

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

“Galectina-3: um biomarcador para *balloon cells* e neurônios dismórficos presentes no córtex cerebral de pacientes com Complexo Esclerose Tuberosa (TSC)”

Ana Luiza Ferreira Donatti

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Psicobiologia.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

“Galectina-3: um biomarcador para *balloon cells* e neurônios dismórficos presentes no córtex cerebral de pacientes com Complexo Esclerose Tuberosa (TSC)”

Ana Luiza Ferreira Donatti

Orientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Martins

RIBEIRÃO PRETO - SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Donatti, Ana Luiza Ferreira

Galectina-3: um biomarcador para *balloon cells* e neurônios dismórficos presentes no córtex cerebral de pacientes com Complexo Esclerose Tuberosa (TSC).

Ribeirão Preto, 2009.

p.68:il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Martins, Antonio Roberto

1. Gal-3. 2. Complexo Esclerose Tuberosa (TSC).

*Dedico esta tese a minha mãe, Maria Luiza,
que nunca mediu esforços
para tornar todos os meus sonhos possíveis.
A senhora, serei eternamente grata.*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Roberto Martins, pela aprendizagem, incentivo, disciplina e amizade, que foram essenciais à minha formação acadêmica.

À CAPES, que me concedeu uma bolsa de estudos durante o mestrado.

Aos membros da banca examinadora, pela importante contribuição feita à finalização desta dissertação.

À Renata, secretária da área de Psicobiologia, pela competência no auxílio às questões burocráticas.

À Vani, pelos serviços histotécnicos prestados, que permitiram a execução do projeto, e principalmente pela amizade e ensinamentos.

Às colegas e amigas do laboratório: Alina, Elizabete, Carol, Liliane e Thaís, pelo companheirismo e contribuições dadas ao meu trabalho.

À Fabiana, Danielle e Beatriz, minhas grandes amigas, pela amizade, companheirismo e carinho que começou na faculdade e se mantiveram até hoje, mesmo com a distância.

Aos meus amigos do coração Danilão, Gandhi, Alan e Diego pela amizade, paciência, companheirismo e principalmente pelos bons momentos que passamos juntos debaixo do mesmo teto.

Aos amigos Angela, Dani (Xorú), Laurinha, Nádia, Mari, Ana Clara, Tio Chico, Rafael (Ky), Kapeta, Boer, Bixinho, Siri, Xuxu, Gui, Quintino, Jonilson, Refugo, João, Andrei, Andrezão, Verme e Xande pela amizade construída.

Ao meu namorado Eduardo, pelo apoio, carinho, paciência e amizade.

Ao meu sogro Antônio e minha sogra Tânia por me receberem de braços abertos e me acolherem como uma filha.

Aos meus cunhados Ronaldo e Renata, pelo apoio e incentivo.

Ao meu irmão Alberto e minha cunhada Sabrina, pelo zelo, carinho e incentivo durante esta caminhada.

Ao meu irmão Júnior e minha sobrinha Sibelle, por suas contribuições nessa caminhada.

Aos meus tios Tião e Rosaly e aos primos, Malu e Leonardo, pelo carinho, apoio e incentivo.

A Deus, que sempre ilumina meu caminho.

*"A auto-satisfação é inimiga do estudo.
Se quisermos realmente aprender alguma coisa
devemos começar por libertar-nos disso.
Em relação a nós próprios devemos ser insaciáveis
na aprendizagem e em relação aos outros, insaciáveis no ensino."*

Mao Tse-Tung

Índice

Introdução	16
Galectina-3	17
Malformações do desenvolvimento do córtex cerebral	20
Complexo Esclerose Tuberosa	21
Características neurológicas do TSC	23
Objetivo	26
Materiais e métodos	28
Grupos experimentais	29
Coloração com hematoxilina e eosina (HE) e Bielschowsky	30
Recuperação da antigenicidade	30
Imuno-histoquímica	30
Preparação das amostras para SDS-PAGE e <i>Western blot</i>	32
Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, Sistema SDS-PAGE	32
Eletrotransferência	33
<i>Western blot</i>	33
Resultados	35
Discussão	46
Conclusões	56
Referências bibliográficas	58

Lista de abreviaturas

- AMT: α -[¹¹C]-methyl-L-tryptophan
- bFGF: basic fibroblast growth factor
- CRD: carbohydrate recognition domain
- DAB: diaminobenzidina
- DCF: displasia cortical focal
- EDTA: etilenodiaminatetracetato di-sódico
- Gal-1: galectina-1
- Gal-3: galectina-3
- GFAP: proteína glial fibrilar ácida
- HE: hematoxilina e eosina
- HME: hemimegalencefalia
- LacNAc, Gal β 1,4(3)GlcNAc: N-acetil-lactosamina
- MDC: malformações do desenvolvimento do córtex cerebral
- mTOR: mammalian target of rapamycin
- NGF: nerve growth factor
- OMS: organização mundial da saúde
- PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
- PET: positron emission tomography
- PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila
- RNA_m: ácido ribonucléico mensageiro
- SDS: dodecil sulfato de sódio
- SEGA: astrocitoma subependimário de células gigantes
- Ser: serina

SNC: sistema nervoso central

SNP: sistema nervoso periférico

TC: túber cortical

TSC: complexo esclerose tuberosa

TEMED: N,N,N',N' tetrametilenodiamina

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

NeuN: neuronal nuclei

RESUMO

Resumo

Galectina-3 (Gal-3) pertence a uma família de lectinas cujos membros reconhecem β -galactosídeos. Sua expressão está associada a diferentes processos biológicos e patológicos, tais como embriogênese, adesão e proliferação celular, apoptose, *splicing* de RNAm, modulação da resposta imune e neoplasias. Entre os tipos celulares que expressam Gal-3 estão os fibroblastos, macrófagos, subpopulações de neurônios dos gânglios da raiz dorsal e diferentes células tumorais. Estudos imuno-histoquímicos realizados em nosso laboratório, mostraram a expressão de Gal-3 em *balloon cells* no córtex cerebral de pacientes com displasia cortical focal IIB, tipo Taylor. *Balloon cells* são células anormais, grandes, que expressam epítopos gliais e/ou neuronais. Outras malformações do desenvolvimento do córtex cerebral também exibem *balloon cells*, tais como o complexo esclerose tuberosa (TSC) e a hemimegalencefalia. O TSC é um distúrbio autossômico dominante associado à mutação de um dos dois genes supressores de tumor, *TSC1* e *TSC2*, os quais codificam as proteínas tuberina e a hamartina, respectivamente. O TSC é caracterizado por vários sinais e sintomas que incluem o desenvolvimento de tumores benignos, denominados hamartomas, em múltiplos órgãos, incluindo os rins, pulmões, coração e sistema nervoso central (SNC). As lesões neuropatológicas do TSC incluem nódulos subependimais, túberes corticais, áreas de hipoplasia cortical focal e heterotopia neuronal. Neste estudo, secções de córtex cerebral de pacientes com diagnóstico de TSC foram incubadas com anticorpo anti-Gal-3 para analisar a expressão imuno-histoquímica desta lectina em malformações do córtex cerebral humano. Nos dez casos estudados as lesões cerebrais características de TSC estavam presentes, *i.e.*, túberes corticais (TCs) multifocais e astrocitomas subependimários de células gigantes. A expressão de Gal-3 nos TCs foi observada em astrócitos reativos, micróglia, *balloon cells* e neurônios dismórficos gigantes. Os astrocitomas subependimários de células gigantes

(SEGAs) expressaram intensamente esta lectina. Nossos resultados sugerem que a expressão de Gal-3 em neurônios citomegálicos dismórficos e em *balloon cells* encontradas nos tecidos de pacientes com TSC poderia estar envolvida em mecanismos que incluem proliferação e sobrevivência celular destas células anômalas, dentre outros processos. A expressão de Gal-3 em TSC contrasta com a sua ausência no tecido cortical cerebral normal. Deste modo, Gal-3 poderia ser utilizada como um marcador para diagnóstico histopatológico, como ferramenta para o estudo desta patologia e para o conhecimento das ações desta proteína nas células alvo e fluídos biológicos.

ABSTRACT

ABSTRACT

Galectin-3 (Gal-3) belongs to a family of lectins whose members recognize β -galactose. Its expression is associated with different biological and pathological processes such as embryogenesis, adhesion and cell proliferation, apoptosis, mRNA splicing, modulation of immune response and cancer. Among the cell types that express Gal-3 are fibroblasts, macrophages, subpopulations of neurons of dorsal root ganglia and different tumor cells. An immunohistochemical study performed in our laboratory, showed the expression of Gal-3 in balloon cells on cortex of patients with focal cortical dysplasia IIB, Taylor type. Balloon cells are abnormal cells, large, expressing glial and/or neuronal epitopes. Other malformations of the development of the cerebral cortex also exhibit balloon cells, such as tuberous sclerosis complex (TSC) and hemimegalencephaly. TSC is an autosomal dominant disease associated with mutation of one of the tumor suppressor genes, TSC1 and TSC2, which encode the proteins tuberin and hamartin respectively. TSC is characterized by the development of benign tumors called hamartomas in multiple organs, including kidneys, lungs, heart and central nervous system (CNS). The neuropathological lesions of TSC include subependymal nodules, cortical tubers, cortical areas of hypoplasia and neuronal heterotopia. In this study, cortex of patients diagnosed with TSC were incubated with anti-gal-3 antibodies to examine the immunohistochemical expression of this lectin in malformations of the human cerebral cortex. In the ten cases studied the characteristics of TSC brain lesions were present, tubers cortical (TC) and subependymal giant cell astrocytomas (SEGAS). The expression of gal-3 in TSC was observed in reactive astrocytes, microglia, balloon cells and giant dysmorphic neurons. The SEGAs, located near the anterior and mesial part of the ventricular system, were also marked by this lectin. Our results suggest that the expression of gal-3 in dysmorphic giant neurons and balloon cells found in tissues of patients with TSC may be

involved in among others cellular mechanisms that include cell proliferation and survival of these anomalous cells. The expression of gal-3 in TSC contrasts with its absence in normal cerebral cortical tissue. Thus, Gal-3 could be used as a marker for histopathologic diagnosis and as a tool for the study of pathology through biophysical methods and immunoaffinity, to the knowledge of the actions of this protein in target cells and biological fluids.

INTRODUÇÃO

Introdução

Galectina-3

Galectina-3 (Gal-3) é uma proteína de 29- a 35-kDa da família galectina de lectinas animais, cujos membros reconhecem especificamente β -galactosídeos (Barondes *et al.*, 1994). Essa proteína consiste de um domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) localizado na porção C-terminal da molécula seguido por um domínio rico em glicina e um domínio N-terminal constituído de aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos (Probstmeier *et al.*, 1995).

Essa lectina possui um extenso sítio de ligação, o qual pode acomodar grandes oligossacarídeos tais como os polilactosaminoglicanos (Knibbs *et al.*, 1993). Estudos descreveram a N-acetil-lactosamina (LacNAc, Gal β 1,4(3)GLcNAc) como o principal ligante de Gal-3 (Agrwal *et al.*, 1993). A interação de seu CRD com carboidratos ligantes é acompanhada por uma mudança conformacional e uma reorganização próxima ao sítio de ligação (Agrwal *et al.*, 1993). Além disso, uma fosforilação na posição Ser⁶ da Gal-3 afeta sua afinidade por açúcares ligantes (Mazurek *et al.*, 2000). A maioria dos fosfatos presentes na Gal-3 são encontrados na Ser⁶ (Huflejt *et al.*, 1993). Cowles e colaboradores (1990) relataram a presença de ambas as formas de Gal-3, fosforilada (pI 8.2) e não-fosforilada (pI 8.7), em fibroblastos 3T3 de camundongos. Os autores encontraram a Gal-3 fosforilada (PI 8.2) no citoplasma e no núcleo, enquanto que a forma não-fosforilada foi encontrada exclusivamente no citoplasma. Esses resultados sugeriram a necessidade da fosforilação para transportar a Gal-3 para dentro do núcleo. A fosforilação reduz consideravelmente sua habilidade de se ligar aos seus ligantes, porém sua habilidade de ligação pode ser totalmente restaurada pela defosforilação da Gal-3 (Mazurek *et al.*, 2000).

A Gal-3 é fortemente expressa no citoplasma. Dependendo do tipo e estado de proliferação celular, essa lectina pode ser detectada no núcleo, na superfície celular ou no

ambiente extracelular (Krześlak & Lipinska, 2004). Papéis biológicos da Gal-3 são definidos por sua localização celular; portanto, devido a sua complexa distribuição subcelular não é possível especificar uma única função precisa da Gal-3. Sua expressão está associada a diferentes processos biológicos e patológicos, tais como embriogênese, adesão e proliferação celular, apoptose, *splicing* de mRNA, colonização de bactérias e modulação da resposta imune e neoplasias (Krześlak & Lipinska, 2004).

A localização intracelular de Gal-3 está conectada com seu papel na regulação de *splicing* de pré-RNA nuclear e proteção contra apoptose (Krześlak & Lipinska, 2004). Lin e colaboradores (2002) descreveram o papel da Gal-3 nuclear na regulação da transcrição gênica. A Gal-3 induz a ativação da ciclina D1 e de fatores de transcrição.

