UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo da interação de galectina-1 e mastócitos

Daniel Roberto Callejon

Ribeirão Preto

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo da interação de galectina-1 e mastócitos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientado: Daniel Roberto Callejon

Orientador: Prof^{o}. Dr^{o}. Marcelo Dias Baruffi

RIBEIRÃO PRETO

2008

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Callejon,Daniel Roberto

Estudo da interação de galectina-1 e mastócitos. Ribeirão Preto, 2008. 122p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP - Área de concentração:Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientador:Marcelo Dias Baruffi.

1. Galectina-1. 2. Mastócito. 3. Inflamação. 4. Desgranulação. 5. Apoptose.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Daniel Roberto Callejon

Título: Estudo da interação de galectina-1 e mastócitos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Marcelo Dias Baruffi

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha Família,

Meu Pai, José Roberto,

Minha Mãe, Maria Lúcia,

Minhas Irmãs Ana Lúcia e Ana Laura,

Qualquer palavra escrita seria pouco para demonstrar toda gratidão que tenho por vocês. Agradeço todo amor, carinho, compreensão e apoio que vocês me ofertaram, nos momentos de solidão, de desânimo, de dúvida, de tristeza e por compartilhar os momentos de alegria, felicidade e sucesso. Sou eternamente grato por tudo o que vocês fizeram por mim e por me mostrar como é bom ter uma família. Obrigado por fazerem parte de minha vida. Vocês sempre estarão em meu coração e em meus pensamentos...

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Pelo dom da vida...

Ao Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi,

Pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Agradeço a orientação, a confiança, o respeito, a amizade e, sobretudo pelos ensinamentos científicos. Tenho na sua pessoa o exemplo de dedicação à pesquisa e ao ensino. Sou muito grato por tudo. *"Eu aprendi que o sucesso deve ser medido não tanto pela posição que alguém alcançou na vida e sim pelos obstáculos que teve que ultrapassar enquanto tentava alcançar o sucesso." (Booker T. Washington)*

Aos Docentes e alunos do laboratório de Biologia Celular e Molecular dos Mastócitos, Anderson, Adriana, Cláudia, Júnior, Liliana, Lorena, Patrícia, Vivian, especialmente ao Rodrigo,

Pela ajuda no desenvolvimento deste projeto, agradeço a paciência, apoio, disponibilidade e amizade. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho. Foi ótimo poder contar com vocês.

Ao Prof. Dr. Roy Larson e ao Lenaldo,

Pela oportunidade do uso do microscópio confocal e pelo auxílio nas análises das imagens.

Aos membros e docentes do Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses (LIIP) e especialmente Carlos Sorgi,

Pelo apoio e disposição na execução dos experimentos.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e em especial aos seguranças Henrique, Paulo, Lima, Reinaldo, técnico do biotério da FCFRP, Fabiana, Zita, Tânia,

Pela amizade, pela disposição e pelas brincadeiras que faziam o cotidiano mais divertido.

Aos funcionários José augusto, Maria Dolores e Maria Teresa,

Pelo apoio técnico nos ensaios de microscopia eletrônica.

À Beatriz,

Por todo amor, carinho, compreensão, dedicação e apoio incondicional. Por mostrar que a vida é mais bela quando se ama alguém...principalmente alguém tão especial como você...Te amo. *"Amar é... sorrir por nada e ficar triste sem motivos, / é sentir-se só no meio da multidão, / é o ciúme sem sentido, / o desejo de um carinho; / é abraçar com certeza e beijar com vontade, / é passear com a felicidade, / é ser feliz de verdade!" (Albert Camus)*

À toda a minha família, meus tios, primos e avós,

Que sempre me apoiaram e confiaram no meu trabalho e dedicação. Agradeço a vocês todos

Aos amigos Norberto, Thaís, Rodrigo, Paulo Daniel, **Carlos Carollo e Dalton,**

Por toda amizade demonstrada nestes anos. É difícil traduzir em palavras todo o carinho e gratidão que tenho por vocês. Vocês sempre estiveram ao meu lado independente da situação...Muito obrigado por fazerem parte da minha vida. *"Amizade é a coisa mais difícil do mundo de se explicar. Não é uma coisa que se aprende na escola. Mas, se você não aprendeu o significado da amizade, você realmente não aprendeu nada." (Muhammad Ali - Cassius Clay)*

Ao Dênis,

Por toda amizade e companherismo. O amigo sempre presente, companheiro para qualquer situação e principalmente para uma pescaria. Você sempre será um exemplo de amizade e alegria. Agradeço a Deus pela honra de ter um amigo como você. *Quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se encontre, jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudades, mas não estará só. (Amyr Klink)*

Aos membros eternos, atuais e itinerantes da república, Augusto, Ricardo, Samuel, Guilherme, Fernando, Cézar, Juliano, Gerson e Marco,

Agradeço o convívio e a amizade. Sempre lembrarei com alegria das eternas discussões científicas a beira da churrasqueira, dos jogos de futebol na TV na quarta-feira, da louça suja sem dono, dos almoços de domingo e das festas em

casa. Vocês foram exemplo de companheirismo e cada qual com sua virtude contribuíram para minha formação. Sou eternamente grato por todos vocês. *"Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas recordações". (Vinícios de Moraes)*

Á Marlise,

Pela colaboração e apoio na execução do trabalho e principalmente pela amizade, por sempre estar presente nos momentos difícies e de dúvida, por sempre ter uma palavra de incentivo. Sou muito grato por todos estes anos de convívio e, sobretudo pela amizade.

Aos amigos do Laboratório, Camilo, Danyelle, Helder, Juliana, Marcella, Michele, Miriam, Natália, Rubens, Thalita e William,

Pela amizade e pelos momentos de alegria, entusiamos, trabalho até de stress compartilhados durante estes anos. Obrigado por terem participado deste importante momento de minha vida. *"O encanto da vida depende unicamente das boas amizades que cultivamos". (Malba Tahan)*

Aos amigos da Pós-Graduação, Carla, Camila, Maurício, Vicente, Carla, Wagner, Luciano, Gabriela, Letícia, Saulo,

Por todos os momentos que passamos juntos, entre discussões, risos e trabalho. Sou grato pela amizade de vocês. Sempre lembrarei com alegria os momentos compartilhados. Foi ótimo trabalhar com vocês.

Aos funcionários e amigos da AADM, Cristina, João, Daniela, Daniel Cerri, Carla, Cláudia, Angélica, Giovana e especialmente a Lílian,

Por todo apoio, incentivo e colaboração na fase final deste trabalho.

A FAPESP e CNPq,

Pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse concluído.

