{-/-} mice *in vivo* model, whose phenotype was strongly exacerbated by the *S. mansoni* infection. In both systems, gal-3 is an important regulatory molecule involved in the B cell differentiation process.

Our phenotypic analysis by flow cytometry demonstrated that B220^{high} lymphocytes presented gal-3 on the cell surface under control conditions, contrasting with the results described by Acosta-Rodriguez et al. [13]. This subpopulation of B cells represents the mature and circulating lymphocytes. These cells are capable of exiting from the bone marrow and entering into the bloodstream, homing to secondary lymphoid organs. The majority of mature B cells expresses surface gal-3 in all the studied tissues, such as bone marrow, spleen, and LN, regardless of whether the animals were infected. Although mature B cells were positive to gal-3, we cannot affirm if this lectin was expressed by the B cell itself or if the gal-3 was produced by another cell type, secreted, and then engaged to a B cell surface receptor. Acosta-Rodriguez and colleagues [13] used an antisense strategy to knock-down gal-3 expression in activated B cells from *T. cruzi*-infected mice. Therefore, at least part of the gal-3, which modulates B cell activation or differentiation, may be expressed by the B cell itself. Whether extracellular gal-3 interferes with B cell function remains to be elucidated. The high account of plasma cell could be generated by specific failure in check-points of B cell differentiation. Our data are in accordance with Katrina et al. [55], who demonstrated an aberrant increase of the gal-3 associated with a malignant B cell development as a result of the antiapoptotic role of gal-3. It is interesting to point out that in our model, the absence of gal-3 induced a more accelerated B cell differentiation by passing other cell-death controls, including the apoptotic programs, as demonstrated by Katrina et al. [55].

In this scenario, self-reactive, clonal cells would be generated, and self-antibodies could lead to autoimmune diseases. Altogether, our data highlight the involvement of gal-3 in key differentiation pathways of myelopoiesis and B lymphopoiesis.

Understanding how gal-3 interferes with monocytes/macrophage activation and B cell differentiation may have implications for the control of innate and acquired immunity.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), Fundações de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, São Paulo (FAPERJ and FAPESP), and Associação Paul Ehrlich de Biologia Celular Aplicada a Medicina. The authors are grateful to Dr. Lígia Peçanha, Departamento de Imunologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, for her support in the measurements of Ig levels in the sera of the animals.

REFERENCES

- Liu, F. T. (1993) S-type mammalian lectins in allergic inflammation. *Immunol. Today* **14**, 486–490.
- Barondes, S. H., Castronovo, V., Cooper, D. N., Cummings, R. D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M. A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K. (1994) Galectins: a family of animal β -galactoside-binding lectins. *Cell* **76**, 597–598.
- Bresalier, R. S., Mazurek, N., Sternberg, L. R., Byrd, J. C., Yunker, C. K., Nangia-Makker, P., Raz, A. (1998) Metastasis of human colon cancer is altered by modifying expression of the β -galactoside-binding protein galectin 3. *Gastroenterology* **115**, 287–296.
- Gong, H. C., Honjo, Y., Nangia-Makker, P., Hogan, V., Mazurak, N., Bresalier, R. S., Raz, A. (1999) The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer Res.* **59**, 6239–6245.
- Partridge, E. A., Le Roy, C., Di Guglielmo, G. M., Pawling, J., Cheung, P., Granovsky, M., Nabi, I. R., Wrana, J. L., Dennis, J. W. (2004) Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science* **306**, 120–124.
- Yamaoka, A., Kuwabara, I., Frigeri, L. G., Liu, F. T. (1995) A human lectin, galectin-3 (ϵ bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *J. Immunol.* **154**, 3479–3487.
- Karlsson, A., Follin, P., Leffler, H., Dahlgren, C. (1998) Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. *Blood* **91**, 3430–3438.
- Jeng, K. C., Frigeri, L. G., Liu, F. T. (1994) An endogenous lectin, galectin-3 (ϵ BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes. *Immunol. Lett.* **42**, 113–116.
- Sano, H., Hsu, D. K., Yu, L., Apgar, J. R., Kuwabara, I., Yamanaka, T., Hirashima, M., Liu, F. T. (2000) Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J. Immunol.* **165**, 2156–2164.
- Zuberi, R. I., Hsu, D. K., Kalayci, O., Chen, H. Y., Sheldon, H. K., Yu, L., Apgar, J. R., Kawakami, T., Lilly, C. M., Liu, F. T. (2004) Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Am. J. Pathol.* **165**, 2045–2053.
- Yang, R. Y., Hsu, D. K., Liu, F. T. (1996) Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6737–6742.
- Joo, H. G., Goedegebuure, P. S., Sadanaga, N., Nagoshi, M., von Bernstorff, W., Eberlein, T. J. (2001) Expression and function of galectin-3, a β -galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 555–564.
- Acosta-Rodriguez, E. V., Montes, C. L., Motran, C. C., Zuniga, E. I., Liu, F. T., Rabinovich, G. A., Gruppi, A. (2004) Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* **172**, 493–502.
- Van den Berg, T. K., Honing, H., Franke, N., van Remoortere, A., Schiphorst, W. E., Liu, F. T., Deelder, A. M., Cummings, R. D., Hokke, C. H., van Die, I. (2004) LacDiNAc-glycans constitute a parasite pattern for galectin-3-mediated immune recognition. *J. Immunol.* **173**, 1902–1907.

15. Nyame, A. K., Lewis, F. A., Doughty, B. L., Correa-Oliveira, R., Cummings, R. D. (2003) Immunity to schistosomiasis: glycans are potential antigenic targets for immune intervention. *Exp. Parasitol.* **104**, 1–13.
16. El-Cheikh, M. C., Borojevic, R. (1990) Extramedullary proliferation of eosinophil granulocytes in chronic *Schistosomiasis mansoni* is mediated by a factor secreted by inflammatory macrophages. *Infect. Immun.* **58**, 816–821.
17. Borojevic, R. (1992) Experimental murine *Schistosomiasis mansoni*: establishment of the chronic phase of the disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **87**, 171–174.
18. Domingo, E. O., Waren, K. S. (1968) Endogenous desensitization: changing host granulomatous response to schistosome eggs at different stages of infection with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Pathol.* **52**, 369–377.
19. Boros, D. L., Pelley, R. P., Waren, K. S. (1975) Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in *Schistosomiasis mansoni*. *J. Immunol.* **114**, 1437–1441.
20. Gzych, J. M., Pearce, E., Cheever, A., Caulada, Z. A., Caspar, P., Heiny, S., Lewis, F., Sher, A. (1991) Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine *Schistosomiasis mansoni*. *J. Immunol.* **146**, 1322–1327.
21. El-Cheikh, M. C., Dutra, H. S., Minoprio, P., Borojevic, R. (1994) Increase of B-lymphocyte number and activity during experimental murine *Schistosomiasis mansoni*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27**, 1605–1617.
22. Lopes, L. M., Pereira, M. A., Gerken, S. E., Vaz, N. (1990) Polyclonal activation of B lymphocytes during experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **100**, 83–91.
23. Weinberg, D. F., Baldo-Correa, E., Lenzi, H. L., Borojevic, R. (1992) *Schistosoma mansoni*: peritoneal plasmacytogenesis and polyploid transformation of mesenteric milky spots in infected mice. *Exp. Parasitol.* **74**, 408–416.
24. Lenzi, H. L., Oliveira, D. N., Pelajo-Machado, M., Borojevic, R., Lenzi, J. A. (1996) Coelom-associated lymphomyeloid tissue (milky spots): site of lymphoid and myelomonocytic cell generation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**, 19–24.
25. Colnot, C., Ripoche, M. A., Milon, G., Montagutelli, X., Crocker, P. R., Poirier, F. (1998) Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-knockout mutant mice. *Immunology* **94**, 290–296.
26. Hsu, D. K., Yang, R. Y., Pan, Z., Yu, L., Salomon, D. R., Fung-Leung, W. P., Liu, F. T. (2000) Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am. J. Pathol.* **156**, 1073–1083.
27. Bernardes, E. S., Silva, N. M., Ruas, L. P., Mineo, J. R., Loyola, A. M., Hsu, D. K., Liu, F. T., Chammass, R., Roque-Barreira, M. C. (2006) *Toxoplasma gondii* infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. *Am. J. Pathol.* **168**, 1910–1920.
28. Alvarez-Silva, M., da Silva, L. C., Borojevic, R. (1993) Cell membrane-associated proteoglycans mediate extramedullary myeloid proliferation in granulomatous inflammatory reactions to schistosome eggs. *J. Cell Sci.* **104**, 477–484.
29. Dolber, P. C., Spach, M. S. (1993) Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. *J. Histochem. Cytochem.* **41**, 465–469.
30. Pecly, I. M., Goncalves, R. G., Rangel, E. P., Takiya, C. M., Taboada, F. S., Martinusso, C. A., Pavao, M. S., Leite Jr., M. (2006) Effects of low molecular weight heparin in obstructed kidneys: decrease of collagen, fibronectin and TGF- β , and increase of chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans and macrophage infiltration. *Nephrol. Dial. Transplant.* **21**, 1212–1222.
31. Pyrrho Ados, S., Ramos, J. A., Neto, R. M., Silva, C. S., Lenzi, H. L., Takiya, C. M., Gattass, C. R. (2002) Dexamethasone, a drug for attenuation of *Schistosoma mansoni* infection morbidity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3490–3498.
32. Snapper, C. M., Paul, W. E. (1987) Interferon- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* **236**, 944–947.
33. Rabinovich, G. A., Rubinstein, N., Toscano, M. A. (2002) Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 274–284.
34. Geuskens, M., Borojevic, R., Van Gansen, P. (1991) Eosinophil granulocytopenia in hepatic periovular granulomas during the chronic phase of experimental murine *Schistosomiasis mansoni*. *Biol. Cell* **71**, 89–96.
35. El-Cheikh, M. C., Dutra, H. S., Borojevic, R. (1991) Eosinophil granulocyte proliferation and differentiation in schistosomal granulomas are controlled by two cytokines. *Lab. Invest.* **64**, 93–97.
36. Dutra, H. S., Rossi, M. I., Azevedo, S. P., el-Cheikh, M. C., Borojevic, R. (1997) Haematopoietic capacity of colony-forming cells mobilized in hepatic inflammatory reactions as compared to that of normal bone marrow cells. *Res. Immunol.* **148**, 437–444.
37. Borojevic, R., Nicola, M. H., Santos da Silva, C. (1984) Modulation of macrophage and polymorphonuclear granulocyte inflammatory reaction in experimental murine *Schistosomiasis mansoni*. *Cell. Mol. Biol.* **30**, 37–42.
38. Grimaud, J. A., Borojevic, R. (1977) Chronic human *Schistosomiasis mansoni*. Pathology of the Disse's space. *Lab. Invest.* **36**, 268–273.
39. Van de Vijver, K. K., Deelder, A. M., Jacobs, W., Van Marck, E. A., Hokke, C. H. (2006) LacDiNAc- and LacNAc-containing glycans induce granulomas in an in vivo model for schistosome egg-induced hepatic granuloma formation. *Glycobiology* **16**, 237–243.
40. Liu, F. T., Hsu, D. K., Zuberi, R. L., Kuwabara, I., Chi, E. Y., Henderson Jr., W. R. (1995) Expression and function of galectin-3, a β -galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am. J. Pathol.* **147**, 1016–1028.
41. Dietz, A. B., Bulur, P. A., Knutson, G. J., Matasic, R., Vuk-Pavlovic, S. (2000) Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 731–738.
42. Sano, H., Hsu, D. K., Apgar, J. R., Yu, L., Sharma, B. B., Kuwabara, I., Izui, S., Liu, F. T. (2003) Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J. Clin. Invest.* **112**, 389–397.
43. Bickle, Q., Helmbly, H. (2007) Lack of galectin-3 involvement in murine intestinal nematode and schistosome infection. *Parasite Immunol.* **29**, 93–100.
44. Maeda, N., Kawada, N., Seki, S., Arakawa, T., Ikeda, K., Iwao, H., Okuyama, H., Hirabayashi, J., Kasai, K., Yoshizato, K. (2003) Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **278**, 18938–18944.
45. Hsu, S. Y., Hsu, H. F., Mitros, F. A., Helms, C. M., Solomon, R. I. (1980) Eosinophils as effector cells in the destruction of *Schistosoma mansoni* eggs in granulomas. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **74**, 179–183.
46. Singh, K. P., Gerard, H. C., Hudson, A. P. A. N. D., Boros, D. L. (2004) Dynamics of collagen, MMP and TIMP gene expression during the granulomatous, fibrotic process induced by *Schistosoma mansoni* eggs. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **98**, 581–593.
47. Henderson, N. C., Mackinnon, A. C., Farnworth, S. L., Poirier, F., Russo, F. P., Iredale, J. P., Haslett, C., Simpson, K. J., Sethi, T. (2006) Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 5060–5065.
48. Cortegano, I., Pozo, V., Cardaba, B., Arrieta, I., Gallardo, S., Rojo, M., Aceituno, E., Takai, T., Verbeek, S., Palomino, P., Liu, F. T., Lahoz, C. (2000) Interaction between galectin-3 and Fc γ RII induces down-regulation of IL-5 gene: implication of the promoter sequence IL-5REIII. *Glycobiology* **10**, 237–242.
49. Broide, D., Sriramarao, P. (2001) Eosinophil trafficking to sites of allergic inflammation. *Immunol. Rev.* **179**, 163–172.
50. Brito, J. M., Borojevic, R. (1997) Liver granulomas in schistosomiasis: mast cell-dependent induction of SCF expression in hepatic stellate cells is mediated by TNF- α . *J. Leukoc. Biol.* **62**, 389–396.
51. Lipscombe, R. J., Nakhoul, A. M., Sanderson, C. J., Coombe, D. R. (1998) Interleukin-5 binds to heparin/heparan sulfate. A model for an interaction with extracellular matrix. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 342–350.
52. Siebenkotten, G., Esser, C., Wabl, M., Radbruch, A. (1992) The murine IgG1/IgE class switch program. *Eur. J. Immunol.* **22**, 1827–1834.
53. Angelin-Duclos, C., Cattoretto, G., Lin, K. I., Calame, K. (2000) Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. *J. Immunol.* **165**, 5462–5471.
54. Underhill, G. H., George, D., Bremer, E. G., Kansas, G. S. (2003) Gene expression profiling reveals a highly specialized genetic program of plasma cells. *Blood* **101**, 4013–4021.
55. Hoyer, K. K., Pang, M., Gui, D., Shintaku, I. P., Kuwabara, I., Liu, F. T., Said, J. W., Baum, L. G., Teitell, M. A. (2004) An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *Am. J. Pathol.* **164**, 893–902.

Parte 2: Expressão de IgE na superfície dos linfócitos B-1 e B-2 peritoneais na esquistossomose experimental murina. Oliveira et al., 2005. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38:1033-1042.

A ativação policlonal dos linfócitos B-2 é bem caracterizada no modelo de infecção causada pelo *S.mansoni*. Entretanto, pouco se sabe sobre a participação dos linfócitos B-1 peritoneais na resposta imunológica desenvolvida contra a presença deste helminto e seus ovos liberados no tecido hepático e depositados em pequenos vasos sanguíneos mesentéricos. A fase aguda da doença é tipicamente Th2, apresentando altas concentrações de IL-4 e IL-5. A fase crônica é caracterizada por uma esplenomegalia, devido à hiperplasia das células B.

O envolvimento dos linfócitos B-1 na resposta humoral a esta infecção não está bem caracterizada. Neste contexto, investigamos a participação destas células na produção de imunoglobulinas nos animais infectados pelo *S.mansoni*, monitorando a expressão de IgM e IgE na superfície destas células residentes na cavidade peritoneal. Nossos resultados sugerem que a esquistossomose murina é um modelo de infecção que induz a ativação e diferenciação dos linfócitos B-1 IgM⁺ em células produtoras de IgE, sendo, portanto, capazes de realizar mudança de classe (IgM para IgE) dentro da cavidade peritoneal.

Em conclusão, nosso grupo propôs que a infecção esquistossomótica experimental murina é considerado um excelente modelo de ativação dos linfócitos B-1, tendo em vista a capacidade de realizar mudança de classe em um microambiente que não possui a organização anatômica dos tecidos linfóides secundários clássicos, como os centros germinativos. Além disso, este modelo de infecção pode ser utilizado como fonte indutora da diferenciação dos linfócitos B-1, cujos programas de ativação e maturação não estão bem elucidados.

IgE expression on the surface of B1 and B2 lymphocytes in experimental murine schistosomiasis

F.L. Oliveira¹,
A.M. Aguiar¹,
R. Borojevic^{1,2} and
M.C. El-Cheikh¹

¹Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas,
²Programa Avançado de Biologia Celular Aplicada à Medicina,
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Abstract

In a previous study we monitored the distribution and phenotype expression of B1 cells during the evolution of experimental murine schistosomiasis mansoni and we proposed that the B1 cells were heterogeneous: a fraction which originated in the spleen and followed the migratory pathway to mesenteric ganglia, while the other was the resident peritoneal B1-cell pool. In the present study, we have addressed the question of whether these two B1-lymphocyte populations are involved in the production of the late Ig isotype IgE, which is present in high levels in schistosomal infection. Lymphocyte expression of surface markers and immunoglobulins were monitored by immunofluorescence flow cytometry. Both in the spleen and mesenteric ganglia, the B1 and B2 cells were induced to switch from IgM to IgE in the early Th2-dominated phase of the disease, with an increase of IgE in its later phases. Conversely, peritoneal B1-IgM⁺ switched to the remaining IgE⁺ present in high numbers in the peritoneal cavity throughout the disease. We correlated the efficient induction of the expression of late Ig isotypes by B1 cells with high levels of inflammatory cytokines due to the intense host response to the presence of worms and their eggs in the abdominal cavity. In conclusion, B1 cells have a different switch behavior from IgM to IgE indicating that these cell sub-populations depend on the microenvironment.

Key words

- Schistosomiasis
- B lymphocytes
- Immunoglobulin switch

Correspondence

M.C. El-Cheikh
Caixa Postal 68021
21941-970 Rio de Janeiro, RJ
Brasil
Fax: +55-21-2562-6483
E-mail:
mcury_el_cheikh@hotmail.com

Presented at the XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular, Campinas, SP, Brazil, July 15-18, 2004.

Research supported by PRONEX, FINEP, CNPq, FAPERJ, and the Associação Técnico-Científica Paul Ehrlich.

Received June 24, 2004
Accepted March 11, 2005

Introduction

B1 lymphocytes are defined as a subset of B cells that express the surface pan-T marker CD5 together with the B-cell surface markers B220^{lo}, IgM^{hi}, and IgD^{lo}. In contrast to standard B cells (B2 lymphocytes), they are CD23⁻. When located in celomic cavities, which are the major site of their homing

and proliferation, they are Mac1⁺. In addition to their phenotypic differences, B1 cells are distinguished from the major B-lymphocyte population, the B2 cells, by their different origin, localization and immunoglobulin repertoires, presumably reflecting different functions in the immune system (reviewed in Refs. 1-3).

B1 cells develop early in ontogeny and

are the major if not the sole B-cell population in the fetal liver and omentum. In adult mice they predominate in the pleural and peritoneal cavities. They are frequent in the lamina propria, but represent only a small percentage of B cells in the spleen, and are essentially absent from lymph nodes and Peyer's patches. B1 cells are maintained by self-replenishment, i.e., by division of fully mature cells. In contrast, B2 cells are replenished throughout life by proliferation and differentiation of immature progenitors in bone marrow (1). In addition to these apparently separate life histories and characteristics of the B1 and B2 lineages, it has been shown that CD5 expression can be induced in mature B2 cells, and the alternative origin of B1 cells among the cells of the B2 lineage has been subsequently proposed (4,5). At present, heterogeneous properties of the B-cell compartment with a double origin have been suggested, depending on the quality of interaction with antigens and with other cells engaged in the immune response (6).

B1 cells produce antibodies that are frequently polyreactive and of low affinity. These "natural antibodies" produced spontaneously under low immunization conditions are often autoreactive, such as antibodies for phosphatidyl choline, DNA and immunoglobulins, or react with common bacterial carbohydrate antigens like phosphorylcholine. Most B1 cells produce IgM. *In vitro* studies have indicated the inability of B1 cells to produce more mature isotypes, but *in vivo* the B1 population as a whole can produce all Ig isotypes (1). The two subsets of B1 cells, the B1a and B1b cells, are distinguished by the presence of CD5 in B1a and its absence in B1b cells, but despite their similar origin and characteristics they switch to different Ig isotypes. In response to IL-5, B1a cells tend to produce IgG2a, IgG2b and IgG3, while B1b cells produce IgG1 and IgE in response to IL-9 (7,8).

In view of their early appearance and broad reactivity, as well as their strategic

submucosal location, B1 cells are considered to be part of the natural resistance to the intestinal flora (9). They can also participate in defense against viral infections (10), and in protection or recovery from experimental infections with large parasites such as *Brugia* and *Schistosoma* (11,12). Murine infection with *Schistosoma mansoni* is relevant for *in vivo* studies of B1 lymphocytes for several reasons. Schistosomiasis is an abdominal disease involving both the luminal and the peritoneal sides of the gut. Adult worms live in the mesenteric venous system, depositing their eggs in small submucosal veins of the intestine. Some of the eggs elicit small abscesses and are expelled into the lumen, but some are trapped in the mesenteric vessels or washed through the portal blood flow into the liver, where they cause granulomatous inflammatory reactions. Besides the typical cellular reaction to the parasites and their eggs, B-cell hyperplasia is a hallmark of schistosomiasis (13). The acute phase of the disease is characterized by a typical Th2 response with high IL-4 and IL-5 levels. The evolution towards the chronic phase is associated with a down-regulation of several aspects of the immune response to parasites, and a modified cytokine pattern (14). However, splenomegaly progressively increases throughout the disease, with activation of germinal centers and enhancement of antibody production with polyclonal B-cell activation (13,15,16). A substantial immunoglobulin response is initiated after 40 days of infection, reaching highest levels in the chronic phase of the disease. IgE levels follow the production of IL-4. They are high immediately after the beginning of oviposition, reaching a peak from the 8th to the 12th week of infection, and progressively decreasing thereafter. Specific antibodies to schistosome egg antigens represent a minor part of the total immunoglobulins (17,18). In addition to the splenic reactivity, the peritoneal cavity is the site of extensive myeloid and lymphoid cell proliferation. Intense

perivascular inflammation of the mesenteric venous system gives rise to plasmacytogenic foci, where immature plasmacytes are observed close to the blood vessel walls and mature ones are located on the surface of the mesenterium, predominantly secreting IgG and IgM (19,20).

In a previous study, we monitored the distribution and phenotype expression of B1 cells during the evolution of experimental murine schistosomiasis *mansoni* (21). We found no evidence of an increase of B1 cells in the peritoneum, nor a mobilization of B1 cells expressing the peritoneal phenotype (CD5^{lo}, IgM^{hi}) in the tissues involved by the infection, despite the systemic increase of the B-cell response and overall hyperplasia of peritoneal cells. Conversely, we detected in the spleen a subpopulation of B lymphocytes characterized as CD5^{hi} and IgM^{lo}, which appeared subsequently in Peyer's patches and mesenteric ganglia, with a progressive acquisition of Mac-1 expression. We proposed that the B1-cell population may be heterogeneous in schistosomiasis: a fraction is originated in the spleen and follows the migratory pathway to mesenteric ganglia, while the other is the resident peritoneal pool that is apparently not increased *in situ*. In the present study, we have addressed the question of whether these two lymphocyte populations (the splenic and the peritoneal pools) are involved in the production of IgE antibodies, which are produced in high levels in schistosomal infection.

Material and Methods

Schistosomal infection

Inbred C3H/HeN mice of both sexes were obtained from the colony bred at the Federal University of Rio de Janeiro and infected by transcutaneous penetration of 40 *S. mansoni* cercariae (BH strain, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Mice were studied after 45-50 and 90-95 days of infec-

tion, corresponding to the acute phase and the beginning of the chronic phase of the disease, respectively (20). Uninfected age- and sex-matched mice were used as controls.

Preparation of cell suspensions

Cell suspensions from normal and infected mice were obtained *ex vivo* by standard mechanical dissociation of spleen, mesenteric ganglia and Peyer's patches. The peritoneal cavity was washed with phosphate-buffered saline (PBS) and red blood cells were lysed with Gey's solution. After lysis, the cell suspensions were washed twice with PBS, pH 7.2, containing 3% fetal bovine serum, and cell concentration was adjusted to 1×10^6 cells/ml. In order to saturate the Fc receptors, the cells were incubated with normal mouse serum for 10 min before adding the specific monoclonal antibodies.

Immunofluorescence

The presence of cell surface markers on lymphoid cells was monitored with the following monoclonal antibodies for three-color analysis: fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-IgM (Sigma, St. Louis, MO, USA) and anti-IgE (Pharmingen, San Diego, CA, USA); phycoerythrin-conjugated anti-B220 (Pharmingen), and quantum red-conjugated anti-CD5 (Sigma). Staining was done separately for each monoclonal antibody for 30 min on ice, followed by washing with cold PBS.

Data acquisition and analysis

Data acquisition and analysis by flow cytometry were performed with a FACS caliber apparatus, using the Cell Quest Software (Becton Dickinson, Mount View, CA, USA). The fluorescence was detected by photomultiplier tubes and adjusted on scatter-gated unstained lymphocytes, and com-

compensation was performed using single-color-stained cells from each organ separately. Cell debris and dead cells were excluded according to the light scatter parameters, and the gate including the lymphocyte population was named R1. Data are reported as dot plots and histograms.

Statistical analysis

Data were analyzed statistically by the Tukey multiple comparison test, with the level of significance set at $P < 0.05$.