A localização de Gal-3 na superfície da célula sugere sua participação na adesão célula-célula e célula-matriz (Krześlak & Lipinska, 2004), na sinalização celular (Dumic *et al.*, 2006) e no desempenho de atividades sobre células da imunidade. Com relação a esse último aspecto, a Gal-3 exerceria um papel em eventos próprios de processos inflamatórios tais como ativação de mastócitos (Liu, 1993) e de neutrófilos (Almkvist & Karlsson, 2004) e regulação da produção de fatores de crescimento e citocinas (Krugluger *et al.*, 1997; Bernardes *et al.*, 2006). A Gal-3 extracelular exibe numerosos efeitos autócrinos e parácrinos (Dumic *et al.*, 2006). Além de mediar a adesão celular, Gal-3 afeta vários processos biológicos tais como manutenção da homeostase celular, reações imunes, organogênese e angiogênese, invasão tumoral e metástase (Van den Brûle *et al.*, 2004).

Entre os tipos celulares que expressam Gal-3 estão os fibroblastos, macrófagos, subpopulações de neurônios dos gânglios da raiz dorsal e diferentes linhagens de células tumorais (Probstmaeier, 1995). A expressão de Gal-3 também está relacionada com a progressão neoplásica de câncer de cabeça e pescoço, câncer de tireóide, câncer gástrico e câncer de cólon (Akahani *et al.*, 1997).

Estudos recentes sugerem que a Gal-3 possa inibir a apoptose através de interações com carboidratos ou com a proteína antiapoptótica Bcl-2. Esta proteína foi identificada, *in vivo*, como a primeira molécula citosólica ligante de Gal-3 (Yang *et al.*, 1996). Foi encontrado um domínio na região C-terminal da Gal-3 com uma seqüência homóloga à do domínio BH1 da família de proteínas Bcl que contém o *motif* NWGR, o qual é responsável pela atividade anti-apoptótica do Bcl-2 (Akahani *et al.*, 1997). Yang *et al.* (1996) demonstraram que a Gal-3 pode interagir com Bcl-2 de uma maneira lactose-inibível. Esse achado é inesperado visto que Bcl-2 não é uma glicoproteína. A ligação da lactose com a Gal-3 pode induzir uma mudança conformacional na sua região *motif* NWGR, o que impede sua interação com Bcl-2 (Krześlak & Lipinska, 2004). O mecanismo molecular pelo qual a Gal-3 regula a apoptose induzida por diferentes agentes permanece desconhecida. No entanto, é possível que esta lectina possa substituir ou mimetizar a proteína Bcl-2 (Krześlak & Lipinska, 2004).

Bcl-2 é uma proteína localizada no exterior da membrana mitocondrial. Ela regula a apoptose bloqueando a liberação de citocromo c pela mitocôndria (Zörnig *et al.*, 2001). Estudos recentes demonstraram que a Gal-3 transportada para o interior da mitocôndria, com a mitocôndria localizada próximo à membrana perinuclear, inibe a liberação de citocromo c e a ativação da via de caspases (Yu *et al.*, 2002). Assim, Gal-3 regula a apoptose associada à mitocôndria, em adição a Bcl-2 (Matarrese *et al.*, 2000).

Por outro lado, a Gal-3 extracelular atua principalmente como um fator pró-apoptótico (Lee *et al.*, 2003). Estudos sugerem que a Gal-3 promove paradas em diferentes pontos do ciclo celular, dependendo do estímulo apoptótico. Porém, o mecanismo preciso de sua ação ainda não é claro (Dumic *et al.*, 2006).

Pesheva e colaboradores (1998) evidenciaram que a Gal-3 serve como um substrato para adesão celular e crescimento de neuritos através da interação de seu CRD com glicoproteínas e/ou glicolipídeos localizados na superfície celular. Após lesão de nervo

periférico, a Gal-3 é supra-regulada intra- e extra-celularmente nas células de Schwann e parece estar envolvida no processo de fagocitose dessas células (Reichert *et al.*, 1994).

Van den Brûle e colaboradores (1997) estudaram a expressão de Gal-1 e Gal-3 durante o primeiro trimestre de embriogênese humana, através de imuno-histoquímica e *Western blotting* e encontraram expressão de Gal-3 na mucosa intestinal, músculo cardíaco, epiderme e notocorda. No sistema nervoso central somente fibras nervosas foram fortemente marcadas por Gal-3, assim como núcleos de neurônios do gânglio da raiz dorsal, que continuam expressando esta lectina na fase adulta. A expressão de Gal-3 nesses neurônios é dependente do fator de crescimento neural (NGF) (Pesheva *et al.*, 2000).

Malformações do Desenvolvimento do Córtex Cerebral

A organização final das camadas corticais é o resultado de uma série de processos encadeados de desenvolvimento pré-natal. Os principais processos envolvidos são: (a) proliferação de células indiferenciadas no neuroepitélio; (b) migração de neuroblastos; (c) sinaptogênese, (d) diferenciação celular, interação célula-célula, e) apoptose, entre outros. Perturbações de alguns desses processos, tais como defeito genético ou influência nociva do meio ambiente, resultam em malformações do desenvolvimento do córtex cerebral (MDC) (Tassi *et al.*, 2002). As MDC foram reconhecidas patologicamente desde o final do século XX (Sidman & Rakic, 1973). As MDCs são definidas como um grupo heterogêneo de transtornos anatômicos corticais focais ou difusos, cujas características patológicas dependem principalmente do momento e localização em que o distúrbio ocorreu durante o desenvolvimento (Barkovich *et al.*, 1996).

Estudos neuropatológicos de tecido cerebral humano identificaram diversas mudanças celulares e da arquitetura cortical. Uma patologia em particular foi descrita primeiramente por

Taylor e colaboradores em 1971, denominada displasia cortical focal (DCF). Ela é caracterizada por desorganização da laminação cortical, heterotopia neuronal, citomegalia e dismorfismo neuronal, sem *balloon cells* (Tipo IIA) ou com *balloon cells* (Tipo IIB) (Palmini *et al.*, 2004). As *balloon cells* são células caracterizadas especificamente por uma membrana alterada, citoplasma opaco e eosinofílico e um ou mais núcleos excêntricos. Estas células são geralmente numerosas e agrupadas principalmente na transição branca-cinzenta (Tassi *et al.*, 2002). Nas DCF tipo IIB as *balloon cells* são elementos diagnósticos da doença e apresentam expressão de marcadores gliais e/ou neuronais (Shick *et al.*, 2007). Esta característica imunocitoquímica sugere que as *balloon cells* sejam derivadas da maturação incompleta de células tronco neuroepiteliais durante os primeiros estágios do desenvolvimento (Mizoguchi *et al.*, 1998). A etiologia e patogenia molecular da DCF IIB (com *balloon cells*) ainda permanecem desconhecidas (Fauser *et al.*, 2004). As *balloon cells* também podem ser observadas em outras MDC, tais como túberes corticais (esclerose tuberosa) ou hemimegalencefalia (HME) (Fauser *et al.*, 2004).

Complexo Esclerose Tuberosa (TSC)

O complexo esclerose tuberosa (TSC) é uma doença autossômica dominante caracterizada pelo desenvolvimento de tumores benignos, denominados hamartomas, em múltiplos órgãos incluindo os rins, pulmões, coração, pele e sistema nervoso central (SNC) (Holmes & Stafstrom, 2007). A doença está associada à mutação de um de dois genes supressores de tumor, *TSC1* e *TSC2*, os quais codificam tuberina e hamartina, respectivamente (Jozwiak *et al.*, 2000). Algumas características do TSC podem estar presentes ao nascimento, enquanto que outras complicações tendem a se desenvolver mais tarde (Roach & Sparagana, 2004).

As manifestações clínicas do complexo esclerose tuberosa (Pan *et al.*, 2004) em diferentes órgãos são:

- cérebro: túberes corticais, nódulos subependimários, astrocitomas subependimários de células gigantes (SEGAs);
- olhos: hamartomas e astrocitomas retinianos;
- coração: rabdomiomas cardíacos;
- rins: angiomiolipomas benignos, angiomiolipomas malignos, cistos, carcinoma de célula renal;
- pulmões: hiperplasia pneumocítica micronodular multifocal;
- face: máculas hipomelanóticas, fibroma sub- ou peri-ungueal, angiofibromas faciais;
- comportamento: retardo mental, desordem bipolar, autismo.

Os mecanismos genéticos e biológicos do TSC não são simples. Por essa razão seu diagnóstico pode ser desafiante (Roach & Sparagana., 2004). Em 1998, um painel de especialistas revisou e estabeleceu os critérios diagnósticos para TSC (Tabela 1) e seus mecanismos moleculares e genéticos (Roach *et al.*, 1998). As características clínicas do TSC são classificadas em maiores e menores. As características maiores incluem os sinais que possuem um alto grau de especificidade para o TSC, já as características menores são menos específicas (Holmes & Stafstrom, 2007). A presença de duas características maiores ou uma maior mais duas menores constitui um diagnóstico de “TSC definitivo”, enquanto que uma característica maior e uma menor indicam o diagnóstico de “TSC provável”. Uma característica maior ou duas ou mais menores indicam “TSC possível” (Roach & Sparagana, 2004). O critério diagnóstico revisado tem sido amplamente difundido e tem-se mostrado de grande utilidade para o diagnóstico de TSC (Roach & Sparagana, 2004).

Tabela 1 - Características para diagnóstico do complexo esclerose tuberosa

Características maiores	Características menores
1. Túberes corticais	1. Múltiplas orifícios no esmalte dentário
2. Nódulos subependimários	2. Hamartomas retinais
3. Astrocitomas subependimários de células gigantes (SEGAs)	3. Cistos ósseos
4. Máculas hipomelanóticas (três ou mais)	4. Linhas de migração radial na substância branca cerebral
5. <i>Shagreen patch</i>	5. Fibromas gengivais
6. Angiofibromas faciais ou placas na testa	6. Hamartoma não renal
7. Múltiplos hamartomas nodulares renais	7. Pequenas áreas acromáticas na retina
8. Fibromas não traumáticos ungueais ou peri-ungueais	8. Lesões em “confete” na face
9. Rabdomioma cardíaco, único ou múltiplo	9. Múltiplos cistos renais
10. Linfangiomatose pulmonar e/ou angiomiolipomas renais	

Holmes & Stafstrom (2007).

Características neurológicas do TSC

O envolvimento neurológico no TSC produz normalmente os sintomas mais severos da doença, incluindo crises epiléticas, retardo mental e autismo (Erbayat-Altay *et al.*, 2007), embora ocorram pacientes com TSC com pouco ou nenhum comprometimento neurológico (Roach & Sparagana, 2004). A severidade das disfunções intelectuais varia de disfunção cognitiva mínima a retardo mental profundo. Autismo e vários distúrbios do comportamento incluindo hiperatividade, agressividade e psicose são comuns, ocorrendo como sintomas e sinais isolados ou em combinação com epilepsia ou déficit intelectual (Hunt *et al.*, 1993).

As lesões neurológicas resultam, provavelmente, de migração neuronal prejudicada e de proliferação anormal (Roach & Sparagana., 2004). Uma hipótese seria que a migração de

células neuroepiteliais primitivas para o córtex, as quais conservam um potencial para mitose, resultaria na proliferação de células dismórficas dentro do córtex (Huttenlocher & Wollman, 1991). As lesões neuropatológicas do TSC incluem nódulos subependimários, hamartomas corticais, áreas de hipoplasia e displasias corticais focais e heterotopia neuronal.

Um túber clássico é uma lesão displásica de um giro cortical cerebral que possui uma superfície rígida e nodular ao tato, e ocorre frequentemente no ápice de um giro (Roach & Sparagana, 2004). Ele contém *balloon cells*, que exibem epitopos neuronais e/ou gliais, neurônios gigantes dismórficos, sugerindo sua origem nos primeiros estágios do desenvolvimento (Holmes & Stafstrom, 2007). As características histopatológicas do túber cortical incluem regiões corticais com hamartomas, morfologia celular anormal, neurônios displásicos, células gigantes (citomegalia), neurônios heterotópicos, arborização dendrítica anormal, projeções axonais anormais e proliferação astrocitária (Holmes & Stafstrom, 2007). Muitos desses neurônios de morfologia anormal são células estreladas ou multipolares não características do córtex normal (Huttenlocher & Wollman, 1991). O córtex cerebral adjacente aos túberes encontra-se, em geral, histologicamente normal. Os túberes corticais são formados durante o desenvolvimento fetal, representando um distúrbio da proliferação neural que se manifesta entre a sétima e a décima segunda semana da gestação humana (Barkovich *et al.*, 2005). O número e a localização dos túberes corticais representam a variabilidade de fenótipos observados em pacientes com TSC (Holmes & Stafstrom, 2007).

Crises epiléticas ocorrem em 75% a 90% dos pacientes com TSC e frequentemente iniciam-se nos primeiros anos de vida como espasmos infantis (Curatolo *et al.*, 2002).

Clinicamente, os túberes são frequentemente identificados como focos epileptogênicos, os quais necessitam de ressecção cirúrgica em pacientes com TSC e epilepsia refratária (Gomez, 1988 *apud* Crino *et al.*, 1996). Múltiplos mecanismos podem estar

envolvidos, mas ultimamente, acredita-se que as crises originam devido a um desequilíbrio entre excitação e inibição em determinadas regiões corticais (Holmes & Stafstrom, 2007).

Os SEGAs são tumores benignos constituídos de uma proliferação de células em forma de fuso assim como de células gigantes, tipo balão, com citoplasma eosinofílico (Hirose *et al.*, 1995). Eles ocorrem tipicamente na primeira ou segunda década de vida e estão localizadas geralmente na parede dos ventrículos laterais ao nível dos gânglios basais (Lopes *et al.*, 1996). Esses tumores podem aumentar causando sintomas tais como aumento da pressão intracraniana, déficits neurológicos ou maior severidade de crises epiléticas (Torres *et al.*, 1998). Nódulos subependimários são adjacentes à parede ventricular e projetam-se caracteristicamente para o lúmen ventricular. São mais comuns nos ventrículos laterais e ocorrerem com maior frequência nas regiões anteriores (Roach & Sparagana, 2004).