RESUMO

RESUMO

CALLEJON, D.R. **Estudo da interação de galectina-1 e mastócitos**. 2008. 122f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A galectina-1 (Gal-1) pertence à uma família de proteínas ligantes de β-galactosídeos e participa de vários processos biológicos, tais como a modulação da resposta inflamatória. Os mastócitos desempenham um importante papel em eventos inflamatórios e alérgicos. Entretanto, o impacto da Gal-1 na biologia dos mastócitos é pouco conhecido. Neste trabalho, foram analisados os aspectos morfológicos e funcionais de células RBL-2H3 tratadas com Gal-1. Além disso, foi investigado o efeito da ausência de Gal-1 endógena sobre a desgranulação *in vivo*. A avaliação da interação de Gal-1Texas-Red com células RBL-2H3, por citometria de fluxo, indicou que esta lectina ligou-se às superfícies dessas células de modo dose-dependente. A Gal-1 foi capaz de promover a exposição de fosfatidilserina (FS, um marcador de apoptose) nas superfícies dessas células por meio de reconhecimento de carboidratos. Entretanto, as células RBL-2H3 tratadas com Gal-1 não apresentaram apoptose e/ou necrose, como indicado pelos resultados obtidos dos ensaios de TUNEL, *DNA laddering*, hipodiploidia, citotoxicidade e microscopia eletrônica de transmissão. As análises de microscopia eletrônica de varredura e *Differential Interference Contrast* (DIC) de células tratadas com Gal-1 (10 µM-1 hora) indicaram que essa lectina induziu ondulações apenas nas porções apicais das membranas plasmáticas de células RBL-2H3. Além disso, a Gal-1 modulou negativamente a formação de ondulações nas superfícies de células RBL-2H3 estimuladas via FcεRI. A distribuição de componentes de *Lipid Rafts* relacionados ao processo de ativação celular via FcεRI (Lyn, LAT e GD1b) foi modificada pelo tratamento dessas células com Gal-1 (10 µM), por 1 hora. As células RBL-2H3 tratadas com Gal-1(10µM-45 minutos) apresentaram níveis de liberação da enzima β-hexosaminidase (β-HEX) semelhantes ao do controle negativo, sugerindo que essa lectina não promove a desgranulação de células RBL-2H3. Por outro lado, a Gal-1 inibiu a desgranulação de células RBL-2H3 ativadas via FcεRI. O valor máximo de inibição (80%) da liberação de β-HEX foi atingido quando as células foram tratadas com 10 µM de Gal-1 por 24 horas. Este efeito inibitório não foi detectado quando as células foram tratadas com Gal-1 na presença de β-D-Tiogalactopiranosídeo (TDG), quando estimuladas com ionóforo de cálcio ou tratadas com a forma monomérica da Gal-1. Os dados de microscopia confocal mostraram que os grânulos secretórios de células submetidas ao procedimento de estimulação via FcεRI, foram fracamente marcados com o anticorpo AD1 e apresentaram uma distribuição citoplasmática difusa. Entretanto, células tratadas com Gal-1 (10 µM - 24 horas) e estimuladas via FcεRI foram intensamente marcadas com anticorpo AD1 e mostraram um padrão perinuclear, como detectado em células não estimuladas. De modo interessante, camundongos deficientes para o gene de Gal-1 quando submetidos ao ensaio de anafilaxia passiva cutânea (PCA) apresentaram uma reação significativamente maior que os animais selvagens. Com base no conjunto de resultados obtidos sugere-se que a Gal-1 pode participar da homeostase de mastóctios sem provocar apoptose e/ou necrose dessas células. Além disso, a Gal-1 pode modular o processo de exocitose de mastócitos por meio das propriedades lectínica e de dimerização dessa proteína e esse efeito

modulatório parece estar associado a eventos de sinalização celular anteriores ao influxo de cálcio.

Palavras-chaves: Galectina-1, Mastócito, Inflamação, Desgranulação, Apoptose.

ABSTRACT

ABSTRACT

CALLEJON, D.R. **Study of the interaction between Gal-1 and mast cell**. 2008. 122f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Galectin-1 (Gal-1) belongs to a family of β-galactoside-binding proteins and is involved in several biological processes, including modulation of the inflammatory response. Mast cells play a critical role in allergic and inflammatory events, however, little is known about the impact of Gal-1 on mast cell biology. In this study, we examined the role of Gal-1 in mast cell function using RBL-2H3 (Rat Basophilic Leukemia) and galectin-1 deficient mice. We report that Gal-1 recognized glycoconjugates on mast cells and this interaction promotes phosphatidylserine (PS) exposure in the absence of cell death or apoptosis. Morphological analysis of Gal-1-treated RBL-2H3 cells, by scanning electron microscopy and Differential Interference Contrast (DIC), indicated that Gal-1 induces modifications on cell membranes and modulation of ruffles formation on cell surface of stimulated RBL-2H3 cells. Interesting, Gal-1 treatment of RBL-2H3 cells, with or without stimulation, promotes alterations in the distribution of the components (Lyn, LAT and GD1b) of Lipid Rafts. Gal-1 did not promote degranulation on RBL-2H3 with or without prior sensitization with IgE. However, Gal-1 treatment inhibits the cell degranulation mediated by via FcεRI and this effect was time and dose-dependent. Also, this inhibition was related to carbohydrate recognition domain and required Gal-1 dimerization. Importantly, confocal microscopy analysis showed that Gal-1 was distributed in cytoplasm close to secretory granules stained AD-1 antibody on RBL-2H3 with or without prior stimulation with FcεRI. In addition, we found significantly increased passive cutaneous anaphylaxis reaction in Gal-1 deficient mice. The results demonstrated that Gal-1 may participate of homeostasis and exocytose in mast cells suggesting that Gal-1 can have important role in allergic and inflammatory process.

Key word: Galectin-1, Mast Cell, Inflammation, Degranulation, Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Interação entre lectinas e glicanas	2
Figura 2. Classificação das galectinas em relação ao DRC	6
Figura 3. Estrutura do receptor de alta afinidade para IgE (FcεRI).	16
Figura 4. Esquema da via de transdução de sinal em mastócitos	20
Figura 5. Perfil cromatográfico da purificação da Gal-1 a partir de extrato de *E. coli*	51
Figura 6. Perfil do procedimento de re-cromatografia das preparações da galectina-1 recombinante humana em coluna de agarose-lactose	51
Figura 7. Perfil da atividade hemaglutinante das preparações de Gal-1 e CAM-Gal-1	53
Figura 8. Gal-1 liga-se a superfícies de células RBL-2H3	54
Figura 9. Células RBL-2H3 permaneceram viáveis após o tratamento com Gal-1	55
Figura 10. TDG e Sacarose não interferem na viabilidade das células RBL-2H3	56
Figura 11. O tratamento de células RBL-2H3 com Gal-1 na presença de carboidratosa não provocou a morte dessas células	56
Figura 12. A exposição de fosfatidilserina nas superfícies de células RBL-2H3 tratadas com Gal-1 foi dependente do reconhecimento de glicoconjugados	58
Figura 13. Células RBL-2H3 tratadas com Gal-1 não apresentaram degradação de DNA	59
Figura 14. Análise eletroforética do DNA de células RBL-2H3 tratadas com Gal-1	60
Figura 15. Gal-1 não alterou o conteúdo de DNA das células RBL-2H3	61
Figura 16. Gal-1 não induziu alterações ultraestruturais indicativas de apoptose em células RBL-2H3	63
Figura 17. Gal-1 induziu alterações morfológicas nas células RBL-2H3	65
Figura 18. Gal-1 induziu ondulações na superfície de células RBL-2H3 e modificou o padrão dos *ruffles* produzidos pela ativação dessas células via FcεRI	67
Figura 19. Gal-1 interferiu na distribuição de componentes de *lipis rafts* em células RBL-2H3 estimuladas ou não	71
Figura 20. Gal–1 não induz a desgranulação de células RBL-2H3 não sensibilizadas	73
Figura 21. Gal–1 não induz a desgranulação em células RBL-2H3 sensibilizadas com IgE	74
Figura 22. CAM-Gal-1 inibe a desgranulação de células RBL-2H3 de modo dose-dependente	75
Figura 23. CAM-Gal-1 inibiu a desgranulação de células RBL-2H3 sensibilizadas em função do tempo de tratamento	76