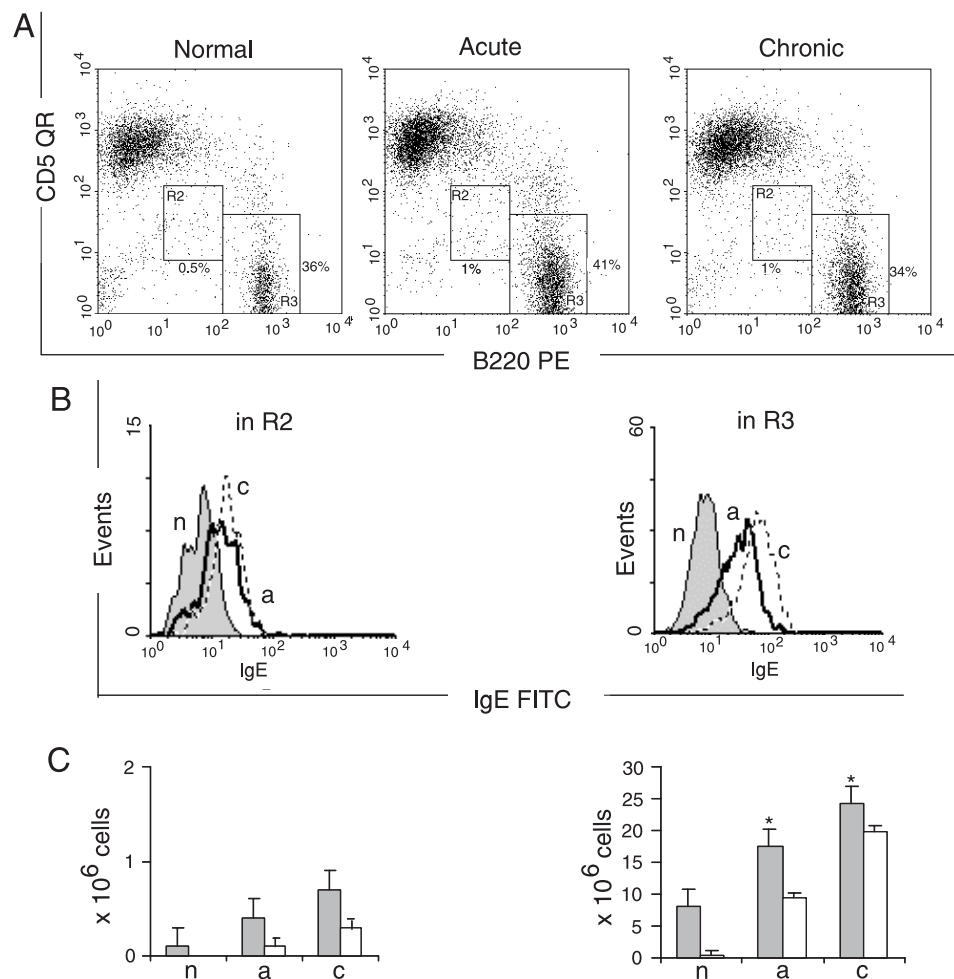
Results

Expression of IgE on the surface of B

cells was monitored in the mesenteric ganglia, Peyer's patches, spleen, and peritoneal cavity of normal and schistosome-infected mice during the evolution of the disease from the acute to the chronic phase (Figures 1 to 4). B1, B2 and T lymphocytes were defined according to differential expression of B220 and CD5 (Figures 1-5A).

The labeling pattern of the cells that did not produce IgE was recorded in all experiments (Figures 1B to 4B) and pooled, and compared to the pattern of cells that reacted with anti-IgE antibodies. In agreement with reported levels of Th2 cytokines (14), mesenteric ganglia showed increased IgE⁺ cell numbers from the acute to the chronic phase of the disease (Figure 1B). The median val-

Figure 1. Surface expression of B220, CD5 and IgE on cells from mesenteric ganglia. **A**, Dot plot of cells in the lymphocyte gate. The R2 and R3 regions represent B1 and B2 cells, respectively. **B**, Intensity of IgE on the B-cell surface. **C**, Total cell numbers (filled columns) and IgE⁺ cells (open columns). Data are reported as means \pm SEM and are representative of five independent experiments, each carried out in 2 normal mice (n), 5 mice with acute infection (a) and 5 with chronic infection (c). * $P < 0.05$ for B-IgE⁺ cells compared to total B cells (Tukey multiple comparison test).



ues were moderately increased in diseased animals, suggesting that rare cells presented low to intermediate IgE fluorescence intensity on their surface. This low or intermediate reactivity is not suggestive of immunoglobulin secretion, but indicates that this B-cell subpopulation has the genetic machinery able to perform all the gene recombinations necessary to switch from IgM to IgE. Due to the low number of events, the difference between the groups was only suggestive ($P = 0.08$). Conversely, in Peyer's patches, only B2 lymphocytes were involved in the switching from IgM to IgE isotype (Figure 2B and C), with a progressive increase from the acute to the chronic phase indicative of switching from the IgM isotype.

In schistosomiasis, the spleen receives a permanent stimulation of the immune sys-

tem, evolving to splenomegaly associated with an increase in B-cell numbers and their polyclonal activation (13). In normal spleens, IgE⁺ cells were very rare in all the B-cell subsets studied (Figure 3B), but their number increased in the acute and chronic phases of the disease. The number of B1-IgE⁺ cells remained stable in infected mice (Figure 3C). In contrast, the total B2 and B2-IgE⁺ cells increased during the evolution of the disease (Figure 3B and C). In agreement with the results shown for mesenteric ganglia, B1-IgE⁺ cells were found in the spleen, participating with B2 lymphocytes in the production of IgE, present in high concentrations in serum of mice during both the acute and chronic phases of the disease.

The peritoneal cavity is the major site of maintenance and production of B1 cells. In

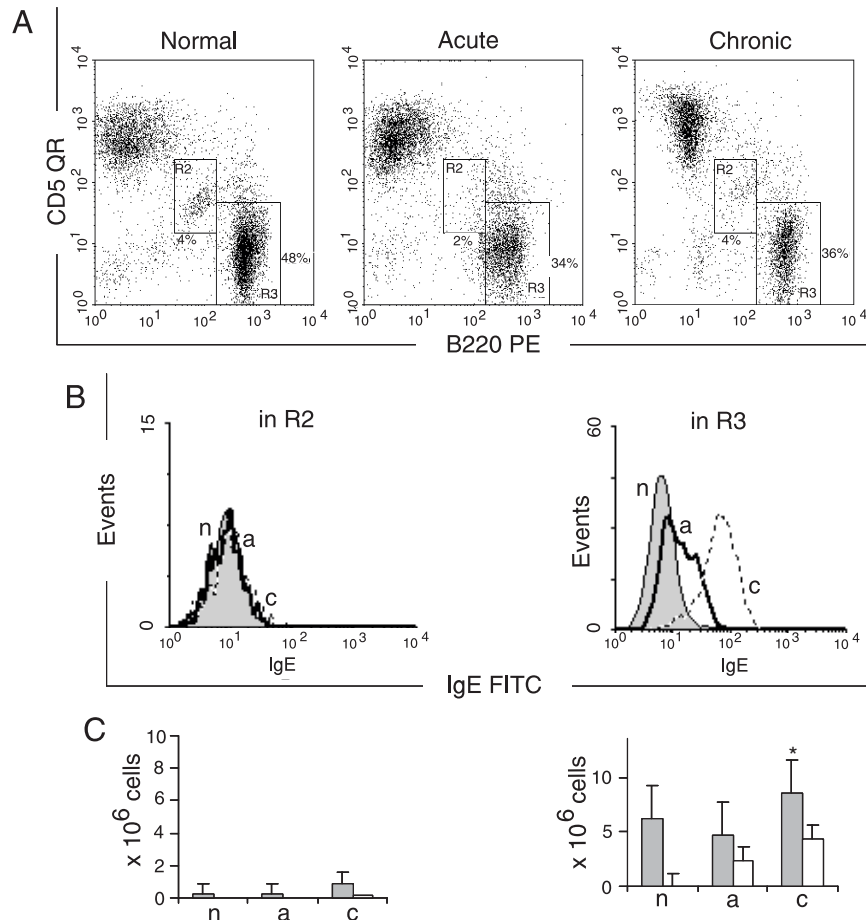


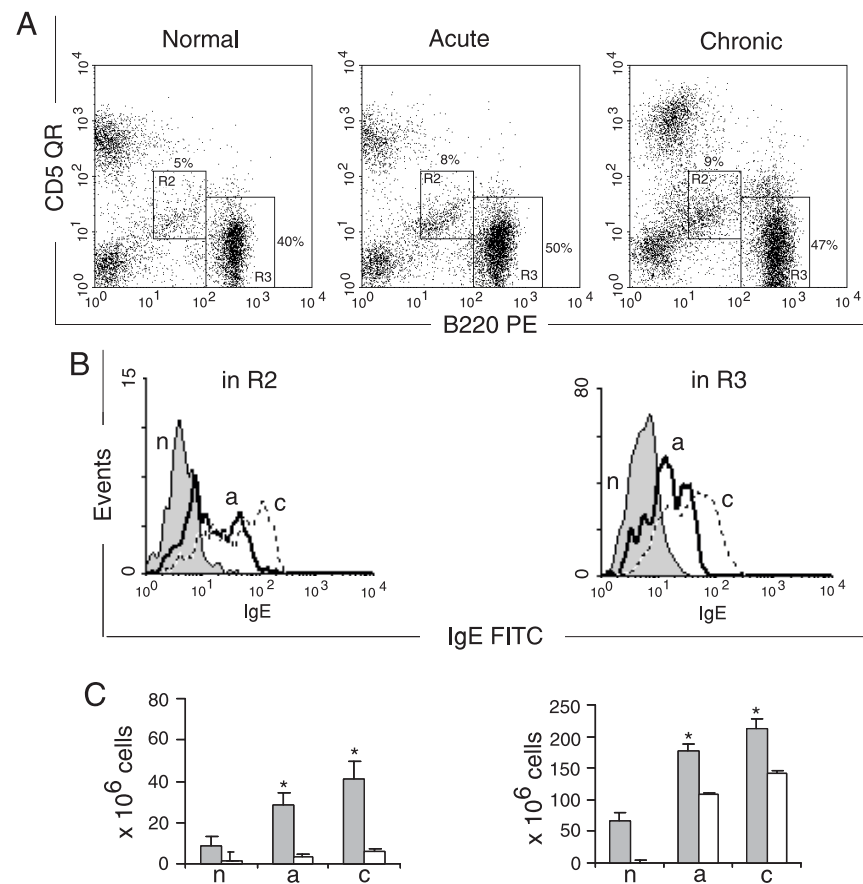
Figure 2. Surface expression of B220, CD5 and IgE on cells from Peyer's patches. *A*, Dot plot of cells in the lymphocyte gate. The R2 and R3 regions represent the B1 and B2 cells, respectively. *B*, Intensity of IgE on the B-cell surface. *C*, Total cell numbers (filled columns) and IgE⁺ cells (open columns). Data are reported as means \pm SEM and are representative of five independent experiments, each carried out in 2 normal mice (n), 5 mice with acute infection (a) and 5 with chronic infection (c). * $P < 0.05$ for B-IgE⁺ cells compared to total B cells (Tukey multiple comparison test).

normal adult mice B1 lymphocytes represent up to 30% of peritoneal cells. B1a cells were increased during the acute phase of the disease, and in the chronic phase their relative number decreased compared to normal mice. According with previously published data (21), the total number of peritoneal B1 cells remained constant throughout the disease as a consequence of the increased number of peritoneal cells. B1a-IgE⁺ cells were negligible in normal mice (Figure 4B and C). Mice with acute infection had an increased B1a-IgE⁺ cell fraction, which remained at the same level during chronic infection. B1b cells (Figure 4B) were negative in normal mice and in mice with acute infection, but in the chronic phase, they were split into two clearly distinct IgE⁺ and IgE⁻ subsets (Figure 4B and C). The conventional

B2 lymphocytes present in the peritoneal cavity were not involved in IgE production in the studied groups (Figure 4B and C). The increase of IgE⁺ cells was thus due to the appearance of a new increasing IgE⁺ cell population in the peritoneal cavity of infected mice, which did not exist in normal mice.

We have addressed the question of the presence of IgM⁺ cells in this cavity in order to monitor the kinetics of the switch of IgM⁺ cells to IgE⁺ cells (Figure 5A and B). IgM⁺ cells were the vast majority in the entire peritoneal B-cell population of normal mice (Figure 5B). The evolution of the disease was concomitant with a progressive decrease of IgM⁺ cells in all B-cell populations. Monitoring IgM expression identified two subpopulations among IgM⁺ cells: a very bright

Figure 3. Surface expression of B220, CD5 and IgE on cells from spleen. A, Dot plot of cells in the lymphocyte gate. The R2 and R3 regions represent the B1 and B2 cells, respectively. B, Intensity of IgE on the B-cell surface. C, Total cell numbers (filled columns) and IgE⁺ cells (open columns). Data are reported as means \pm SEM and are representative of five independent experiments, each carried out in 2 normal mice (n), 5 mice with acute infection (a) and 5 with chronic infection (c). *P < 0.05 for B-IgE⁺ cells compared to total B cells (Tukey multiple comparison test).



and another one with slightly lower IgM expression (Figure 5B). We understand that the latter population corresponds to the IgM cells switching to the expression of IgE. In the acute phase, an increase of IgM^{lo} cells was concomitant with the appearance of IgE⁺ cells (Figures 4B and 5B) indicating the isotype switching. In the chronic phase, a larger part of B1 cells were IgM⁻ (Figure 5B), indicating a full switch to more mature Ig isotypes, as demonstrated by the presence of B1a and B1b-IgE⁺ cells (Figure 4B). A smaller IgM^{lo} population potentially corresponds to the cells switching to other isotypes. It is notable that no IgM^{hi} cells were found in this phase of infection, indicating that self-replenishment of IgM-producing cells did not occur. Low quantities of IgM⁺ cells in this phase (Figure 5C) were appar-

ently engaged in switching to more mature isotypes, while the constant presence of IgE-producing cells in the peritoneal cavity may correlate with the permanent granulomatous and diffuse inflammation of the viscera in response to the long-lasting presence of worms and their eggs in the tributaries of the mesenteric venous system. In conclusion, we understand that IgE⁺ cell kinetics in the peritoneal cavity has different patterns and is controlled by distinct molecular mechanisms.

Discussion

B1 cells can produce IgM and IgG3 spontaneously in the absence of T cells. This production is considered to be part of the natural resistance to exogenous antigens,

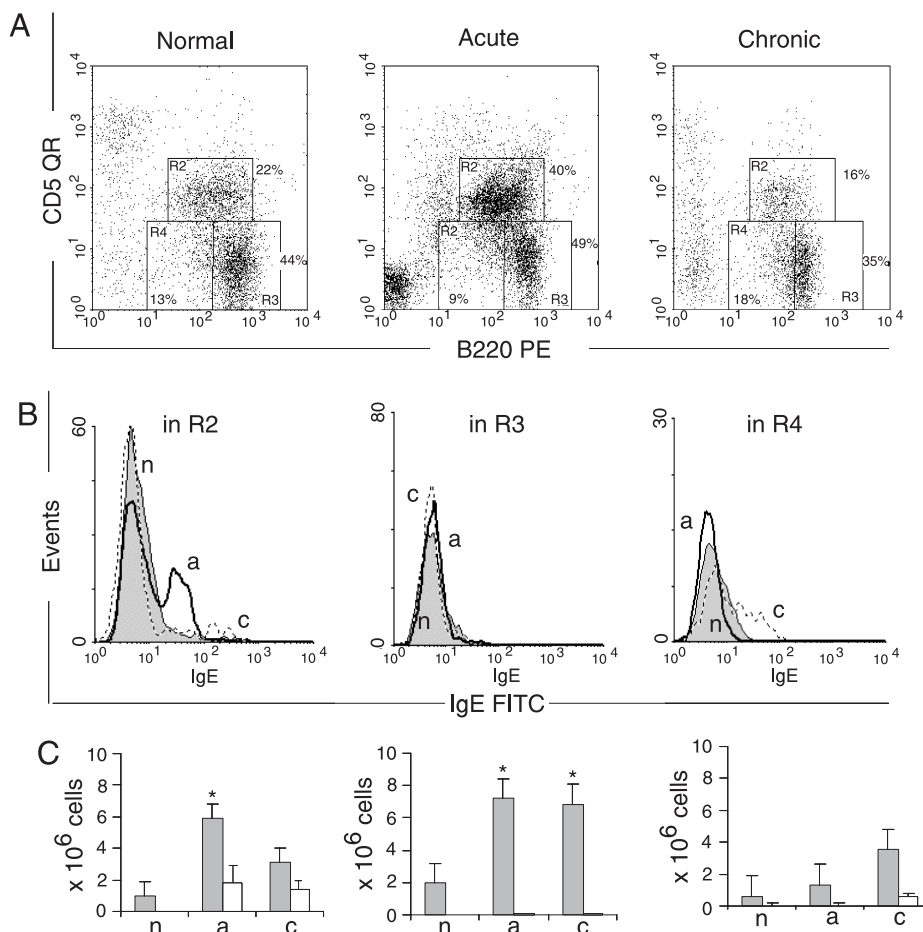


Figure 4. Surface expression of B220, CD5 and IgE molecules on cells from the peritoneal cavity. A, Dot plot of cells in the lymphocyte gate. The R2, R3 and R4 regions represent the B1a, B2 and B1b cells, respectively. B, Intensity of IgE on the B-cell surface. C, Total cell numbers (filled columns) and IgE+ cells (open columns). Data are reported as means \pm SEM and are representative of five independent experiments, each carried out in 2 normal mice (n), 5 mice with acute infection (a) and 5 with chronic infection (c). *P < 0.05 for B-IgE⁺ cells compared to total B cells (Tukey multiple comparison test).

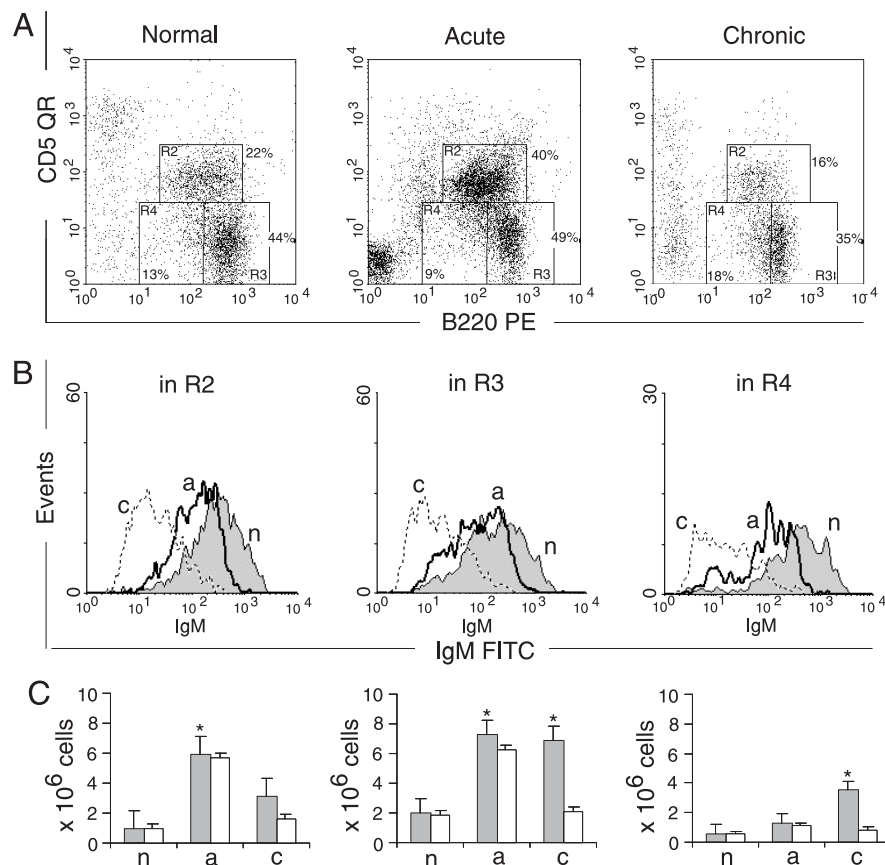
and can participate in a short-term response of the immune system to infectious agents (22-24). T cells can increase the production of these isotypes, presumably in an antigen-dependent manner, as part of the adaptive immune response. The production of IgG1 by B1 cells is totally dependent on T cells.

Production of other immunoglobulins by B1 cells can be either T-independent or T-dependent, and these antibodies strongly contribute to the IgA-secreting plasma cells of the intestinal lamina propria (25,26). A significant difference between the response of splenic and peritoneal B cells to IL-5 has been reported (27-29). We observed simultaneous generation of B1-IgE⁺ cells in the spleen and in the peritoneal cavity during the acute phase of the disease when the overall pattern of the immune response is Th2-domi-

nated. While the great majority of splenic cells that switched to IgE⁺ were B2, in the peritoneal cavity IgE⁺ cells apparently originated in the B1-IgM⁺-cell population, suggesting the generation and expansion of a new cell population in response to the infection. Schistosome soluble egg antigens are known to elicit a very strong Th2 response, with high levels of IL-4 and IL-5 (15,30).

In vitro, the induction of IgE switch in B1 cells has been shown to be difficult, requiring very high levels of cytokines (29), in studies based on the production of IgM, IgG1, IgE, and IgA by B1 (CD23⁻) and B2 lymphocytes (CD23⁺). Both subpopulations were obtained by sorting from the spleen and peritoneal cavity and cultured with lipopolysaccharide and IL-4. Only the B1 and B2 cells purified from spleen were capable

Figure 5. Surface expression of B220, CD5 and IgM on cells from the peritoneal cavity. **A**, Dot plot of cells in the lymphocyte gate. The R2, R3 and R4 regions represent the B1a, B2 and B1b cells, respectively. **B**, Intensity of IgM on the B-cell surface. **C**, Total cell numbers (filled columns) and IgM⁺ cells (open columns). Data are reported as means \pm SEM and are representative of five independent experiments, each carried out in 2 normal mice (n), 5 mice with acute infection (a) and 5 with chronic infection (c). *P < 0.05 for B-IgM⁺ cells compared to total B cells (Tukey multiple comparison test).



of producing all the tested isotypes, including high levels of IgE. Here we demonstrated *in vivo* the presence of B1-IgE⁺ in infected mice. Although B1-IgE⁺ were relatively rare compared to B2-IgE⁺ cells, they showed intermediate to high fluorescence intensity, suggesting that both cell types participated in the production of IgE, known to be high in this disease (31). *In vitro*, peritoneal B1a cells were able to produce IgG1, but only rarely switched further to the IgE isotype, indicating that this second step requires additional stimuli (32). Moreover, the rare B1a cells that were reactive for IgE on the surface did not produce the antibody to the supernatant. In our model, the peritoneal environment was able to fulfill these requirements, generating a considerable quantity of IgE-producing B1 cells, particularly so during the acute phase of the disease, consistently with the high level of Th2 cytokines in this phase.

Our observation of the relatively large number of B1 cells switching to IgE⁺ cells *in vivo* potentially corresponds to the associa-

tion between high cytokine levels and appropriate presentation of antigens in the granulomatous and diffuse inflammatory reactions in the abdominal cavity, and in the downstream sites of the antigen circulation in the spleen. The presence of B-IgE⁺ cells in all the compartments studied agrees with the high concentration of IgE in the serum of infected mice in the late chronic phase of the disease (normal mice = 1.07 ± 1.01 µg/ml, versus infected mice = 69.4 ± 43.3 µg/ml; El-Cheikh MC, unpublished data).

In the experimental model employed here, the peritoneal B1-IgE⁺ cells did not decrease during the evolution of the disease, indicating that their migration and homing are different from those observed for IgA⁺ cells (33). Although only a fraction of IgE has been shown to be specific for the assayed schistosome antigens (31), the IgE response is apparently a part of the specific response to the infection, since its patterns follow the overall kinetics of the immune relationship between the host and the parasite.

References

- Herzenberg LA, Baumgarth N & Wilshire JA (2000). B-1 cell origins and V_H repertoire determination. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 252: 3-13.
- Hayakawa K, Shinton SA, Asano M & Hardy RR (2000). B-1 cell definition. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 252: 15-22.
- Fagarasan S, Watanabe N & Honjo T (2000). Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells. *Immunological Reviews*, 176: 205-215.
- Wortis HH (1992). Surface markers, heavy chain sequences and B cell lineages. *International Review in Immunology*, 8: 235-246.
- Haughton G, Arnold LW, Whitmore AC & Clarke SH (1993). B1 cells are made, not born. *Immunology Today*, 14: 84-87.
- Potter M & Melchers F (2000). Opinions on the nature of B1 cells and their relationship to B cell neoplasia. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 252: 307-324.
- Takatsu K, Takaki S, Hitoshi Y, Mita S, Katoh S, Yamaguchi N & Tominaga A (1992). Cytokine repertoires on Ly-1 B cells. IL-5 and its receptor system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 651: 241-258.
- Vink A, Warnier G, Brombacher F & Renauld JC (1999). Interleukin 9-induced *in vivo* expansion of the B1 lymphocyte population. *Journal of Experimental Medicine*, 189: 1413-1423.
- Murakami M, Tsubata T, Shinkura R, Nisitani S, Okamoto M, Yoshioka H, Usui T, Miyawaki S & Honjo TJ (1994). Oral administration of lipopolysaccharides activates B1 cells in the peritoneal cavity and lamina propria of the gut and induces autoimmune symptoms in an autoantibody transgenic mouse. *Journal of Experimental Medicine*, 180: 111-121.
- Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H & Zinkernagel RM (1999). Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science*, 286: 2156-2159.
- Paciorkowski N, Porte P, Shultz LD & Rajan TV (2000). B1 B lymphocytes play a critical role in host protection against lymphatic filarial parasites. *Journal of Experimental Medicine*, 191: 731-736.
- Gaubert S, Costa AV, Maurage CA, Lima ECS, Fontaine J, Lafitte S, Minoprio P, Capron A & Grzych JM (1999). X-linked immunodeficiency affects the outcome of *Schistosoma mansoni* infection in the murine model. *Parasite Immunology*, 21: 89-101.
- El-Cheikh MC, Dutra HS, Minoprio P & Borojevic R (1994). Increase of B-lymphocyte number and activity during experimental murine schistosomiasis mansoni. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27: 1605-1617.
- Grzych JM, Pearce E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, Lewis F & Sher A (1991). Egg deposition is the major stimulus for

- the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology*, 146: 1322-1327.
15. Sher A, McIntyre S & Lichtenberg F (1977). *Schistosoma mansoni*: kinetics and class specificity of hypergammaglobulinemia induced during murine infection. *Experimental Parasitology*, 41: 415-422.
 16. Bout D, Rousseaux R, Calier Y & Capron A (1980). Kinetics of classes and sub-classes of total immunoglobulins and specific antibodies to *Schistosoma mansoni* during murine infection. *Parasitology*, 80: 247-256.
 17. Jarret E & Bazin H (1974). Elevation of total serum IgE in rats following helminth parasite infection. *Nature*, 251: 613-614.
 18. Weinberg DF, Baldo-Correa E, Lenzi HL & Borojevic R (1992). *Schistosoma mansoni*: peritoneal plasmacytogenesis and polypoid transformation of mesenteric milky spots in infected mice. *Experimental Parasitology*, 74: 408-416.
 19. Lenzi HL, Oliveira DN, Pelajo-Machado M, Borojevic R & Lenzi JA (1996). Coelom-associated lymphomyeloid tissue (milky spots): site of lymphoid and myelomonocytic cell generation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29: 19-24.
 20. Borojevic R, Nicola MH & Santos-da-Silva C (1984). Modulation of macrophage and polymorphonuclear granulocyte inflammatory reactions in experimental murine *Schistosomiasis mansoni*. *Cellular and Molecular Biology*, 30: 37-42.
 21. El-Cheikh MC, Bonomo AC, Rossi MID, Pinho MFB & Borojevic R (1998). Experimental murine schistosomiasis mansoni: modulation of the B1 lymphocyte distribution and phenotype expression. *Immunobiology*, 199: 51-62.
 22. Murakami M & Honjo T (1995). Involvement of B1 cells in mucosal immunity and autoimmunity. *Immunology Today*, 16: 534-539.
 23. Martin F & Kearney JF (2001). B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Current Opinion in Immunology*, 13: 195-201.
 24. Thurnheer MC, Zuercher AW, Cebra JJ & Bos NA (2003). B1 cells contribute to serum IgM, but not to intestinal IgA, production in gnotobiotic Ig allotype chimeric mice. *Journal of Immunology*, 170: 4564-4571.
 25. Taki S, Schmitt M, Tarlinton D, Forster I & Rajewsky K (1992). T cell-dependent antibody production by Ly-1 B cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 651: 328-335.
 26. Whitmore AC, Haughton G & Arnold LW (1992). Isotype switching in CD5 B cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 651: 143-151.
 27. Coffman RL, Shrader B, Carty J, Mossmann TR & Bond MW (1987). A mouse T cell product that preferentially enhances IgA production. I. Biologic characterization. *Journal of Immunology*, 139: 3685-3690.
 28. Sher A, Coffman RL, Hieny S & Cheever AW (1990). Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *Journal of Immunology*, 145: 3911-3916.
 29. Foy TM & Waldschmidt TJ (1993). Switching capacity of FcεRIII-positive and negative murine B cells. *European Journal of Immunology*, 23: 3208-3216.
 30. Erickson LD, Foy TM & Waldschmidt TJ (2001). Murine B1 B cells require IL-5 for optimal T cell-dependent activation. *Journal of Immunology*, 166: 1531-1539.
 31. Prevost-Rousseaux R, Bazin H & Capron A (1977). IgE in experimental schistosomiasis. I. Serum IgE levels after infection by *Schistosoma mansoni* in various strains of rats. *Immunology*, 33: 501-505.
 32. Siebenkotten G, Esser C, Wabl M & Radbruch A (1992). The murine IgG1/IgE class switch program. *European Journal of Immunology*, 22: 1827-1834.
 33. Jiang HQ, Thurnheer MC, Zuercher AW, Boiko NV, Bos NA & Cebra JJ (2004). Interactions of commensal gut microbes with subsets of B- and T-cells in the murine host. *Vaccine*, 22: 805-811.