Estudos imuno-histoquímicos realizados por AR Martins e colaboradores (comunicação pessoal) com tecido cortical de pacientes com displasia cortical focal IIB, tipo Taylor, demonstraram neurônios dismórficos e *balloon cells* marcados com Gal-3.

As similaridades histopatológicas e neuro-radiológicas entre DCF-Taylor IIB e TSC sugerem uma relação entre a forma “frustrada” de TSC com a DCF-Taylor IIB (Becker *et al.*, 2002). Sendo assim, o objetivo deste estudo é analisar se estas células anormais presentes no TSC também expressam Gal-3.

OBJETIVO

OBJETIVO

Tecidos provenientes de ressecção cortical de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico de epilepsia não-controlada por medicamentos podem permitir o estudo das características morfológicas e imuno-histoquímicas de patologias associadas a malformação do desenvolvimento cortical. Sendo assim, propomos:

- 1) Verificar a expressão da lectina Gal-3 no córtex cerebral de pacientes com diagnóstico de Complexo Esclerose Tuberosa, utilizando técnicas de imuno-histoquímica e *western blott*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materials e Métodos

Grupos experimentais

Amostras de dez ressecções corticais de pacientes submetidos à cirurgia para tratamento de epilepsia de difícil controle foram obtidas no Hospital das Clínicas da FMRPUSP (Tabela 2). Os tecidos de nove pacientes com diagnóstico de complexo esclerose tuberosa (Tabela 2, caso 2-10) e um cavernoma (Tabela 2, caso 1), foram fixados em formalina 4% (peso/volume) em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7.4, por até 2 dias, desidratados com etanol, diafanizados com xileno e incluídos em parafina. Secções com 6 µm de espessura foram cortadas em micrótomo modelo RM 2065 (Leica) e colocadas em lâminas revestidas com gelatina e cromalumem (Baker) para uso imuno-histoquímica ou em lâminas silanizadas para colorações especiais.

Tabela 2. Caracterização clínico-cirúrgica dos casos estudados. F, feminino; M, masculino; a, anos; m, meses; D, direito; E, esquerdo.

Caso	Sexo	Idade à cirurgia	Tipo de cirurgia/ Região/Lado	Classe Engel
1	F	20 a	Craniotomia/temporal/E	NA
2	M	03 a	Quadrantectomia posterior/temporal/E	I
3	F	03 a	Lesionectomia/frontal/D	I
4	M	10 m	Hemiesferectomia/hemisfério/E	II
5	F	11 m	Lesionectomia/frontal/D	I
6	M	02 a	Lobectomia/frontal/E	I
7	F	3 a 5 m	Lesionectomia/parietal/D	III
8	F	17 a	Lobectomia/occipital/E	I
9	M	07 a	Lesionectomia/parietal/D	I
10	M	09 a	Lesionectomia/frontal/D	III

Coloração com hematoxilina e eosina (HE) e pelo método de Bielschowsky

Secções parafinizadas de tecido cerebral foram colocadas em lâminas revestidas com 3-aminopropil(trimetoxi)silano (Sigma) e coradas por HE e pelo método de Bielschowsky (Mirra *et al.*, 1993) para diagnóstico. Após a coloração, as secções foram desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e montadas sob lamínula com Permount (Fisher).

Recuperação da antigenicidade

A recuperação antigênica foi realizada conforme descrito por Martins *et al.* (1999) e Zanardo *et al.* (1997). As lâminas com as secções de tecido desparafinizadas foram colocadas em jarros de Coplin imersas em 800 ml de tampão citrato de sódio 10 mM, pH 6,0 e tratadas por dois períodos de 5 minutos seguido de dois outros de 4 minutos cada, com potência nominal 900 watt em aparelho de microondas NN-5668 (Panasonic). Antes de dar continuidade à técnica de imuno-histoquímica, houve uma pausa para que o tampão contido nos jarros Coplin voltasse à temperatura ambiente.

Imuno-histoquímica

As secções (6 µm) tratadas para recuperação antigênica foram incubadas em solução de H₂O₂ 4,5 vol. % em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4, contendo NaCl 0,9% (p/v) (PBS) para bloqueio da atividade da peroxidase endógena.

A recuperação antigênica foi realizada conforme o procedimento anteriormente descrito. Após resfriamento, as secções foram incubadas com tampão Tris-Glicina 0,1 M, pH 7,4, por 30 minutos e em seguida com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,4, contendo: NaCl 0,45 M, Triton X-100 0,3% (v/v), soro de jumento inativado 1:6 (v/v) (tampão de bloqueio)

durante 4 horas, para bloqueio dos grupamentos aldeído livres e para minimizar a interação do anticorpo primário com sítios de ligação inespecífica no tecido, respectivamente.

Para a reação imuno-histoquímica foi utilizado os seguintes anticorpos primários: IgY anti-Gal-3 diluído em tampão de bloqueio a 1:100 (v/v), coelho anti-GFAP bovino (Dako Z0334) diluído em tampão de bloqueio a 1:1.000 (v/v) e anti-NeuN (MAB 377) diluído em tampão de bloqueio a 1:100. Nas secções utilizadas como controles do experimento, houve omissão do anticorpo primário que foi substituído por tampão de bloqueio. A incubação ocorreu por aproximadamente 14 horas e em seguida as secções foram lavadas com tampão B [tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,4 contendo: NaCl 0,45 M e Triton X-100 0,3% (v/v)]. Os anticorpos secundários empregados para detecção dos anticorpos primários foram IgG de coelho anti-IgY conjugado com peroxidase (Sigma A9045) diluído a 1:100 (v/v) em tampão de bloqueio, porco anti-IgG de coelho (Dako E0353) diluído a 1:200 (v/v), e coelho anti-rato biotilado (Z0354) diluído a 1:200. O anticorpo primário IgY anti-Gal-3 foi pré-adsorvido por três horas à temperatura ambiente com diferentes concentrações de Gal-3 e Gal-1 para confirmar sua especificidade. Para essa reação foram utilizadas Gal-3 (cedido gentilmente por E. S. Bernardes) nas concentrações de 0,137 μ g/ μ l, 0,48 μ g/ μ l e 4,4 μ g/ μ l; e galectina-1 (cedido gentilmente por E. S. Bernardes) na concentração de 0,49 μ g/ μ l, ambas diluídas em tampão de bloqueio contendo o anticorpo primário. A detecção foi baseada na reação da peroxidase, utilizando-se H₂O₂ e 3,3'-diaminobenzidina (DAB). A reação foi interrompida com H₂O destilada. As secções foram então desidratadas com etanol (Merck), diafanizadas em xilol (Merck) e montadas sob lamínula com Permount (Fisher). Todos os procedimentos foram realizados à temperatura ambiente, exceto o da recuperação antigênica.

A análise das secções foi feita em microscópio óptico Jenamed 2 (Carl Zeiss) e lupa SZH10 (Olympus) e as microfotografias em microscópio óptico BX60 (Olympus).

Preparação das amostras para SDS-PAGE e *Western blot*

Para estes experimentos utilizamos amostras de Gal-3 e tecido de córtex cerebral de um paciente normal. O tecido procedente de autópsia foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Após o congelamento, o tecido foi armazenado em *freezer* a -80°C para posterior homogeneização e preparo das amostras. Imediatamente antes do uso, o tecido foi retirado do *freezer*, pesado e homogenizado (10% p/v) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, na presença de inibidores de proteases: etilenodiaminatetracetato di-sódico (EDTA) 10 mM, benzamidina 1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 0,3 mM e aprotinina 0,3µM. A homogeneização foi realizada em copo Potter-Elvehjem (2 ml) com pistilo de teflon. Foram feitas 10 incursões do pistilo, em banho de gelo. As amostras de Gal-1, Gal-3 e tecido cortical foram diluídas 4:1 (v/v) em tampão de Laemmli (Laemmli e Favre, 1973) modificado [tampão Tris-HCl 0,075 M, pH 6,8, contendo glicerol 1,5% (v/v), SDS 1,5% (p/v), azul de bromofenol 0,001% e β-mercaptoetanol 5%], agitadas vigorosamente e fervidas durante 4 minutos antes da aplicação no gel.

6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, Sistema SDS-PAGE

As amostras de Gal-3 e tecido cortical obtidas para SDS-PAGE e *Western blot* foram aplicadas em gel de poliacrilamida com gel de empilhamento a 5% e gel de separação a 8%, segundo o método descrito por Laemmli e Favre (1973). O gel de empilhamento consiste em tampão Tris-HCl 0,126 M, pH 6,8 contendo N, N, N', N' tetrametilenodiamina (TEMED) 0,125% (v/v), persulfato de amônio 0,063% (p/v), SDS 0,1% e acrilamida-bisacrilamida 5% (p/v). O gel de separação é composto de tampão Tris-HCl 0,378 M, pH 8,8 contendo TEMED 0,125% (v/v), persulfato de amônio 0,063% (p/v), SDS 0,1% e acrilamida-bisacrilamida 8% (p/v).

Foram aplicados 10 μ g de Gal-3, e 11 μ g do homogenizado do córtex cerebral em cada poço do gel de empilhamento. O controle positivo do anticorpo anti-Gal-3 empregado foi a proteína Gal-3 (10 μ g). O gel foi colocado numa cuba para eletroforese preenchida com tampão Tris 25 mM e Glicina 190 mM, contendo SDS 0,1%. A eletroforese foi conduzida a 10 mA durante a corrida na região de empilhamento do gel e a 15 mA durante a corrida na região de separação, durante aproximadamente 2 horas e 30 minutos.

7. Eletrotransferência

Após a eletroforese, as proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (HyBond C Extra, Amersham), de acordo com o procedimento estabelecido por Towbin *et al.* (1979). O gel foi colocado em contato com a membrana num conjunto formado sucessivamente por: placa acrílica, esponja, papel de filtro, gel, membrana de nitrocelulose, papel de filtro, esponja e placa acrílica. A transferência foi conduzida sob voltagem constante de 30 V durante 2 horas, numa cuba para transferência, em tampão Tris 25 mM e Glicina 190 mM, contendo SDS 0,1% (p/v) e etanol 18,75% (v/v).

A seguir, a membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau S (USB) 5% (p/v), diluído em ácido tricloroacético (Merck) 3% (p/v) durante 30 minutos e lavada com uma solução descorante [ácido tricloroacético 3% (p/v)] para visualização e marcação das bandas referentes aos padrões de peso molecular utilizados.

8. Western blot

Após secagem, a membrana de nitrocelulose foi lavada com tampão de lavagem [tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo NaCl 150 mM e Triton X-100 0,1% (v/v)] e submetida ao bloqueio de sítios de ligação inespecífica com tampão de bloqueio [tampão de

lavagem contendo leite em pó desnatado (Molico) 10% (p/v)] durante 2 horas. Em seguida, foi realizada a incubação com o anticorpo rato anti-Gal-3 diluído 1:1000 (v/v) em tampão de bloqueio durante 2 horas. O controle negativo foi obtido pela omissão do anticorpo primário, que foi substituído por tampão de bloqueio. Após lavagens com tampão de lavagem a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-rato IgG conjugado com peroxidase (Jackson Immuno Research Laboratories) diluído 1:2000 (v/v) em tampão de bloqueio durante 1 hora. Ao término da incubação a membrana foi lavada com tampão de lavagem e tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,6. A revelação foi feita pela reação da peroxidase, utilizando-se H₂O₂ e 3,3'-diaminobenzidina (DAB). A reação foi interrompida com H₂O destilada. O imunoblot revelado foi digitalizado utilizando-se scanner (HP Scanjet 8350).

RESULTADOS

Resultados

Nove pacientes portadores do complexo esclerose tuberosa e epilepsia resistente a medicamento foram submetidos a cirurgia para tratamento de epilepsia no Hospital das Clínicas da FMRPUSP (Tabela 2). Os achados neuropatológicos foram compatíveis com os diagnósticos clínico e por imagem e consistiram de túberes corticais (TC) multifocais e astrocitomas subependimários de células gigantes (SEGA), grau I pelos critérios da Organização Mundial Saúde (OMS).

A especificidade do anticorpo anti-Gal-3 foi testada utilizando-se *Western blotting* e imuno-histoquímica. O anticorpo anti-Gal-3 reconheceu a banda de Gal-3 (Figura 1A). A pré-incubação do anticorpo anti-Gal-3 com Gal-3 recombinante (rGal-3) aboliu o reconhecimento da Gal-3 pelo anticorpo, a julgar pelos experimentos usando *Western blotting* (Figura 1B). O anticorpo anti-Gal-3 não reconheceu galectina-1 recombinante (não mostrado aqui). O anticorpo anti-Gal-3 reconheceu uma banda presente em homogenizado de córtex cerebral humano macro e microscopicamente normal proveniente da exérese do lobo temporal esquerdo para prover acesso a cavernoma na região temporal inferior esquerda (Tabela 2, caso 1), que exibiu a mesma migração eletroforética que a Gal-3 recombinante (Figura 1C); esta marcação foi abolida por pré-incubação do anti-Gal-3 com Gal-3 recombinante (Figura 1 D). As membranas de nitro-celulose para as quais foram transferidos Gal-3 recombinante e homogenizado de córtex cerebral humano e que foram processadas com omissão do anticorpo primário não exibiram bandas (Figuras 1E, F, respectivamente).