Figura 24. O efeito inibitório da CAM-Gal-1 sobre a desgranulação de células RBL-2H3 sensibilizadas é dependente da propriedade lectínicas e da dimerização dessa lectina	78
Figura 25. CAM-Gal-1 não inibiu a desgranulação de células RBL-2H3 estimuladas com ionóforo de cálcio	79
Figura 26. CAM-Gal-1 não interferiu na desgranulação de células RBL-2H3 estimuladas com ionóforo de cálcio	80
Figura 27. Camundongos deficientes para o gene galectina-1 apresentam um aumento da reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA)	81
Figura 28. CAM-Gal-1 não modificou a distribuição dos filamentos de actina em células RBL-2H3 sensibilizadas com IgE e a ligação foi dependente do reconhecimento de glicoconjugados	84
Figura 29. Localização da CAM-Gal-1 em células RBL-2H3	85
Figura 30. Localização da A CAM-Gal-1 em células RBL-2H3 estimuladas via FcεRI	86
Figura 31. Distribuição dos grânulos secretórios e CAM-Gal-1 em células RBL-2H3 sensibilizadas com IgE	89
Figura 32. A distribuição dos grânulos secretórios em células RBL-2H3 tratadas com CAM-Gal-1 e estimuladas via FcεRI	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-ME	2β-mercaptoetanol
b-FGF	*Fibroblast Growth Factor*
β-HEX	Beta-hexosaminidase
CAM-GAL-1	Gal-1 derivatizada com iodocetamida
CPT	Camptotecina
CTMC	*Conective Tissue Mast Cell*
DAG	Diacilglicerol
DIC	Microscopia de contraste diferencial de interferência
DO	Densidade óptica
DRC	Domínio de reconhecimento de carboidrato
ERK	*Extracelular-signal-regulated kinase-1*
FcεRI	Receptor de alta afinidade para IgE
FcγRIIB	Receptor de baixa afinidade para IgG
FLCγ	Fosfolipase C γ
FLD	Fosfolipase D
FLA2	Fosfolipase A2
FS	Fosfatidilserina
Gal-1	Galectina-1
Gal-3	Galectina-3
GM-CSF	Fator estimulador de colônias granulócito/macrófago
GPI-AP	Proteínas ancoradas - glicofosfatidilinositol
Grb2	*Growth-factor-receptor bound protein 2*
IL	Interleucina
INFγ	Interferon γ
InsP3	Inositol-1,4,5trifosfato
IP	Iodeto de propídeo
ITAM	*Immunoreceptor Tyrosine-Based Activaction Motif*
ITIM	*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*
LAT	*Linker for activaction of T cell*

LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
MAFA	*Mast cell function-associated antigen*
MNCF	*Macrophage-derived neutrophil chemotatic factor*
JNK	*JUN amino-terminal kinase*
MAPKKK	*Mitogen-activated protein kinase*
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia de Eletrônica de Varredura
NAG	p-nitophenil-N-acetil-b-glucosamina
MMC	*Mucosal Mast Cell*
PAF	*Platelet Activing Factor*
PCA	Análise da anafilaxia cutânea passiva
PGD2	Prostaglandina-D2
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKC	*Protein kinase C*
PTEN	*Phosphatase and tensin homologue deleted on chromossome 10*
PTK	Proteína tirosino quinase
RBL-2H3	*Rat Basophilic Leukemia Cells*
RNA	Ácido ribonucleotideo
SCF	*Stem Cell Factor*
SHC	*SH2-dominian-containing transforming protein C*
SHIP	*SH2-contaning 5'inositol phophatase*
SHP-2	*SH2-contaning inositol phophatase 1/2*
SLP-76	*SH2-dominian-containingleukocyte protein of 76 kDa*
SNAREs	S*oluble N-ethylmaleimide attachament protein receptors*
SDS-PAGE	*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
Sos	*Son of sevenless homologue*
Syk	*Spleen tyrosine kinase*
TGF-β	*Transforming Growth Factor* β
TNF-α	*Tumor Necrosis Factor* α

Vav	*Guanine nucleotide exchange factor*
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*

SUMÁRIO

RESUMO	*i*
ABSTRACT	*iii*
Lista de figuras	*iv*
Lista de Abreviaturas e siglas	*vi*
1) INTRODUÇÃO	01
1.1) Lectinas	01
1.2) Galectinas	04
1.3) Galectina – 1 (Gal-1)	07
1.4) Gal-1 e o sistema imune	09
1.5) Mastócitos	12
1.5.1) Ativação dos mastócitos via FcεRI e a liberação de mediadores	15
1.5.2) Transdução de sinal via FcεRI	17
1.6) Lectinas, galectinas e mastócitos	22
2) OBJETIVO	25
3) MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1) Células RBL-2H3	26
3.2) Ativação das células RBL-2H3 via receptor de alta afinidade para a IgE (Fc□RI)	26
3.3) Ativação das células RBL-2H3 independente da via receptor Fc□RI	27
3.4) Produção da Galectina-1 Recombinante Humana Dimérica (Gal-1)	27
3.4.1) Obtenção do extrato bruto bacteriano da produção de Galectina-1 Recombinante Humana Dimérica (Gal-1)	27
3.4.2) Purificação da Galectina-1 (Gal-1) em gel de agarose-lactose	28
3.5) Controle da atividade lectínica de preparações de Gal-1 por hemaglutição	31
3.6) Análise da ligação entre Gal-1 nas células RBL-2H3 com Gal-1 TexasRed, por citometria de fluxo	32
3.7) Análise da viabilidade celular ou do processo de apoptose em células RBL-2H3 tratadas com Gal-1	33
3.7.1) Análise da viabilidade de células RBL-2H3	33
3.7.2) Indução da exposição de fosfatidilserina na superfície de células RBL-2H3	34
3.7.3) Análise da alteração do conteúdo de DNA em células RBL-2H3 tratadas com Gal-1, por citometria de fluxo	34
3.7.4) Análise do nível de indução de degradação de DNA em células RBL-2H3	35

tratadas com Gal-1 pela Reação de Tunel	
3.7.5) Determinação do nível de degradação de DNA em células tratadas com Gal-1, por eletroforese em gel de agarose	36
3.7.6) Análise ultraestrutural de células RBL-2H3 tratadas com Gal-1, por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	37
3.8) Avaliação dos efeitos da Gal-1 na morfologia e distribuição dos grânulos em células RBL-2H3, por microscopia	37
3.8.1) Microscopia de contraste diferencial de interferência (*Differential Interference Contraste* - DIC)	38
3.8.2) Microscopia de Eletrônica de Varredura (MEV)	38
3.8.3) Microscopia de Fluorescência	39
3.9) Avaliação do nível de organização dos *Lipids rafts*, por fracionamento subcelular em gradiente de sacarose	41
3.10) Investigação do papel da Gal-1 na desgranulação de células RBL-2H3.....	43
3.11) Análise da anafilaxia cutânea passiva (PCA - *Passive Cutaneous Anaphylaxis)* em camundongos deficientes em Gal-1	45
4) RESULTADOS	47
4.1) Obtenção da Galectina –1 recombinante humana	47
4.2) Análise da atividade hemaglutinante da Gal-1	49
4.3) Análise da Ligação da Galectina-1 em células RBL-2H3, por citometria de fluxo	50
4.4) Avaliação da viabilidade celular e da apoptose de células RBL-2H3 tratadas com Gal-1	51
4.4.1) Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de MTT	51
4.4.2) Análise da exposição de fosfatidilserina por citometria de fluxo	54
4.4.3) Avaliação da degradação de DNA pela reação de TUNEL e por análise eletroforética	56
4.4.4) Detecção de alteração do conteúdo de DNA celular por citometria de fluxo	58
4.4.5) Detecção de apoptose por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	59
4.5) Avaliação das alterações morfológicas do tratamento da Gal-1 de células RBL-2H3 (DIC e MEV)	61
4.5.1) Microscopia de contraste diferencial de interferência (DIC)	62
4.5.2) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	62
4.6) Análise da distribuição dos componentes dos *lipids rafts*	65
4.7) Avaliação do papel da Gal-1 na desgranulação de células RBL-2H3	68