Parte 3: Regulação da diferenciação e mudança de classe de imunoglobulinas em linfócitos B-1a e B-1 em animais infectados pelo *S.mansoni*.

Os resultados obtidos demonstram claramente que a ausência de galectina-3 modifica o compartimento linfóide B-2 na medula óssea, no baço e nos linfonodos mesentéricos, acelerando a geração de plasmócitos, e a infecção esquistossomótica amplifica esse fenótipo. Previamente, nosso grupo demonstrou que os linfócitos B-1a e B-1b, estimulados no decorrer da infecção esquistossomótica experimental, foram capazes de realizar mudança de classe de IgM para IgE *in vivo*, na cavidade peritoneal. Durante a progressão da fase aguda para a fase crônica, as subpopulações celulares B-1a e B-1B passaram a expressar IgE de superfície (Figura 4, parte 2), proporcionalmente à redução na expressão de IgM na membrana (Figura 5, parte 2). Em relação aos linfócitos B-1a e B-1b, nenhum trabalho havia descrito sobre o envolvimento da galectina-3 na ativação, diferenciação e plasmocitogênese derivada destes linfócitos B peritoneais.

Como o programa de diferenciação dos linfócitos B convencionais estava modificado nos animais galectina-3^{-/-}, tornou-se sugestivo analisar também as subpopulações de linfócitos B-1 dos animais deficientes de galectina-3 infectados pelo *S.mansoni*. Com este modelo de estudo, foi possível avaliar se a ausência desta lectina poderia estar envolvida na ativação, diferenciação e homeostasia dos linfócitos B-1a e B-1b, bem como investigar a participação desta lectina na regulação da mudança de classe de imunoglobulinas nestas células peritoneais.

RESULTADOS - Parte 3

*Avaliação do envolvimento da galectina-3 na regulação da mudança de classe de imunoglobulinas nos linfócitos B-1 peritoneais em animais infectados pelo *S. mansoni*:*

Em condições fisiológicas, os linfócitos B-1 IgM⁺ se diferenciam em células secretoras de IgA na mucosa intestinal, após serem estimulados ainda na cavidade peritoneal. Este microambiente é repleto de citocinas, como IL-5, fundamental para a expressão de IgA. No decorrer da infecção, as concentrações de citocinas e fatores que induzem a diferenciação dos linfócitos B-1 encontram-se aumentadas. Portanto, pode-se sugerir que a cavidade peritoneal seja uma região que tenha condições de suportar a diferenciação dos linfócitos B-1. Neste contexto, procuramos esclarecer se a falta de galectina-3 estaria modificando o compartimento B-1, bem como sua capacidade de expressar IgA e IgE, envolvida com a resposta humoral na esquistossomose.

Animais WT e galectina-3^{-/-} infectados com *S.mansoni* foram analisados durante a fase crônica e o fenótipo dos linfócitos B-1 foi monitorado, em relação às mudanças de classes de imunoglobulinas. Não foram observadas diferenças na expressão de IgA na membrana das células B-1a dos animais não-infectados WT e galectina-3^{-/-} (Figura 10A). Animais WT não-infectados, também não apresentaram células B1a-IgE⁺. Todavia, nos animais galectina-3^{-/-}, cerca de 10% das células B-1a expressavam IgE na superfície, sugerindo que a ausência de galectina-3 esteja induzindo a formação de células IgE⁺ na cavidade peritoneal (Figura 10B).

Durante a fase crônica da doença, os linfócitos B-1a obtidos no lavado peritoneal não expressavam IgA na superfície. Em contrapartida, a infecção experimental induziu um intenso aumento de IgA na superfície das células B-1a dos animais galectina-3^{-/-} (Figura 10C). Nos animais infectados, os linfócitos B-1a galectina-3^{-/-} apresentaram maior intensidade de fluorescência de IgE na membrana (Figura 10D). Esses resultados sugerem que a ausência de galectina-3 acelera o processo de mudança de classe de imunoglobulinas nas células B-1a para IgA e IgE nos animais infectados pelo *S.mansoni* dentro da cavidade peritoneal.

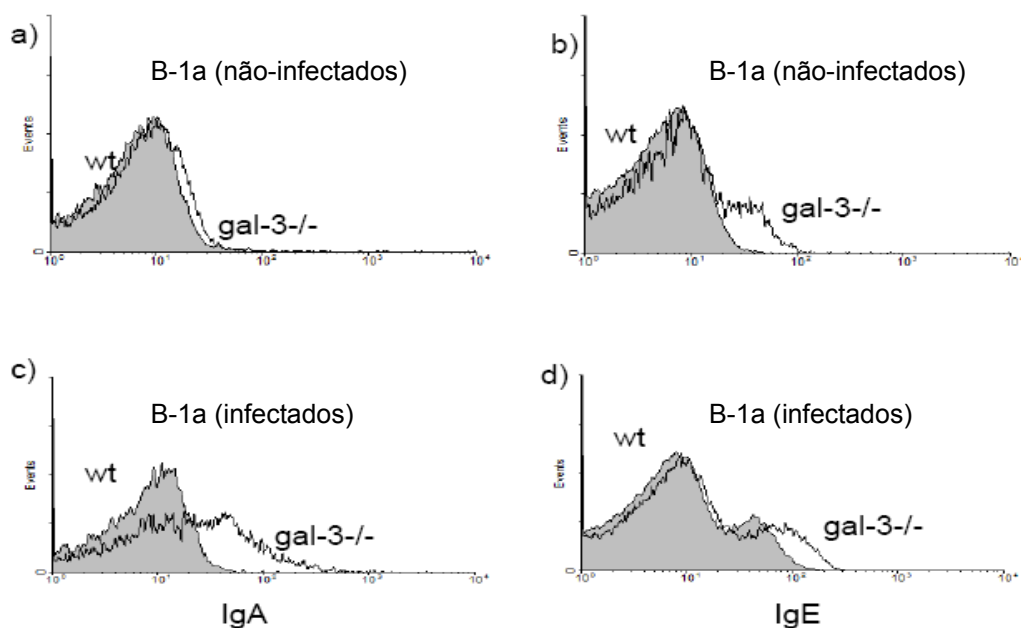


Figura 10: Mudança de classe de imunoglobulinas nos linfócitos B-1a. a) Expressão de IgA na superfície dos linfócitos B-1a ($B220^{\text{low}}CD19^{\text{high}}CD5^+$) provenientes dos animais WT (histograma cheio) e galectina-3^{-/-} (histograma vazio) não-infectados. b) Expressão de IgE na superfície dos linfócitos B-1a provenientes dos animais WT (histograma cheio) e galectina-3^{-/-} (histograma vazio) não-infectados. c) Expressão de IgA na superfície dos linfócitos B-1a provenientes dos animais WT (histograma cheio) e galectina-3^{-/-} (histograma vazio) infectados pelo *S.mansoni*, em fase crônica. d) Expressão de IgE na superfície dos linfócitos B-1a provenientes dos animais WT (histograma cheio) e galectina-3^{-/-} (histograma vazio) esquistossomóticos em fase crônica. Esses gráficos são representativos de 3 experimentos, totalizando 9 animais por grupo.

Linfócitos B-1b dos animais não-infectados WT e galectina-3^{-/-} não expressavam IgA (Figura 11A), nem IgE de superfície (Figura 11B). No curso da infecção, a ausência de galectina-3 contribuiu para uma intensa mudança de classe para IgA nesta subpopulação celular, enquanto as células WT não modificaram sua expressão (Figura 11C). Em relação a expressão de IgE pelas células dos animais infectados, foi observado que os linfócitos B-1a WT IgE⁺ eram mais numerosos do que os linfócitos B-1a galectina-3^{-/-} IgE⁺ (Figura 11D). Esses resultados sugerem que a ausência de galectina-3 interfere diferentemente na mudança de classes para IgA e IgE nos linfócitos B-1b.

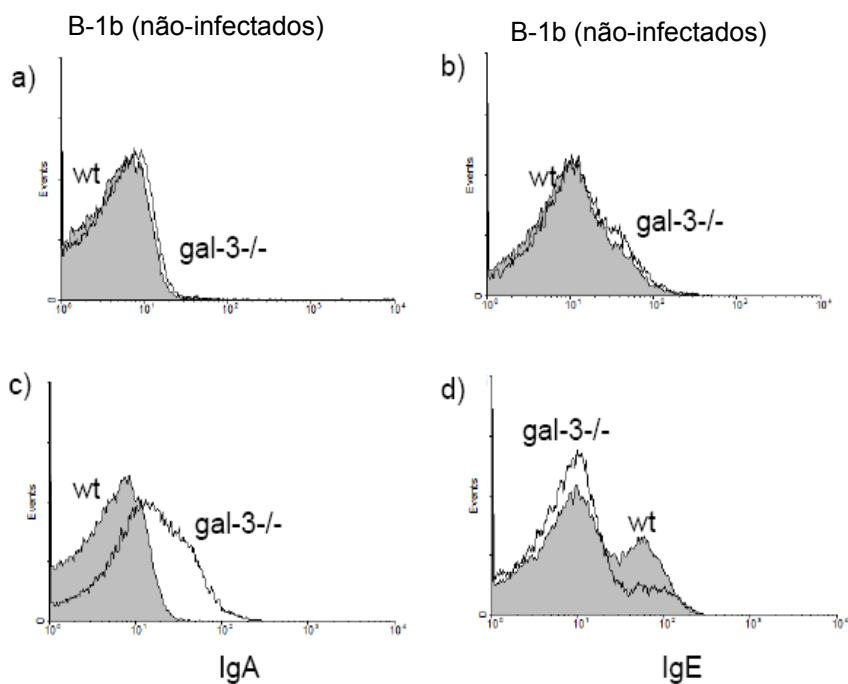


Figura 11: Mudança de classe de imunoglobulinas nos linfócitos B-1b. a) Expressão de IgA na superfície dos linfócitos B-1b (B220^{low}CD19^{high}CD5⁻) obtidos dos animais WT (histograma cheio) e galectina-3^{-/-} (histograma vazio) não-infectados. b) Expressão de IgE na superfície dos linfócitos B-1b provenientes dos animais WT (histograma cheio) e galectina-3^{-/-} (histograma vazio) não-infectados. c) Expressão de IgA na superfície dos linfócitos B-1b dos animais WT (histograma cheio) e galectina-3^{-/-} (histograma vazio) infectados pelo *S.mansoni*, em fase crônica. d) Expressão de IgE na superfície dos linfócitos B-1b provenientes dos animais WT (histograma cheio) e galectina-3^{-/-} (histograma vazio) esquistossomóticos em fase crônica. Esses gráficos são representativos de 3 experimentos, totalizando 9 animais por grupo.

Durante o processo de mudança de classe, os linfócitos modulam a expressão das imunoglobulinas de superfície. As células reduzem a expressão de IgM e passam a expressar outro isotipo. A avaliação fenotípica de IgM de superfície nos linfócitos B-1a e B-1 dos animais WT e galectina-3^{-/-}, corroborou com os resultados de IgA e IgE. Comparado com células WT, a expressão de IgM na membrana dos linfócitos B-1a dos animais galectina-3^{-/-} apresentou-se discretamente aumentada (Figura 12A). No curso da esquistossomose experimental, a ausência de galectina-3 causou um distúrbio ainda maior, como se a infecção tivesse amplificado o fenômeno da mudança de classe nesta subpopulação linfóide (Figura 12B).

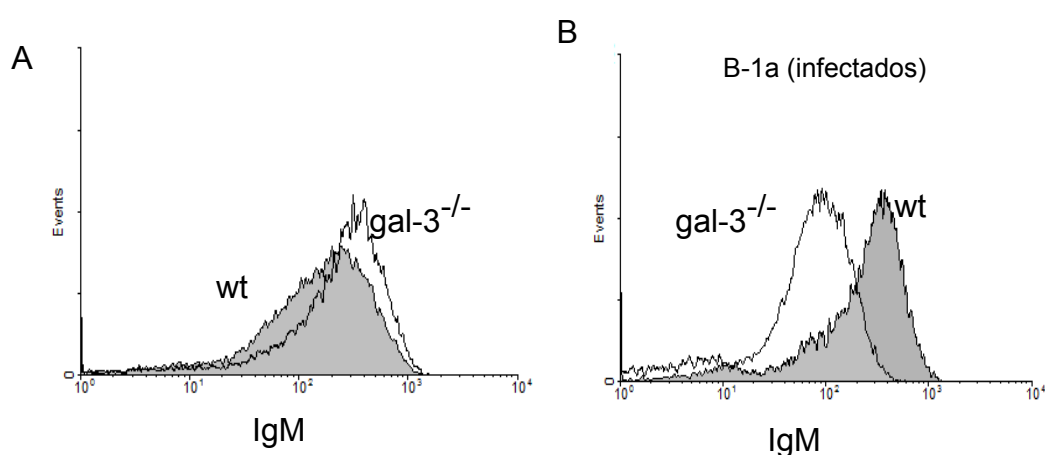


Figura 12: Mudança de classe de imunoglobulinas nos linfócitos B-1a. A) Expressão de IgM na superfície dos linfócitos B-1a (B220^{low}CD19^{high}CD5⁺) obtidos dos animais WT (histograma cheio) e galectina-3^{-/-} (histograma vazio) não-infectados. B) Expressão de IgM na superfície dos linfócitos B-1a dos animais WT (histograma cheio) e galectina-3^{-/-} (histograma vazio) infectados pelo *S.mansoni*, em fase crônica. Esses gráficos são representativos de 3 experimentos, totalizando 9 animais por grupo.

Os linfócitos B-1b dos animais WT e galectina-3^{-/-} não infectados apresentaram uma discreta diferença na intensidade de expressão de IgM de superfície. A ausência de galectina-3 favoreceu uma pequena redução na expressão de IgM de superfície (Figura 13A). Durante a esquistossomose experimental, a ausência de galectina-3 induziu uma maior distinção entre a expressão de IgM na superfície dos linfócitos B-1b WT e galectina-3^{-/-}, reduzida nestes animais alterados geneticamente (Figura 13B). A mudança de classe foi evidente nesta subpopulação peritoneal, principalmente no sentido IgM para IgA e para IgE, nos animais infectados pelo *S.mansoni*.

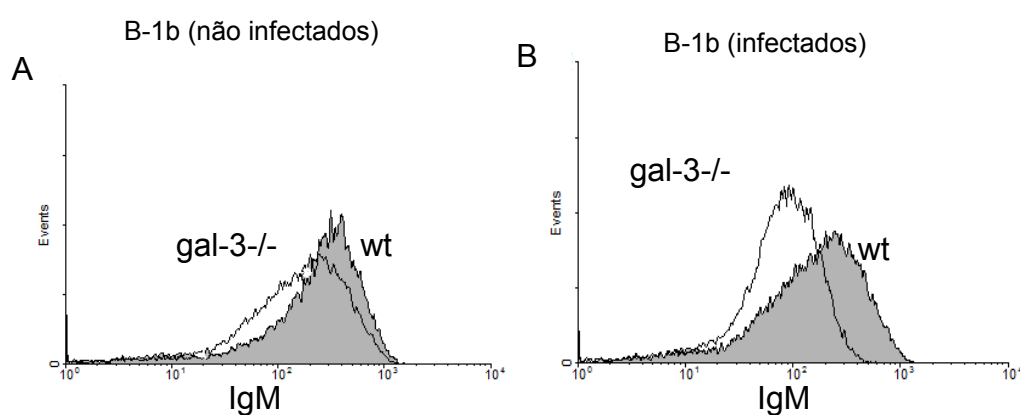


Figura 13: Mudança de classe de imunoglobulinas nos linfócitos B-1b. A) Expressão de IgM na superfície dos linfócitos B-1b (B220^{low}CD19^{high}CD5⁻) obtidos dos animais WT (histograma cheio) e galectina-3^{-/-} (histograma vazio) não-infectados. B) Expressão de IgM na superfície dos linfócitos B-1b dos animais WT (histograma cheio) e galectina-3^{-/-} (histograma vazio) infectados pelo *S.mansoni*, em fase crônica. Esses gráficos são representativos de 3 experimentos, totalizando 9 animais por grupo.

Avaliação da expressão de B220 e CD43 na superfície dos linfócitos B-1 presentes nos animais infectados pelo S.mansoni.

O programa de ativação, diferenciação e migração celular dos linfócitos B-1a e B-1b inclui a participação de B220 e CD43, duas moléculas de superfície com alto grau de glicosilação e potenciais ligantes de galectina-3. Os linfócitos B-1a dos animais galectina-3^{-/-} infectados pelo *S.mansoni* aumentaram a expressão de B220 e reduziram a expressão de CD43 na superfície, comparando com as células B-1a dos animais WT (Figura 14A e 14C, respectivamente). Os linfócitos B-1b não modificaram a expressão de B220 e também apresentaram menor expressão de CD43 na superfície (Figura 14B e

14D, respectivamente). Estes resultados sugerem que a ausência de galectina-3 interfere na expressão de duas moléculas de membrana, envolvidas com os processos de diferenciação e migração das células B-1 na cavidade peritoneal.

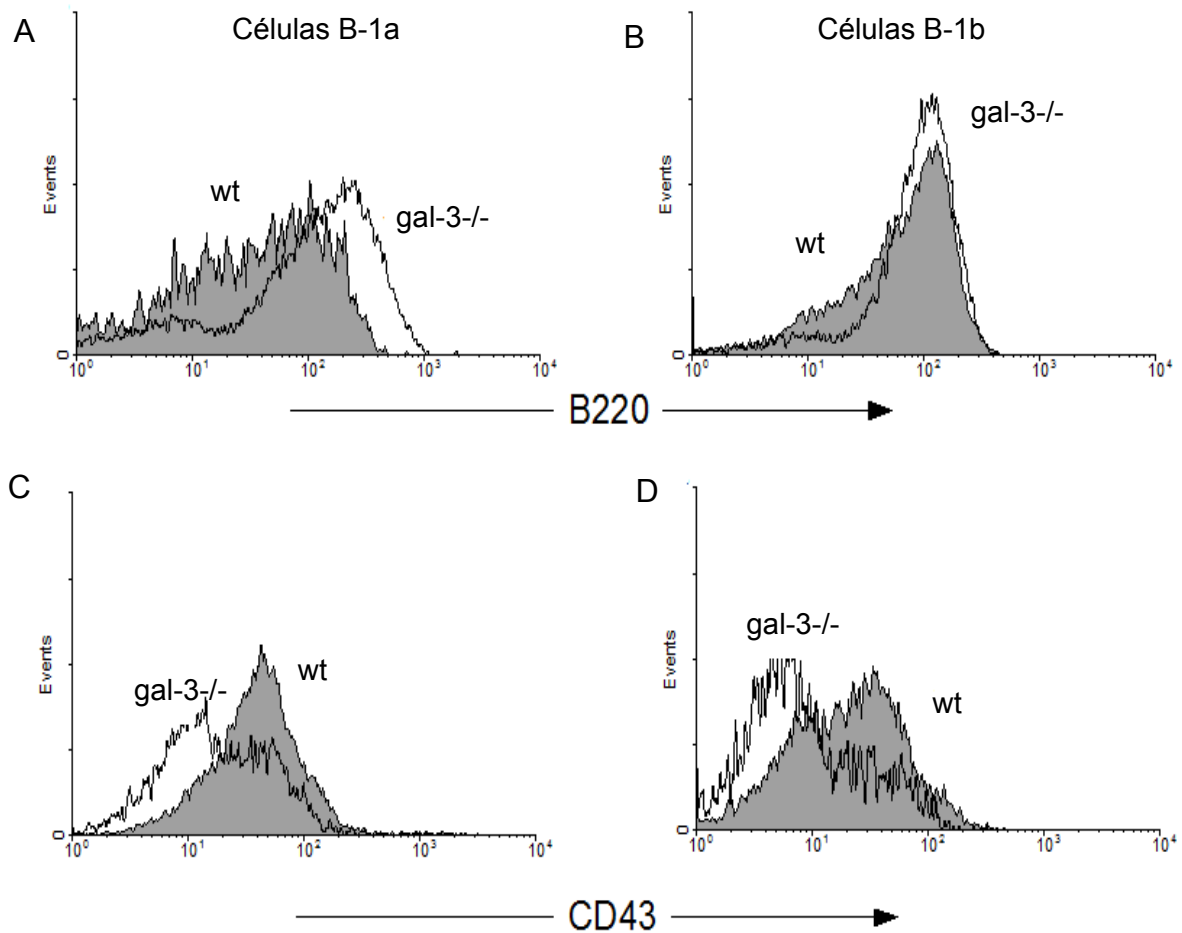


Figura 14: Análise fenotípica dos linfócitos B-1a e B-1b dos animais infectados pelo *S.mansoni*. a) O histograma cheio representa a expressão de B220 na superfície das células B-1a dos animais WT e o histograma vazio representa as células B-1a dos animais galectina-3^{-/-} infectados. b) Expressão de B220 na superfície dos linfócitos B-1b dos animais WT (histograma cheio) e galectina-3^{-/-} (histograma vazio) infectados. c) Expressão de CD43 na superfície dos linfócitos B-1a e (d) nas células B-1b dos animais WT (histograma cheio) e galectina-3^{-/-} (histograma vazio) infectados. Esses gráficos são representativos de 2 experimentos, totalizando 6 animais por grupo.

Cultivo de células peritoneais: participação da IL-5 na ativação e diferenciação dos linfócitos B-1 in vitro

Células peritoneais WT foram mantidas em sistema de cultivo, na presença de IL-5, apresentaram maior expressão de B220 na superfície, uma semana após o tratamento (Figura 15A). Esse dado não foi obtido no tratamento com IL-7 (Figura 15B). Quando células galectina-3^{-/-} foram cultivadas com IL-5, a expressão de B220 foi ainda maior (Figura 16A) e não foi alterada na presença de IL-7 (Figura 16B), sugerindo que a ausência de galectina-3 acelera a diferenciação de linfócitos B-1 e IL-5 pode estar envolvido neste processo.

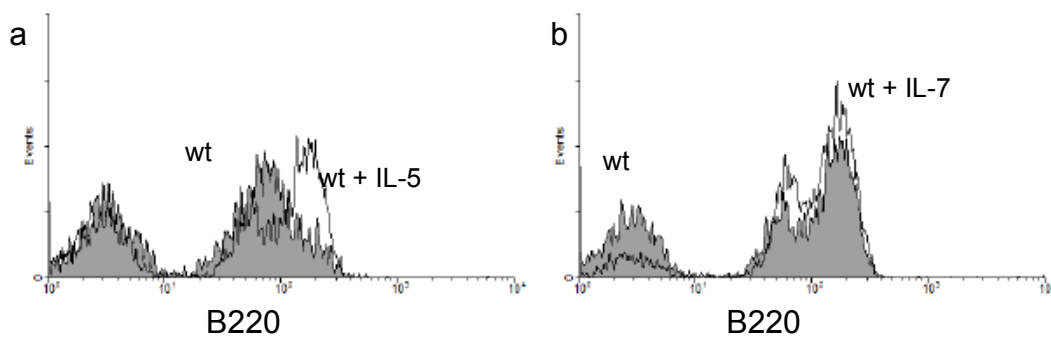


Figura 15: Cultivo de células peritoneais WT na presença de IL-5. (A) Após uma semana de tratamento, foi observado que a IL-5 estimula a expressão de B220 na superfície das células B peritoneais. B) O tratamento com IL-7 não interferiu na expressão de B220 na membrana das células B peritoneais. Os cultivos controles, sem adição de IL-5 ou IL-7 são representados pelo histograma cheio. As amostras tratadas com as citocinas são representadas pelo histograma vazio. Esses gráficos são representativos de 3 experimentos independentes.