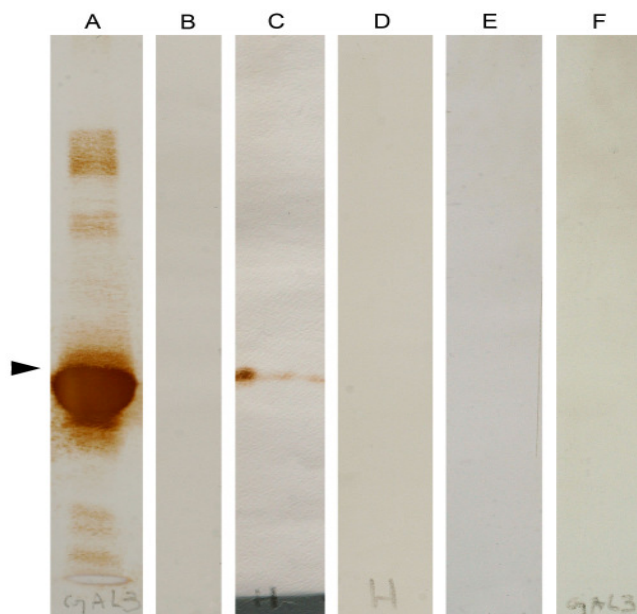


Figura 1. O córtex cerebral humano contém Gal-3 detectável mono-especificamente pelo anticorpo galinha anti-Gal-3 humana recombinante em *Western blotting*. O anticorpo galinha anti-Gal-3 (diluído 1:20, vol/vol) detectou rGal-3 (11 μ g) (Fig. 1A) e sua pré-adsorção com Gal-3 (55 μ g) aboliu a detecção da lectina recombinante (Fig. 1B). O anticorpo anti-Gal-3 (diluído 1:20, vol/vol) detectou uma única banda de Gal-3 em córtex cerebral humano (17.5 μ g proteína) (Fig. 1C) e sua pré-adsorção com 55 μ g de Gal-3 aboliu a detecção da lectina (Fig. 1D).

A detecção imuno-histoquímica de Gal-3 foi estudada quanto à especificidade da reação. O anticorpo anti-Gal-3 marcou intensamente o núcleo e o citoplasma de células abalonadas, de astrócitos gigantes e de células fusiformes em várias, mas não em todas as regiões da secção, indicando heterogeneidade de expressão da Gal-3 pelas células tumorais (Figura 2A). A pré-incubação do anticorpo anti-Gal-3 com rGal-3 na concentração de 0.14 μ g/ μ l reduziu substancialmente a marcação citoplasmática e menos acentuadamente a marcação nuclear (Figura 2B). Já a pré-incubação do anticorpo anti-Gal-3 com Gal-3 na concentração de 0.48 μ g/ μ l reduziu apreciavelmente as marcações citoplasmática e nuclear pelo anticorpo anti-Gal-3 (Figura 2C). A expressão de Gal-3 não foi detectada quando se omitiu o anticorpo primário durante a revelação das lâminas (Figura 2D), indicando que os métodos imuno-histoquímico e de detecção foram específicos. Tomados em conjunto, os resultados obtidos em *Western blotting* (Figura 1) e imuno-histoquímica (Figura 2) indicam a especificidade da detecção de Gal-3 em tecido humano proveniente de pacientes com

esclerose tuberosa submetidos a cirurgia para tratamento de epilepsia resistente a medicamento foi específica.

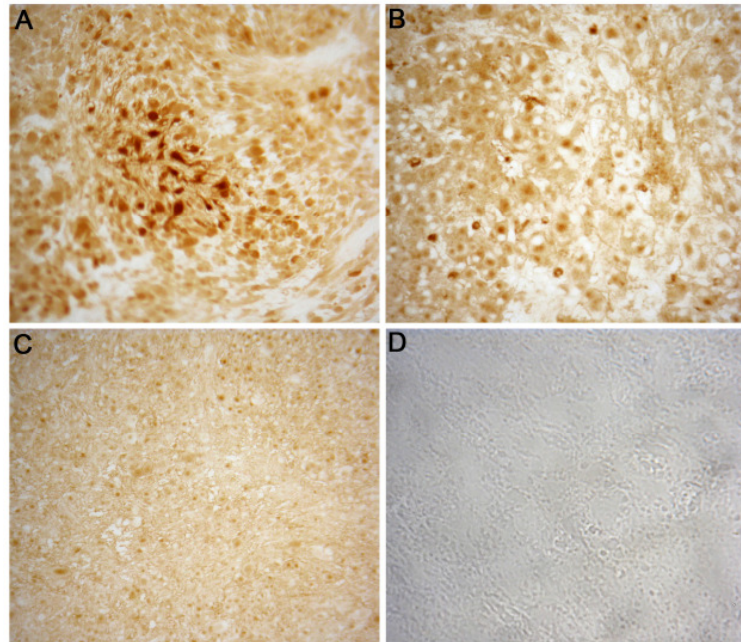


Figura 2. A detecção de Gal-3 em secções de tecido cerebral humano é específica (caso 6). Observa-se intensa marcação citoplasmática e nuclear de células gigantes e de células fusiformes com anticorpo anti-Gal-3 (A), que foi progressivamente reduzida por pré-adsorção do anticorpo primário com concentrações crescentes de rGal-3 (B, 0,48 µg/µl; C, 4,4 µg/µl). A omissão do anticorpo anti-Gal-3 (controle negativo, D) aboliu a detecção de Gal-3. A-D, aumento original, X10.

Tecido cortical cerebral proveniente de um paciente submetido a cirurgia para ressecção de cavernoma na região temporal inferior e de nove pacientes com complexo esclerose tuberosa, portadores de epilepsia refratária a medicamento, que incluíram dois astrocitomas subependimários de células gigantes (Tabela 1), foram corados por hematoxilina & eosina (HE), por prata pelo método Bielschowsky e analisados quanto à expressão de Gal-3, proteína glial fibrilar acídica (GFAP) e NeuN.

Os TC foram lesões nodulares firmes e freqüentemente calcificadas no córtex cerebral. Histopatologicamente exibiram laminação cortical anormal com perda da organização colunar (Figura 3A, B), citomegalia com dismorfismo neuronal (Figuras 3B, C), número variável de células grandes com citoplasma eosinofílico homogêneo e núcleo excêntrico e em muitas

delas nucléolo grande e conspícuo (Figuras 3B, C, D), semelhantes às *balloon cells* que ocorrem na displasia cortical focal tipo IIB, também chamada displasia cortical focal de Taylor. Essas *balloon cells* exibiram coloração castanho dourada típica quando coradas por prata pelo método de Bielschowski (Figura 3F, G) e também foram observadas em regiões corticais externas aos túberes. Nas regiões dos TC foi observado borramento da transição entre as substâncias cinzenta e branca (Figura 3A). Grande quantidade de calcificação foi notada, tanto na substância branca (Figura 3E) quanto na substância cinzenta. Gliose intensa foi vista na maioria dos casos (Figura 3A, B). Observou-se heterotopia neuronal com aspecto nodular e gliose em três dos casos (Figura 3C, D).

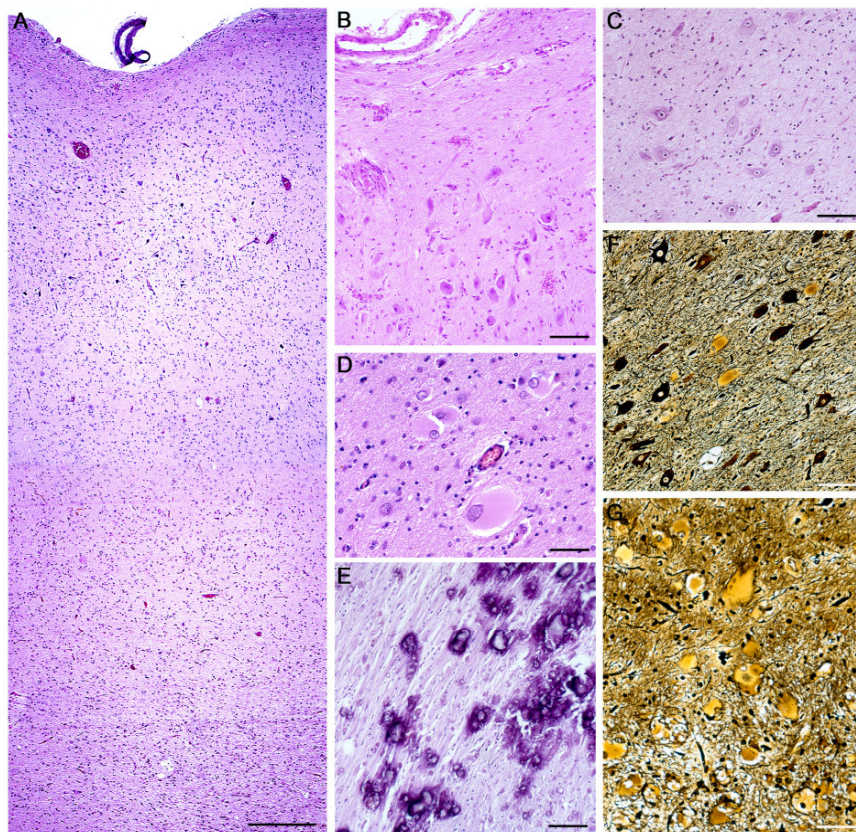


Figura 3. Características histopatológicas das lesões corticais nos casos de esclerose tuberosa estudados (caso 8: A, B, C, D e G; caso 2: E e F). A, túber cortical exibindo displasia e perda da organização colunar cortical, com gliose mais intensa na lâmina I, HE; B, túber cortical com neurônios gigantes dismórficos e *balloon cells*, HE; C, neurônios gigantes dismórficos e *balloon cells* na substância branca cortical, HE; D, *balloon cells* características, HE. E, numerosas calcificações na substância branca. F, neurônios gigantes dismórficos e *balloon cells* (cor castanho-dourado), coloração por prata. G, numerosas *balloon cells* na transição cinzenta-branca, coloração por prata. Barras: A, 400 μm; B, C, E, F, 100 μm; D, G, 50 μm.

GFAP foi intensamente expressado em áreas de gliose/heterotopia nodular e especificamente na lâmina cortical I (Figura 1A). Nas áreas de gliose predominaram células com morfologia de astrócitos ativados (Figura 4B). Pequeno número de células com características morfológicas de *balloon cells* expressaram GFAP pouco intensamente (Figura 4C); a maioria dessas células não expressou GFAP (Figura 4D).

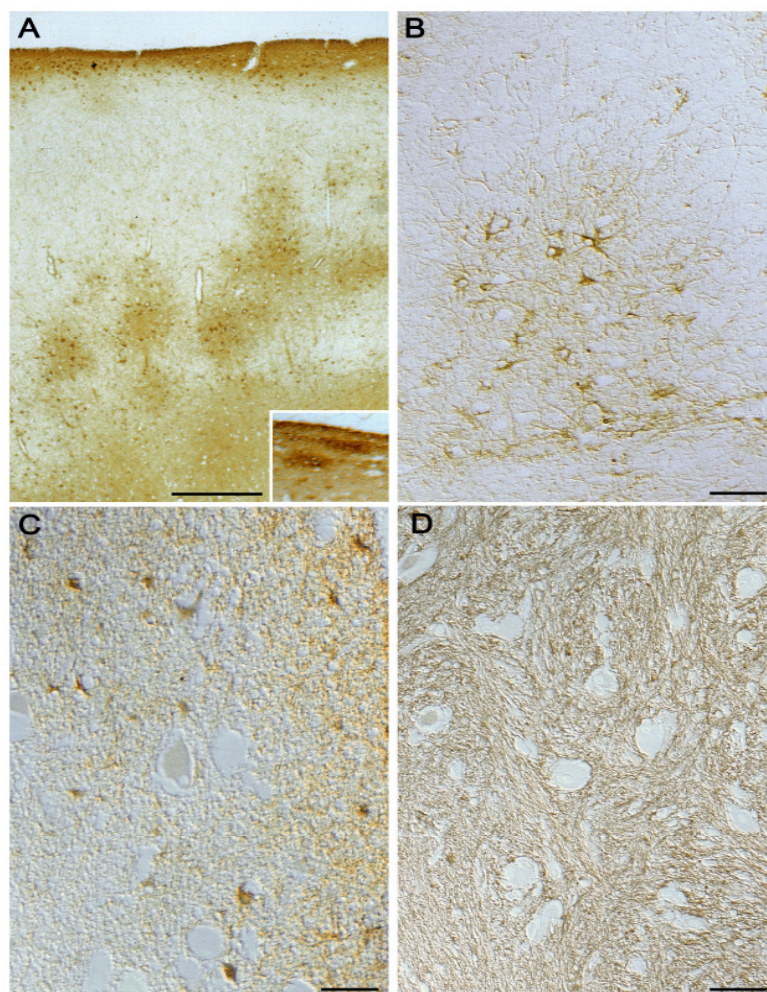


Figura 4. Expressão de GFAP nos casos de esclerose tuberosa estudados (caso 8: A, B e D; caso 3: C). A, túber cortical exibindo gliose intensa na lâmina I e em regiões nodulares no córtex cerebral, nota-se numerosas células GFAP positivas; *inset*, mostrando outro caso de gliose na região da lâmina I em túber cortical. B, região de gliose nodular correspondente a um dos nódulos em A exibindo numerosos astrócitos reativos. C, *balloon cell* positiva para GFAP. D, numerosas *balloon cells* negativas para GFAP. Barras: A, 400 µm; B, 100 µm; C, D, 50 µm. Óptica Nomarski: B, C, D.