4.7.1) Análise da capacidade indutora de desgranulação	69
4.7.2) Investigação do potencial inibitório da Gal-1 sobre a desgranulação	71
4.8) Avaliação da reação de anafilaxia passiva cutânea (PCA – *Passive Cutaneous Anaphylaxis*) em camundongos deficientes ou não para o gene da galectina-1	78
4.9) Análise das alterações do citoesqueleto de actina e da distribuição dos grânulos em células RBL-2H3 tratadas com Gal-1, por microscopia de fluorescência (confocal)	79
4.9.1) Avaliação do citoesqueleto de actina e da localização da Gal-1 por microscopia de fluorescência (confocal)	80
4.9.2) Avaliação da localização da Gal-1 e do anticorpo AD-1 (marcador de grânulos) por microscopia de fluorescência (confocal)	85
5) DISCUSSÃO	91
6 CONCLUSÃO	
6)REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Galectinas: uma família de lectinas de mamíferos

Lectinas são proteínas capazes de reconhecer carboidratos de modo específico: associados (glicoconjugados), ou não, a outras moléculas como proteínas e lipídeos (SHARON; LIS, 1986; LIS; SHARON, 1998; VARKI *et al.,* 1999). Originalmente, as lectinas foram identificadas em plantas como proteínas que apresentavam a habilidade de aglutinar eritrócitos de diferentes tipos sangüíneos de modo seletivo (revisado por SHARON; LIS, 1972). BOYD; SHAPLEIGH (1954) consideraram a atividade hemaglutinante dessas proteínas para cunharem o nome lectina, do latim *legere*, escolher, reconhecer ou discriminar. SHARON; LIS (1972) propuseram a generalização do termo lectina para toda proteína com capacidade de reconhecer açúcar de modo específico de origem não imune.

As lectinas estão presentes em vários organismos, desde vírus a seres humanos (SHARON; LIS, 1989; KARLSSON, 1995; LIS; SHARON, 1998). Provavelmente, o primeiro registro da literatura sobre a presença de atividade lectínica em animais foi feito por FLEXNER; NOGUCHI (1902). Eles demonstraram que o veneno de serpente *Crotalus durissus* era capaz de promover a aglutinação de eritrócitos humanos (KILPATRICK, 2002).

A primeira evidência direta da existência de lectinas em mamíferos foi obtida a partir de estudos que demonstraram que a meia-vida de glicoproteínas séricas poderia ser controlada por atividade lectínica presente no fígado de coelhos (ASHWELL; MORELL, 1972). A continuação do trabalho destes pesquisadores levou ao isolamento pioneiro de uma lectina de mamífero, ela foi purificada do fígado de coelhos, ligava-se a resíduos de galactose e foi denominada receptor hepático para asialoglicoproteínas (STOCKERT *et al.*, 1974; HUDGIN *et al.*, 1974).

A partir de meados de 70, vários achados sobre lectinas de origem animal e ligantes β-galactosídeos foram descritos. BARONDES *et al.* (1994), propuseram a criação da família das galectinas para agrupar essas proteínas. A “eletrolectin” foi o primeiro membro dessa família, ela foi isolada a partir de tecidos de peixe elétrico (TEICHBERG *et al*., 1975). Ainda nessa época, foram descritas as primeiras lectinas ligantes de β-galactosídeos derivadas de mamíferos (de WAARD *et al*., 1976), as quais foram posteriormente definidas com galectina-1 e 3 (BARONDES *et al*., 1994).

Há uma enorme diversidade estrutural de glicoconjugados nos seres vivos, a qual pode estar associada a uma grande diversidade biológica, pois estas glico-estruturas podem codificar diversas informações biológicas que podem ser decodificadas por lectinas (SHARON; LIS, 1989; LIS; SHARON, 1998). A Figura 1 ilustra algumas interações biológicas mediadas pelas lectinas.

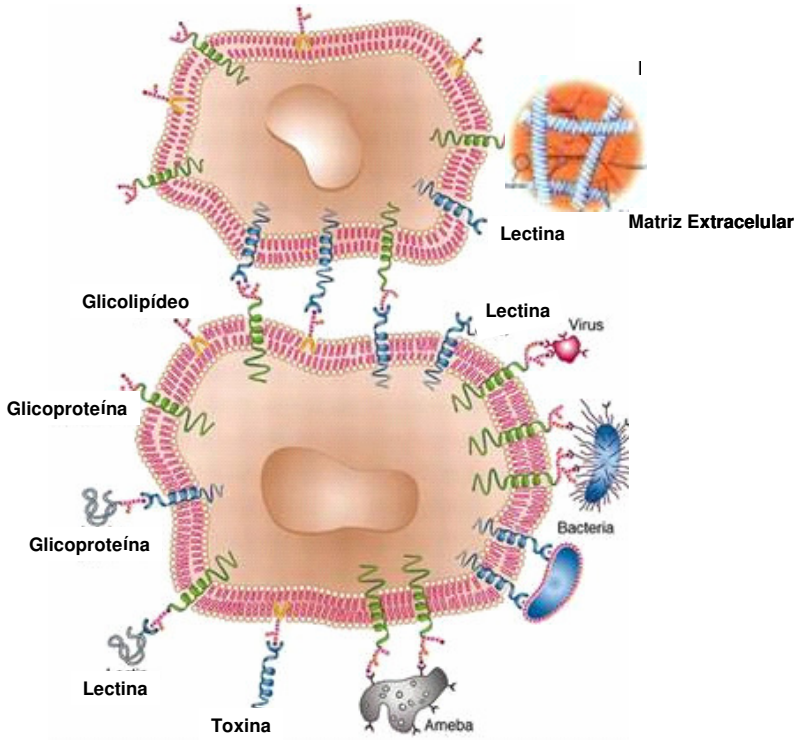

Figura 1. Interação entre lectinas e glicanas. Lectinas estabelecem interações célula-célula e/ou célula-matriz extracellar através do reconhecimento específico de glicoconjugados. A interação lectina-carboidrato pode promover a ligação de moléculas bioativas em componentes celulares. As lectinas podem participar de vários eventos biológicos como: infecção microbiana; defesa de plantas;

síntese de glicoproteínas; imunidade inata e resposta inflamatória; ativação, proliferação e crescimento celulares; apoptose; embriogênese e fertilização. (Figura modificada de SHARON; LIS, 2004).

Portanto, o reconhecimento de carboidratos por lectinas é um fenômeno bioquímico associado a vários processos fisiológicos e/ou patológicos como fertilização, embriogênese, migração, proliferação e diferenciação celulares, defesa imunológica, infecção por microorganismos e, câncer (SHARON; LIS, 1986; SHARON; LIS, 1989; LIS; SHARON, 1998; SANTOS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 1994; DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; LIU; RABINOVICH, 2005). Além disso, lectinas podem ser utilizadas como ferramentas na pesquisa básica e aplicadas (SANTOS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 1994; SANTUCCI *et al.*, 2003; ROGÉRIO *et al.*, 2007, SHARON, 2007).

Nas superfícies das células de vertebrados existe uma camada de glicoconjugados composta por glicoproteínas, glicolipídios e glicosaminoglicanos, conhecida por “glicocalix” que pode ser alvo para diferentes lectinas (VARKI *et al.*, 1999). Geralmente, as lectinas são moléculas multivalentes que podem estabelecer pontes entre células e matriz extracelular, através do reconhecimento concomitante de glicanas contidas em ambas as estruturas (SHARON; LIS, 1993).