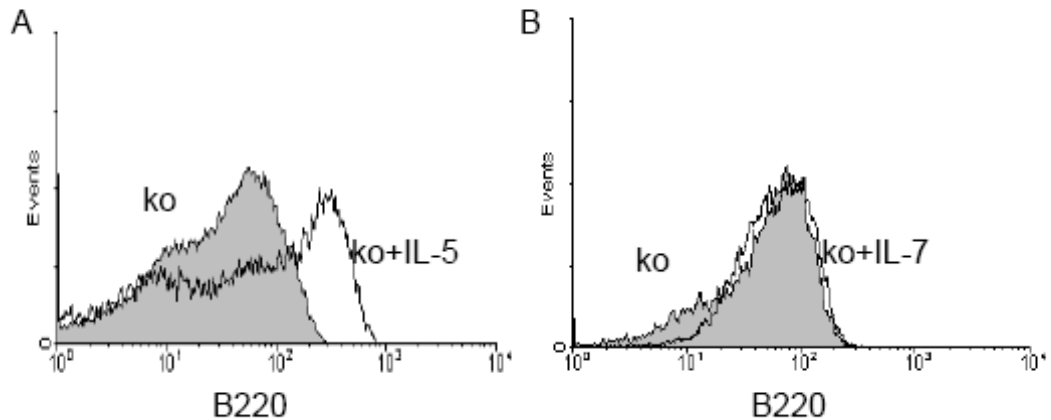


Figura 16: Cultivo de células peritoneais galectina-3^{-/-} na presença de IL-5. (A) Após uma semana de tratamento, foi observado que a IL-5 estimula a expressão de B220 na superfície das células B peritoneais. B) O tratamento com IL-7 não interferiu na expressão de B220 na membrana das células B peritoneais. Os cultivos controles, sem adição de IL-5 ou IL-7 são representados pelo histograma cheio. As amostras tratadas com as citocinas são representadas pelo histograma vazio. Esses gráficos são representativos de 3 experimentos independentes.

Esses resultados demonstraram que a ausência de galectina-3 acelera a mudança de classe de imunoglobulinas nos linfócitos B-1a e B-1b, diferentemente nos animais infectados *in vivo*. Os ensaios *in vitro* associam a diferenciação dos linfócitos B-1 à presença de IL-5. Como a expressão de IL-5 pode ser controlada pela galectina-3, existe a possibilidade desta interleucina ser expressa constitutivamente aumentada nos animais galectina-3^{-/-} e isso poderia influenciar na diferenciação e homeostasia dos linfócitos B-1 na cavidade peritoneal. Células B-1a e B-1b isoladas por citometria de fluxo (FACS – Fluorescence Activated Cell Sorter) foram analisadas quanto a expressão relativa do RNAm de IL-5. Células B-1a dos animais WT e galectina-3^{-/-} não apresentaram diferenças significativas na expressão, enquanto células B-1b dos animais galectina-3^{-/-} expressaram aproximadamente o dobro de RNAm de IL-5 (Figura 17), sugerindo que a ausência de galectina-3 favorece a transcrição do gene IL-5.

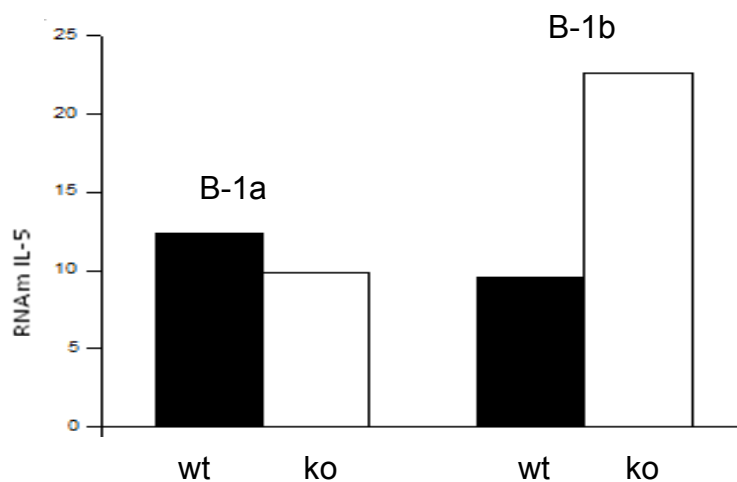


Figura 17: Expressão relativa de RNAm de IL-5 nas subpopulações B-1 peritoneais. 1×10^6 células/animal foram analisadas por RT-PCR em tempo real. As células B-1a foram isoladas pelo fenótipo ($B220^{\text{low}}CD19^{\text{high}}CD5^+$). As células B-1b foram isoladas pelo fenótipo ($B220^{\text{low}}CD19^{\text{high}}CD5^-$). Apenas dois animais por grupo foram avaliados.

A distinta regulação da expressão de IgA e IgE nos linfócitos B-1a e B-1b dos animais galectina-3^{-/-} infectados pelo *S. mansoni*, poderia ser consequência da ausência desta lectina, e também, uma modulação dependente de citocinas. Neste contexto, IL-5 tem papel fundamental, pois é crucial para a mudança de classe de imunoglobulinas (IgM para IgA). Além disso, é uma citocina que regula a atividade fisiológica das células B-1, que são IL-5R⁺.

Estes resultados indicam que a ausência de galectina-3 modificou o programa de ativação e diferenciação dos linfócitos B-1a e B-1b, tornando as células mais suscetíveis à mudança de classe de IgM para IgA e IgE no decorrer da infecção causada pelo *S. mansoni*. Entretanto, células WT peritoneais mantidas em cultivo na presença de IL-5, uma citocina cuja transcrição é controlada pela galectina-3, foram estimuladas a diferenciarem *in vitro* (aumento na expressão de B220), sugerindo que esta lectina esteja envolvida na fisiologia das células peritoneais, independente da instalação de uma infecção. Por isso, decidimos investigar o envolvimento da galectina-3 na geração de plasmócitos e na homeostasia dos linfócitos B-1a e B-1b peritoneais, independentemente de um processo infeccioso.

Parte 4: Galectina-3, um regulador de de-adesão de linfócitos B-1 ao mesentério, controla a plasmocitogênese. Oliveira et al., 2008. Em vias de submissão. Blood.

Nossos resultados descritos na parte 3 demonstram uma evidente influência da galectina-3 na modulação da mudança de classe de IgM para IgE e IgA nas células B-1a e B-1b, independente da instalação de um processo inflamatório. O passo seguinte foi investigar as vias de sinalização que a galectina-3 estaria envolvida, regulando o programa de diferenciação dos linfócitos B-1.

A galectina-3 extracelular regula a migração e a adesão dos linfócitos B-2, bem como a diferenciação destas células em plasmócitos. Neste trabalho, nosso grupo avaliou o papel da galectina-3 na fisiologia das células B-1 peritoneais. Nos animais galectina-3^{-/-}, o número de linfócitos B-1a estava reduzido, enquanto o número de células B-1b estava aumentado, quando comparados com os animais WT. A ausência de galectina-3 favoreceu a diferenciação das células B-1a, cujo fenótipo alterou de B220^{low} para B220^{high}, além de ter contribuído para a localização anormal de plasmócitos fortemente aderidos na membrana mesentérica destes animais.

A molécula CD43, um ligante de galectina-3, é constitutivamente expressa pelas células B-1a e B-1b. Nos animais galectina-3^{-/-}, a expressão desta molécula estava reduzida na superfície dos linfócitos B-1. Para esclarecer se a redução de CD43 estava associada diretamente com o processo de plasmocitogênese exacerbado na cavidade peritoneal, analisamos animais CD43^{-/-} e observamos que as células mononucleares estavam fortemente aderidas ao mesentério também. Contudo, não observamos a presença de plasmócitos nas membranas mesentéricas destes animais, sugerindo que a molécula CD43 deve estar envolvida com o fenômeno da adesão destes linfócitos B-1, mas não diretamente com o processo de diferenciação em plasmócitos.

Reunidos, os nossos resultados sugerem que a galectina-3 modula a fisiologia das células B-1, interferindo com as funções de CD43. Sua ausência ou inibição alterou a homeostasia das células peritoneais e acelerou o programa de plasmocitogênese nesta cavidade celomática, assim como havia sido demonstrado nos tecidos linfóides primários e secundários, compartimentos favoráveis à diferenciação dos linfócitos B-2.

Galectin-3, a regulator of CD43-dependent B1 cell deadhesion to mesentery, controls B-1a plasmacytogenesis

Oliveira FL,^{*} Chammas R,⁺ Ricon L,^{*} Fermino ML[#], Bernardes ES[#], Hsu DK[&], Liu FT,[&] Borojevic R^{*} and El-Cheikh MC^{*}.

^{*}Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

⁺Laboratório de Oncologia Experimental, Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo and Centre for Cell-Based Therapy CEPID-FAPESP, São Paulo, Brazil.

[&] Department of Dermatology, School of Medicine, University of California, Davis, Sacramento, California, USA.

[#]Laboratório de Glicobiologia e Imunoquímica, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Abstract

Extracellular galectin-3 is known to contribute to migration and adhesion of B2 lymphocytes as well as their differentiation into plasma cells. Here, we analyzed the role of galectin-3 in B1 cell physiology and the balance between B1a and B1b lymphocytes in the peritoneal cavity. In galectin-3^{-/-} mice, the total number of B1a lymphocytes was lower, but that of B1b lymphocytes was higher compared with wild type mice. In galectin-3^{-/-} mice, the differentiation of B1a cells was accompanied by the presence of plasma cells abnormally located and strongly adhered onto the mesentery. CD43, constitutively expressed by B1 lymphocytes, was down-regulated in galectin-3^{-/-} mice. Mononuclear cells adhered strongly to the mesenteric membranes from both CD43^{-/-} and galectin-3^{-/-} mice. However, differently from CD43^{-/-} mice, the accumulation of B1 cells in peritoneal structures in galectin-3^{-/-} mice was accompanied by their functional differentiation into plasma cells. Thus, we suggest that galectin-3 modulates the B1 cell physiology by interfering with the CD43 functions and delaying B1 cell differentiation into plasma cells, thus maintaining the equilibrium between the B1a and B1b subpopulations.

Introduction

Myeloid and lymphoid cells in peritoneal cavity are dispersed in the peritoneal fluids and in contact with the omentum and mesentery, in contrast to the organized distribution of cells in the primary and secondary lymphoid organs. Both structures contain myeloid and lymphoid follicles, known as milky spots¹⁻³, sources for cells in the first line of defense, such as macrophages and B1 lymphocytes⁴. Polypoid structures originating from mesenteric milky spots were reported as sites for plasmacytogenesis⁵. B1 lymphocytes represent a functionally distinct subset of “natural” IgM and IgA-secreting B cells that reside predominantly in pleural and peritoneal cavities and in the spleen^{6,7}. They are distinguished from B2 lymphocytes by differences in their surface markers, while B1 lymphocytes are B220^{lo}/IgM^{hi}/IgD^{lo}/CD43⁺CD23⁻, B2 lymphocytes are B220^{hi}/IgM^{lo}/IgD^{hi}/CD43⁻CD23⁺ cells. Peritoneal B1 cells express CD11b/CD18 (Mac-1) and can be further divided into B1a and B1b subpopulations, based on the expression of CD5, present only in B1a cells^{8,9}. Functionally, while B1a cells spontaneously secrete protective natural antibodies, B1b cells are required for long-term protection against certain parasites and bacteria^{10,11}.

Like B2 lymphocytes, B1 cells also differentiate into secreting plasma cells in a Blimp-1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1)-dependent pathway¹². In contrast to B2 cells that arise from the bone marrow throughout life, B1 cells tend to arise early from fetal liver-derived precursors and become self-renewing in the peritoneal cavity of adult mice^{8,13,14}. In adults, B1b cells are preferentially derived from bone marrow precursors described as CD45^{lo/neg} CD19⁺[¹⁵]. Blimp-1, a transcription repressor acting as a master regulator of plasma cell differentiation¹⁶, is not necessary for the formation and self-renewal of B1 lymphocytes¹².

Despite the importance of the B1a and B1b cell population, relatively little is known about how the cells enter, accumulate in peritoneal cavities, and drain into lymphatics

through the parathymic lymph nodes (PTLN)^{17,18}. Accumulating evidence suggests that peritoneal B1 cells traffic between the milky spots and peritoneal fluid and their exit to the lamina propria is biologically regulated, either by chemokines and cytokines, such as CXCL13, CXCL-12 and IL-10^{17,19,20} or by sphingosine 1-phosphate²¹. However, the mechanisms that control the arrival of precursors from bone marrow, the first steps of B1 activation within the peritoneal cavity and B1 cell interaction with the mesenteric structures remain to be elucidated.

CD43, a cell surface sialoglycoprotein expressed during the stromal-dependent phase of B cell development in bone marrow and in peritoneal B1 lymphocytes, is involved in the migration of peritoneal leukocytes. It has been demonstrated that the down-regulation of CD43 inhibits the egress of peritoneal leukocytes²², and shedding of this molecule is an initial event during neutrophil migration²³. The role of CD43 in the peritoneal B1 cell trafficking is still not well known. Intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) has been identified as a putative ligand for CD43²⁴. Engagement of CD43 with its ligand could regulate cycles of adhesion and de-adhesion, important events in B1 cell physiology. Other CD43 ligands include members of the galectin family, such as galectin-1 and galectin-3²⁵, which interact with lactosamine residues found in the extracellular domain of CD43²⁶.

In B lymphocytes, down-regulation of galectin-3 gene expression by anti-sense oligonucleotides led to an increase in the number of secreting plasma cells in the course of *Trypanosoma cruzi* infection²⁷. Recently, we have observed a remarkable plasmacytogenesis in different lymphoid compartments of *Schistosoma mansoni* infected galectin-3^{-/-} mice, as compared to infected wild type mice²⁸. It was clear that the absence of galectin-3 markedly altered the program of B2 lymphocyte differentiation into plasma cells.

Here we have focused on B1 cell physiology and analyzed the involvement of galectin-3 in the balance between B1a and B1b lymphocytes in the peritoneal cavity of naïve mice. In galectin-3^{-/-} mice we observed a reduction in the total number of B1 cells,

accompanied by an activation of resident B1a and an increase of the B1b cell population, as compared with the wild type mice. Plasma cells were abnormally located and strongly adhered in mesentery in galectin-3^{-/-} mice. Cell surface exposure of CD43 was decreased in B1 cells derived from galectin-3^{-/-} mice. Here we also showed that galectin-3^{-/-} mice are a phenocopy of CD43^{-/-} mice, regarding the accumulation of mononuclear cells in the mesenteric membranes. However, in contrast with the latter, accumulation of B1 cells onto peritoneal structures was accompanied by their functional differentiation into plasma cells in galectin-3^{-/-} mice. Thus we suggest that galectin-3 interferes with B1 cell physiology at two distinct levels: (1) by regulating CD43 functions and (2) by delaying B1 cell differentiation into plasma cells in the peritoneal cavity.

Materials and Methods

Mice and Cell suspensions

Inbred C57/bl6, Gal-3^{-/-} mice (backcrossed to C57/bl6 for 10 generations²⁹, GFP transgenic mice³⁰ and CD43^{-/-} mice, age and sex-matched were obtained from the colony bred at the Federal University of Rio de Janeiro (Brazil). All mice procedures were performed in accordance with institutional guidelines (protocol number DAHEICB 009, Federal University of Rio de Janeiro. Peritoneal, blood and bone marrow cell suspensions were harvested on cold PBS (pH 7.2, 3% FBS). Red blood cells were lysed with hypotonic ACK solution.

Flow cytometry

All flow cytometry stains were performed by incubating 10⁶ cells in 30µl of 4% FBS in PBS with the Fc blocker antibody (clone 2.4G2) for 10min before adding the mAb. The following monoclonal antibodies were used in this study: FITC-labeled B220, IgA, IgE and

CD43; PE-labeled Mac-1, CD19 and CD43; biotin-labeled B220 and IgM and revealed with streptavidin-APC; Cychrome-labeled CD5 (all from BD Bioscience, San Jose, CA, USA). The unlabeled anti-galectin-3 was obtained from the M3/38 hybridoma (ATCC, Manassas, VA USA). The secondary antibody was a FITC-labeled anti-rat IgG. The sample was acquired in a flow cytometer (FACScalibur, BD Bioscience, San Jose, CA) and analyzed using two specific softwares, Cell Quest and WinMDI 2.8.

***In vivo* experiments**

In vivo cell transfer experiments were done by i. p injection of GFP transgenic mice peritoneal cells (1.0×10^6 cells/200 μ L PBS) in both wild type and gal-3^{-/-} mice peritoneal cavity. The GFP⁺ cells were maintained in the peritoneal microenvironment for 7 days, and harvested for phenotypic analyses.

The intra-peritoneal injection of anti-galectin-3 mAB (cloneM3/38) or isotype control IgG2a was performed in a single dose (approximately 0.5mg/200 μ l per mouse). Seven days after treatment, the mice were euthanized with CO₂. Peritoneal cells were harvested and stained for phenotypic analyzes. The mesenteric membrane were removed before and after the peritoneal washing, sticker onto glass and fixed for 24 hours in methanol. The specimens were stained following the May-Grunwald and Giemsa's method, as described elsewhere³¹ an analyzed by optical microscopy (Zeiss-Axioplan-Germany).The pictures were acquired in bright field using a camera Evolution MP 5.0 RTV- Color-Media Cybernetics, Canada.

***In vitro* assays**

Total 5.0×10^5 peritoneal cells of wild type and Gal-3^{-/-} mice were harvested in Modified Eagle's medium (alpha-MEM) supplemented with 10% FBS, 2mM glutamine, 10^{-5} β -mercaptoethanol and 100 mg/mL penicillin and streptomycin and cultured on 25 cm² tissue culture flasks during a week at 37°C in 5% CO₂ ambient oxygen. Concomitant, anti-galectin-3 mAb or isotype antibody control was added in the culture. No feeder layer cells nor cytokines were added in these cultures. Phenotypic analyses were performed after one week.

Peritoneal cell sorting

Peritoneal B-1a and B-1b cells were sorted from WT and Gal-3^{-/-} mice based on B220, CD5 and mac-1 expression. B-1a cells were sorted as B220^{low}CD5⁺Mac-1⁺ cells and B-1b cells as B220^{low}CD5⁻Mac-1⁺ cells using a Mo Flo cytometer (Dako–Cytomation, Denmark). Both fractions were harvested in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS. Post-sort analysis using Summit v4.3 software showed purities of > 90% for both subsets. Subsequently, the peritoneal subpopulations were centrifuged at 1200 RPM and pellet suspended in 1mL of Trizol to Real Time PCR experiments.

Real-time quantitative PCR analysis

Total RNA was isolated from 1×10^6 cells using the TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was performed in a final volume of 20 μ L, using ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega Corporation, Madison, WI, USA). The reaction mixture contained 4 μ g of total RNA, 20 pmol of oligo dT primer (Invitrogen Life Technologies), 40U of RNasin, 500 μ M of dNTP mix and 1U of reverse transcriptase in 1X reverse transcriptase buffer. The cDNA was treated with 10 μ g of RNase (Gibco, Carlsbad, CA, USA) and then

immediately used or stored at -20°C. PCR amplification and analysis were achieved using an ABI Prism 7500 sequence detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All the reactions were performed with SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) using a 25 µL volume in each reaction, which contained 2 µL of template cDNA, 5 pmol of each primer and 12.5 µL of SYBR Green. The primers used for PCR amplification were β-actin (forward: 5'-AGCTGCGTTTTACACCCTTT-3', reverse: 5'-AAGCCA TGCCAATGTTGTCT-3'); Blimp-1 (forward: 5' - AAGTCTAGCTCCGGCTCCGT - 3', reverse: 5' - TCGGCCTCTGTCCACAAAGT - 3') and CD43 (forward 5' - AGC AGAAAAACATCCACGACG - 3', reverse: 5' - AAGGCAATAAGCATGGGCAC - 3'). The relative expression of each gene was obtained using the Comparative CT Method, and they were normalized using β-actin as an endogenous control. Therefore, data in graphs of relative expression represent the ratio between the mRNA levels of the target gene and the expression of β-actin.

Statistical Analysis

The statistical tests were accomplished using the Tukey's Multiple Comparison Test (*t* test), significance threshold was fixed for $\alpha= 0.05$. Therefore, *p* values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Results

Dynamics and imbalance of B1 subpopulations in the peritoneal cavity of galectin-3^{-/-} mice

Galectin-3 is involved in macrophage activation, recruitment of inflammatory cells and differentiation of B2 lymphocytes into plasma cells. The peritoneal cavity shelter several types of leukocytes, including monocytes, macrophages, B2 lymphocytes and resident B1a and B1b subpopulations³². In order to investigate the role of galectin-3 in the dynamics of peritoneal B cell populations, we first investigated the Lin⁻CD19⁺B220^{-low} B1 progenitors (as described by Montecino-Rodriguez and colleagues¹⁵) in the bone marrow (Figure 1 A and B), and CD19⁺B220^{-low} in the peripheral blood (Figure 1 C and D) and peritoneal cavity (Figure 1 E and F) in both wild type and galectin-3^{-/-} mice. In bone marrow, we found that the number of these progenitor cells increased about 3-fold in galectin-3^{-/-} mice (Figure 1B) comparing with wild type mice (Figure 1A), in parallel to an increase of the same cells in the peripheral blood and in the peritoneal cavity (Figure 1D and 1F, respectively). As we compare Figs. 1 E and F, we observe that in the absence of galectin-3, there was a significant increase in the B220^{int}CD19^{hi} population. This is the phenotype of B1b cells¹⁵. Alternatively, increased expression of B220 in B1a cells could account for the same phenotype. We further characterized both B1a and B1b populations in the peritoneal cavity of both wild type and galectin-3^{-/-} mice.

In wild type mice, B1 lymphocytes were described as B220^{low} (Figure 1G in R3) and B2 lymphocytes as B220^{high} (Figure 1G in R2) and both cell types displayed galectin-3 on the cell surface. As expected, no reactivity to galectin-3 antibodies was observed in galectin-3^{-/-} mice and B220^{low} lymphocytes were drastically reduced in number in galectin-3^{-/-} mice (Figure 1H, arrow), when compared with wild type mice. This reduction was accompanied by a decrease in the total number of leukocytes and B cells (Figure 1I and 1J), suggesting that the absence of galectin-3 could interfere with the distribution of floating peritoneal B1 cells, either by accelerating the migration of cells out the peritoneal

cavity or by up-regulating B220 cell surface expression.

To investigate which subpopulation, B1a or B1b, was responsible for the decreased recovery of peritoneal B1 cells, we extended the phenotypic characterization using additional surface markers, including CD5, Mac-1, CD19, CD23, IgM and CD43. B1a lymphocytes, defined as B220^{low}CD5⁺Mac-1⁺ cells, were reduced in galectin-3^{-/-} mice, compared to the wild type mice (Figure 2A in R2, 2B in R2 and 2C). In this subpopulation, we also observed a concomitant increase in B220 surface expression (Figure 2D) and a decrease in CD43 surface expression in galectin-3^{-/-} mice (Figure 2E). In contrast, we detected high levels of CD43 mRNA in B1a cells derived from galectin-3^{-/-} mice (Figure 2F).

On the other hand, B1b lymphocytes, defined as B220^{low}CD5⁻Mac-1⁺, were increased in number in the peritoneal cavity of galectin-3^{-/-} mice (Figure 2A in R3, 2B in R3 and 2C). With regard to the B1b subpopulation in galectin-3^{-/-} mice, the number of B220⁺ cells was higher, and CD43 surface expression was lower (Figure 2G and 2H, respectively) without significant variation in its mRNA levels in B1b cells (Figure 2I). Expression of IgM and CD23 was not modified in both B1a and B1b (data not shown).

Mesentery as a site for B1 cell differentiation into plasma cells in galectin-3^{-/-} mice

To investigate if the absence of galectin-3 interferes with the distribution of B1 cells between the peritoneal liquid (non-adherent or floating cells) and the mesentery (adherent cells), we performed the morphological analyses of the mesenteric membranes before and after the peritoneal wash procedures, in both WT and galectin-3^{-/-} mice. There was a significant 3-fold increase in the number of adherent cells in the mesentery of galectin-3^{-/-} mice as compared with wild type mice before the washing procedure (Figure 3A and 3B). After the peritoneal washing, approximately 2-fold more adherent cells persisted in the

mesentery of galectin-3^{-/-} mice as compared with wild type mice (Figure 3C-D and 3E-F). It is important to point out that plasma cells were the major cells found adhered in the galectin-3^{-/-} mice mesentery after the peritoneal washes (Figure 3F, arrows indicate plasma cells). On the other hand, myeloid cells were the major cells found in the mesentery of wild type mice (arrows in Figure 3E).

Together, our results suggested that in the absence of galectin-3, B cell differentiation into plasma cells was favored. To determine which B1 lymphocyte subpopulations differentiated into plasma cells in the peritoneal cavity, we monitored the differential expression of CD138, a surface marker of the plasma blast and plasma cells. We observed an increase in both CD138⁺/CD5⁺ and CD138⁺/CD5⁻ cells, indicating that the absence of galectin-3 favors the differentiation of both B cell subsets into plasma blast cells (Figure 4A and 4B). It has been demonstrated that Blimp-1 is an important transcription factor in B1 differentiation. In our model, we demonstrated by real time-PCR that the relative expression of Blimp-1 increased in B1a cell, but not B1b cell subpopulation of galectin-3^{-/-} mice. These data suggest that it is predominantly B1a cells that differentiate into plasma cells in a Blimp-1 dependent manner in the peritoneal cavity (Figures 4C and 4D).

Extracellular galectin-3 sustains CD43 exposure on B1 cell surface, leading to a deadhesive phenotype

Decreased cell surface expression of the deadhesion molecule CD43, which is also a known galectin-3 ligand in lymphocytes³³, prompted us to evaluate the involvement of this molecule as a negative regulator of the adhesion of B1 cells to the mesentery and their differentiation into plasma cells. The de-adhesive function of CD43 was confirmed by morphological analyses of the mesenteric membranes in CD43^{-/-} mice. In Figure 5A, we

observed approximately 4-fold more adherent cells, organized in large clusters, in the mesentery of CD43^{-/-} mice when compared with the mesentery of wild type mice (Figure 3A). However, after the peritoneal wash procedure less cells were adhered and myeloid but no plasma cells were observed in the mesentery of the CD43^{-/-} mice, differing from what we have observed for galectin-3^{-/-} mice (Figure 5B and 5C, arrow). Interestingly, in both galectin-3^{-/-} (Figure 2D and 2G) and CD43^{-/-} mice (Figure 5D), the peritoneal B cells expressed higher levels of B220 on the cell surface, but it was only in the absence of galectin-3 that the cells completed their program of differentiation into plasma cells. The levels of other phenotypic markers, such as CD19, Mac-1, CD5, IgM and CD23, were not significantly different between galectin-3^{-/-} and CD43^{-/-} mice (data not shown).

To investigate the role of galectin-3 in the control of peritoneal cell adhesion observed *in vivo*, we performed *in vitro* studies, using anti-galectin-3 antibody in cultured peritoneal cells. After 48 hours of culture, we observed that adherent cells (including B1 cells and monocyte/macrophages) from wild type mice were spread out, while most peritoneal cells from galectin-3^{-/-} were attached, but round in shape (data not shown), in accordance with others works^{28,29,34}. The same pattern was maintained by cells after 1 week of culture (Figures 6A and 6B). Interestingly, when the peritoneal cells of wild type mice were treated with galectin-3 antibody the cells in culture assumed rounded morphologies, suggesting loss of their ability for spreading (Figure 6C). In contrast, when the cells in culture were treated with a control antibody, we did not observe any change in cell morphology (Figure 6D). When cells from the peritoneal cavity were cultured for up to 7 days, the increased expression of B220 and lower expression of CD43 observed *ex vivo* (Figures 2D-2G and 2E-2H) were maintained (Figures 6E-6F). In addition, when cells from wild type mice were then exposed to anti-galectin-3 antibodies or an Ig control (Figures 6G-6H), only the former resulted to an increase of B220 cell surface expression (Figure 6G) and partially decreased CD43 expression (Figure 6H).