A expressão de NeuN permitiu confirmar que regiões corticais vizinhas às dos túberes exibiram morfologia normal, com preservação das estruturas laminar e colunar (Figura 5A). *Balloon cells* típicas (Figura 5B) e neurônios citomegálicos dismórficos (Figura 5C) expressaram NeuN, porém a maioria das *balloon cells* não expressou NeuN (Figuras 7B, C). Regiões heterotópicas expressaram NeuN (Figuras 5D).

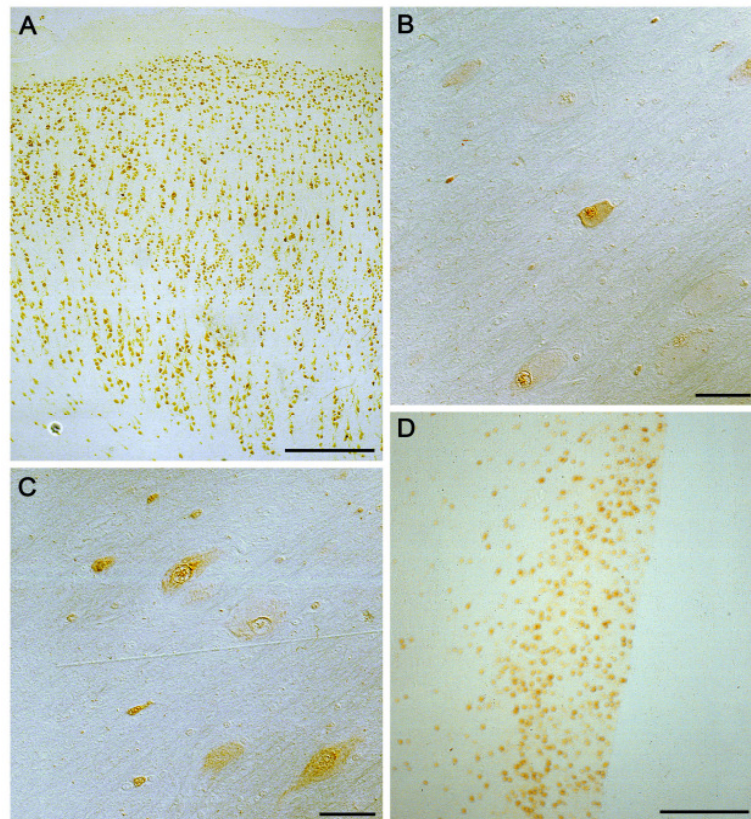


Figura 5. Expressão de NeuN nos casos de esclerose tuberosa estudados (caso 8: A-C; caso 3: D). A, córtex cerebral com estruturas laminar e colunar normais. B, *balloon cells* marcadas e não marcadas pelo anticorpo anti-NeuN. C, neurônios citomegálicos dismórficos. D, região heterotópica. Barras: A, D, 400 μ m; B, C, 50 μ m. A-D, óptica Normarski.

A Gal-3 foi expressa com maior intensidade nos envelados glióticos corticais (Figura 6A) e nas heterotopias neuronais (Figura 6B), mas não em regiões corticais vizinhas aos túberes, porém com estrutura normal (Figura 6C). *Balloon cells* expressaram Gal-3 no núcleo (Figura 6D), no citoplasma (Figuras 6E, F) ou, alternativamente, não a expressaram (Figuras 6D, E, F).

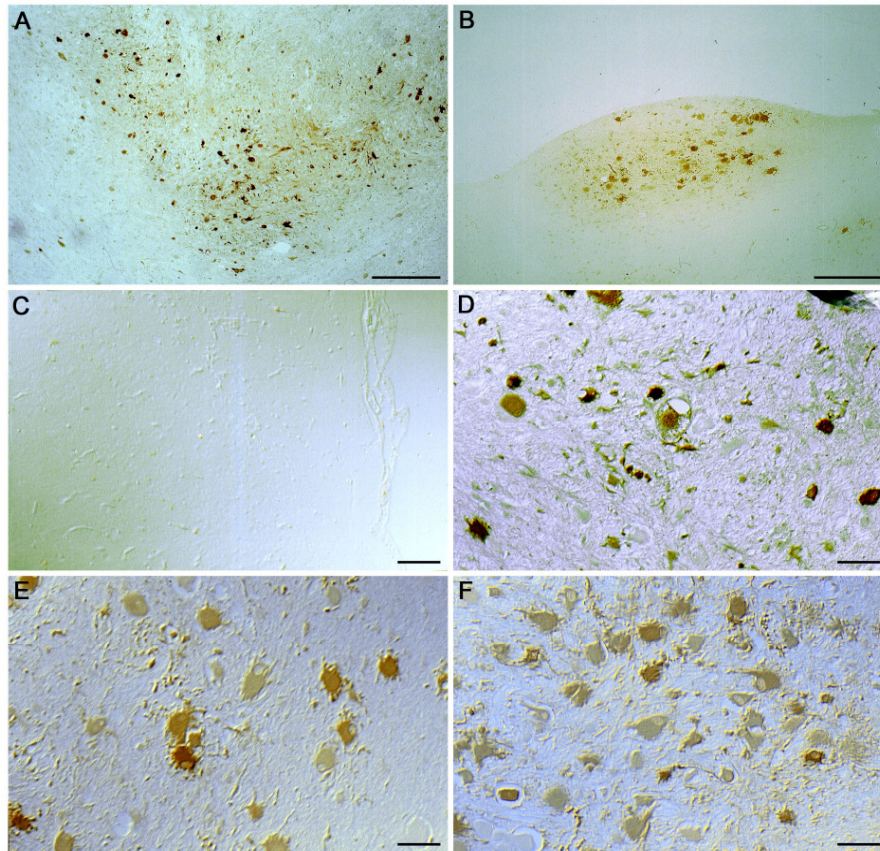


Figura 6. Expressão de Gal-3 em túberes e heterotopia corticais de pacientes portadores de esclerose tuberosa (caso 8: A e D; caso 3: B, C, E e F). A Gal-3 foi expressa em nódulos corticais glióticos (A) e em heterotopia corticais (B). C, o córtex cerebral normal não expressou Gal-3. *Balloon cells* expressaram Gal-3 no núcleo (D), no citoplasma (D, E, F), em ambos (D) ou não a expressaram (D, E). Células com morfologia semelhante à de astrócitos ativados expressaram Gal-3 com intensidade variável (E, F). Barras: A, B, 400 μm ; C, 100 μm ; D, E, F, 50 μm . A-F, óptica Nomarski.

Os SEGAs estavam localizados na região subependimária dos ventrículos cerebrais laterais. A população tumoral foi constituída por células fusiformes e epitelióides grandes e por células gigantes, eosinofílicas, com um ou mais núcleos excêntricos, semelhantes à *balloon cell* (Figuras 7A, B). Estas células exibiram disposição espiralada ou enrolada, principalmente dispostas ao redor de vasos sanguíneos (Figuras 7A, C) e formando nódulos. Células gigantes, alongadas, com nucléolo proeminente estavam dispostas ao redor de vasos sanguíneos (Figura 7D). Grande quantidade de calcificação foi notada. Mastócitos e células gigantes de corpo estranho estavam ocasionalmente presentes. Figuras mitóticas foram

detectadas raramente e os casos nos quais estavam presentes foram classificados como grau I pelos critérios da OMS.

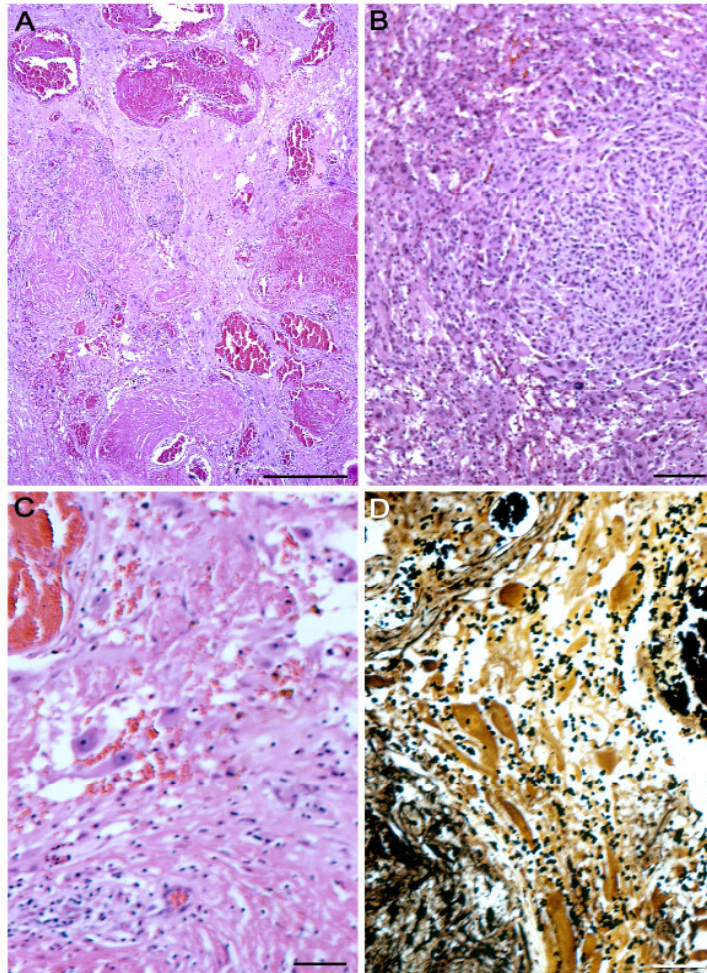


Figura 7. Aspecto histológico dos astrocitomas subependimários de células gigantes (caso 6). **A**, observa-se a disposição celular perivascular característica, o grande número de vasos sanguíneos e os nódulos celulares. **B**, os nódulos estavam envolvidos por intensa gliose. **C** e **D**, os nódulos continham células fusiformes grandes e células alongadas com nucléolo grande e proeminente; estas células alongadas foram consistentemente observadas nas áreas de gliose que rodeavam os nódulos. Barras: A, 400 μm ; B, 100 μm ; C, D, 50 μm .

Algumas das *balloon cells* observadas exibiram marcação pelo anticorpo anti-GFAP (Figuras 8C, D, E) e outras expressaram tanto marcadores gliais (GFAP, Figura 8C) como neuronais (NeuN, não documentados aqui).

A expressão de Gal-3 foi geralmente verificada nas mesmas regiões que expressaram GFAP. Assim, alguns nódulos (Figuras 9A, B) e áreas de gliose perinodulares (Figuras 9A, C)

expressaram Gal-3 com intensidade variável, tanto no citoplasma quanto no núcleo (Figuras 9C, D). Células gigantes com morfologia astrocitária e processos curtos e grossos foram observadas em regiões de gliose perinodular (Figura 9D). *Balloon cells* intranodulares exibiram marcação nuclear (Figura 9E) e/ou citoplasmática (Figura 9F) pelo anticorpo anti-Gal-3 com intensidade variando de não marcada a fortemente marcada.

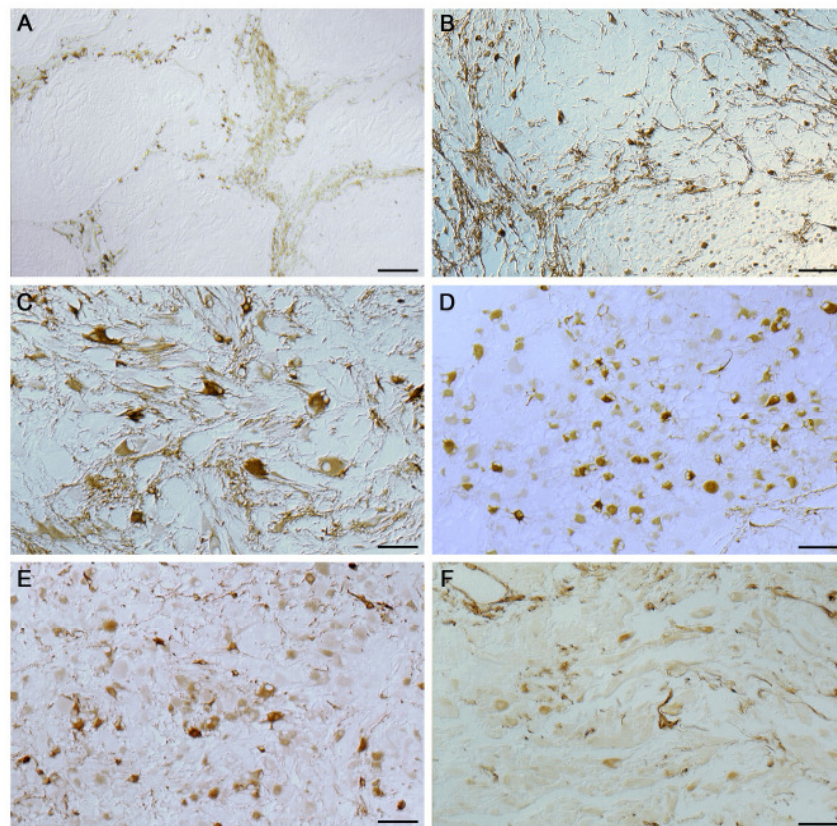


Figura 8. Expressão de GFAP nos astrocitomas subependimários de células gigantes (caso 6). Observa-se a localização de áreas de gliose ao redor de nódulos não marcados por anti-GFAP (A); estas áreas de gliose continham grande quantidade de fibras GFAP-positivas e células GFAP-positivas grandes, lembrando astrócitos dismórficos (B, C) e células grandes, com núcleo excêntrico, algumas binucleadas, semelhantes às *balloon cells* (C). Alguns nódulos exibiram células com morfologia semelhante à de astrócitos reativos e de *balloon cells*, com intensidade de marcação por anti-GFAP variável e correspondente a fração das células presentes nos nódulos (D, E, F). Barras: A, B, 100 μ m; C, D, E, F, 50 μ m. A-F, óptica Nomarski.