Em linhas gerais, o reconhecimento de carboidratos pelas lectinas é um evento reversível que se manifesta por meio de um equilíbrio químico regido pela lei da ação das massas. Assim, a afinidade química de uma lectina por seu ligante pode ser definida a partir da constante desse equilíbrio (VARKI *et al.*, 1999). As ligações químicas mais comuns envolvidas na combinação entre lectinas e glicanas são pontes de hidrogênio (sendo às vezes mediadas pela água), ligações hidrofóbicas, interações eletrostáticas (menos freqüentes) e coordenação por metais (SHARON, 2007).

A capacidade das lectinas de se ligar especificamente a açúcares é atribuível a uma porção globular e limitada dessas moléculas, denominada domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) (WEIS; DRICKAMER, 1996, DODD; DRICKAMER, 2001). Os CRDs de muitas lectinas relacionam-se entre si, quanto à seqüência de aminoácidos e a especificidade de carboidratos, o que faz com que muitas lectinas conhecidas possam ser agrupadas em famílias (WEIS; DRICKAMER, 1996; DODD; DRICKAMER, 2001). Uma das famílias de lectinas animais mais estuda é a das galectinas, sendo que, inicialmente, os membros dessa família foram caracterizados como lectinas tipo-S ou Lac-S por reconhecerem β-galactosídeos de modo dependente de estado de oxidação de seus grupos sulfidrílicos presentes em cisteínas livres e independente de íons cálcio (BARONDES *et al.*, 1994; COOPER; BARONDES, 1999). Na atualidade, sabe-se que a propriedade lectínica das galectinas não é, necessariamente, dependente de grupos sulfidrílicos (KILPATRICK, 2002).

As galectinas são lectinas de mamíferos que apresentam seqüências de consenso de aminoácidos no CRD e reconhecem preferencialmente unidades repetidas de lactosaminas, polilactosaminas, com resíduos de galactose acessíveis (BARONDES *et al.*, 1994; STOWELL *et al.*, 2004; LOPEZ-LUCENDO *et al.*, 2004). A importância biológica das galectinas pode ser ilustrada pela elevada conservação evolucionária e pela ampla distribuição dessas proteínas, pois distintos tecidos e/ou células de diferentes organismos (protozoários a seres humanos) podem expressar essas lectinas ou seus homólogos (RUBINSTEIN *et al.*, 2004a). Estudos termodinâmicos e biológicos mostram que apesar dessas proteínas reconhecerem lactosaminas como requisito químico mínimo, elas podem apresentar diferenças sutis de especificidade no reconhecimento de carboidratos. Por exemplo, a

galectina-1, e não a galectina-3, liga-se com maior afinidade para resíduos de galactose terminais do que os internos em polilactosaminas (AHMAD *et al.*, 2004., STOWELL *et al.*, 2004). Nessa linha, tem sido descrito que as galectinas 1 e 3 podem reconhecer distintas glicanas na superfície de células T e isto pode influenciar diferencialmente a produção de citocinas e a apoptose dessas células (STILLMAN *et al.*, 2006; TOSCANO *et al.*, 2007; VAN DER LEIJ *et al.*, 2007).

Atualmente já foram descritas 15 galectinas derivadas de mamíferos e todas apresentam um CRD com aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos. HIRABAYASHI; KASAI (1993) classificaram as galectinas em 3 categorias: “proto-type”, quimera e “tandem repeat-type”. As primeiras possuem um único tipo de CRD e se apresentam com monômeros ou dímeros com CRD idênticos associados de modo não-covalente (galectinas: 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15). A galectina-3 representa o tipo quimera, ela tem um CRD e um domínio não-lectínico envolvido em sua oligomerização. As galectinas 4, 6, 8, 9 e 12 são conhecidas como “Tandem repeat-type” por apresentarem dois CDRs distintos unidos por pequeno peptídeo ligador (RUBINSTEIN *et al.*, 2004a ; LIU *et al.*, 2005).

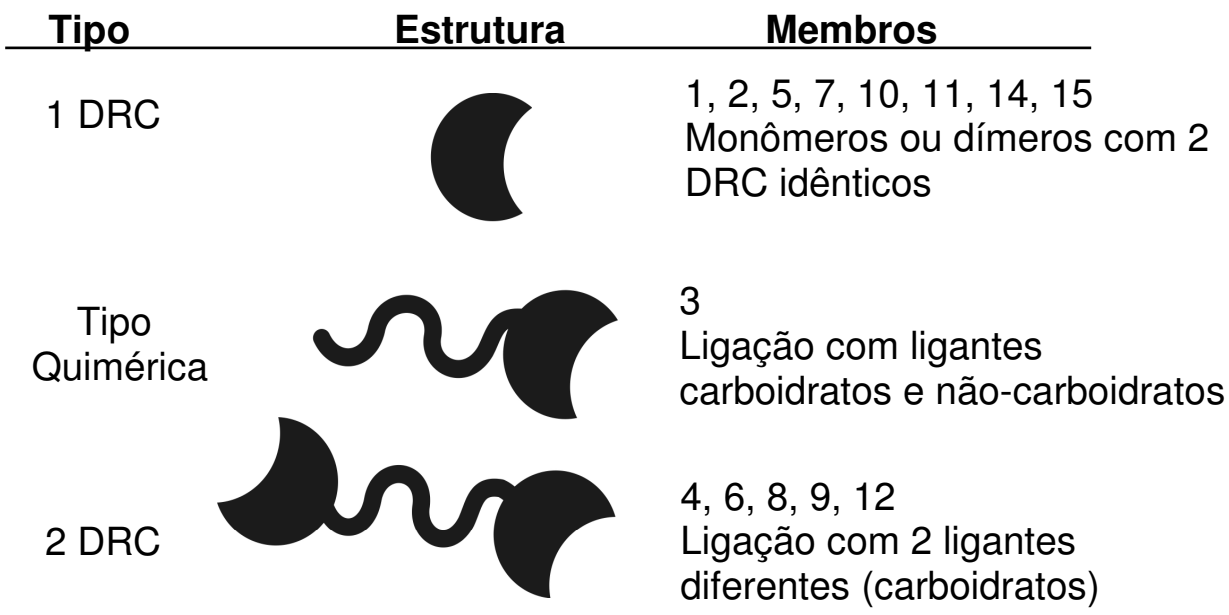

Figura 2. **Classificação das galectinas em relação ao DRC**. Representação esquemática da divisão dos tipos de galectinas em relação ao DRC. Modificado de RUBINSTEIN *et al.*, (2004b).

A maioria das galectinas apresenta características de proteínas citoplasmáticas como região N-terminal acetilada, presença de grupos sulfidrílicos não-oxidados (livres) e ausência de glicosilação (RUBINSTEIN *et al.*, 2004a e b). Entretanto, as galectinas podem estar localizadas na superfície celular, matriz extracelular, citoplasma e núcleo (RUBINSTEIN *et al.*, 2004a). Apesar de essas proteínas serem detectadas no meio extracelular, elas não apresentam peptídeo sinal, sendo secretadas pelas células por mecanismo não clássico e independente do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi (HUGHES, 1999). Dados da literatura sugerem que a galectina-1 (Gal-1) pode ser secretada pela translocação direta do citosol através da membrama plasmática com auxílio de fatores do citosol e da membrana, como descrito para o fator-2 de crescimento de fibroblasto (SCHÄFER *et al.*, 2004; NICKEL *et al.*, 2005). As galectinas podem promover no meio extracelular o intercruzamento de glicoconjugados da superfície das células e induzir eventos de transdução de sinal por meio da formação de agrupamentos de

receptores e de uma malha (galectina-receptor) na superfície celular (BREWER, *et al.*, 2002). Já no meio intracelular, os eventos biológicos das galectinas parecem não depender de sua propriedade lectínica e nesse microambiente elas podem participam do processamento de RNA e da regulação da homeostasia celular (LIU *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2004). De modo interessante, as galectinas podem exercer efeitos antagônicos em função da localização destas proteínas no meio intra ou extracelulares (YANG *et al.*, 1996; FUKUMORI *et al.*, 2003).