We next performed *in vivo* experiments by inoculating either an Ig control or anti-galectin-3 in the peritoneal cavity of wild type mice (Figures 7A-D). While in the control situation, myeloid cells were preferentially found in the mesentery, upon treatment with anti-galectin-3, mononuclear cells were the major adhering cells in the mesentery, mimicking what we had observed in the mesentery of galectin-3^{-/-}. Taken together, these results suggest that extracellular galectin-3 is involved in cell de-adhesion to mesenteric membranes as observed in these experiments. To further confirm this notion, we engrafted peritoneal cells from GFP transgenic mice into the peritoneal cavity of either wild type or galectin-3^{-/-} receptor mice. After one week, peritoneal cells were harvested and analyzed for both B220 (Figure 7E) and CD43 (Figure 7F) cell surface expression. In Figure 7E, we observed that the B220 expression pattern in the donor galectin-3⁺/GFP⁺ B1 cells increased when cells were injected in the peritoneal cavity of galectin-3^{-/-} mice, assuming the phenotype of the peritoneal cells from the receptor. On analyzing CD43 expression, no changes were observed when GFP cells were grafted into the peritoneal cavities of wild type mice; however, a subset of B1 cells lost part of the CD43 cell surface expression when grafted into galectin-3^{-/-} mice peritoneal cavities (Figure 7F). Therefore, expression levels of B220 and CD43 on B1 cell surface seem dependent on extracellular galectin-3 from the receptor microenvironments.

Discussion

Our results clearly demonstrated that the absence of galectin-3 modifies the homeostasis of B1 lymphocytes in the peritoneal cavity, by accelerating their differentiation into plasma cells. The accelerated program in cell differentiation is suggested by the up-regulation of B220 and down-modulation of CD43 surface expression associated with high level of Blimp-1 mRNA. Here, we suggest a new function of galectin-3 in the regulation of differentiation of B-1a lymphocytes into plasma cells.

In accordance with the literature, both B1 and B2 lymphocytes require Blimp-1 to differentiate into plasma cells¹². It has been demonstrated that in splenic B2 lymphocytes the high level of Blimp-1 is a *sine qua non* condition for rapid secretion of immunoglobulin^{35,36}. In the peritoneal cavity, B-1a lymphocytes respond more promptly than the B-1b to several stimuli, by secreting mainly the natural IgM antibodies. The difference in their capacity of response could be attributed to the differential expression of Blimp-1 in both sub-populations as observed in the present work.

The association of the absence of galectin-3 with a high level of Blimp-1 has been demonstrated also in splenic B2 lymphocytes activated by *T cruzi* infection²⁷. These authors has been suggested also that galectin-3 seems to favor the memory B2 cell fate²⁷. Here, we further demonstrated that the complete absence of galectin-3 in normal knockout mice modifies specifically the level of Blimp-1 on B-1a lymphocytes, which is associated with their high degree of differentiation into plasmablasts (CD138^{low}) and plasma cells inside the peritoneal cavity and in the mesentery, respectively. Recently, Tsai and colleagues showed that Blimp-1 induces transcription of galectin-1. Once secreted, galectin-1 favors the differentiation of antibody secreting plasma cells³⁷. Extracellular galectin-1 and -3 therefore play opposing roles in B cell differentiation. The underlying mechanisms for the antagonism of these lectins are not known. As they may interact with similar ligands on the cell surface, such as CD43 and CD45 isoforms (e.g, B220), antagonism could be either competitive or eventually dependent on the activation of different signaling pathways.

Under physiological conditions, B1 lymphocytes exit from the peritoneal cavity constitutively and their differentiation program includes the increase in cell surface B220 and CD43 molecules, which are critically involved in cell activation and migration, respectively³⁸. Although B1 lymphocytes do not differentiate directly into plasma cells in the peritoneal cavity, they need to migrate to intestinal lamina propria where they complete

their differentiation program and pass from IgM to IgA-secreting cells^{39,40}. In our model, the absence of galectin-3 in B1 lymphocytes results in a down modulation of CD43, probably in response to the up-modulation of the B220 molecules, thus altering their adhesion and de-adhesion properties. As the peritoneal B1 cells are being extensively activated and differentiated into plasmablasts and plasma cells, their exit to the conventional sites for secretion could be drastically modified as the cells become more adherent to the mesentery. In fact, as we observed, the large part of peritoneal cells in CD43^{-/-} mice are adhered in the mesentery, but without any evidence to plasma cell generation. These data indicate that only the absence of the CD43 is not sufficient to induce the B1 to differentiate into plasma cells, although B220 expression is up-regulated, but that the absence of galectin-3 is crucial for B-1a differentiation through the Blimp-1 pathway.

Interestingly, both surface proteins B220 and CD43 are heavily glycosylated in the extracellular domain suggesting they are possible ligands for galectin-3. B220 (CD45RA) is expressed during all steps of B-cell differentiation and activation, and considered an essential regulatory molecule in the BCR signaling pathway^{41,42}. In addition, CD43 is expressed concomitantly with B220 molecules in a very early stage of B cell development, and expressed *de novo* by peritoneal B1 cells, but not by mature B2 lymphocytes. In the B2 cell development, the up-regulation of B220 is accompanied by a down modulation of CD43, which is expressed only in pre-B lymphocytes. The high level of B220 in peripheral B2 cells could explain in part the absence of CD43 on their surface. In this context, the low level of B220 on the surface of B1 cells could be associated with the presence of CD43, mimicking the early steps of the bone marrow development⁴³. Accordingly, B220 cell surface expression was higher in B cells from CD43 knockout animals. In the absence of galectin-3, B220 molecules were also more highly expressed on the surface of B1 cells. Under this condition, B1 cell differentiation was altered. Reciprocal loss of CD43 on the cell surface leads to dysregulation of the adhesion and de-adhesion properties of these

cells^{44,45}. Our results add new information about these two molecules in the control of the B1 cell behavior within the peritoneal cavity and their interaction with the mesenteric structures.

As first demonstrated, the peritoneal mononuclear cells of galectin-3^{-/-} mice presented a delay in their capacity to differentiate into macrophages *in vitro*^{29,34}. The same results were obtained by our group recently, on culturing mononuclear cells from hepatic granulomatous inflammatory reactions, indicating that the absence of galectin-3 modifies monocyte activation *in vivo* and *in vitro*, besides altering the pattern of collagen deposition around the *Schistosoma mansoni* eggs²⁸. In addition to the *in vitro* data observed in this work, we can suggest that the signals controlling the peritoneal cell adherence and activation are dependent on the extracellular galectin-3. As we observed, the addition of soluble anti-galectin-3 antibodies in the culture system altered the pattern of cell adherence and activation by modifying the surface expression of CD43 and B220, similarly to that observed in galectin-3^{-/-} mice.

The hypothesis that extracellular galectin-3 could be responsible for regulation of peritoneal cell differentiation is reinforced by our experiments using GFP-peritoneal cell grafting. Like in *in vitro* assays, the phenotype of the WT/GFP⁺ cells was drastically modified upon transplantation into the peritoneal cavity of galectin-3^{-/-} mice, suggesting that the surface galectin-3 signaling is constitutive and necessary for controlling the adherence and activation of peritoneal cells, mainly the B1 lymphocytes.

The differentiation of B1 lymphocytes into plasma cells in the mesentery increases the demand of new cells to maintain the cellular equilibrium between B1 sub-populations *in loco*. Our results suggest that the numerical differences between B1a and B1b cells can be explained by the anatomical localization of their precursors. B1a cells are produced earlier in the ontogeny and are maintained by self-renewal in the peritoneal cavity. In contrast, B-1b cells are maintained by progenitors in the bone marrow, described recently

by Montecino-Rodriguez as being CD19⁺/B220^{low-neg} lymphocytes¹⁵. In galectin-3^{-/-} mice, we monitored the presence of these CD19⁺/B220^{low-neg} cells in the bone marrow, bloodstream and peritoneal cavity. Our results suggest that the intensive peritoneal plasma cell generation could stimulate the recruitment of new B1 lymphocytes. As B-1a self-renewing cells may differentiate rapidly and the adult bone marrow is capable of repopulating mainly B-1b cells, this subpopulation predominates among the peritoneal B1 cells.

In this study we did not analyze the B-1a splenic lymphocytes, although it has been demonstrated that the spleen is indispensable for generation and maintenance of these cells⁴⁶. On the other hand, B-1a cells resident in the spleen seem to respond promptly to systemic bacterial stimuli, such as LPS, and differentiate into plasma cells immediately, and that additional B-1a cells immigrate from the peritoneal cavity, thus replenishing continuously this reservoir and contributing to the first step of the innate immune response⁴⁷.

Here we showed that the homeostasis of the B1 pool from the peritoneal cavity is controlled locally by the mesenteric microenvironment and systemically by the bone marrow compartment, which replenishes the B-1b subpopulation. In the absence of galectin-3, mesenteric membranes are a more adhesive substratum for mononuclear cells, favoring differentiation of galectin-3 deficient B1a cells into plasma cells. Increased adhesiveness depends at least in part on loss of the galectin-3 ligand CD43 from the cell surface. Although necessary, increased adhesion is not sufficient for plasma cell differentiation, as observed in CD43^{-/-} mice. Therefore, galectin-3 interferes with two distinct processes involved with plasmacytogenesis of B1a, as it decreases CD43 exposure on the cell surface and it is a negative regulator of Blimp-1 expression on B1a cells. The mechanisms underlying Blimp-1 control by galectin-3 warrants further investigation.

Acknowledgments

We thank Dr. Alberto Nóbrega and Dr. Alessandra Granato for the sorting procedures and Dr. Lúcia Previato for providing the CD43^{-/-} mice, from the Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

Figures

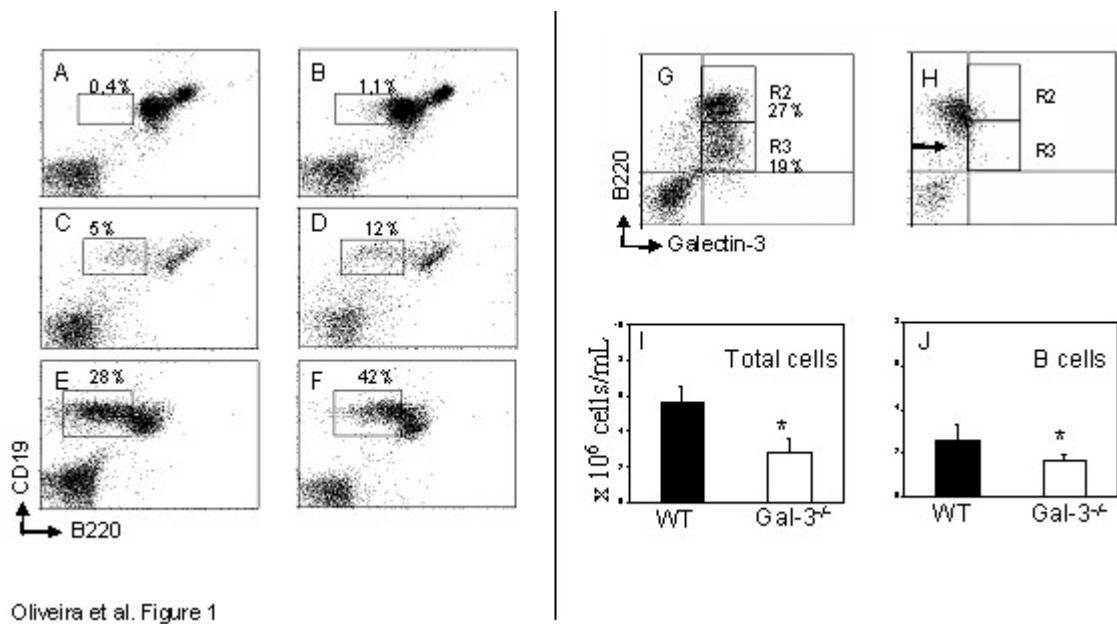
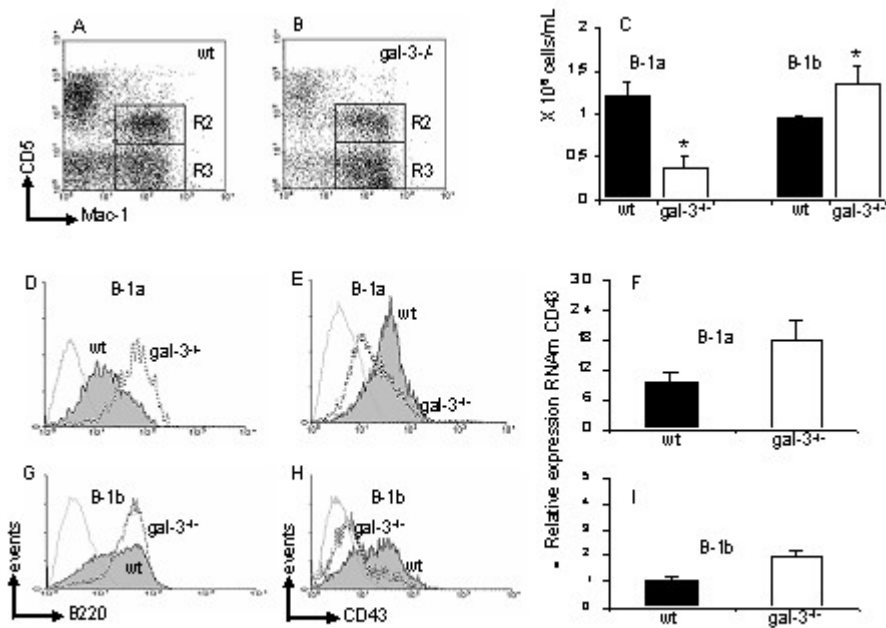
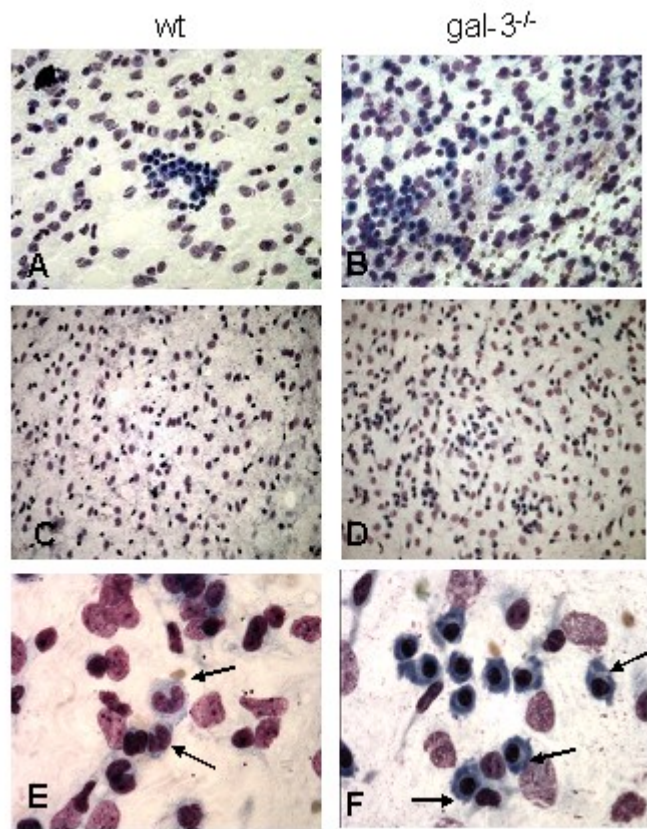


Figure 1: Phenotypic analysis and cellularity of B220^{neg/low} CD19⁺ lymphocytes in wild type and galectin-3^{-/-} mice. In bone marrow, this cell subpopulation increased c.a. 3-fold in galectin-3^{-/-} mice (B, gated cells) as compared to wild type mice (A, gated cells). B220^{neg/low}CD19⁺ cells were found in the circulation from both wild type and knockout mice (C and D, gated cells, respectively). In the peritoneal cavity, B220^{neg/low} CD19⁺ lymphocytes were reduced in galectin-3^{-/-} mice (F, gated), as compared to wild type mice (E, gated cells). (G) Phenotypic characterization of peritoneal B2 lymphocytes (B220^{high}/Gal-3⁺ cells, gated in R2 region) and peritoneal B1 lymphocytes (B220^{low}/Gal-3⁺ cells, gated in R3 region) in wild type mice. (H) Peritoneal B2 lymphocytes (B220^{high}/Gal-3⁻ cells) and B1 lymphocytes (B220^{low}/Gal-3⁻ cells) in galectin-3^{-/-} mice. The arrow shows a reduction of B220^{low} cells in peritoneal cavity in the absence of galectin-3. (I) Total cell number in peritoneal cavity of wild type and galectin-3^{-/-} mice was measured and it was observed a significant decrease in the cell number in galectin-3^{-/-} mice. (J) Differential account of peritoneal B cells (B220⁺CD19⁺) recovered from peritoneal cavity of both wild type and galectin-3^{-/-} mice. The solid bars represent wild-type mice and the open bars represent the galectin-3^{-/-} mice. Data are reported as means + SEM and are representative of five independent experiments, each carried out in three wild type and galectin-3^{-/-} mice. Statistical analysis: Tukey's multiple comparison test (*, *P*<0.05). WT: wild type mice. Gal-3^{-/-}: galectin-3^{-/-} mice.



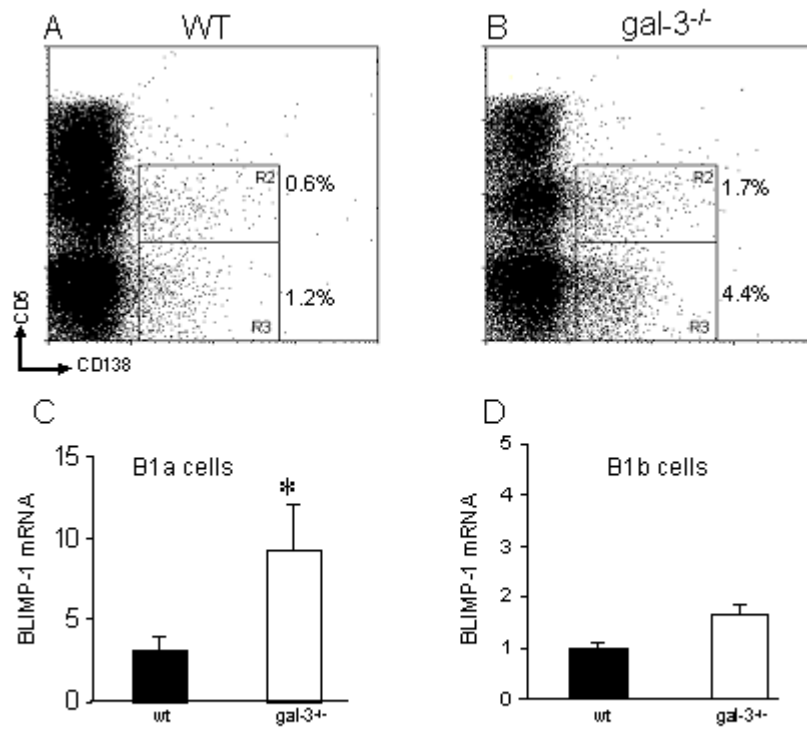
Oliveira et al. Figure 2

Figure 2: Cellularity, molecular and phenotypic analyses of peritoneal B1a and B-1b lymphocytes in wild type and galectin-3^{-/-} mice. (A) B1a cells were selected in R2 region and defined as Mac-1⁺, CD5^{+/low}, B220^{+/low} and CD43⁺. B1b cells were selected in R3 region and defined as Mac-1⁺, CD5^{neg}, B220^{+/low} and CD43⁺ in wild type mice. (B) The same subpopulations were selected in galectin-3^{-/-} mice. (C) The total cell number of B1a lymphocytes decreased in galectin-3^{-/-} mice (open bars) when compared to wild type mice (solid bars), while the B-1b subpopulation increased in galectin-3^{-/-} mice. Cell surface expression of B220 was higher in both B-1a (panel D) and B-1b (panel G) cells from galectin-3^{-/-} mice, as compared to cells derived from wild type (WT) mice. Conversely, CD43 exposure on the cell surface decreased in both B-1a (panel E) and B-1b (panel H) cells derived from galectin-3^{-/-} mice, as compared to WT mice. (F and I) Analysis by Real Time PCR of the relative expression of CD43 mRNA in B-1a and B-1b sorted cells, respectively, indicated that in the absence of galectin-3 (open bars), the expression levels of CD43 were higher in B-1a (panel F), but not B-1b (panel I) cells derived from galectin-3^{-/-} mice, as compared to cells derived from WT mice. Data are representative of five independent experiments, each carried out in three wild type and galectin-3^{-/-} mice in phenotypic analysis by flow cytometry and the molecular analysis data are representative of three independent experiments, each carried out in three WT and galectin-3^{-/-} mice. Statistical analysis: Tukey's multiple comparison test (*, $P < 0.05$). WT: wild type mice. Gal-3^{-/-}: galectin-3^{-/-} mice.



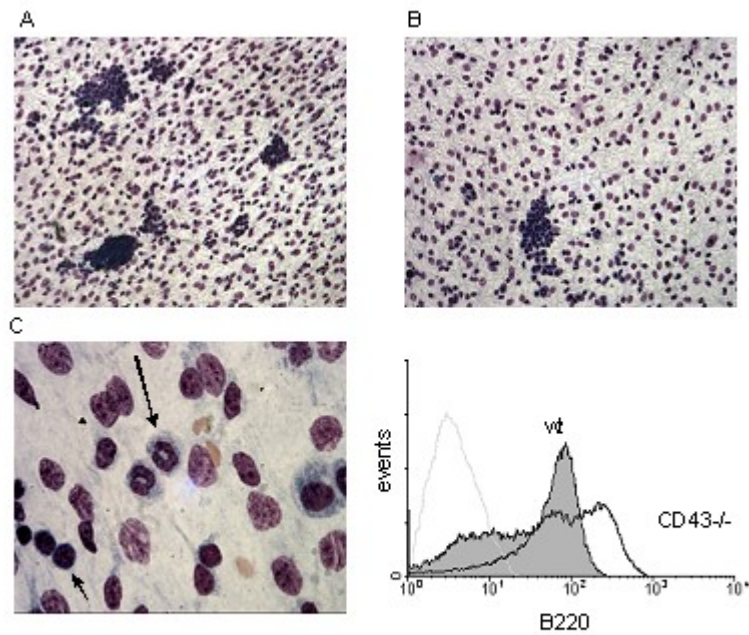
Oliveira et al. Figure 3

Figure 3: Photomicrographs of mesentery in wild type and galectin-3^{-/-}. The mesentery of wild type and galectin-3^{-/-} mice were analyzed by optical microscopy after staining by the May-Grunwald Giemsa's method. Morphological analysis of the mesentery before peritoneal wash procedure, in wild type mice (A) and in galectin-3^{-/-} mice (B). After peritoneal wash, the amount of adherent mononuclear cells present in the mesentery of galectin-3^{-/-} mice (D) was approximately 2-fold the amount of cells adhered in the mesentery of wild type mice (C). Plasma cells were abnormally detected (arrows) in the mesentery in the absence of galectin-3 (F), whereas in mesentery of wild type mice, the predominant subpopulations were morphologically characterized as myeloid or mononuclear cells (E). Magnification: A and B, 50x; C and D, 200x; E and F, 1000x. WT: wild type mice. Gal-3^{-/-}: galectin-3^{-/-} mice.



Oliveira et al. Figure 4

Figure 4: Phenotypic and molecular characterization of peritoneal B cells. Peritoneal plasmablast-like cells from wild type mice (A) and galectin-3^{-/-} mice (B) were characterized as B-1a (R2) and B-1b enriched cell populations (R3). (B) In galectin-3^{-/-} mice, both cell regions were enriched of CD138^{low} cells, indicating an increase in B1 differentiating cells into plasma cells CD138⁺ in these mice. (C and D) Relative expression of Blimp-1 mRNA in B1a and B1b sorted cells, respectively, of wild type (solid bars) and galectin-3^{-/-} mice (open bars). Data are representative of three independent experiments, each carried out in three wild type and galectin-3^{-/-} mice. Statistical analysis: Tukey's multiple comparison test (*, $p < 0.05$). WT: wild type mice. Gal-3^{-/-}: galectin-3^{-/-} mice.



Oliveira et al. Figure 5

Figure 5: Photomicrographs of the mesentery and phenotypic analysis of peritoneal cells from $CD43^{-/-}$ mice. (A) Before peritoneal wash, several cells stayed adhered in the mesentery of $CD43^{-/-}$ mice. (B and C) After the peritoneal wash procedure lesser cells were found adhered in the mesentery and the predominant cells were of myeloid (arrow) and mononuclear morphology (arrowhead). It is important to note that there were no plasma cells in the mesentery of these mice, as observed in galectin-3 $^{-/-}$ mice. (D) Phenotypic analyses of the floating cells recovered from the peritoneal cavity of either WT or $CD43^{-/-}$ mice allowed for the characterization of these cells as B220^{interm/low} in WT, and as B220^{interm/high} in $CD43^{-/-}$ mice. Data are representative of three independent experiments, each carried out in three wild type and $CD43^{-/-}$ mice. Magnification: A and B, 100x; C: 1000x. $CD43^{-/-}$: $CD43^{-/-}$ mice.