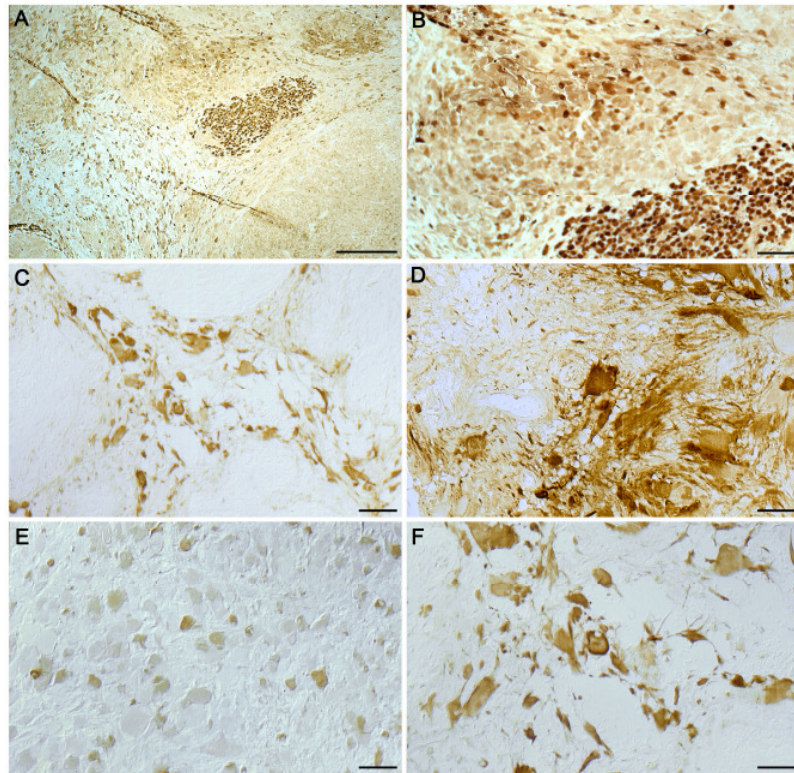


Figura 9. A Gal-3 é expressa em astrocitomas subependimários de células gigantes (*caso 6*). Expressão de Gal-3 em nódulos (A, B) e regiões de gliose internodulares (C, D) de SEGA. Observa-se a marcação de células gigantes, arredondadas ou alongadas, com núcleo excêntrico (C) e de células achatadas, com núcleo central ou excêntrico, marcados ou não (E, F). Barras: A, 400 µm; B, C, 100 µm; D, E, F, 50 µm. C-F, óptica Nomarski.

DISCUSSÃO

Discussão

Constitui pontos críticos em métodos imuno-histoquímicos de investigação e diagnóstico a escolha de um fixador apropriado e o estabelecimento da duração do processo de fixação de maneira a promover uma máxima preservação da morfologia do tecido com perda mínima da antigenicidade (Shi *et al.*, 1991).

Embora a formalina permaneça como o fixador mais usado em estudos patológicos, está claro que nem sempre é a melhor escolha para a preservação da antigenicidade dos tecidos usados em procedimentos imunohistoquímicos (Shi *et al.*, 1991). A ação do paraformaldeído leva à formação de ligações cruzadas entre regiões da cadeia polipeptídica de uma mesma proteína ou entre proteínas vizinhas (Hoyer *et al.*, 1991). O processo de fixação do tecido tem sido dividido em duas etapas: uma reação primária de adição entre o grupo amino e um aldeído ou cetona, seguida de uma reação secundária de condensação (Wong, 1991). A ligação cruzada é um processo que gera alterações conformacionais da proteína e uma vez que os anticorpos reconhecem epitopos específicos localizados numa configuração espacial particular da molécula de proteína, as alterações conformacionais induzidas pelo fixador podem mascarar a antigenicidade do tecido (Shi *et al.*, 1997).

A técnica de recuperação antigênica foi desenvolvida baseada em uma série de estudos bioquímicos realizados por Fraenkel-Conrat e colaboradores (1947). Esses estudos indicavam que as ligações cruzadas entre resíduos de aminoácidos, produzidas pela fixação com formalina, poderiam ser revertidas por altas temperaturas ou por forte hidrólise alcalina. A técnica baseada no aquecimento de secções de tecidos foi introduzida em 1991 por Shi e colaboradores. Desde então, uma variedade de antígenos foram testados pelo procedimento de recuperação antigênica usada no forno de microondas em presença de metais, uréia, ou

soluções tamponadas, obtendo uma melhora da imunomarcção de secções obtidas de tecidos fixados com formalina e incluídos em parafina (Shi *et al.*, 1995).

Shi e colaboradores (1995) mostraram que o pH de uma solução utilizada na recuperação antigênica também influencia na intensidade da imunomarcção e é um fator crítico para assegurar a efetividade de um procedimento de recuperação antigênica com microondas. Para que o método de recuperação antigênica seja eficaz é necessário testar diferentes combinações de temperatura, tempo e velocidade de aquecimento, composição e pH da solução. Em nosso laboratório foi testado, para a detecção de Gal-3, um método de tratamento em microondas com tampão citrato de sódio 10mM, pH 6,0 que havia sido padronizado para a detecção de miosina-V (Martins *et al.*, 1999). O tratamento das secções do córtex cerebral com esse tampão e aquecimento em forno de microondas melhoraram apreciavelmente a detectabilidade da Gal-3 em secções de córtex cerebral humano fixados com formalina e embebidos em parafina (este trabalho).

A especificidade do anticorpo anti-Gal-3 utilizado foi confirmada por *Western blott* e imuno-histoquímica. O anticorpo anti-Gal-3 reconheceu a banda da Gal-3 recombinante e também uma banda com peso molecular aparente aproximadamente igual ao da Gal-3 recombinante presente em homogenizado de córtex cerebral humano macro e microscopicamente normal proveniente da exérese do lobo temporal esquerdo para prover acesso a cavernoma. Esta marcação foi abolida com a pré-incubação do anticorpo com Gal-3 recombinante. Nas secções utilizadas como controles dos experimentos de imuno-histoquímica, onde houve a omissão do anticorpo primário, não foi detectada marcação. Este resultado indica que a detecção de Gal-3 foi método-específica. A ausência de marcação de células nervosas em secções de córtex cerebral de pacientes normais também aponta para a especificidade do anticorpo, já que a Gal-3 não é expressa em neurônios normais (Park *et al.*, 2008).

Outra abordagem imuno-histoquímica utilizada neste estudo para verificar a especificidade do anticorpo primário foi a pré-adsorção do mesmo com a proteína Gal-3. O anticorpo foi pré-adsorvido em três concentrações diferentes de Gal-3: 0,137 μ g/ μ l, 0,48 μ g/ μ l e 4,4 μ g/ μ l. Na maior concentração as secções de túberes corticais e astrocitomas não apresentaram ou tiveram imunomarcação muito reduzida para esta lectina, mostrando que o anticorpo utilizado foi específico.

Quando as secções foram incubadas com o anticorpo primário pré-adsorvido com Gal-3 na concentração de 0,137 μ g/ μ l as marcações encontradas nos tecidos estavam, em grande parte, localizadas no citoplasma. Porém, quando esta concentração aumentou para 0,48 μ g/ μ l a marcação foi detectada somente em núcleo. Assim, a pré-incubação do anticorpo com concentrações crescentes de Gal-3 associou-se a imunomarcação progressivamente mais restrita ao núcleo.

Numerosas moléculas citosólicas foram previamente identificadas como ligantes de Gal-3, dentre elas estão as proteínas Bcl-2 e sinexina; no núcleo, a Gal-3 está associada a complexos de ribonucleoproteínas (Laing & Wang, 1988). Diferentes ligantes podem promover diferentes mudanças conformacionais na molécula, resultando em exposição ou omissão de epitopos. Essas mudanças na estrutura do antígeno podem afetar profundamente a avidéz do anticorpo policlonal pelo antígeno, promovendo diferentes intensidades de marcação em locais distintos.

Os dez casos de TSC estudados foram analisados quanto à expressão de Gal-3, GFAP e NeuN. Em todos os casos as lesões cerebrais características da esclerose tuberosa estavam presentes, como foi observado pelas colorações com HE e prata (Bielschowsky). As lesões consistiram de túberes corticais (TCs) multifocais e de astrocitomas gigantes subependimais (SEGAs). As características histopatológicas do túber cortical incluem regiões corticais com morfologia celular anormal, neurônios displásicos, células gigantes (citomegálicas), neurônios

heterotópicos, arborização dendrítica anormal, projeções axonais anormais e proliferação astrocitária. Na coloração por HE, os TCs exibiram laminação cortical anormal (displasia cortical) e fibras de Rosenthal presentes em ambas as substâncias, branca e cinzenta. Nódulos de neurônios dismórficos foram observados na substância branca, coincidindo com uma forte expressão de GFAP.

Nos TCs a expressão de Gal-3 foi encontrada em astrócitos reativos, micróglia, *balloon cells* e neurônios dismórficos gigantes. Sua expressão foi mais intensa nos envelados glióticos corticais e nas heterotopias neuronais.

As *balloon cells* Gal-3 imunopositivas encontradas nos túberes corticais são morfológicamente similares às células tumorais dos SEGAs também marcadas por essa proteína. Ambas são caracterizadas pelo núcleo excêntrico e arredondadas, corpo celular eosinofílico e homogêneo. Alguns autores consideram as *balloon cells* dos túberes e as células tumorais dos SEGAs como as mesmas células ocorrendo, porém, em tecidos diferentes (Hirose *et al.*, 1995).

Existe a hipótese de que as lesões intracranianas do TSC provêm de células tronco localizadas na matrix celular, com expressão gênica anormal, que não desenvolveram ou migraram corretamente, resultando em células displásicas nas regiões subependimárias, córtex e ao longo das vias de migração celular (Curatolo & Verdecchia, 2003). Algumas das *balloon cells* exibiram marcação pelo anticorpo anti-GFAP e outras expressaram tanto marcadores gliais como neuronais (NeuN).

A diferenciação de alguns tipos celulares é acompanhada por um aumento ou supressão da expressão de Gal-3. Tanto a Gal-3 endógena como a exógena podem induzir ou inibir o crescimento celular (Dumic *et al.*, 2006). A expressão de Gal-3 nas *balloon cells* do presente estudo poderia estar relacionada ao fato delas serem células que ainda não foram diferenciadas, visto que as mesmas exibiram tanto marcadores gliais como neuronais. Porém,

estudos demonstraram que não há presença de células neuroniais expressando Gal-3 durante o processo de desenvolvimento do SNC.

Neurônios dismórficos gigantes imunomarcados com gal-3 estavam presentes nas camadas corticais e na substância branca. Em algumas secções essas células foram encontradas tanto nas camadas mais inferiores do córtex cerebral como também nas mais próximas à superfície pial, e isoladas na substância branca. As *balloon cells* e os neurônios dismórficos gigantes foram encontrados em regiões de displasia cortical e heterotópicas, similarmente ao que foi observado em tecidos de pacientes com DCF-tipo Taylor IIB quando provados com esta mesma lectina.

Fortes similaridades histopatológicas e neuro-radiológicas entre DCF-Taylor IIB e TSC levaram a propor-se uma relação entre a forma “frustrada” de TSC com a DCF-Taylor IIB. Becker e colaboradores (2002) sugeriram que os genes *TSC1* e *TSC2* são candidatos à patogenia molecular da DCF tipo Taylor ou IIB, embora até o momento esta suposição não tenha sido confirmada.

A perda da função de *TSC1* ou *TSC2*, que codificam as proteínas hamartina e tuberina, respectivamente, leva a uma ativação seletiva da cascata mTOR. A modulação negativa dessa cascata pelo complexo hamartina-tuberina resulta na supressão do crescimento e restrição do tamanho celular. Portanto, mutações nesses genes provêm mecanismo plausível para a formação da citomegalia característica do TSC (Holmes & Stafstrom, 2007).

Além disso, as proteínas codificadas pelos genes *TSC* possuem papel na morte celular. Inibição da proteína p70S6K pela tuberina ativa a heterodimerização de BAD com Bcl-2 e Bcl-X, promovendo apoptose (Freilinger *et al.*, 2006a e 2006b). Visto que a Gal-3 é uma proteína adicional a Bcl-2 para regular a apoptose, pergunta-se: as células citomegálicas expressariam esta lectina devido à ativação de processos apoptóticos?

Segundo Oppenheim (1991), durante o desenvolvimento, o sistema nervoso é inicialmente formado com um número excessivo de neurônios. Essa produção excessiva é seguida por processos de apoptose que levam à eliminação da maioria das células produzidas. Esta perda celular maciça que ocorre durante estágios mais avançados do desenvolvimento neural serve provavelmente como um ajuste quantitativo de populações de neurônios conectados de modo incorreto. A eliminação de projeções que estão incorretas ou aberrantes é conhecida como poda neurítica e provê refinamento de conexões sinápticas e correção de erro. No entanto, se as lesões neurológicas do complexo esclerose tuberosa e da DCF tipo Taylor resultassem de migração neuronal prejudicada e da proliferação anormal dos elementos gliais (Roach & Sparagana, 2004), esperar-se-ia então que essas células sofressem apoptose, visto que as células características de ambas as patologias encontraram-se em regiões displásicas e de heterotopias neuroniais, formando conexões atípicas (Sidman & Rakic, 1973).