As galectinas são moléculas multifuncionais que participam de vários processos biológicos como controle da adesão, proliferação e ciclo celulares, apoptose, gênese de tumores, fagocitose e processamento de RNA (PERILLO *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 2002; DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; LEFFLER *et al.*, 2004; RUBINSTEIN *et al.,* 2004a, STOWELL *et al.*, 2007). As galectinas também podem estar associadas ao risco de infarto do miocárdio e ao controle de processo inflamatório (TANAKA; OZAKI, 2006; OZAKI *et al.,* 2004; TOSCANO *et al.,* 2006).

1.2 Galectina-1 (Gal-1)

O gene da galectina-1 humana está localizado no cromossomo 22 entre as regiões q12-q13 deste cromossomo, em camundongos na região E do cromossomo 15 (GITT; BARONDES, 1991; BALDINI *et al.*, 1993). Esta lectina é um homodímero de 28kDa, associado de modo não covalente apresentando uma constante de dissociação de ~ 7 μM (CHO; CUMMINGS, 1995). A expressão da Gal-1 é verificada em vários tecidos.

Em condições normais, a Gal-1 é expressa em músculos, timo, próstata, fígado, baço, células endoteliais, pele e cérebro em desenvolvimento (YANG; LIU, 2003). Recentemente, foi descrito que a Gal-1 pode participar da fisiologia e do

desenvolvimento embrionário de pulmão (FOSTER *et al.*, 2006; CASE *et al.*, 2007). Em condições patológicas, a Gal-1 é expressa em carcinomas de tiróide, cólon, ovário, melanoma e linfoma (PERILLO; MARCUS; BAUM, 1998). Vários agentes podem induzir a expressão de galectina-1, por exemplo, o estrógeno, lipoproteína de baixo peso molecular minimamente oxidada e citocinas (BAUM *et al.*, 1995; TAHARA *et al.*, 2003).

Na literatura são descritos vários ligantes para a Gal-1, incluindo os localizados na superfície celular, tais como as integrinas, nos lisossomos com a proteínas de membrana lissosomal 1 e 2; no citoplasma com o oncogene H-Ras; no núcleo com ribonucleoproteínas e Gemin-4; e na matriz extracelular com laminina e fibronectina (CAMBY *et al.*, 2006).

A maioria dos efeitos biológicos da Gal-1 é dependente da propriedade lectínica, a qual é abolida pela oxidação dos grupos sulfidrílicos das cisteínas presente na estrutura da Gal-1, impedindo o reconhecimento de carboidratos por esta lectina (VARKI *et al.*, 1999). O meio intracelular apresenta caráter redutor, enquanto o extracelular é oxidante. Portanto, segundo alguns autores, a preservação da atividade lectínica da Gal-1 no meio extracelular ou em condições experimentais *in vitro* é depende da ligação imediata dessa proteína aos seus ligantes e/ou da presença de agentes redutores como 2β-mercaptoetanol (2-ME) (BAUM *et al.*, 1995; VARKI *et al.*, 1999; DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; STOWELL, *et al.*, 2007). Entretanto, a Gal-1 oxidada, forma sem atividade lectínica, é capaz de promover crescimento axonal de neurônios da raiz dorsal após a instalação de lesão de nervos periféricos (KADOYA *et al.*, 2005).

A Gal-1 exerce uma variada gama de funções abrangendo várias patologias tais como; no câncer, envolvida na progressão e metastase de tumores; em doenças

neurodegenerativas; a forma oxidada da Gal-1 está relacionada a regeneração do sistema nervoso central; em processos inflamatórios, modulação da resposta imune (CAMBY *et al.,* 2002; RUBINSTEIN *et al.,* 2004; CHANG-HONG *et al.*, 2005 KADOYA; HORIE, 2005; CAMBY *et al.,* 2006; RABINOVICH *et al.,* 2007)

1.3 Gal-1 e o sistema imune

As lectinas animais constituem um importante grupo de moléculas que participam da defesa imunológica, principalmente da imunidade inata, pois atuam na defesa do hospedeiro como: aglutininas, ativadoras do sistema complemento, moléculas indutoras da secreção de mediadores (GABIUS *et al.*, 1997). Logo, a Gal-1 sendo uma lectina possui importantes efeitos na regulação da resposta imune.

A Gal-1 participa da resposta imune inata e adaptativa, promovendo um efeito antiinflamatório. Os mecanismos envolvidos neste efeito antiinflamatório são relacionados ao fato da Gal-1 modular a secreção de citocinas pró-inflamatórias e participar da homeostasia de leucócitos.

Primeiramente, a Gal-1 pode inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias *in vitro*, tais como IL-2, Interferon γ (INFγ) e TNF-α (*Tumor Necrosis Factor* α) (VESPA *et al.*, 1999; ILARREGUI *et al.*, 2005). Estudos *in vivo,* em modelos experimentais de inflamação crônica e autoimunidade, mostraram a capacidade da Gal-1 modular o balanço da resposta imunológica em direção a um padrão Th-2, com diminuição dos níveis de IFN-γ, IL-2 e aumento dos níveis de secreção de IL-5 ou IL-10 por células T (SANTUCCI *et al.*, 2003; BAUM *et al.*, 2003; TOSCANO *et al.,* 2006; RABINOVICH *et al.*, 2007).

Outro aspecto é o fato da Gal-1 exercer um efeito regulador da fisiologia da célula T. Foi demonstrado que a Gal-1 induziu apoptose dos timócitos corticais *in*

vitro, sugerindo que a Gal-1 tem um papel na manutenção da tolerância central (PERILLO *et al.*, 1997) e de células T ativadas (PERILLO *et al.*, 1995; RABINOVICH *et al.*, 1998). Este efeito pró-apoptótico da Gal-1 foi demonstrado, em muitos casos, em altas concentrações (na razão de μM), mas é incerto que este nível de concentração seja encontrado *in vivo*. Entretanto, um estudo demonstrou que a quantidade de Gal-1 secretada por diferentes tipos celulares é suficiente para promover a morte das células T (HE; BAUM, 2004). Em outros estudos, demonstrou-se que Gal-1 induz apoptose em células CEM e em células de linhagem T MOLT-4, indicada pela monitorização da exposição de fosfatidilserina (FS) (PACE *et al.*, 1999; PACE *et al.*, 2000), um fosfolipídio de membrana que pode ser expresso na superfície de células apoptóticas (MARTIN *et al.*, 1995) e não-apoptóticas (FRASCH *et al.*, 2000).

A apoptose de células T pela Gal-1 envolve vários sinais tais como: modulação da produção da proteína Bcl-2, despolarização do potencial de membrana da mitocôndria e liberação do cromossomo *c* e ativação de caspases (ION *et al.*, 2005; MATARRESE *et al.*, 2005; RABINOVICH *et al.*, 2000a).

Logo, estes achados indicam que a Gal-1 exerce um efeito regulatório nas células T ativadas sugerindo um mecanismo autócrino de morte para manutenção da homeostasia durante o término da resposta imune (BLASER *et al.*, 1998; RABINOVICH *et al.*, 2002).