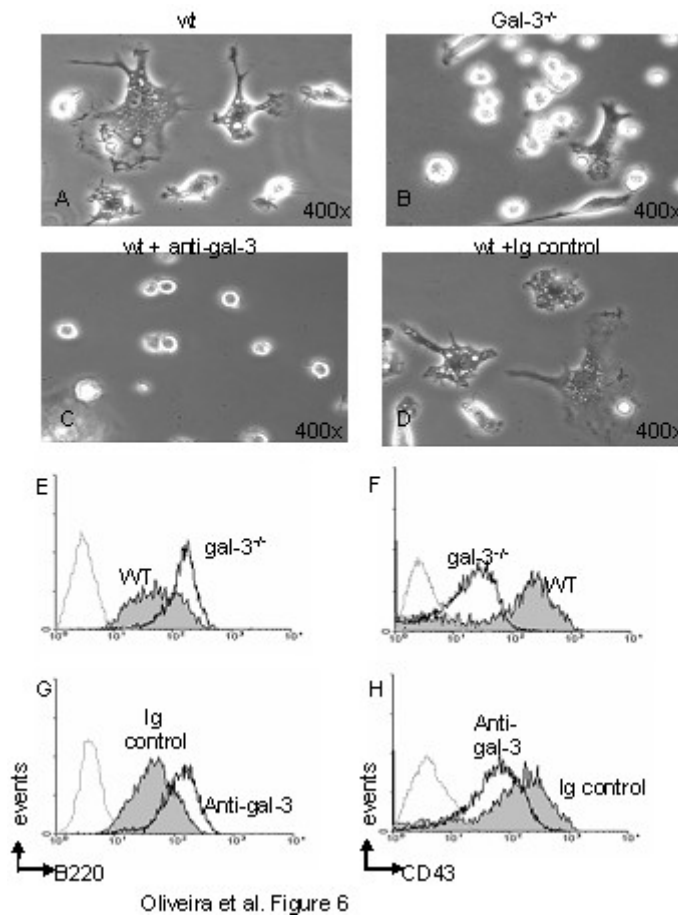
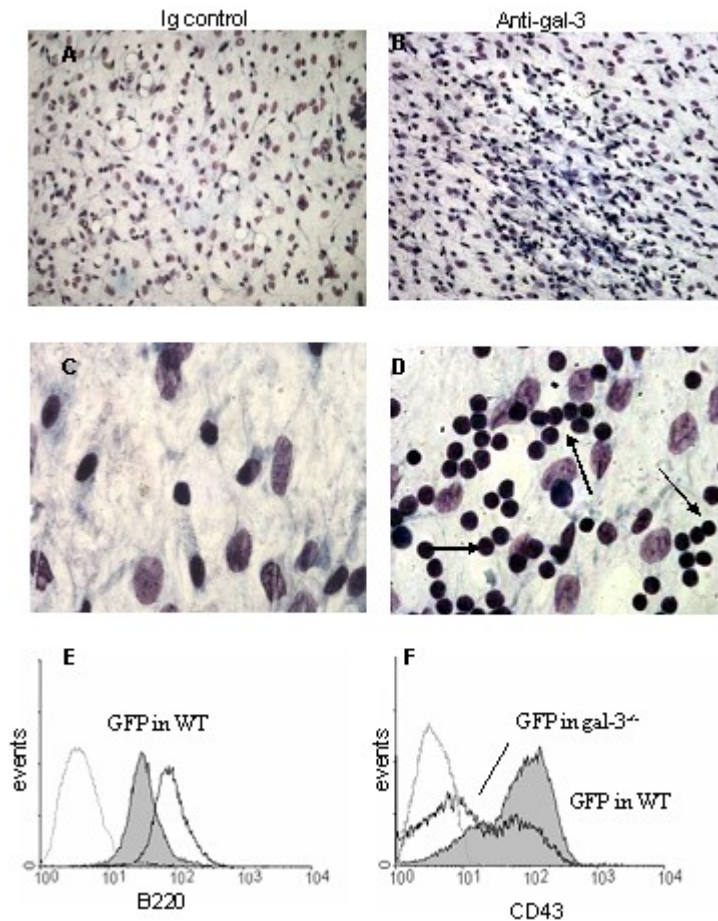


Figure 6: Extracellular galectin-3 modulates B220 and CD43 expression *in vitro*. Total peritoneal cells from wild type (A) and galectin-3^{-/-} mice (B) were maintained for 1 week in culture. The cells from wild type had a vacuolated and spread out morphology when compared with the cell population of galectin-3^{-/-} mice, that were round in shape. The morphology was altered when the cells of wild type mice were treated with the anti-galectin-3 antibody (C) and not altered when treated with IgG2a control antibody (D), indicating the role of the extracellular galectin-3 in cell activation. In parallel, the surface B220 expression was up-modulated in the wild type cells treated with the anti-galectin-3 antibody (G, empty histogram) when compared with the treatment with the anti-IgG2a-control (G, shaded histogram). (H) The down-modulation of CD43 in cells treated with anti-galectin-3 antibody (empty histogram) compared with the anti-IgG2a-control (shaded histogram). (E) The B220 (F) and CD43 expression in peritoneal cells of wild type mice (shaded histogram) and in cells of galectin-3^{-/-} (empty histogram) in normal conditions. Data are representative of three independent experiments, each carried out in three wild type and galectin-3^{-/-} mice. Magnification: A-D: 400x. WT: wild type mice. Gal-3^{-/-}: galectin-3^{-/-} mice.



Oliveira et al. Figure 7

Figure 7: Extracellular galectin-3 modulates B220 and CD43 expression *in vivo*. Morphological aspects of the mesentery 1 week after i.p. injection of an isotypic control anti-IgG2a antibody (A and C) and anti-galectin-3 antibody (B and D) in WT mice, after peritoneal wash. A significant x-fold increase of adherent mononuclear cells was observed in the mesentery of anti-galectin-3 injected mice (D, arrows). (E-F) Peritoneal cells derived from GFP⁺-transgenic mice were transplanted in the peritoneal cavity of either wild type or galectin-3^{-/-} mice, and after 1 week cells were recovered and analyzed. (E) Cell surface expression of B220 increased in GFP⁺ cells maintained in a microenvironment without galectin-3 (empty histogram) when compared to the same cells maintained in a galectin-3⁺ microenvironment (shaded histogram). (F) Conversely, cell surface CD43 was down-regulated in the absence of galectin-3 (empty histogram), as compared with the GFP⁺ cells maintained in the wild type peritoneal cavity (shaded histogram). Data are reported as means and are representative of three independent experiments, each carried out in three wild type and galectin-3^{-/-} mice. Magnification: A and B, 100x; C and D, 1000x.

References:

1. Solvason N, Lehuen A, Kearney JF. **An embryonic source of Ly1 but not conventional B cells.** *Int Immunol.* 1991 Jun;3(6):543-50.
2. Pinho M F, Hurtado SP, El-Cheikh MC, Rossi MI, Dutra HS, Borojevic R. **Myelopoiesis in the omentum of normal mice and during abdominal inflammatory processes.** *Cell Tissue Res.* 2002 Apr;308(1):87-96.
3. Pinho MF, Hurtado SP, El-Cheikh MC, Borojevic R. **Haemopoietic progenitors in the adult mouse omentum: permanent production of B lymphocytes and monocytes.** *Cell Tissue Res.* 2005 Jan;319(1):91-102.
4. LeBien TW and Tedder TF. **B lymphocytes: how they develop and function.** *Blood* 2008 Sep 1;112(5):1570-80.
5. Weinberg DF, Baldo-Correa E, Lenzi HL, Borojevic R. **Schistosoma mansoni: peritoneal plasmacytogenesis and polyploid transformation of mesenteric milky spots in infected mice.** *Exp Parasitol.* 1992 Jun;74(4):408-16
6. Martin F and Kearney JF. **B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets.** *Curr Opin Immunol.* 2001 Apr;13(2):195-201. Review.
7. Baumgarth M, Tung JW, Herzenberg LA. **Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion.** *Springer Semin Immunopathol.* 2005 Mar;26(4):347-62.
8. Kantor, AB and Herzenberg, LA. **Origin of murine B cell lineages.** *Annu. Rev. Immunol.* 1993. 11:501.
9. Tung JW, Herzenberg LA. **Unraveling B-1 progenitors.** *Curr Opin Immunol.* 2007 Apr;19(2):150-5. Review.
10. Alugupalli KR, Leong JM, Woodland RT, Muramatsu M, Honjo T, Gerstein RM. **B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity.** *Immunity.* 2004 Sep;21(3):379-90.
11. Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. **B-1a and B-1b cells exhibit distinct**

developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity*. 2005 Jul;23(1):7-18.

12. Savitsky D and Calame K. **B-1 B lymphocytes require Blimp-1 for immunoglobulin secretion.** *J Exp Med*. 2006 Oct 2;203(10):2305-14.

13. Hayakawa K, Hardy RR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. **Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells.** *J Exp Med*. 1985 Jun 1;161(6):1554-68.

14. Marcos MA, Gaspar ML, Malenchere E, Coutinho A. **Isolation of peritoneal precursors of B-1 cells in the adult mouse.** *Eur J Immunol*. 1994 May;24(5):1033-40.

15. Montecino-Rodriguez E, Leathers H, Dorshkind K. **Identification of a B-1 B cell-specified progenitor.** *Nat Immunol*. 2006 Mar;7(3):293-301.

16. Fairfax KA, Corcoran LM, Pridans C, Huntington ND, Kallies A. **Different kinetics of Blimp-1 induction in B cell subsets revealed by reporter gene.** *J Immunol*. 2007. 178:4104–11.

17. Ansel KM, Harris RB, Cyster JG. **CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity.** *Immunity*. 2002 Jan;16(1):67-76.

18. Berberich S, Dähne S, Schippers A, Peters T, Müller W, Kremmer E, Förster R, Pabst O. **Differential molecular and anatomical basis for B cell migration into the peritoneal cavity and omental milky spots.** *J Immunol*. 2008 Feb 15;180(4):2196-203.

19. Höpken UE, Achtman AH, Krüger K, Lipp M. **Distinct and overlapping roles of CXCR5 and CCR7 in B-1 cell homing and early immunity against bacterial pathogens.** *J Leukoc Biol*. 2004 Sep;76(3):709-18.

20. Balabanian K, Foussat A, Bouchet-Delbos L, Courderc J, Krzysiek R, Amara A, Baleux F, Portier A, Galanaud P, Emilie D. **Interleukin-10 modulates the sensitivity of peritoneal B lymphocytes to chemokines with opposite effects on stromal cell-derived factor-1 and B-lymphocyte chemoattractant.** *Blood*. 2002 Jan 15;99(2):427-36.

21. Kunisawa J, Kurashima Y, Gohda M, Higuchi M, Ishikawa I, Miura F, Ogahara I, Kiyono H. **Sphingosine 1-phosphate regulates peritoneal B-cell trafficking for subsequent intestinal IgA production.** *Blood*. 2007 May 1;109(9):3749-56.

22. Woodman RC, Johnston B, Hickey MJ, Teoh D, Reinhardt P, Poon BY, Kubes P. **The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice.** *J. Exp Med.* 1998 Dec 7;188(11):2181-6.
23. Lopez S, Seveau S, Lesavre P, Robinson MK, Halbwachs-Mecarelli L. **CD43 (sialophorin, leukosialin) shedding is an initial event during neutrophil migration, which could be closely related to the spreading of adherent cells.** *Cell Adhes Commun.* 1998 Mar;5(2):151-60
24. Zuprin P, Alkhamesi NA, Ridgway PF, Peck DH, Darzi AW. **Tumour-expressed CD43 (sialophorin) mediates tumourmesothelial cell adhesion.** *Biol Chem.* 2004 Aug;385(8):755-61
25. Yang RY, Rabinovich, Liu FT. **Galectins: structure, function and therapeutic potential.** *Expert Rev Mol Med.* 2008 Jun 13;10:e17. Review.
26. Hernandez JD, Nguyen JT, He J, Wnag W, Ardman B, Green JM, Fukuda M, Baum LG. **Galectin-1 binds different CD43 glycoforms to cluster CD43 and regulate T cell death.** *J Immunol.* 2006 Oct 15;177(8):5328-36.
27. Acosta-Rodriguez EV, Montes CL, Motran CC, Zuniga EI, Liu FT, Rabinovich GA and Gruppi A. **Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during Trypanosoma cruzi infection.** *J Immunol.* 2004 Jan 1;172(1):493-502.
28. Oliveira FL, Frazão P, Chammas R, Hsu DK, Liu FT, Borojevic R, Takiya CM, El-Cheikh MC. **Kinetics of mobilization and differentiation of lymphohematopoietic cells during experimental murine schistosomiasis in galectin-3 ^{-/-} mice.** *J Leukoc Biol.* 2007 Aug; 82(2): 300-10.
29. Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, Liu FT - **Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses** - *Am J Pathol.* 2000 Mar;156(3):1073-83.
30. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 1997 May 5;407(3):313-9

31. El-Cheikh, M. C., Borojevic, R. **Extramedullar proliferation of eosinophil granulocytes in chronic Schistosomiasis mansoni is mediated by a factor secreted by inflammatory macrophages.** *Infect. Immun.* 1990. 58, 816–821.
32. Cook AD, Braine EL, Hamilton JA. **The phenotype of inflammatory macrophages is stimulus dependent: implications for the nature of the inflammatory response.** *J Immunol.* 2003 Nov 1;171(9):4816-23.
33. Stillman BN, Hsu DK, Pang M, Brewer CF, Johnson P, Liu FT and Baum L. **Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death.** *J Immunol* 2006 Jan 15;176(2):778-89.
34. Colnot C, Ripoche MA, Milon G, Montagutelli X, Crocker PR, Poirier F. **Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice.** *Immunology* 1998. 94.: 290-296.
35. Angelin-Duclos, C., G. Cattoretti, K.-I. Lin, and K. Calame. **Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with blimp-1 expression in vivo.** *J. Immunol.* 2000. 165:5462–5471.
36. Lin KI, Angelin-Duclos C, Kuo TC, Calame K. **Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells.** *Mol Cell Biol* 2002. 22(13), 4771–4780.
37. Tsai CM, Chiu YK, Hsu TL, Lin IY, Hsieh SL, Lin KI. **Galectin-1 promotes immunoglobulin production during plasma cell differentiation.** *J Immunol.* 2008 Oct 1;181(7):4570-9.
38. Foussat A , Balabanian K, Amara A, Bouchet-Delbos L, Durand-Gasselini I, Baleux F, Couderc J, Galanaud P. Emilie D. **Production of stromal cell-derived factor 1 by mesothelial cells and effects of this chemokine on peritoneal B lymphocytes.** *Eur J Immunol* 2001. 31(2):350-9.
39. Kroese, F. G., and N. A. Bos. **Peritoneal B-1 cells switch in vivo to IgA and these IgA antibodies can bind to bacteria of the normal intestinal microflora.** *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1999. 246:343.

40. Beagley KW, Murray AM, McGhee JR, Eldridge JH. **Peritoneal cavity CD5 (Bla) B cells: cytokine induced IgA secretion and homing to intestinal lamina propria in SCID mice.** *Immunol Cell Biol* 1995. 73 (5):425-32.
41. Coffman RL, Weissman IL. **A monoclonal antibody that recognizes B cells and B cell precursors in mice.** *J Exp Med* 1981. 153(2):269-79.
42. Huntington ND, Tarlinton DM. **CD45: direct and indirect government of immune regulation.** *Immunol Lett.* 2004 Jul 15;94(3):167-74. Review
43. Hardy RR and Hayakawa K. **B cell development pathways.** *Annu Rev Immunol.* 2001;19:595-621. Review.
44. McEvoy LM, Sun H, Frelinger JG, Butcher EC. **Anti-CD43 inhibition of T cell homing.** *J Exp Med.* 1997. 185(8):1493-8.
45. Matsumoto M, Shigeta A, Miyasaka M, Hirata T. **CD43 plays both antiadhesive and proadhesive roles in neutrophil rolling in a context-dependent manner.** *J Immunol.* 2008 Sep 1;181(5):3628-35.
46. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. **Predominant autoantibody production by early human B cell precursors.** *Science* 2003; 301:1374-7.
47. Yang Y, Tung JW, Ghosn EE, Herzenberg LA, Herzenberg LA. **Division and differentiation of natural antibody-producing cells in mouse spleen.** *Proc Natl Acad Sci.* 2007 Mar 13; 104 (11) : 4542-6.

4 – DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento embrionário, a migração e as interações celulares são responsáveis pelo estabelecimento estrutural dos tecidos e dos órgãos. Após o estabelecimento dos planos corporais, os movimentos celulares tornam-se escassos. Contudo, uma notável exceção nos adultos é o sistema imunológico e o hematopoético (revisado por *Germain e cols., 2008*). Por exemplo, os linfócitos B-2 desenvolvem-se na medula óssea a partir de progenitores específicos e migram para os tecidos linfóides secundários, onde são estimulados por antígenos ou sinais inflamatórios a se diferenciarem (revisado por *LeBien e Tedder, 2008*). Já os linfócitos B-1, residem na cavidade peritoneal e migram preferencialmente para a mucosa intestinal, onde se diferenciam em plasmócitos secretores de anticorpos, principalmente IgA (*Fagarasan, 2000*).

Existem mecanismos moleculares que direcionam o movimento de migração destas células, definindo os locais de acesso ou o exato momento que tais células devem sair de um determinado tecido. Estes fenômenos altamente intrigantes são pouco esclarecidos, embora seja descrito um vasto repertório de moléculas envolvidas nesta dinâmica de circulação e recirculação das células do sistema imunológico, incluindo citocinas, quimiocinas, selectinas e moléculas de adesão, como as galectinas (*Hsu e Liu, 2004*).

Os camundongos Galectina-3^{-/-} são viáveis e podem sobreviver sob condições fisiológicas, sendo permissivos a análises de eventos biológicos complexos, como uma infecção experimental de curta ou longa duração, uma vez que suas células são produzidas, distribuídas e se diferenciam de modo similar aos processos biológicos que ocorrem no sistema hematopoético dos animais selvagens (*Colnot e cols., 1998; Hsu e cols., 2000*). Neste trabalho, nosso grupo sugere uma nova função para galectina-3, na regulação da diferenciação dos linfócitos B-2, B-1a e B-1b em plasmócitos.

Desde a última década, alguns pesquisadores têm demonstrado que a galectina-3 direciona mecanismos de resposta imune inata, regulando processos associados com a ativação, migração e diferenciação de células mielóides, como neutrófilos, monócitos e macrófagos (*Liu e cols., 1995; Sano e cols., 2000; Oliveira e cols., 2007 – parte 1*). Nas células linfóides, a galectina-3 atua como um crítico regulador negativo da diferenciação e sobrevivência dos linfócitos B (*Acosta-Rodriguez e cols., 2004 e Oliveira e cols., 2007 – parte 1*).

Na parte 1 de nossos resultados, realizamos estudos com animais galectina-3^{-/-} e

foi demonstrado que a ausência desta lectina interferiu na resposta inflamatória granulomatosa causada pelo *Schistosoma mansoni*, onde foram evidenciadas alterações estruturais nos granulomas hepáticos, um retardo na ativação e diferenciação de monócitos em macrófagos, e ainda, uma acelerada plasmocitogênese, na medula óssea, no baço, nos linfonodos mesentéricos e na cavidade peritoneal (resultados, parte 1 e parte 4). A expressão de galectina-3 nos linfócitos B é significativamente induzida após estimulação com IL-4 e CD40, moléculas sinalizadoras que direcionam as células B para o estágio de “células de memória”, ou seja, não secretoras. A estratégia de inibição da galectina-3 por maquinaria genética *antisense* promoveu uma diferenciação mais intensa de linfócitos B-2 ativados em plasmócitos, durante a infecção causada pelo *Trypanossoma cruzi* (Acosta-Rodriguez e cols., 2004).

Em nossos estudos, os animais foram desafiados com a infecção esquistossomótica, cujo hospedeiro responde aos ovos embolizados e à presença dos vermes, ambos no sistema venoso mesentérico, gerando uma resposta inflamatória controlada inicialmente pela atividade de macrófagos. Utilizando animais galectina-3^{-/-} infectados pelo *S.mansoni*, foi observado que a infecção experimental murina amplificou os fenômenos detectados nos animais galectina-3^{-/-} não-infectados: uma plasmocitogênese marcante nos compartimentos medulares e extramedulares, incluindo baço e linfonodos mesentéricos (resultados, parte 1). Outros tipos celulares também apresentaram uma alteração na dinâmica da mobilização e diferenciação, durante o curso da esquistossomose. Análises histológicas nos granulomas intra-hepáticos dos animais galectina-3^{-/-}, revelaram uma diminuição no diâmetro do granuloma periovular e uma modificação na deposição de colágeno, contendo fibras menos concêntricas e mais difusas pelo parênquima hepático (comparar com Henderson e cols., 2006).

Galectina-3 extracelular tem alta afinidade por glicoconjugados sintetizados por diferentes parasitas, como o *S.mansoni*. Antígenos do parasita contendo estruturas derivadas de N-acetilgalactosamina 1-4 N-acetilglicosamina, tais como GalNAc1-4 (Fuc1-3)G1cNAc(Lac-DiNAc) interagem diretamente com galectina-3, elicitando uma resposta imune humoral bem caracterizada em resposta à presença do parasita (Nyame e cols., 2003). Por esse fato, galectina-3 pode ser denominada de receptor PAMP (*pathogen-associated molecular pattern receptor*). É importante ressaltar que bilhas metálicas cobertas com estruturas LacDiNAc apenas, foram suficientes para estimular a mobilização de células inflamatórias e induzir uma reação granulomatosa no parênquima hepático, ao redor das bilhas contendo tais glicoconjugados (Van de Vijver e cols., 2006).

O modelo de infecção aguda e crônica, causada pelo *S.mansoni*, é caracterizada pela presença permanente dos antígenos provenientes dos vermes secretados no sistema venoso mesentérico, sendo constitutivamente drenados para os linfonodos mesentéricos. A presença dos antígenos derivados dos ovos gera um estímulo permanente garantindo o envolvimento do baço na regulação das respostas inflamatórias. É uma infecção experimental de longa duração, cuja fase aguda se estabelece cerca de 50 dias e fase crônica 90 dias após a infecção com as cercárias (El-Cheikh e Borojevic, 1990).

Os granulomas formados em resposta aos ovos do *S.mansoni* acumulam alta quantidade de galectina-3 (resultados, parte 1). A expressão desta lectina é aumentada quando monócitos diferenciam em macrófagos (Liu e cols., 1995) e é reduzida quando essas células se diferenciam em células dendríticas (Dietz e cols., 2000), sugerindo que a galectina-3 tem um papel distinto na diferenciação de monócitos em macrófagos. Embora galectina-3 seja considerada uma molécula importante para as funções macrofágicas, a sua ausência não influenciou na formação dos granulomas periovulares, uma resposta mediada por células, dentre os quais macrófago tem função inicial central.

Esses resultados indicam que a galectina-3 pode controlar a intensidade de uma resposta imunológica programada. Trabalhos recentes têm demonstrado que a galectina-3 age no núcleo inibindo a transcrição de IL-5 (Cortegano e cols., 2000), a principal citocina envolvida na proliferação e diferenciação de eosinófilos, bem como uma interleucina importante na diferenciação de linfócitos B (Broid e cols., 2001). As concentrações elevadas de IL-5, local e sistêmica, poderiam explicar a eosinofilia nos animais galectina-3^{-/-} (resultados, parte 1). As células estromais do tecido hepático fibrogranulomatoso produzem várias citocinas, tais como *stem cell factor*, GM-CSF e IL-5, garantindo inclusive a formação de um sítio mielopoético extramedular (Brito e Borojevic, 1997; Lipscombe e cols., 1998). Assim, gera-se a hipótese que células inflamatórias estromais hepáticas dos animais galectina-3^{-/-} poderiam estar produzindo grandes quantidades de IL-5 e isto potencializaria o microambiente hepático a suportar o crescimento de eosinófilos (estudo em andamento, tese de doutorado de Lígia Paiva – Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas – Universidade Federal do Rio de Janeiro).

Os resultados do artigo 1 sugerem que a galectina-3 esteja envolvida na diferenciação mielóide e linfóide, agindo de forma antagonista na questão da diferenciação de linfócitos B e macrófagos (resultados, parte 1). As análises fenotípicas por citometria de fluxo demonstraram que os linfócitos B220^{high} maduros apresentaram

galectina-3 na membrana, em todos os tecidos analisados: medula óssea, baço e linfonodos mesentéricos, independente de infecção. Entretanto, não é possível afirmar que esta lectina está sendo sintetizada pelas próprias células B ou se a galectina-3 está sendo secretada por um outro tipo celular e, subseqüentemente, agregada a algum receptor nas células B. Células estromais da medula óssea expressam galectina-3 e nos animais galectina-3^{-/-} há um acúmulo significativo de progenitores de células B c-Kit⁺ B220^{low} CD19^{low} IL-7R⁺ IgM⁻ (Ricon, 2008). A estratégia de inibição molecular, utilizando RNA antisenso (knock-down) para galectina-3 nas células B ativadas por *T. cruzi* (Acosta-Rodrigues e cols., 2004), sugere que as próprias células B seriam produtoras de galectina-3, pelo menos durante um processo infeccioso. O quanto galectina-3 extracelular interfere com as funções das células B, ainda é desconhecido.

Nos animais galectina-3^{-/-} foi observado intensa plasmocitogênese, concomitante com redução de células B220⁺CD5⁻ (linfócitos B-2) nos tecidos linfóides secundários, como baço e linfonodos mesentéricos. O aumento no número de plasmócitos funcionais foi confirmado pelos altos níveis de IgG total e IgE no sangue dos animais galectina-3^{-/-}. Bickle e Helmsby demonstraram que os níveis de IgG1 específica para os antígenos derivados dos ovos de *S. mansoni* estavam maiores na fase aguda, no sangue dos animais galectina-3^{-/-} (Bickle e Helmsby, 2007). Esse achado corrobora com o aumento de IgE detectado nesses animais, na fase crônica, uma vez que a produção de IgG1 antecede a mudança de classe para IgE, nas células B diferenciadas (Siebenkotten e cols., 1992). A alta concentração de IgE no soro dos animais galectina-3^{-/-} infectados sugere uma resposta imune predominante T_H2, ao contrário da resposta T_H1 exacerbada nos modelos de asma (Zuberi e cols., 2004) e infecção causada pelo *Toxoplasma gondii* (Bernardes e cols., 2006).

Na ausência de galectina-3, o número de células CD138⁺ B220^{low} foi significativamente aumentado no baço, embora nos linfonodos mesentéricos o aumento tenha sido apenas sugestivo (resultados, parte 1). Os resultados de Acosta-Rodrigues e colaboradores (2006), usando um modelo de infecção aguda pelo *T. cruzi*, como um processo de ativação policlonal de células B, evidenciaram o envolvimento da galectina-3 como um sinal crítico de sobrevivência, diferenciação e comprometimento dos linfócitos B com o fenótipo de células de memória, modulando a expressão do fator repressor de transcrição Blimp-1, essencial para a diferenciação dos plasmócitos (Angelin-Duclos e cols., 2000).

Há uma relação diretamente proporcional entre o aumento de galectina-3 e o desenvolvimento de células B malignas, como resultado de um efeito anti-apoptótico

exercido por esta lectina nos linfócitos B (*Katrina e cols., 2004*). É interessante ressaltar que a ausência de galectina-3 induziu uma aceleração na diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos, provavelmente sobrepondo controle de apoptose periférica. Sabe-se que ocorre uma seleção dos linfócitos B já nos tecidos linfóides secundários, especificamente nos centros germinativos (*Peled e cols., 2008*). Esses órgãos possuem microambientes enriquecidos de células dendríticas foliculares derivadas de células mesenquimais que apresentam antígenos na superfície na forma de complexos imunes diretamente aos linfócitos B (centroblastos ou centrócitos). Nesse estágio da diferenciação, as células B estão particularmente prontas para hipermutação somática dos genes codificantes das partes variáveis das moléculas de imunoglobulinas (mutação por afinidade ao antígeno). Os rearranjos gênicos também podem acontecer nos segmentos gênicos codificantes da parte constante das cadeias pesadas das imunoglobulinas, resultando na perda da capacidade de sintetizar IgM e IgD, além de realizar mudança de classe para IgG, IgA e IgE. Esses dois eventos precedem a diferenciação terminal das células B em plasmócitos secretores de anticorpos (revisado por *Peled e cols., 2008*). O grande número de plasmócitos, associado à mudança no perfil das imunoglobulinas produzidas na ausência de galectina-3, poderia ser resultado de falhas específicas em pontos de checagem nas etapas terminais da diferenciação dos linfócitos B (resultados, partes 1 e 3).