O anticorpo anti-Gal-3 marcou intensamente o núcleo e o citoplasma das *balloon cells* e neurônios dismórficos localizados nos túberes corticais. Não foi observada expressão dessa proteína em regiões corticais vizinhas aos túberes, porém histologicamente normais. Túberes corticais são reconhecidos como fontes de descargas interictais, embora áreas epiléptogênicas abranjam freqüentemente o córtex adjacente (Luat et al., 2007). Sendo assim, a Gal-3 poderia atuar como uma proteína anti-apoptótica, já que a sobrevivência neuronal também depende da eficácia, do número e distribuição sináptica, da ramificação axonal e dendrítica (Pomeroy & Purves, 1988) e de agentes neurotróficos que promovem sobrevivência neuronal (Oppenheim, 1991). Células pós-sinápticas, em geral, secretam agentes tróficos que contribuem para a formação e manutenção das terminações pré-sinápticas (Purves & Lichtman, 1980). Acredita-se que sobrevivem somente aqueles neurônios que recebem estímulos tróficos corretos de sua

população alvo (Becker & Bonni, 2004) ou estímulos elétricos da cadeia neuronal (Purves *et al.*, 1988).

Kuklinski e colaboradores (2003) demonstraram que a expressão de Gal-3 é supra-regulada pela neurotrofina NGF em células PC12, assim como em neurônios dos gânglios da raiz dorsal (Pesheva *et al.*, 2000). Ambos NGF e bFGF (*basic fibroblast growth factor*) induzem a expressão de Gal-3 em ambas células e promovem o crescimento de neuritos (Kuklinski *et al.*, 2003).

Sabendo-se que a Gal-3 intracelular protege diferentes tipos celulares contra apoptose em resposta a vários estímulos (Dumic *et al.*, 2006), estariam essas células citomegálicas expressando esta proteína devido à ativação de processos anti-apoptóticos?

No entanto, nem todos os túberes são epileptogênicos. Resultados de estudos cirúrgicos mostraram uma boa recuperação de crises epiléticas após a ressecção de um túber epileptogênico suspeito, localizado com auxílio de AMT (α -[¹¹C]-methyl-L-tryptophan) PET durante avaliação pré-cirúrgica, mesmo com a permanência de túberes não epileptogênicos (Kagawa *et al.*, 2005).

A histopatologia, a biologia celular e a patofisiologia dos túberes necessita de estudos mais detalhados. Existem numerosas características nos túberes que contribuem para sua propensão a epileptogenicidade, incluindo citoarquitetura cortical alterada, proliferação astrocitária calcificação, anatomia vascular alterada, edema, expressão alterada de receptores, células citomegálicas e dismórficas, proliferação e morte celular (Holmes & Stafstrom, 2007).

Marcações com o anticorpo anti-GFAP indicaram regiões de intensa gliose na maioria dos casos, predominando células com morfologia de astrócitos ativados, indicando processo inflamatório. A expressão de Gal-3 foi geralmente verificada nas mesmas regiões que expressaram GFAP. Alguns nódulos e áreas de gliose perinodulares expressaram Gal-3 com intensidade variável, tanto no citoplasma quanto no núcleo.

Uma poderosa atividade pró-inflamatória foi proposta para Gal-3. A Gal-3 extracelular promove a ativação de vários tipos celulares tais como, mastócitos, neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos através da sua ligação com glicoconjugados localizados na superfície celular (Zuberi *et al.*, 2004). Bernardes e colaboradores (2006) mostraram que a ausência de Gal-3, em camundongos deficientes desta lectina, afeta a migração de macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e linfócitos em vias diferentes dependendo da condição experimental. Além disso, a expressão de Gal-3 é aumentada quando monócitos diferenciam-se em macrófagos e diminuída quando essas células diferenciam-se em células dendríticas, sugerindo que essa proteína pode ter funções especificamente associada com estágios particulares de diferenciação na linhagem celular dos monócitos (Sano *et al.*, 2003).

A população celular dos SEGAs foi constituída por células fusiformes e epitelióides grandes e por células gigantes dispostas principalmente ao redor dos vasos sanguíneos. Células gigantes, alongadas, com nucléolo proeminente também estavam dispostas ao redor de vasos sanguíneos. Nangia-Makker e colaboradores (2000) mostraram que a Gal-3 extracelular induz a formação do tubo capilar endotelial *in vitro* e angiogênese *in vivo*.

Investigações sobre a expressão de Gal-3 em tumores cerebrais foram realizadas para estabelecer diagnóstico diferencial de gliomas. Neder e colaboradores (2004) mostraram que o nível de expressão de Gal-3 pode ser útil para a discriminação de glioblastomas de oligodendrogliomas, assim como de astrocitomas pilocísticos de astrocitomas difusos. Alguns estudos sugerem que a expressão aumentada de Gal-3 em tumores está associada com sua progressão (Califice *et al.*, 2004). Outros pesquisadores insistem que a alta expressão de Gal-3 pode ser um marcador útil para malignidade, especialmente em carcinomas hepatocelular (Hsu *et al.*, 1999) e de tireóide (Aron *et al.*, 2006).

Biomarcadores são utilizados rotineiramente no prognóstico e diagnóstico de patologias e recentemente reconhecidos como uma ferramenta útil para o desenvolvimento de

drogas (Lee & Hall, 2008). Nas áreas de diabetes, câncer, artrite reumatóide e doenças cardiovasculares o desenvolvimento de novos biomarcadores aumentou notavelmente (Lee & Hall, 2008). Um biomarcador baseado em um gene, proteína ou metabólitos de um paciente pode ser usado para identificar e avaliar o estágio de uma doença, determinar tratamentos e monitorar o progresso e o prognóstico de uma patologia (Lee & Hall, 2008).

Até agora, não foram relatados na literatura estudos sobre um marcador específico para essas células “balonadas” encontradas em displasia cortical focal tipo IIB ou Taylor, hemimegalencefalia e TSC, patologias classificadas como malformações do desenvolvimento cortical.

Estas células neuroniais aberrantes imunomarcadas com Gal-3, assim como, oligodendrócitos e micróglias (não ativadas ou reativas), não estão presentes em tecido humano normal, tanto no embrião como no adulto. Essa omissão de marcação em tecido humano normal demonstra a especificidade e seletividade do anticorpo primário anti-Gal-3 para as *balloon cells* e neurônios citomegálicos. Deste modo, a expressão de Gal-3 em TSC e na DCF tipo Taylor sugere a sua utilização como um biomarcador histopatológico para uso em diagnóstico, além de uma ferramenta para o estudo destas patologias e para o conhecimento das ações desta proteína nas células alvo e fluídos biológicos.

CONCLUSÕES

Conclusões

Nos TCs a Gal-3 foi expressa em astrócitos reativos, micróglia, *balloon cells* e neurônios dismórficos gigantes.

Neurônios dismórficos gigantes imunomarcados com Gal-3 foram detectados nas substâncias cinzenta e branca corticais.

Nos SEGAs, astrócitos gigantes e *balloon cells* expressaram Gal-3.

Diferentes intensidades de marcação de Gal-3 foram detectadas no citoplasma e núcleo de *balloons cells* e de neurônios citomegálicos dismórficos.

Neurônios com morfologia normal não foram imunomarcados pelo anticorpo anti-Gal-3 presentes no córtex normal.

Do mesmo modo que na displasia cortical focal IIB – tipo Taylor (AR Martins comunicação pessoal), *balloon cells* localizadas em áreas displásicas do córtex cerebral de pacientes com TSC também expressaram Gal-3. Sendo assim, sugere-se utilizar a expressão de Gal-3 como um biomarcador histopatológico para diagnóstico e como ferramenta para o estudo desta patologia.

REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS

Referências bibliográficas

- AGRWAL, N.; SUN, Q.; WANG, S.Y. and WANG, J.L. Carbohydrate-binding protein 35. Properties of the recombinant polypeptide and the individuality of the domains. **J. Biol. Chem.** 268: 18250-18258, 1993.
- AKAHANI, S.; NANGIA-MAKKER, P.; INOHARA, H.; KIM, H.R.C. and RAZ, A. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. **Cancer Res.** 27: 3595-3602, 1997.
- ALMKVIST, J. and KARLSSON A. Galectins as inflammatory mediators. **Glycoconj. J.** 19 (7-9): 575-581, 2004.
- ARON, M.; KAPILA, K. and VERMA K. Utility of galectin-3 expression in thyroid aspirates as a diagnostic marker in differentiating benign from malignant thyroid neoplasms. **Indian J. Pathol. Microbiol.** 49: 376-380, 2006.
- BARKOVICH, A.J.; KUZNIECKY, R.I.; DOBYNS, W.B.; JACKSON G.D.; BECKER, L.E. and EVRARD, P. A classification scheme for malformations of cortical development. **Neuropediatrics.** 27: 59-63, 1996.
- BARKOVICH, A.J.; KUZNIECKY, R.I.; JACKSON, G.D.; GUERRINI, R. and DOBYNS W.B. A development and genetic classification for malformations of cortical development. **Neurology.** 65: 1873-1887, 2005.
- BARONDES, S.H.; COOPER, D.N.; GITT, M.A. and LEFFLER, H. Structure and Function of a large family of animal lectins. **The J. Biol. Chemistry.** 269 (19): 20807-20810, 1994.
- BECKER, A.J.; URBACH, H.; SCHEFFLER, B.; BADEN, T.; NORMANN, S.; LAHL, R.; PANNEK, H.; TUXHORN I.; ELGER, C.E.; SCHRAMM, J.; WIESTLER, O.D. and BLÜMCKE. Focal cortical dysplasia of Taylor's balloon cell type: mutational analysis of the TSC1 gene indicates a pathogenic relationship to tuberous sclerosis. **Ann. Neurology.** 52: 29-37, 2002.

- BECKER, E.B.E. and BONNI, A. Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. **Progress in Neurobiology**. 72: 1-25, 2004.
- BERNARDES, E.S.; SILVA, N.M.; RUAS, L.P.; MINEO, J.R.; LOYOLA, A.M.; HSU, D.K.; LIU, F.T.; CHAMMAS, R. and ROQUE-BARREIRA, M.C. Toxoplasma gondii infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. **Am. J. Pathol.** 168 (6): 1910-1920, 2006.
- CALIFICE, S.; CASTRONOVO, V. and VAN DEN BRULE, F. Galectin-3 and cancer. **Int. J. Oncol.** 25: 983-992, 2004.
- COWLES, E.A.; AGRWAL, N.; ANDERSON, R.L. and WANG, J.L. Carbohydrate-binding protein 35. Isoelectric points of the polypeptide and a phosphorylated deriviate. **J. Biol. Chem.** 265: 17706-17712, 1990.
- CRINO, P.B.; TROJANOWSKI, J.Q.; DICHTER, M.A. and EBERWINE, J. Embryonic neuronal markers in tuberous sclerosis: single-cell molecular pathology. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93 (24): 14152-14157, 1996.
- CURATOLO, P.; VERDECCHIA, M. and BOMBARDIERI, R. Tuberous sclerosis complex: a review of neurological aspects. **Eur. J. Pediatr. Neurol.** 6 (1): 15-23, 2002.
- DUMIC, J.; DABELIC, S. and FLÖGEL, M. Galectin-3: An open-ended story. **Biochimica et Biophysica acta.** 1760: 616-635, 2006.
- ERBAYAT-ALTAY, E.; ZENG, L.; XU, L.; GUTMANN, D.H. and WONG, M. The natural history and treatment of epilepsy in a murine model of tuberous sclerosis. **Epilepsia.** 48(4): 1470-1476, 2007.
- FAUSER, S.; BECKER, A.; SCHULZE-BONHAGE, A.; HILDEBRANDT, M.; TUXHORN, I.; PANNEK, W,H.; LAHL, R.; SCHRAMM, J. and BLÜMCKE, I. CD34-immunoreactive balloon cells in cortical malformations. **Acta Neuropathol.** 108: 272-278, 2004.
- FRAENKEL-CONRAT, H.; BRANDON, B.A. and OLCOTT, H.S. The reaction of formaldehyde with proteins. Participation of indole groups. Gramicidin. **J. Biol. Chem.** 168: 99-118, 1947.