Recentemente, foi descrito que a Gal-1 pode promover a apoptose de células T produtoras de citocina pró-inflamatória IL-17 (T_h-17) e não de células T_h2 produtoras de IL-10 e TGF-β (citocinas com caráter antiinflamatório) por meio de reconhecimento diferencial de glicanas nas superfícies dessas células (TOSCANO *et al.*, 2007). Além disso, células associadas a linfomas de Hodgkin, podem

promover o escape da resposta imunológica antitumoral desses linfomas, por expressar grandes quantidades de Gal-1 (JUSZCZYNSKI *et al.*, 2007). Segundo esses autores, a Gal-1 está envolvida neste processo de escape imunológico por favorecer a secreção de citocinas T_h2 e a expansão de células T regulatórias do tipo CD4+, CD25(*high*) e FOXP3+.

Apesar deste potencial apoptótico da Gal-1, há relatos que a Gal-1 está envolvida na homeostase celular por via independente da apoptose. Estudos mostraram que apesar da Gal-1 induziu a exposição de FS na superfície de células MOLT-4, na ausência de apoptose, pois não se detectou fragmentação de DNA e perda da capacidade proliferativa nessas células após tratamento com Gal-1 (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; STOWELL *et al.*, 2007). Além disso, Gal-1 dimérica promoveu a exposição de FS na superfície de neutrófilos pré-ativados e a fagocitose dessas células. Logo, estes autores sugerem que a fagocitose de leucócitos, na ausência de apoptose, é uma das vias pela qual a Gal-1 pode modular a homeostasia leucocitária e a resolução da inflamação.

Nessa linha, CHUNG *et al.* (2000) demonstraram que a Gal-1 pode promover a fosforilação parcial da cadeia zeta do receptor de células T e este fato pode inibir os eventos inicias da ativação dessas células sem promover apoptose. HANH *et al.*, (2004), mostraram que a Gal-1 induziu apoptose em células da linhagem leucêmicas de células T MOLT-4, mas este processo de apoptose não foi acompanhado de 2 marcadores característicos de apoptose, liberação do citocromo *c* e ativação de caspase-3.

Atualmente, sugere-se que vários fatores podem influenciar a ação da Gal-1 no controle da resposta imunológica adaptativa e da inflamação, tais como o tipo

celular envolvido, o microambiente, estado de ativação celular e o padrão de glicosilação das células alvo (BIANCO *et al.*, 2006).

Com base nestes estudos verifica-se que a Gal-1 tem um papel importante nas respostas imunológicas pela regulação da homeostasia de leucócitos e modulação da secreção de mediadores.

1.4 Mastócitos

Os mastócitos são células do sistema imunológico que podem participar da imunidade inata e adquirida. Estas células são derivadas de células progenitoras hematopoiéticas positivas para diferentes marcadores como CD13, $CD34^+$, CD117 (METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997). Os mastócitos deixam a medula óssea como células indiferenciadas e completam o processo de diferenciação nos tecidos periféricos (KITAMURA, 1989; METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997).

Nos tecidos, os mastócitos estão localizados preferencialmente em associação com os vasos sanguíneos e nervos próximos à superfície de interface ambiente-hospedeiro, sendo uma das primeiras células a entrar em contato com patógenos invasores (METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997; WEDEMEYER; TSAI; GALLI, 2000).

No homem e nos roedores, os mastócitos apresentam uma heterogeneidade relacionada à localização e nas características morfológicas, bioquímicas, histoquímicas e funcionais. Considerando estes aspectos, os mastócitos podem ser classificados:

- Mastócitos de mucosa (MMC – *Mucosal Mast Cell*), localizados na lâmina própria dos intestinos e pulmões.

- Mastócitos de tecido conjuntivo (CTMC – *Conective Tissue Mast Cell*) localizados no tecido conjuntivo, principalmente pele e cavidade peritoneal (GAYTAN *et al.*, 1990; METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997).

A atuação dos mastócitos nos mecanismos de defesa do organismo está principalmente relacionada aos processos alérgicos, inflamatórios e na expulsão de parasitas (METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997; GALLI, 2000). Os mastócitos também podem participar de doenças degenerativas, como mal de Alzhemeir, esclerose múltipla; doenças cardiovasculares e artrites inflamatórias (PANULA *et al.*, 1998; SECOR *et al.*, 2000; ZAPUELA *et al.*, 2002; THEOHARIDES; COCHRANE, 2004).

No sistema imune, os mastócitos atuam como células efetoras na imunidade inata e adquirida, reações alérgicas e inflamatórias e na defesa contra patógenos. Nestes processos, ocorre a ativação celular e conseqüente liberação de uma variada gama produtos ou mediadores farmacologicamente ativos. Estes mediadores são classificados em: mediadores pré-formados; mediadores neo-formados e mediadores neo-sintetizados (MARSHALL, 2004; GILFILLAN; TKACZYK, 2006).

Os mediadores pré-formados são produzidos e armazenados nos grânulos citoplasmáticos e são liberados após a estimulação celular. Dentre estes fatores podemos citar: substâncias como histamina, heparina, β-hexosaminidase, proteoglicanas, proteases neutras e algumas citocinas. Entre estes fatores encontram-se as interleucinas IL-8 e IL-16, e alguns fatores como TNF-α (*Tumor Necrosis Factor α*), b-FGF (*Fibroblast Growth Factor*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), TGF-β (*Transforming Growth Factor β*), SCF (*Stem Cell Factor*)

(RANZIN *et al.*,1983; IRANI *et al.*, 1986; GORDON; GALLI, 1990; MARSHALL, 2004).

Os mediadores neo-formados são liberados logo após a estimulação celular e compreende alguns derivados do metabolismo do ácido aracdônico, como a PGD_2 (Prostaglandina-D2), leucotrienos como o LTC4 e LTB4, PAF (*Platelet Activing Factor*) e tromboxanos (MENCIA-HUERTA *et al.*, 1983; HEAVEY *et al.*, 1988; GALLI; NAKAE; TSAI, 2005).

Os mediadores neo-sintetizados são sintetizados após 8 a 12 horas da estimulação dos mastócitos, dentre eles, destacam-se as interleucinas IL-1β, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10; interferon-γ (INF-γ) e o fator estimulador de colônias granulócito/macrófago (GM-CSF) (PLAUT *et al.,* 1989*;* BURD *et al.*, 1989; GORDON; GALLI, 1990; RIVERA; GILFILLAN 2006).

A sobrevivência dos mastócitos é prolongada (alguns meses) e a taxa de proliferação parece estar relacionada a fatores intrínsecos dessas células e ao microambiente onde elas residem (FODINGER *et al.*, 1994; METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997; KAWAKAMI; GALLI, 2002). Entretanto, o número de mastócitos é relativamente constante nos tecidos em condições normais e após a resolução da resposta imune (HUANG; SALI; STEVENS, 1998). Este fato parece depender de um balanço entre a proliferação celular e apoptose (HARTMANN; METCALFE, 2000). Citocinas como SCF (*Stem Cell Factor*) e IL-3 são fundamentais nos processos de diferenciação, proliferação e sobrevivência de mastócitos (GALLI; ZSEBO; GEISSLER, 1994; LANTZ *et al.*, 1998).

Os mastócitos estão envolvidos em processos patológicos associados ao descontrole da resposta inflamatória e a processos tumorais (HARTMANN; METCALFE, 2000; CHEN *et al.*, 2002; SIMPSON; METCALFE, 2002; WYMANN *et*

al., 2003). Nessas patologias, tanto a proliferação quanto a apoptose dessas células podem estar desreguladas (HUANG; SALI; STEVENS, 1998; HARTMANN; METCALFE, 2000).