Nesse cenário, com aparente auto-reatividade, clones celulares poderiam não ser induzidos à apoptose e a produção de auto-anticorpos ocasionaria doenças auto-imunes. De fato, a galectina-3 está envolvida na diferenciação mielóide e linfóide B. O entendimento da interferência da galectina-3 nos processos de ativação de monócitos/macrófagos e nas vias que regulam a plasmocitogênese, tem implicações diretas no controle da interface entre a imunidade inata e adaptativa. Além disso, como a galectina-3 participa diretamente da diferenciação dos linfócitos B-2, foi proposto investigar se esta lectina também estaria interferindo na diferenciação dos linfócitos B-1 peritoneais, tendo em vista a ausência de trabalhos associando este evento, até o momento.

Ao contrário da distribuição celular organizada dos órgãos linfóides primários e secundários, as células mielóides e linfóides presentes na cavidade peritoneal ficam dispersas no fluido peritoneal e aderidas às estruturas mesentéricas. Uma delas é o omento, caracterizado por uma dupla camada de células mesoteliais, conectando o estômago e o baço em camundongos. Uma outra estrutura é a membrana mesentérica, localizada na região serosa das alças intestinais, caracterizada por conter uma dupla

camada de células mesoteliais, que expressam inúmeras moléculas de adesão e de sinalização, como ICAM-1 e citocinas, sugerindo um papel na regulação da homeostase da cavidade peritoneal (Solvason e cols., 1991; Pinho e cols., 2002; Pinho e cols., 2005). Tanto a membrana mesentérica quanto o omento são estruturas associadas às cavidades celomáticas e originam células consideradas como parte do sistema imune primitivo ou da imunidade inata, como os macrófagos e os linfócitos B1. Esses dados são de extrema importância e nos permitem propor questões relacionadas à proliferação, adesão e diferenciação das células presentes nesse microambiente peritoneal.

Embora os mecanismos que controlam a homeostasia das células presentes nas cavidades celomáticas não estejam definidos, alguns autores descrevem um fluxo emigratório das células peritoneais por drenagem linfática, através dos linfonodos paratímicos e ducto torácico, alcançando a corrente sanguínea posteriormente (Ansel e cols., 2002). Devido ao intenso fluxo de linfócitos B-1 rumo a lâmina própria intestinal, onde se diferenciam em células secretoras de IgA (Kroese cols., 1989), alguns pesquisadores têm procurado esclarecer os mecanismos que regulam o processo de diferenciação destas células, desde a ativação no interior da cavidade peritoneal, até a plasmocitogênese na mucosa intestinal. Evidências recentes sugerem que o tráfego de células B-1 entre o omento e o fluido peritoneal, e o egresso das células para a lâmina própria, são biologicamente regulados por quimiocinas e citocinas como CXCL13, CXCL12 e IL-10 (Ansel e cols., 2002; Hopken e cols., 2004; Balabanian e cols., 2002).

Dentre as moléculas envolvidas no controle da ativação, migração e diferenciação das células B peritoneais, duas são bem glicosiladas e provavelmente são importantes sítios de ligação da galectina-3: CD43 e B220 (CD45RA). O domínio extracelular de CD43 é composto por glicanos intensamente sialilados, conferindo uma função anti-adesiva e uma alta capacidade de ligação a lectinas, como galectina-1 e galectina-3 (Sttilman e cols., 2006). A molécula CD43 é expressa simultaneamente com B220 nos estágios iniciais da linfopoese B, na medula óssea. Nos tecidos periféricos, tais moléculas são co-expressas somente em linfócitos B-1 peritoneais. Na cavidade peritoneal, CD43 participa dos mecanismos sinalizadores que regulam a migração celular, uma vez que a diminuição da expressão desta sialoglicoproteína inibe o egresso dos leucócitos peritoneais (Woodman e cols., 1998).

A análise da celularidade no lavado peritoneal obtido dos camundongos galectina-3^{-/-} revelou uma redução de linfócitos B-1a e um aumento de linfócitos B-1b, comparados com os animais WT (resultados, parte 4). Esse desequilíbrio aparente entre

as duas subpopulações de linfócitos B-1 foi acompanhado por alterações na expressão de B220 e CD43. Em ambas subpopulações, B-1a e B-1b, foi observado que a expressão de B220 de superfície estava aumentada, enquanto a expressão de CD43 de membrana estava diminuída na ausência de galectina-3. A avaliação do ciclo celular, pela incorporação de iodeto de propídio, demonstrou que não houve diferenças na quantidade de células peritoneais WT e galectina-3^{-/-} viáveis. Esse ensaio foi realizado devido à questão da diminuição no número de linfócitos B-1a, pois a primeira hipótese estava relacionada a uma maior taxa de apoptose, devido ao papel anti-apoptótico da galectina-3 em algumas linhagens celulares, principalmente tumores (*Mazurek e cols., 2000; Takenaka e cols., 2004*).

A proteína B220 é uma tirosina-fosfatase, cuja função na diferenciação dos linfócitos B não está bem estabelecida. Esta proteína é uma isoforma da molécula CD45 (CD45RA), detectada na superfície das células B em processo de desenvolvimento (*Coffman e Weissman, 1981*). Esta molécula regula crescimento celular, ciclo mitótico, transformação oncogênica e diferenciação em plasmócitos (revisado por *Ishikawa e cols., 2003*). Seu domínio extracelular é glicosilado e, portanto, um potencial ligante de galectina-3. Suas funções dependem de contatos diretos com os componentes do complexo antígeno-receptor, induzindo a diferenciação das células B em plasmócitos (*Huntington e Tarlinton, 2004*).

CD43 é uma glicoproteína de superfície celular expressa pela maioria das células progenitoras hematopoéticas, inclusive pelas células da linhagem B dependentes de contato com estroma. Na cavidade peritoneal, as células B-1 também expressam essa molécula. Seu domínio extracelular é glicosilado e fortemente sialilado, conferindo uma função anti-adesiva. É comprovadamente um ligante de galectina-3 (*Sttilman e cols., 2006*). Seu papel na diferenciação e migração dos linfócitos B-1 é pouco estudado. A administração de anticorpos anti-CD43 inibe a migração de monócitos e linfócitos T em órgãos linfóides secundários, em uma via dependente de selectina-E (*McEvoy e cols., 1997; Matsumoto e cols., 2005*).

Em condições fisiológicas os linfócitos B-1 saem da cavidade peritoneal constitutivamente e concluem o programa de diferenciação. Esse processo inclui o aumento da expressão de B220 de superfície e a modulação da expressão de CD43, pois são moléculas criticamente envolvidas na ativação e migração celular, respectivamente (*Foussat e cols., 2001*). De acordo com a literatura científica, os linfócitos B-1 não completam seu desenvolvimento em plasmócitos dentro da cavidade peritoneal, pois precisam migrar para a mucosa intestinal, onde finalmente diferenciam-

se em células secretoras de IgA, deixando de expressar IgM (Kroese e cols., 1989; Beagley e cols., 1995). Nossos dados, descritos na parte 4, demonstraram que a ausência de galectina-3 nos linfócitos B-1 resultou em uma redução da expressão de CD43, provavelmente em resposta ao aumento na expressão de B220 de superfície, alterando as propriedades adesivas e anti-adesivas destas células. Nos animais galectina-3^{-/-} os linfócitos B-1 podem estar sendo extensivamente ativados e assim, diferenciando em plasmablastos e plasmócitos na própria cavidade peritoneal, devido à intensa aderência ao mesentério provocada pela ausência de CD43.

Para esclarecer se a redução na expressão de CD43 era o ponto crítico na plasmacitogênese observada na cavidade peritoneal dos animais galectina-3^{-/-}. Foram realizadas análises morfológicas no mesentério dos animais CD43^{-/-}. De fato, foi observado um maior número de células mielóides aderidas, ordenadas em agregados (*clusters*) celulares, comparando com as membranas dos animais WT. Entretanto, não houve qualquer evidência de plasmócitos. Esses dados indicam que somente a ausência de CD43 não é suficiente para induzir a diferenciação dos linfócitos B-1 em plasmócitos, embora a expressão de B220 de superfície esteja aumentada. Além disso, nossos dados sugerem que a galectina-3 esteja diretamente envolvida no controle da diferenciação terminal das células B-1 peritoneais, bem como nas células B-2 presentes nos órgãos linfóides secundários, como baço e linfonodos mesentéricos.

Análises nos animais CD43^{-/-} e galectina-3^{-/-} sugeriram que a redução na expressão de CD43 de superfície e/ou a sua ausência interferem com as propriedades adesivas das células peritoneais na membrana mesentérica. Contudo, a ausência de galectina-3, e não de CD43, foi essencial para a plasmocitogênese na cavidade peritoneal. Não está claro se esses contatos dos linfócitos peritoneais com as células mesoteliais presentes nesta membrana representam um mecanismo de manutenção das células renováveis, um sítio de chegada das células periféricas para a cavidade peritoneal ou uma área de saída das células para sítios efetores.

No desenvolvimento dos linfócitos B-2, o aumento da expressão de B220 de superfície é acompanhado de uma redução na expressão de CD43 de superfície. Neste sentido, os altos níveis de B220 na membrana dos linfócitos B-2 periféricos poderiam explicar, pelo menos em parte, a ausência de CD43 na superfície. Em contrapartida, os baixos níveis de B220 na membrana dos linfócitos B-1 poderiam estar associados com a presença de CD43 na sua superfície, mimetizando os primeiros estágios da linfopoese B (Hardy e Hayakawa, 2001). Interessantemente, nos animais CD43^{-/-} essa correlação também pode ser feita, uma vez que as células B-1 nestes animais apresentam maior

expressão de B220 na membrana, comparados aos animais WT.

Quando a proteína B220 é expressa com maior intensidade, como observado nas células obtidas dos animais galectina-3^{-/-}, o programa que regula a diferenciação dos linfócitos B-1 parece modificado. Isso poderia interferir diretamente na expressão de CD43 e, conseqüentemente, na desregulação das propriedades adesivas e anti-adesivas nos linfócitos B-1, uma vez que o domínio extracelular desta molécula possui alto grau de sialilação, conferindo funções anti-adesivas à molécula (*Matsumoto e cols., 2005*). O papel de CD43 no controle da migração celular na cavidade peritoneal é controverso, nos diversos modelos biológicos estudados, incluindo migração de células inflamatórias e metástases tumorais (*Carlow e Ziltener, 2006*). Os resultados obtidos neste trabalho revelam uma nova informação sobre estas duas moléculas, B220 e CD43, no controle do comportamento das células B-1 dentro da cavidade peritoneal, bem como nas interações com o mesentério.

As análises moleculares das subpopulações de células B peritoneais isoladas identificaram uma provável via de sinalização que regula a diferenciação dos linfócitos B-1a e B-1b. Na ausência de galectina-3, observamos maior expressão relativa do RNAm para Blimp-1 nas células B-1a, enquanto as células B-1b apresentaram maior expressão relativa de RNAm para IL-5, comparados com as células B-1a e B-1b WT, respectivamente. É plausível propor que a modulação da expressão de B220 e CD43 poderia preceder a expressão de Blimp-1 nos linfócitos B-1a. Sem galectina-3, uma molécula regulatória da plasmocitogênese, este programa de diferenciação estaria acelerado e os linfócitos B-1a mais diferenciados em plasmablastos no fluido peritoneal (B220^{high} CD5^{low} CD138^{int}) e em plasmócitos aderidos no mesentério. Os linfócitos B-1b também estariam se diferenciando em plasmablastos (B220^{high} CD5^{neg} CD138^{int}) mais rápido que as células WT. Entretanto, como apresentaram baixa expressão de Blimp-1, podemos supor que estas células chegam à fase de plasmablastos não-secretoras (resultados, parte 4). O fato das células B-1b apresentarem alta expressão de IL-5 sugere que esta subpopulação possa utilizar um programa de diferenciação diferente das células B-1a ou estas células controlam constitutivamente a diferenciação dos linfócitos B-1a IL-5R⁺.

Para completar as etapas da plasmocitogênese, Blimp-1 reprime o programa de proliferação das células em diferenciação, controlando a expressão de *c-myc* (*Lin e cols., 1997*), bem como de outros genes: E2F-1, *PCN*, e *DNA pol* requeridos para as células entrarem em ciclo celular, replicarem de DNA e realizarem mitose. Além disso, Blimp-1 reprime a expressão de MHC classe II (*Piskurich e cols., 2000*), Bcl-6, Pax-5 e

AID (regulador da hipermutação somática e mudança de classe de imunoglobulinas) nos centros germinativos (Gonda e cols., 2003), além de várias proteínas envolvidas em cascatas de sinalização posteriores à ativação do BCR e CXCR5. Esses fenômenos esclarecem, em parte, como um único fator repressor transcricional pode ser suficiente para direcionar a diferenciação de plasmócitos.

A expressão forçada de Blimp-1 em linfócitos B esplênicos foi suficiente para induzir a plasmocitogênese (Piskurich e cols., 2000). Os linfócitos B1, expressam baixos níveis de RNAm e da proteína Blimp-1 (Fairfax e cols., 2007) e rapidamente aumentam a expressão deste fator transcricional após estímulo com LPS (Savitsky e Calame, 2006). Plasmablastos Blimp-1^{int} possuem maior capacidade de replicação que os plasmócitos Blimp-1^{high}. Contudo, não há evidências científicas que garantam uma via de diferenciação a partir das células Blimp-1^{int} para Blimp-1^{high} durante a geração de plasmócitos. Os resultados apresentados na parte 4 sugerem uma outra hipótese: a diferença entre a intensidade de expressão de Blimp-1 poderia ser dependente do subtipo celular. Como os linfócitos B-1a prontamente secretam anticorpos naturais quando estimulados e os linfócitos B-1b são posteriores nessa questão, essa diferença fisiológica poderia estar relacionada à variação nos níveis expressão de Blimp-1. Neste caso, as células B-1a teriam o fenótipo Blimp-1^{int-high} e as células B-1b seriam Blimp-1^{low-int}. É interessante ressaltar que linfócitos B-1 purificados de camundongos Blimp-1^{-/-} apresentaram defeitos na secreção de IgM, sendo 14 vezes menor que a secreção das células B-1 dos animais WT (Savitsky e Calame, 2006).

Blimp-1 pode agir como um supressor tumoral, e a perda da sua atividade está associada a algumas formas de linfoma. Em contrapartida, células derivadas de plasmacitomas (em camundongos) e mieloma múltiplo (em humanos) expressam altas concentrações de Blimp-1 (revisado por Martins e Calame, 2008). A atividade de Blimp-1 depende de sua associação com histonas (deacetilases e metiltransferases) e seu mecanismo de repressão parece depender de modificações covalentes destas histonas (de-acetilação e metilação) que criam uma estrutura repressiva ou inativa na cromatina (Gyory e cols., 2004). Portanto, a utilização de um modelo de estudo envolvendo o controle da expressão de genes envolvidos com a progressão tumoral pode ter alta relevância científica. As vias moleculares envolvidas na cascata de sinalização envolvendo galectina-3 e Blimp-1 parecem importantes para futuros esclarecimentos e terapias associadas a linfomas e mielomas, duas malignidades biologicamente opostas, porém, com prováveis vias de sinalização em comum.

Os plasmablastos que passam a expressar Blimp-1 reduzem a expressão de CD43

(Soro e cols., 1999). De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, está sendo proposto que a redução de CD43 durante a diferenciação das células B peritoneais possa ser um passo importante para as células de-aderirem da membrana mesentérica ou de qualquer estrutura em que elas estejam aderidas. Os dados do PCR em tempo real sugerem que as células B-1a e B-1b, estimuladas a diferenciarem na cavidade peritoneal aumentam a mensagem transcricional de CD43 para tentar sair da cavidade peritoneal, provavelmente. Assim, tais células poderiam iniciar seus processos de migração para sítios onde completariam sua diferenciação em plasmócitos, aumentando a expressão de Blimp-1 e CD138. O fato das células perderem ou não expressarem CD43 de superfície não significa que elas se diferenciam em plasmócitos, tendo em vista que as análises realizadas nos animais CD43^{-/-} demonstraram células aderidas à membrana mesentérica, sem se diferenciarem em plasmócitos, como nos animais galectina-3^{-/-}. As células B-1 necessitam migrar da cavidade peritoneal para outros sítios efetores, onde secretam imunoglobulinas (Kroese e cols., 1989; Beagley e cols., 1995; Kawahara e cols., 2003; e Itakura e cols., 2005). No entanto, há algumas evidências controversas, descrevendo a própria cavidade peritoneal como área de secreção de anticorpos pelas células B-1 (Tumang e cols., 2005).

Os resultados *in vitro* demonstrados na parte 4 indicam que a ausência de galectina-3 modifica a morfologia das células peritoneais. Células WT mantidas em cultivo por uma semana apresentaram características que validaram o sistema experimental, pois corroboraram com dados da literatura científica: intenso espalhamento de macrófagos repletos de vacúolos citoplasmáticos, indicando que estas células se ativam ao entrarem em contato com um substrato sólido. No mesmo período de cultivo, as células mononucleares peritoneais, obtidas dos animais galectina-3^{-/-}, apresentaram retardo na capacidade de se diferenciarem em macrófagos e morfologia mais arredonda, semelhante a monócitos (Colnot e cols., 1998 e Hsu e cols., 2000). Resultados similares, descritos na parte 1, foram obtidos com células mononucleares cultivadas a partir da dissociação dos granulomas hepáticos, indicando que a ausência de galectina-3 modifica o programa de ativação de monócitos/macrófagos *in vivo* e *in vitro*, sendo atribuído como causa da alteração do perfil de deposição de colágeno ao redor dos ovos de *Schistosoma mansoni*.

A interpretação dos ensaios de cultivo de células peritoneais, descritos na parte 4, permitiu-nos propor uma regulação desses estágios de ativação, dependentes de galectina-3 exógena. A adição de anti-galectina-3 solúvel inibiu a ativação de macrófagos WT e após essa inibição, as células WT apresentaram um comportamento

similar às células peritoneais obtidas dos animais galectina-3^{-/-}, sugerindo um importante papel da galectina-3 extracelular na regulação da ativação e diferenciação de macrófagos.

Nesses ensaios *in vitro* foi possível monitorar também a expressão de B220 e CD43 na superfície dos linfócitos peritoneais. A adição de anticorpos solúveis anti-galectina-3, mantidos no sistema de cultivo de células WT durante 7 dias, alterou o padrão fenotípico de ativação e aderência, devido ao aumento na expressão de B220 e redução de CD43 na superfície destas células, tornando-as similares às células dos animais galectin-3^{-/-}. Anticorpos solúveis anti-galectina-3 diretamente injetados na cavidade peritoneal dos animais WT ou adicionados nos sistema de cultivo de células WT, alteraram os padrões morfológicos e fenotípicos das células peritoneais WT, tornando-as similares às células galectina-3^{-/-}. Além disso, os anticorpos favoreceram a adesão das células peritoneais à membrana mesentérica após a realização do lavado peritoneal, semelhantes às células galectina-3^{-/-}. Com este tratamento, o fenótipo das células WT também se alterou, modulando a expressão de B220 e CD43 como os animais galectina-3^{-/-}. Juntos, estes resultados indicam que os sinais que controlam a ativação e adesão das células peritoneais são dependentes de galectina-3 extracelular.

A hipótese da galectina-3 extracelular ser um dos fatores responsáveis pela regulação da diferenciação celular na cavidade peritoneal foi reforçada pelos experimentos com animais que expressam constitutivamente GFP (*green fluorescence protein*), apresentados na parte 4 dos nossos resultados. Células peritoneais GFP⁺ foram injetadas na cavidade peritoneal dos animais WT e galectina-3^{-/-}. O fenótipo das células dos animais WT é similar ao das células GFP⁺. Como nos ensaios *in vitro*, o fenótipo das células WT/GFP⁺ foi dramaticamente modificado após o uma semana de transplante na cavidade peritoneal dos animais galectin-3^{-/-}. As células GFP⁺ transplantadas aumentaram a expressão de B220 e reduziram a de CD43 de superfície, tornando-as semelhantes às células galectina-3^{-/-}. Estes resultados sugerem que a sinalização via galectina-3 de superfície é constitutiva e necessária para o controle de aderência e ativação das células peritoneais, principalmente para os linfócitos B-1.

Na medula óssea, as células estromais secretoras de CXCL12 interagem diretamente com os progenitores pré-pró B CD138^{low} e com os plasmócitos CD138^{int-high} (Tokoyoda e cols., 2004; Nagasawa, 2007). Quando co-cultivados, os plasmócitos geram efeitos pró-apoptóticos nos progenitores de células B. Este fato indica um possível

controle da homeostasia nas populações de células B, mantido pelo equilíbrio entre o número de plasmócitos em um determinado microambiente e a demanda de novos linfócitos B. de acordo com os dados descritos na parte 4, sugerimos que a plasmocitogênese acelerada na cavidade peritoneal dos animais deficientes para galectina-3 deve estimular o recrutamento de novas células, com a finalidade de manter o equilíbrio celular local.

O desequilíbrio numérico entre as células B-1a e B-1b pode ser explicado pela localização anatômica e funcional dos seus precursores. Os linfócitos B-1a são produzidos precocemente na ontogenia e são mantidos por auto-renovação na própria cavidade peritoneal. Os linfócitos B-1b são mantidos por progenitores localizados na medula óssea, descritos recentemente com o fenótipo $CD19^+/B220^{low-neg}$ (Montecino-Rodriguez e cols., 2006). Camundongos galectina-3^{-/-} foram monitorados, em relação à dinâmica destas células $CD19^+/B220^{low-neg}$ na medula óssea, sangue periférico e cavidade peritoneal. De acordo com os resultados obtidos, descritos na parte 4, foi sugerido que a plasmocitogênese exacerbada na cavidade peritoneal poderia estimular o recrutamento de novos linfócitos B-1. Como as células B-1, supostamente, estariam se diferenciando mais rápido nos animais galectina-3^{-/-}, seria plausível que o *pool* de células auto-renováveis estivesse se esgotando ou já estaria esgotado. Além disso, a medula óssea de um animal adulto é capaz de repopular preferencialmente as células B-1b. Essa combinação de fatores seria responsável pela predominância de linfócitos B-1b na cavidade dos animais deficientes para galectina-3.

As células B1 esplênicas não foram avaliadas, embora tenha sido classicamente demonstrado que o baço é indispensável para a geração e manutenção destas células B-1 peritoneais (Wardemann e cols., 2003). Por outro lado, as células B-1 residentes no baço respondem prontamente a estímulos bacterianos, como LPS, e diferenciam em plasmócitos (Yang e cols., 2007). O baço dos animais galectina-3^{-/-} é aparentemente desorganizado, contendo centros germinativos com tamanhos variados e uma intensa marcação para CD138 na zona marginal (dado não mostrado, resultados preliminares).

A homeostasia das células B peritoneais pode ser controlada localmente pelo microambiente mesentérico e sistemicamente pela medula óssea, através dos progenitores presentes neste compartimento. Na ausência de galectina-3, as membranas mesentéricas formaram um substrato intensamente aderente às células mononucleares, favorecendo a diferenciação dos linfócitos B-1a em plasmócitos. A adesividade aumentada depende, em parte, da perda de CD43, um importante ligante de galectina-3 na superfície das células. Embora necessária, a aderência aumentada ao

mesentérico não é suficiente para a diferenciação dos linfócitos B-1 em plasmócitos, como observado nos animais CD43^{-/-}. Além disso, galectina-3 interfere com dois processos biológicos distintos envolvidos na plasmocitogênese: na regulação da expressão ou da exposição de CD43 na superfície celular e na modulação da expressão de Blimp-1 nos linfócitos B-1a. Os mecanismos moleculares que associam a atividade da galectina-3 e a expressão de Blimp-1 precisam ser melhores investigados.

Nossos resultados mostram claramente que a ausência de galectina-3 altera significativamente o programa de diferenciação das células B-2 em plasmócitos. Entretanto, seu papel nos linfócitos B1 jamais havia sido estudado. Assim, as análises foram estendidas para as subpopulações de linfócitos B peritoneais e descobrimos que a galectina-3 controla a diferenciação das células B-1 em plasmócitos, bem como acontece na diferenciação dos linfócitos B-2.

Conjuntamente, nossos resultados sugerem que a falta de galectina-3 modifica a homeostasia dos linfócitos B-2 na medula óssea, no baço e nos linfonodos mesentéricos, além dos linfócitos B-1 peritoneais, acelerando a plasmocitogênese nestes tecidos linfóides. As alterações no programa de diferenciação em plasmócitos nas células B-1 foram detectadas pelo aumento da expressão de B220 e diminuição de CD43 na superfície destas células, em paralelo com aumento nos níveis de RNAm de Blimp-1 e na expressão de CD138 de superfície.

Em conclusão, demonstramos uma nova função de galectina-3, na regulação da diferenciação das subpopulações de linfócitos B em plasmócitos na medula óssea, em tecidos linfóides secundários, como baço e linfonodos mesentéricos, e em tecidos linfóides associados ao celoma, como a cavidade peritoneal.

5 – REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES:

Albrandt K, Orida NK, Liu FT. **An IgE-binding protein with a distinctive repetitive sequence and homology with an IgG receptor** - *Proc Natl Acad Sci*. 1987;84(19):6859.

Allen CD and Cyster JG. **Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function**. *Semin Immunol*. 2008;20(1):14.

Angelin-Duclos, C., G. Cattoretti, D. Chang, K. Lin, Y. Lin, J. Yu, and K. Calame. **The role of B lymphocyte-induced maturation protein-1 (BLIMP-1) in terminal differentiation of B cells and other cell lineages**. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol*. 1999. 64:61.

Applequist SE, Wallin RP, Ljunggren HG. **Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines**. *Int Immunol*. 2002; 14(9):1065.

Bao Q, Hughes RC - **Galectin-3 and polarized growth within collagen gels of wild-type and ricin-resistant MDCK renal epithelial cells**. *Glycobiology*. 1999; 9(5):489.

Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. **Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins**. *J Biol Chem*. 1994; 269(33):20807. Review.

Bernardes, E. S., Silva, N. M., Ruas, L. P., Mineo, J. R., Loyola, A. M., Hsu, D. K., Liu, F. T., Chammas, R., Roque-Barreira, M. C. (2006) **Toxoplasma gondii infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity**. *Am. J. Pathol*. 168, 1910.