- FREILINGER A.; ROSNER, M. and HENGSTSCHLAGER, M. Tuberin negatively affects BCL-2's cell survival function. **Amino Acids**. 30: 391-396, 2006a.
- FREILINGER A.; ROSNER, M.; KRUPITZA, G.; LUBEC, G.; KORSMEYER, S.J. and HENGSTSCHLAGER, M. Tuberin activates the proapoptotic molecule BAD. **Oncogene**. 25: 6467-6479, 2006b.
- HIROSE, T.; SCHEITHAUER, B.W.; LOPES, M.B.S.; GERBER, H.A.; ALTERMATT, H.J.; HUKKEE, M.J.; VANDENBERG, S.R. and CHARLESWORTH, J.C. Tuber and subependymal giant cell astrocytoma associated with tuberous sclerosis: an immunohistochemical, ultrastructural, and immunoelectron microscopy study. **Acta Neuropathol**. 90: 387-399, 1995.
- HOLMES, G.L. and STAFSTROM, C.E. Tuberous sclerosis complex and epilepsy: recent developments and future challenges. **Epilepsia**. 48 (4): 617-630, 2007.
- HOYER, P.E.; LYON, H.; PRENTO, P.; VAN DEURS, B.; HASSELAGER, E. and ANDERSEN, A.P. Tissue processing: III. Fixation, General Aspects. In: Theory and Strategy in Histochemistry. **H. Lyon (Ed.)**. p.171-174, 1991.
- HSU, D.K.; DOWLING, C.A.; JENG, K.C.; CHEN, J.T.; YANG, R.Y. and LIU, F.T. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. **Int. J. Cancer**. 81: 519-526, 1999.
- HUFLEJT, M.E., TURCK, C.W.; LINDSTEDT, R.; BARONDES, S.H. and LEFFLER, H. L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine12 in vivo and by casein kinase I. **J. Biol. Chem**. 268: 26712-26718, 1993.
- HUNT, A. and SHEPHERD, C. A prevalence study of autism in tuberous sclerosis. **J. Autism Dev. Disord**. 23: 323-339, 1993.
- HUTTENLOCHER, P.R. and WOLLMAN, R.; L. Cellular neuropathology of tuberous sclerosis. **Ann. NY Acad. Sci**. 615: 40-148, 1991.
- JOZWIAK, S.; SCHWARTZ, R.A.; JANNINGER, C.K. and BIELICKA-CYMERMAN, J. Usefulness of diagnostic criteria of tuberous sclerosis complex in pediatric patients. **Journal of Child Neurology**. 15: 652-659, 2000.

- KAGAWA, K.; CHUGANI, D.C.; ASANO, E.; JUHÁSZ, C.; MUZIK, O.; SHAH, A.; SHAH, J.; SOOD, S.; KUPSKY, W.J.; MANGNER, T.J.; CHAKRABORTY, P.K. and CHUGANI, H.T. Epilepsy surgery outcome in children with Tuberous Sclerosis Complex evaluated with α -[^{11}C]Methyl-L-Tryptophan Positron Emission Tomography (PET). **Journal of Child Neurology**. 20(5): 429-438, 2005.
- KNIBBS, R.N.; AGRWAL, N.; WANG, J.L. and GOLDSTEIN, I.J. Carbohydrate-binding protein 35. Analysis of the interaction of the recombinant polypeptide with saccarides. **J. Biol. Chem.** 268: 14940-14947, 1993.
- KRUGLUGER W.; FRIGERI L.G.; LUCAS T.; SCHMER M.; FORSTER O.; LIU F.T. and 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**. 197: 97-109, 1997.
- KRZEŚLAK, A. and LIPINSKA, A. Galectin-3 as a multifunctional protein. **Cell. Mol. Biol. Lett.** 9 (2): 305-328, 2004.
- KUKLINSKI, S.; VLADIMIROVA, V.; WAHA, A.; KAMATA, H.; PESHEVA, P. and PROBSTMEIER, R. Expression of galectin-3 in neuronally differentiating PC12 cells is regulated both via Ras/MAPK-dependent and-independent signaling pathways. **J. Neurochem.** 87: 1112-1124, 2003.
- LAEMMLI, U.K. and FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. **J. Mol. Biol.**, 80: 575-599, 1973.
- LAINING, J.G. and WANG, J.L. Identification of carbohydrate binding protein. **Biochemistry**. 27: 5329-5334, 1988.
- LEE, J.W. and HALL, M. Method validation of protein biomarkers in support of drug development or clinical diagnosis/prognosis. **J. of Chromatography B**. Nov. 18, 2008.
- LEE, Y.J.; SONG, Y.K.; SONG, J.J.; SIERVO-SASSI, R.R.; KIM, H.R.; LI, L.; SPITZ, D.R.; LOKSHIN, A. and KIM, J.H. Reconstitution of galectin-3 alters glutathione content and potentiates TRAIL-induced cytotoxicity by dephosphorylation of Akt. **Exp. Cell Res.** 288: 21-34, 2003.

- LIN, H.M.; PESTELL, R.G.; RAZ, A. and KIM, H.R. Galectin-3 enhances cyclin D (1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. **Oncogene**. 21: 8001-8010, 2002.
- LIU, F.T. S-type mammalian lectins in allergic inflammation. **Immunol. Today**. 14: 486-490, 1993.
- LOPES, M.B.S.; ALTERMATT, H.J.; SCHEITHAUER, B.W.; SHEPHERD, C.W. and VANDENBERG, S.R. Immunohistochemical characterization of subependymal giant cell astrocytomas. **Acta Neuropathol**. 91: 368-375, 1996.
- LUAT, A.F.; MAKKI, M. and CHUGANI, H.T. Neuroimaging in tuberous sclerosis complex. **Curr. Opin. Neurol**. 20: 142-150, 2007.
- MARTINS, A.R.; DIAS, M.M.; VASCONCELOS, T.M.; CALDO, H.; COSTA, M.C.R.; CHIMELLI, L. and LARSON, R.E. Microwave-stimulated recovery of myosin-V immunoreactivity from formalin-fixed, paraffin-embedded human CNS. **Journal of Neurosci. Methods**. 92: 25-29, 1999.
- MATARRESE, P.; FUSCO, O.; TINARI, N.; NATOLI, C.; LIU, F.T.; SEMERAPO, M.L.; MALORNI, W. and IACOBELLI, S. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. **Int. J. Cancer**. 85(4): 545-554, 2000.
- MAZUREK, N.; CONKLIN, J. BYRD, J.C. RAZ, A. and BRESALIER, R.S. Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. **J. Biol. Chem**. 275: 36311-36315, 2000.
- MIRRA, S.S.; HART, M.N. and TERRY, R.D. Making the diagnosis of Alzaimers's disease. A primer for practicing pathologists. **Arch. Pathol. Lab. Med**. 177(2): 129-131, 1993.
- MIZOGUCHI, M.; IWAKIT, T.; MORIOKA, T.; FUKUI, M. and TATEISHI, J. Abnormal cytoarchitecture of cortical dysplasia verified by immunohistochemistry. **Clin. Neuropathol**. 17 (2): 100-109, 1998.
- NANGIA-MAKKER, P.; HONJO, Y.; SARVIS, R.; AKAHANI, S.; HOGAN, V.; PIENTA, K.J. and RAZ, A. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. **American J. of Pathology**. 156 (3): 899-909, 2000.

- NEDER, L.; MARIE, S.K. and CARLOTTI, C.G.JR. Galectin-3 as an immunohistochemical tool to distinguish pilocytic astrocytomas from diffuse astrocytomas, and glioblastomas from anaplastic oligodendrogliomas. **Brain Pathology**. 14: 399-405, 2004.
- OPPENHEIM, R.W. Cell death during development of the nervous system. **Annu. Rev. Neuroscience**. 14: 453-501, 1991.
- PALMINI, A.; NAJM, I.; AVANZINI, G.; BABB, T.; GUERRINI, R.; FOLDVARY-SCHAEFER, N.; JACKSON, G.; LUDERS, H.O.; PRAYSON, R.; SPREAFICO, R. and VINTERS, H.V. Terminology and classification of the cortical dysplasias. **Neurology**. 62: 2-8, 2004.
- PAN, D.; DONG, J.; ZHANG, Y. and GAO, X. Tuberous sclerosis complex: from drosophila to human disease. **Trends in Cell Biology**. 14: 78-85, 2004.
- PARK, S.-H.; MIN, H.S.; KIM, B.; MYUNG, J. and PAEK, S.H. Galectin-3: a useful biomarker for differential diagnosis of brain tumors. **Neurophatology**. Apr. 1, 2008.
- PESHEVA, P.; KUKLINSKI, S.; BIERSACK, H. and PROBSTMEIER, R. Nerve growth factor-mediated expression of galectin-3 in mouse dorsal root ganglion neurons. **Neurosc. Letters**. 293: 37-40, 2000.
- PESHEVA, P.; KUKLINSKI, S.; SCHMITZ, B. and PROBSTMEIER, R. Galectin-3 promotes neural cell adhesion and neurite growth. **J. Neurosci. Res**. 54: 639-654, 1998.
- POMEROY, S.L. and PURVES, D. Neuron/glia relationships observed over intervals of several months in living mice. **J. Cell Biol**. 107 (3): 1167-1175, 1988.
- PROBSTMEIER, R.; MONTAG, D. and SCHACHNER, M. Galectin-3, a β -Galactoside-Binding animal lectin, binds to neural Recognition Molecules. **J. Neurochem**. 64 (6): 2465-2472, 1995.
- PURVES, D. and LICHTMAN, J.W. Elimination of synapses in the developing nervous system. **Science**. 210: 153-157, 1980.
- PURVES, D.; SNIDER, W.D. and VOYVODIC, J.T. Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. **Nature**. 336(10): 123-128, 1988.

- REICHERT, F.; SAADA, A. and ROTSHENKER, S. Peripheral nerve injury induces Schwann cells to express two macrophage phenotypes: phagocytosis and the galactose-specific lectin Mac-2. **J. Neurosci.** 14: 3231-3245, 1994.
- ROACH, E.S. and SPARAGANA, S.P. Diagnosis of tuberous sclerosis complex. **Journal of Child Neurology.** 19 (9): 643-649, 2004.
- ROACH, E.S.; DiMARIO, F.J.; KANDT, R.S. and NORTHRUP, H. Tuberous sclerosis consensus conference: recommendations for diagnostic evaluation. **Journal of Child Neurology.** 14 (6): 401-407, 1998.
- SANO, H.; HSU, D.K.; APGAR, J.R.; YU, L.; SHARMA, B.B.; KUWABARA, I.; IZUI, S. and LIU, F.T. Critical role of galectina-3 in phagocytosis by macrophages. **The J. of Clinical Investigation.** 112 (3): 389-397, 2003.
- SHI, S.R.; COTE, R.J. and TAYLOR, C.R. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. **J. of Histochemistry and Cytochemistry.** 45: 327-343, 1997.
- SHI, S.R.; IMAM, S.A.; YOUNG, L.; COTE, R.J. and TAYLOR, C.R. Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. **J. of Histochemistry and Cytochemistry.** 43 (2): 193-201, 1995.
- SHI, S.R.; KEY, M.E. and KRISHAN, L.K. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. **The J. of Histochemistry and Cytochemistry.** 39 (6): 741-748, 1991.
- SHICK, V.; MAJORES M.; ENGELS, G.; HARTMANN W.; ELGER, C.E.; SCHRAMM J.; SCHOCH S. and BECKER A.J. Differential Pi3K-pathway activation in cortical tubers and focal cortical dysplasias with balloon cells. **Brain Pathology.** 17: 165-173, 2007.
- SIDMAN, R.L. and RAKIC P. Neuronal migration disorders, with special reference to developing human brain: a review. **Brain Res.** 62: 1-35, 1973.
- TASSI, L.; COLOMBO, N.; GARBELLI, R.; FRANCIONE, S.; LO RUSSO, G.; MAI, R.; CARDINALE, F.; COSSU, M.; FERRARIO, A.; GALLI, C.; BRAMERIO, M.;

- CITTERIO, A. and SPREAFICO, R. Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome. **Brain**. 125: 1719-1732, 2002.
- TAYLOR, D.C.; FALCONER, M.A.; BRUTON, C.J. and CORSELLIS, J.A. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**. 34: 369-387, 1971.
- TORRES, O.A.; ROACH, E.S. and DELGADO, M.R. Early diagnosis of subependymal giant cell astrocytoma in patients with tuberous sclerosis. **Journal of Child Neurology**. 13: 173-177, 1998.
- TOWBIN, H.; STAEHELIN, T. and GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 76: 4350-4354, 1979.
- VAN DEN BRÛLE, F.A.; CALIFICE, S. and CASTRONOVO, V. Expression of galectins in câncer: a critical review. **Glicoconj. J.** 19: 537-542, 2004.
- VAN DEN BRÛLE, F.A.; FERNANDEZ, P.L.; BUICU, C.; LIU, F.; JACKERS, P.; LAMBOTTE, R. and CASTRONOVO, V. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 during first trimester human embryogenesis. **Developmental Dynamics**. 209: 399-405, 1997.
- WONG, S.S. Chemistry of protein conjugation and cross-linking. Boca Raton, FL, Ann Arbor, MI, Boston, London, **CRC Press**. p. 1-48, 1991.
- YANG, R.Y.; HSU, D.K. and LIU, F.T. Expression de galectin-3 modulates T-cell growth e apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 93: 6737-6742, 1996.
- YU, F.; FINLEY JR, R.L.; RAZ, A. and KIM, H.R.C. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranas and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. **J. Biol. Chem.** 277: 15819-15827, 2002.
- ZANARDO, R.C.; COSTA, E.; FERREIRA, H.H.; ANTUNES, E.; MARTINS, A.R.; MURAD, F. and DE NUCCI, G. Pharmacological and immunohistichemical evidence for a functional nitric oxide synthase system in rat peritoneal eosinophils. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 94: 14111-14114, 1997.

ZÖRNIG, M.; HUEBER, A.-O.; BAUM, W. and EVAN, G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1551: F1-F37, 2001.

ZUBERI, R.I.; HSU, D.K.; KALAYCI, O.; CHEN, H.-Y.; SHELDON, H.K.; YU, L.; APGAR, J.R.; KAWAKAMI, T.; LILLY, C.M. and LIU, F.T. Critical role for galectina-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asma. **American J. of Pathology**. 165 (6): 2045-2053, 2004.

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](#)