Bickle Q and Helmbly H. **Lack of galectin-3 involvement in murine intestinal nematode and schistosome infection**. *Parasite Immunol*. 2007; 29(2):93.

Borojevic R, Nicola MH, Santos da Silva C - **Moldulation of macrophages and polymorphonuclear granulocyte inflammatory reaction in experimental murine schistosomiasis mansoni**. *Cell and Molecular Biology*. 1984. 30: 37.

Borojevic, R. **Experimental murine schistosomiasis mansoni: establishment of the chronic phase of the disease**. *Mem.Int.Osw.Cruz*. 1992; 87:171.

Boros DL, Amsden AF, Hood AT. **Modulation or granulomatous hypersensitivity. IV. Immunoglobulin and antibody production by vigorous and immunomodulated liver granulomas of Schistosoma mansoni-infected mice**. *J Immunology* .1982; 128: 1050.

Boros, D.L. - **The role of cytokines in the formation of the Schistosome egg granuloma.** *Immunobiol.* 1994; 191; 441.

Borregaard N, Theilgaard-Mönch K, Sorensen OE, Cowland JB. **Regulation of human neutrophil granule protein expression.** *Curr Opin Hematol.* 2001; 8(1):23. Review.

Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A. **The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells.** *Blood.* 2003; 102(3):956.

Breuilh L, Vanhoutte F, Fontaine J, van Stijn CM, Tillie-Leblond I, Capron M, Faveeuw C, Jouault T, van Die I, Gosset P, Trottein F. **Galectin-3 modulates immune and inflammatory responses during helminthic infection: impact of galectin-3 deficiency on the functions of dendritic cells.** *Infect Immun.* 2007; 75(11):5148.

Brito, J. M., Borojevic, R. **Liver granulomas in schistosomiasis: mast cell-dependent induction of SCF expression in hepatic stellate cells is mediated by TNF- α .** *J. Leukoc. Biol.* 1997. 62, 389.

Broide, D., Sriramarao, P. **Eosinophil trafficking to sites of allergic inflammation.** *Immunol. Rev.* 2001. 179: 163.

Carlow DA, Ziltener HJ. **CD43 deficiency has no impact in competitive in vivo assays of neutrophil or activated T cell recruitment efficiency.** *J Immunol.* 2006; 177(9):6450

Castronovo V, Van Den Brule FA, Jackers P, Clause N, Liu FT, Gillet C, Sobel ME - **Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer -** *J Pathol.* 1996; 179(1):43.

Cheng X, Morin PE, Harms AC, Bruce JE, Ben-David Y and Smith RD. **Mass spectrometric characterization of sequence-specific complexes of DNA and transcription factor PU.1 DNA binding domain.** *Anal Biochem.* 1996; 239(1):35.

Cherayil BJ, Weiner SJ, Pillai S. **The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE.** *J Exp Med.* 1989; 170(6):1959.

Choufani G, Nagy N, Saussez S, Marchant H, Bisschop P, Burchert M, Danguy A, Louryan S, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R, Hassid S. **The levels of expression of galectin-1, galectin-3, and the Thomsen-Friedenreich antigen and their binding sites decrease as clinical aggressiveness increases in head and neck cancers.** *Cancer.* 1999;8 6(11):2353

Cooper DN and Barondes SH - **God must love galectins; he made so many of them –** *Glycobiology;* 1999; 9(10):979

Cortegano I, del Pozo V, Cardaba B, de Andres B, Gallardo S, del Amo A, Arrieta I, Jurado A, Palomino P, Liu FT, Lahoz C. **Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types.** *J Immunology* 1998. 161: 385.

Cortegano, I., Pozo, V., Cardaba, B., Arrieta, I., Gallardo, S., Rojo, M., Aceituno, E., Takai, T., Verbeek, S., Palomino, P., Liu, F. T., Lahoz, C. **Interaction between galectin-3 and FcRII induces down-regulation of IL-5 gene: implication of the promoter sequence IL-5REIII.** *Glycobiology* 2000. 10: 237.

Craig SS, Krishnaswamy P, Irani AM, Kepley CL, Liu FT, Schwartz LB - **Immunoelectron microscopic localization of galectin-3, na IgE binding protein, in human mast cells and basophils** - *Anat Rec* 1995. 242:211.

Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ - **Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing** - *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1995; 92(4):1213.

Danguy A, Camby I, Kiss R - **Galectins and cancer** - *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1572(2-3):285.

DeKoter RP, Walsh JC, and Singh H. **PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors.** *EMBO J*. 1998. 17(15): 4456–4468.

DeKoter RP, Lee HJ, Singh H. **PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors.** *Immunity*. 2002; 16(2):297.

Dietz AB, Bulur PA, Knutson GJ, Matasic R, Vuk-Pavlovic S. **Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization.** *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 275(3):731.

Dietz, A. B., Bulur, P. A., Knutson, G. J., Matasic, R., Vuk-Pavlovic, S. **Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization.** *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2000. 275, 731.

Dolber PC and Spach MS - **Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart** - *J Histochem Cytochem*. 1993. 41:465.

Domingo M, Mais RF, Weiskopf R, Fink S. **Detection of schistosome ova by dark field fluorescence microscopy.** *Gastroenterology*. 1968; 54(5):884.

Dunne DW and Cooke A. **A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease.** *Nat Rev Immunol*. 2005; 5:420.

Dutra, H.S; Rossi, M.I.D; Azevedo, S.P; El-Cheikh, M.C and Borjevic, R – **Haematopoietic capacity of colony forming cells mobilized in hepatic inflammatory reactions as compared to that of normal bone marrow cells.** *Res.Immunol.* 1997; 148: 437

El-Cheikh, M.C.; Dutra, H.S and Borojevic, R. **Eosinophil granulocyte proliferation and differentiation in schistosomal granulomas are controlled by two cytokines.** *Lab.Invest.* 1991; 64:93

Fagarasan S, Watanabe N, Honjo T. **Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells.** *Immunol Rev.* 2000;176:205. Review

Farmer JL, Burghardt RC, Jousan FD, Hansen PJ, Bazer FW, Spencer TE. **Galectin 15 (LGALS15) functions in trophectoderm migration and attachment.** *FASEB J.* 2008; 22(2):548.

Fairfax KA, Corcoran LM, Pridans C, Huntington ND, Kallies A. **Different kinetics of Blimp-1 induction in B cell subsets revealed by reporter gene.** *J. Immunol.* 2007; 178:4104

Feuk-Lagerstedt E, Jordan ET, Leffler H, Dahlgren C, Karlsson A. **Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils.** *J Immunol.* 1999;163(10):5592.

Friedman, AD. **C/EBPalpha induces PU.1 and interacts with AP-1 and NF-kappaB to regulate myeloid development.** *Blood Cells Mol Dis.* 2007. 39(3):340.

Fugmann SD, Lee AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG. **The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition.** *Annu Rev Immunol.* 2000; 18:495. Review.

Fukumori, T., Y. Takenaka, T. Yoshii, H. R. Kim, V. Hogan, H. Inohara, S. Kagawa, and A. Raz. **CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis.** *Cancer Res.* 2003. 63: 8302.

Ghia P, ten Boekel E, Sanz E, de la Hera A, Rolink A, Melchers F - **Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci -** *J Exp Med.* 1996; 184(6):2217.

Gonda H, Sugai M, Nambu Y, Katakai T, Agata Y, Mori KJ, Yokota Y, Shimizu A. **The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression,** *J Exp Med.* 2003; 198(9), 1427.

Helming L, Gordon S. **The molecular basis of macrophage fusion.** *Immunobiology.* 2007; 212(9-10):785.

Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson

KJ, Sethi T. **Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis.** *Proc Natl Acad Sci.* 2006; 103(13):5060-5

Hernandez JD, Nguyen JT, He J, Wang W, Ardman B, Green JM, Fukuda M, Baum LG. **Galectin-1 binds different CD43 glycoforms to cluster CD43 and regulate T cell death.** *J Immunol.* 2006; 177(8):5328

Hsu DK, Liu FT. **Regulation of cellular homeostasis by galectins.** *Glycoconj J.* 2004; 19(7-9):507.
Review

Germain RN, Bajénoff M, Castellino F, Chieppa M, Egen JG, Huang AY, Ishii M, Koo LY, Qi H. **Making friends in out-of-the-way places: how cells of the immune system get together and how they conduct their business as revealed by intravital imaging.** *Immunol Rev.* 2008; 221:163.

Gyory I, Wu J, Fejer G, Seto E, Wright KL. **PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing,** *Nat Immunol* 2004. 5(3), 299.

Hardy RR, Li YS, Allman D, Asano M, Gui M, Hayakawa. **B-cell commitment, development and selection.** *Immunol Rev.* 2000; 175:23.

Hardy, R. R., and K. Hayakawa. **CD5 B cells, a fetal B cell lineage.** *Adv.Immunol.* 1994. 55:297.

Hayakawa K and Hardy RR. **Development and function of B-1 cells.** *Curr Opin Immunol.* 2000; 12(3):346. Review.

Hirabayashi J, Kasai K. **The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution.** *Glycobiology.* 1993; 3(4):297. Review.

Ho MK and Springer TA - **Mac-2, a novel 32,000M, mouse macrophage subpopulation-specific defined by monoclonal antibodies.** *J Immunol.* 1982; 28:1221

Holers VM - **The complement system as a therapeutic target in autoimmunity.** *Clin Immunol.* 2003; 107(3):140

Höpken UE, Achtman AH, Krüger K, Lipp M. **Distinct and overlapping roles of CXCR5 and CCR7 in B-1 cell homing and early immunity against bacterial pathogens.** *J Leukoc Biol.* 2004; 76(3):709.

Hoyer KK, Pang M, Gui D, Shintaku IP, Kuwabara I, Liu FT, Said JW, Baum LG, Teitell MA. An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *Am J Pathol.* 2004; 164(3):893.

Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, Liu FT - **Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses** - *Am J Pathol.* 2000; 156(3):1073.

Huntington ND, Tarlinton DM. **CD45: direct and indirect government of immune regulation.** *Immunol Lett.* 2004; 94(3):167. Review

Itakura A, Szczepanik M, Campos RA, Paliwal V, Majewska M, Matsuda H, Takatsu K, Askenase PW, **An hour after immunization peritoneal B-1 cells are activated to migrate to lymphoid organs where within 1 day they produce IgM antibodies that initiate elicitation of contact sensitivity,** *J Immunol.* 2005. 175(11), 7170.

Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, Liu S, Li FJ, Otsuyama K, Zheng X, Kawano MM. **Interleukin-6, CD45 and the src-kinases in myeloma cell proliferation.** *Leuk Lymphoma.* 2003; 44(9):1477. Review.

Jia S, Mee RP, Morford G, Agrwal N, Voss PG, Moutsatsos IK, Wang JL. **Carbohydrate-binding protein 35: molecular cloning and expression of a recombinant polypeptide with lectin activity in Escherichia coli.** *Gene.* 1987; 60(2-3):197.

Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ - **Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes -** *J Leukoc Biol.* 2001; 69(4):555

Kantor, A. B. **The development and repertoire of B-1 cells (CD5 B cells).** *Immunol. Today.* 1991. 12:389.

Karlsson A, Follin P, Leffler H, Dahlgren C - **Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils -** *Blood.* 1998; 91(9):3430.

Katrina, K. H., Mabel, P., Dorina, G. I., Peter, S., Ichiro, K., Fu-Tong, L., Jonathan, W. S., Linda, G. B., Michael, A. T. **An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas.** *Am. J. Pathol.* 2004. 164, 893.

Kawahara T, Ohdan O, Zhao G, Yang YG, Sykes M. **Peritoneal cavity B cells are precursors of splenic IgM natural antibody-producing cells.** *J Immunol.* 2003. 171(10), 5406.

Kikuchi Y, Hirano M, Seto M, Takatsu K. **Identification and characterization of a molecule, BAM11, that associates with the pleckstrin homology domain of mouse Btk.** *Int Immunol.* 2000; 12(10):1397.

Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL. **Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application.** *Annu Rev Immunol.* 2003. 21:759.

Krugluger W, Frigeri LG, Lucas T, Schmer M, Forster O, Liu FT, Boltz-Nitulescu G - **Galectin-3 inhibits granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-driven rat bone marrow cell proliferation and GM-CSF-induced gene transcription -** *Immunobiology.* 1997; 197(1):97.

Kuwabara I, Kuwabara Y, Yang RY, Schuler M, Green DR, Zuraw BL, Hsu DK, Liu FT - **Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release** - *J Biol Chem.* 2002; 277(5):3487

kuwabara I, Liu FT. **Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin.** *J Immunol.* 1996; 156(10):3939.

Le Marer N – **Galectin-3 expression in differentiating human myeloid cells** - *Cell Biol Int.* 2000. 24(4):245

Lenzi HL, Oliveira DN, Pelajo-Machado M, Borojevic R, Lenzi JA. **Coelom-associated lymphomyeloid tissue (milky spots): site of lymphoid and myelomonocytic cell generation.** *Braz J Med Biol Res.* 1996;29(1):19.

Lin Y, Wong K, Calame K. **Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation.** *Science* 1997. 276 (5312): 596–599.

Lin, H., Grosschedl, R. **Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF.** *Nature* 1995. **376**, 263–267

Lipscombe, R. J., Nakhoul, A. M., Sanderson, C. J., Coombe, D. R. **Interleukin-5 binds to heparin/heparan sulfate. A model for an interaction with extracellular matrix.** *J. Leukoc. Biol.* 1998. **63**, 342–350.

Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR Jr - **Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages.** *Am J Pathol* 1995. 147:1016.

Liu FT, Patterson RJ, Wang JL - **Intracellular functions of galectins** - *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1572(2-3):263

Lopes, LM; Pereira, AM; Gerken, SE and Vaz, N – **Polyclonal activation of B lymphocytes during experimental infection with *S.mansoni*.** *Parasitology.* 1990; 100:83

Lopez S, Seveau S, Lesavre P, Robinson MK, Halbwachs-Mercarelli L. **CD43 (sialophorin, leukosialin) shedding is an initial event during neutrophil migration, which could be closely related to the spreading of adherent cells.** *Cell Adhes Commun.* 1998; 5(2):151

Lotan R, Belloni PN, Tressler RJ, Lotan D, Xu XC, Nicolson GL - **Expression of galectins on microvessel endothelial cells and their involvement in tumour cell adhesion** - *Glycoconj J.* 1994; 11(5):462.

Martins G, Calame K. **Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes.** *Annu Rev Immunol.* 2008; 26:133. Review.

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

Mazurek N, Conklin J, Byrd JC, Raz A, Bresalier RS. **Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands.** *J Biol Chem.* 2000; 275(46):36311

Messika EJ, Lu PS, Sung YS, Yao T, Chi JT, Chien YH, Davis MM. **Differential effect of B lymphocyte-induced maturation protein (Blimp-1) expression on cell fate during B cell development.** *J Exp Med.* 1998. 188(3), 515.

Miranda MB e Johnson DE. **Signal transduction pathways that contribute to myeloid differentiation.** *Leukemia.* 2007; 21(7):1363. Review.

Mita, S., A. Tominaga, Y. Hitoshi, K. Sakamoto, T. Honjo, M. Akagi, Y. Kikuchi, N. Yamaguchi, and K. Takatsu. **Characterization of high affinity receptors for interleukin 5 on interleukin 5-dependent cell lines.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989. 86:2311.

Moutsatsos IK, Wade M, Schindler M, Wang JL. **Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts.** *Proc Natl Acad Sci.* 1987 ;84(18):6452.

Nagasawa. **The chemokine CXCL12 and regulation of HSC and B lymphocyte development in the bone marrow niche.** *Adv Exp Med Biol.* 2007;602:69

Nibbering PH, Leijh PC, van Furth R - **Quantitative immunocytochemical characterization of mononuclear phagocytes. I. Monoblasts, promonocytes, monocytes, and peritoneal and alveolar macrophages** - *Cell Immunol.* 1987; 105(2):374

Nyame, A. K., Lewis, F. A., Doughty, B. L., Correa-Oliveira, R., Cummings, R. D. **Immunity to schistosomiasis: glycans are potential antigenic targets for immune intervention.** *Exp. Parasitol.* 2003; 104, 1.

Ofek I, Crouch E, Keisari Y. **The role of C-type lectins in the innate immunity against pulmonary pathogens.** *Adv Exp Med Biol.*; 2000; 479:27. Review

Ogata, N., T. Kouro, A. Yamada, M. Koike, N. Hanai, T. Ishikawa, and K. Takatsu. **JAK2 and JAK1 constitutively associate with an interleukin-5 (IL-5) receptor and c subunit, respectively, and are activated upon IL-5 stimulation.** *Blood.* 1998; 91:2264.

Owen S, Pearson D, Suarez-Mendez V, O'Driscoll R, Woodcock A - **Evidence of free-radical activity in asthma** - *N Engl J Med*. 1991; 325(8):586.

Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim HP, Wang G, Qi CF, Hwu P, Shaffer DJ, Akilesh S, Roopenian DC, Morse HC, Lipsky PE, Leonard WJ. **Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6**. *J Immunol*. 2004. 173(9), 5361.

Peled JU, Kuang FL, Iglesias-Ussel MD, Roa S, Kalis SL, Goodman MF, Scharff MD. **The biochemistry of somatic hypermutation**. *Annu Rev Immunol*. 2008; 26:481. Review

Perillo NL, Marcus ME, Baum. **Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death**. *J Mol Med*. 1998; 76(6): 402. Review

Philips, S.M and Colley, D.G. **Immunologic aspects of host response to schistosomiasis: resistance, immunopathology, and eosinophil involvement**. *Progr. Allergy*. 1978; 24: 49

Piskurich JF, Lin KI, Lin Y, Wang Y, Ting JP, Calame K. **BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells**. *Nat Immunol*. 2000; 1(6), 526.

Prieto VG, Mourad-Zeidan AA, Melnikova V, Johnson MM, Lopez A, Diwan AH, Lazar AJ, Shen SS, Zhang PS, Reed JA, Gershenwald JE, Raz A and Bar-Eli M. **Galectin-3 Expression is associated with tumor progression and pattern of sun exposure in melanoma**. *Clin Cancer Res* 2006; 6709 12(22)

Rabinovich GA, Rubinstein N, Toscano MA. **Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes** - *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1572(2-3):274. Review.

Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS, Vasta GR. **Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices**. *Curr Opin Struct Biol*. 2007; 17(5):513

Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KGC, Dörner T and Hiepe F. **Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell**. *Nature Reviews Immunology* 6, 741-750

Reljic R, Wagner SD, Peakman LJ, Fearon DT. **Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6**. *J Exp Méd*. 2000. 192(12), 1841.

Ricon L. **O papel da galectina-3 na diferenciação dos linfócitos B**. Tese de mestrado. Defendida em Abril de 2008. *Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas* – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Rolink AG, Schaniel C, Andersson J, Melchers F - **Selection events operating at various stages in B cell development** - *Curr Opin Immunol*. 2001; 13(2):202.

Rossi MI, Dutra HS, El-Cheikh MC, Bonomo A, Borojevic R. **Extramedullar B lymphopoiesis in liver schistosomal granulomas: presence of the early stages and inhibition of the full B cell differentiation.** *Int Immunol*. 1999; 11(4):509.

Rossiter H, Alon R, Kupper TS - **Selectins, T-cell rolling and inflammation** - *Mol Med Today*. 1997; 3(5):214. Review

Sano H, Hsu DK, Apgar JR, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, Izui S and Liu FT. **Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages.** *J Clin Invest*. 2003; 112(3):389.

Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, Hirashima M, Liu FT - **Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages** - *J Immunol*. 2000; 165(4):2156

Sato S, Ouellet N, Pelletier I, Simard M, Rancourt A, Bergeron MG - **Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia** - *J Immunol*. 2002; 168(4):1813

Sakaki M, Oka N, Nakanishi R, Yamaguchi K, Fukumori T, Kanayama HO. **Serum level of galectin-3 in human bladder cancer.** *J Med Invest*. 2008; 55(1-2):127

Schliephake DE, Schimpl A. **Blimp-1 overcomes the block in IgM secretion in lipopolysaccharide/anti-mu F(ab')₂-co-stimulated B lymphocytes.** *Eur J Immunol* 1996; 26(1), 268.

Shapiro-Shelef M, Calame K. **Regulation of plasma cell development.** *Nat. Rev.Immunol*. 2005; 5:230. Review.

Shekhar MPV, Nangia-Makker P, Tait L, Miller F and Raz A. **Alterations in galectin-3 expression and distribution correlate with breast cancer progression.** *Am J Pathol*. 2004; 165:133

Shimamura T, Sakamoto M, Ino Y, Shimada K, Kosuge T, Sato Y, Tanaka K, Sekihara H, Hirohashi S. **Clinico-pathological significance of galectin-3 expression in ductal adenocarcinoma of the pancreas.** *Clin Cancer Res*. 2002; 8(8):2570

Siebenkotten G, Esser C, Wabl M, Radbruch A. **The murine IgG1/IgE class switch program.** *Eur. J. Immunol*. 1992; 22, 1827.

Silva-Monteiro E, Reis LL, Kenji NO, Junqueira M, Rabinovich GA, Hsu DK, Liu FT, Savino W, Chammas R, Villa-Verde DM. **Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection.** *Am J Pathol*. 2007; 170(2):546

Smith E and Sigvardsson M. **The roles of transcription factors in B lymphocyte commitment, development, and transformation.** *J Leukoc Biol.* 2004; 75(6):973.

Smith MA, Smith JG, Pallister CJ and Singer CR. **Haemopoietic growth factors, the cell cycle of acute myeloblastic leukaemia progenitors and sensitivity to cytosine arabinoside.** *Leuk Lymphoma.* 1996; 23(5-6):467. Review.

Soro PG, Morales-A P, Martínez-M JA, Morales-A S, Copín SG, Marcos MA, Gaspar ML. **Differential involvement of the transcription factor Blimp-1 in T cell-independent and -dependent B cell differentiation to plasma cells.** *J Immunol.* 1999; 163(2):611

Stadecker, MJ. **The role of T-cell anergy in the immunomodulation of schistosomiasis.** *Immunol.Today.*1992; 8:199

Stillman BN, Hsu DK, Pang M, Brewer CF, Johnson P, Liu FT and Baum L. **Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death.** *J Immunol.* 2006; 176(2):778

Schwarz G Jr, Rimmelink M, Decaestecker C, Gielen I, Budel V, Burchert M, Darro F, Danguy A, Gabius HJ, Salmon I, Kiss R. **Galectin fingerprinting in tumor diagnosis. Differential expression of galectin-3 and galectin-3 binding sites, but not galectin-1, in benign vs malignant uterine smooth muscle tumors.** *Am J Clin Pathol.* 1999; 111(5):623

Takatsu, K., S. Takaki, and Y. Hitoshi. **Interleukin-5 and its receptor system: implications in the immune system and inflammation.** *Adv. Immunol.* 1994. 57:145.

Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T. **Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs.** *Mol Cell Biol.* 2004;24:4395.

Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T. **Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development.** *Immunity* 2004; 20(6):707.

Truong MJ, Gruart V, Kusnierz JP, Papin JP, Loiseau S, Capron A, Capron M.J - **Human neutrophils express immunoglobulin E (IgE)-binding proteins (Mac-2/epsilon BP) of the S-type lectin family: role in IgE-dependent activation –** *J Exp Med.* 1993; 177(1):243.

Tumang JR, Frances R, Yeo SG, Rothstein TL. **Spontaneously Ig-secreting B-1 cells violate the accepted paradigm for expression of differentiation-associated transcription factors.** *J Immunol.* 2005; 174(6), 3173

Turner CA, Mack DH, Davis MM. **Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulinsecreting cells.** *Cell* 1994. 77(2), 297.

Urbanek, P., Wang, Z. Q., Fetka, I., Wagner, E. F., Busslinger, M. **Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP.** *Cell* 1994. 79, 901.

Van de Vijver, K. K., Deelder, A. M., Jacobs, W., Van Marck, E. A., Hokke, C. H. **LacDiNAc- and LacNAc-containing glycans induce granulomas in an in vivo model for schistosome egg-induced hepatic granuloma formation.** *Glycobiology*. 2006. 16, 237.

Van den Brule FA, Waltregny D. **Alteration of the cytoplasmic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression.** *Int J Cancer*. 2000; 89:361.

van den Berg TK, Honing H, Franke N, van Remoortere A, Schiphorst WE, Liu FT, Deelder AM, Cummings RD, Hokke CH, van Die I. **LacdiNAc-glycans constitute a parasite pattern for galectin-3-mediated immune recognition.** *J Immunol*. 2004; 173(3):1902.

van Zelm MC, van der Burg M, de Ridder D, Barendregt BH, de Haas EF, Reinders MJ, Lankester AC, Révész T, Staal FJ, van Dongen JJ. **Ig gene rearrangement steps are initiated in early human precursor B cell subsets and correlate with specific transcription factor expression.** *J Immunol*. 2005; 175(9):5912-22.

Vereecken P, Zouaoui Boudjeltia K, Debray C. **High serumgalectin-3 in advanced melanoma: preliminary results.** *Clin Exp Dermatol*. 2006;31:105

Wang JH, Nichogiannopoulou A, Wu L, Sun L, Sharpe AH, Bigby M, Georgopoulos K. **Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation.** *Immunity*. 1996; 5(6):537.

Weinberger PM; Adam BL, Gourin CG; Moretz WH; Bollag RJ; Wang BY; Liu Z; Lee JR and Terris DJ. **Association of nuclear, cytoplasmic expression of galectin-3 with beta-catenin/Wnt-pathway activation in thyroid carcinoma.** *Arch Otolaryngol Head and Neck Surg*. 2007. 133:100

Woodman RC, Johnston B, Hickey MJ, Teoh D, Reinhardt P, Poon BY, Kubes P. **The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice.** *J Exp Med*. 1998; 188(11):2181.

Yang RY, Hsu DK, Liu FT - **Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis -** *Proc Natl Acad Sci*. 1996; 93(13):6737

Ye M and Graf T. **Early decisions in lymphoid development.** *Curr Opin Immunol*. 2007; 19(2):123.

Review.

Yu F, Finley RL Jr, Raz A, Kim HR. **Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation.** *J Biol Chem.* 2002; 277(18):15819

Zanetta JP, Badache A, Maschke S, Marschal P, Kuchler S. **Carbohydrates and soluble lectins in the regulation of cell adhesion and proliferation.** *Histol Histopathol.* 1994; 9(2):385. Review.

Zhang DE, Zhang P, Wang ND, et al. **Absence of G-CSF signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein α -deficient mice.** *Proc Natl Acad Sci.* 1997. 94:569

Zuberi, R. I., Hsu, D. K., Kalayci, O., Chen, H. Y., Sheldon, H. K., Yu, L., Apgar, J. R., Kawakami, T., Lilly, C. M., Liu, F. T. **Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma.** *Am. J. Pathol.* 2004. 165: 2045.

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](#)