1.4.1 Ativação dos mastócitos via FcεRI e a liberação de mediadores

A participação dos mastócitos em processos fisiológicos e/ou patológicos está relacionada à produção e liberação dos mediadores pela ativação celular destas células. A principal via de ativação é mediada por receptores de alta afinidade para a imunoglobulina E, o receptor FcεRI (SIRAGANIAN, 2003). No entanto, a liberação de mediadores pelos mastócitos também pode ocorrer de modo independente do FcεRI quando induzida diretamente por mediadores químicos e moléculas básicas como substância P, mastoporam, ionóforos de cálcio, composto 48/80, polimixina B, citocinas, anafilotoxinas e outros. A desgranulação é um processo não citotóxico e não lítico que permite a regranulação dos mastócitos (JAMUR; VUGMAN, 1988; METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997)

O receptor FcεRI pertence à classe de receptores multi-cadeia de reconhecimento imune (*Multi-Chain Recognition Receptor – Mirrs*), a qual se inclui o receptor de célula T (TCR), receptor de célula B (BCR) e outros dois receptores para IgG, FcγRI e FcγRIII (CAMBIER, 1995).

O receptor FcεRI é formado por 3 subunidades ($\alpha\beta\gamma_2$) e não possui atividade enzimática intrínseca (RIVERA; GILFILAN, 2006). A subunidade α possui um único domínio transmembrana, sendo que a porção extracelular é responsável pela ligação de alta afinidade com a porção Fc da imunoglobulina E (IgE) na proporção 1:1. A subunidade β possui quatros domínios transmembranas com as porções amino e carboxi-terminais citoplasmáticos. As subunidades γ são ligadas por pontes

de dissulfeto formadas por um domínio extracelular e outro citoplasmático. Esta subunidade está associada à cadeia β do receptor (Figura 1) (PEREZ-MONTFORT; KINET; METZGER, 1983; RIVERA *et al*., 1988; BLANK *et al*., 1989).

Nestes receptores encontram-se os ITAMs (*Immunoreceptor Tyrosine-Based Activaction Motif*), que são seqüências que contém resíduos de tirosina que serão fosforilados, iniciando assim a transdução de sinal. No receptor FcεRI, os ITAMs estão localizados nos domínios citoplasmáticos das subunidades β e γ (KINET, 1990; RIVERA;GILFILAN, 2006).

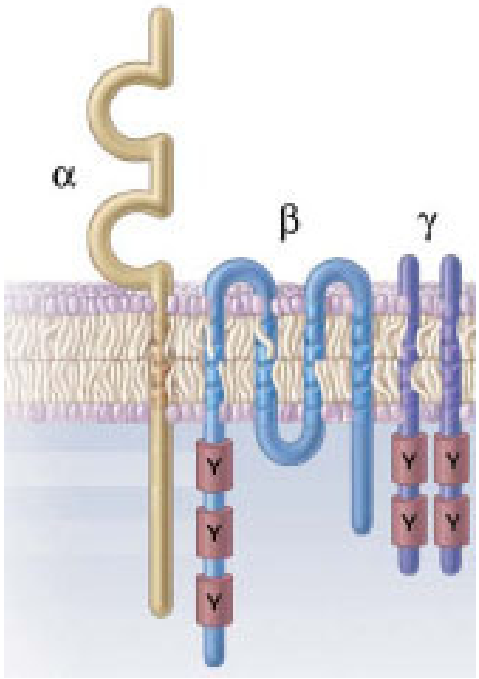

Figura 3. Estrutura do receptor de alta afinidade para IgE (FcεRI). O tetrâmero que compõem o receptor é formado por uma subunidade α, responsável pelas regiões de ligação com a IgE; uma subunidade β, a qual possui quatro porções transmembrana com domínios intra e extracelulares e duas subunidades γ, ligadas por pontes de dissulfeto. Nas caudas citoplasmáticas das subunidades β e γ encontram-se os ITAMs, Y representa as tirosinas que podem ser fosforiladas (Modificado de RIVERA; GILFILLAN, 2006).

As tirosinas localizadas nos ITAMs quando fosforiladas são utilizadas como sítios de ligação para outras proteínas de sinalização, as quais são responsáveis pela propagação do sinal, resultando em fosforilação de outras proteínas

intracelulares, aumento do cálcio intracelular e ativação de genes (LIN *et al.*, 1996; NADLER *et al.* 2001).

Na cascata de sinalização do receptor FcεRI, a fosforilação das tirosinas (ITAMs) da cadeia γ é suficiente para iniciar a cascata, sendo que a amplificação desta sinalização é realizada pela fosforilação das tirosinas (ITAMs) da cadeia β (LIN *et al.*, 1996; DOMBROWICZ *et al.*, 1998).

1.4.2 Transdução de sinal via FcεRI

A imunoglobulina E liga-se com alta afinidade à subunidade α, no domínio extracelular do receptor FcεRI, sem provocar mudança conformacional e não induz a desgranulação dos mastócitos. Na desgranulação ocorre a ligação cruzada de IgE-FcεRI por um antígeno multivalente (alérgeno), o que acarreta a agregação deste receptor resultando na ativação celular, consequentemente na produção e liberação de mediadores (METZGER, 1992, NADLER *et al.*, 2001).

Quando ocorre o intercruzamento dos receptores FcεRI, há o deslocamento destes receptores para microdomínios lipídicos da membrana denominados *lipids rafts* ou balsas lipídicas. Estes microdomínios da membrana são ricos em colesterol, esfingomielina, gangliosídeos e proteínas com modificações lipídicas e tem a função de facilitar e direcionar as interações moleculares para transdução de sinal, pois nestes microdomínios encontram-se importantes proteínas para o desenvolvimento da cascata de sinalização (FIELD, HOLOWKA, BAIRD, 1999; WILSON; PFEIFFER; OLIVER, 2000).

O receptor FcεRI não contém atividade de quinase intrínseca, mas durante o intercruzamento dos receptores e a formação dos *lipids rafts*, a Lyn, uma proteína tirosino quinase (PTK) promove a fosforilação dos ITAMs de ambas as subunidades

β e γ (EISEMAN; BOLEN, 1992; VONAKIS *et al.*, 2005; GILFILAN; TKACZYK, 2006).

A sinalização prossegue pela interação direta dos ITAMs fosforilados das subunidades β e γ com outras proteínas. A Syk (Proteína tirosina quinase do baço – *spleen tyrosine kinase*) interage principalmente no ITAM fosforilado da subunidade γ através de seus dois domínios SH2 (*Src homology)*, promovendo a fosforilação e ativação da Syk. Este processo de fosforilação é restrito a receptores ativado sendo imediatamente reversível após a desagregação dos receptores FcεRI (ZHANG *et al.*, 1996; SIRAGANIAN *et al.*, 2002).

Após a ativação, a Sky e a Lyn vão promover a fosforilação da LAT (*Linker for activaction of T cells*), uma proteína transmembrana que se localiza nos *lipids rafts,* a qual é crucial para os passos subsequentes da sinalização. A fosforilação da LAT resulta na formação de uma "plataforma molecular" para a ligação de inúmeras proteínas adaptadoras e reguladoras, tais como a Grb2 (*Growth-factor-receptor bound protein 2* - proteína adaptadora), Gads (GRB2 - proteína adaptadora), SHC (*SH2-dominian-containing transforming protein C*) e SLP-76 (*SH2-dominian-containing leukocyte protein of 76 kDa*), Sos (*son of sevenless homologue*), Vav (*guanine nucleotide exchange factor*) e a enzima FLCγ (Fosfolipase C γ) (SAITOH *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2000; GILFILAN; TKACZYK, 2006).

A formação deste complexo macromolecular resulta na diversificação da cascata de sinalização, o que é necessário para a liberação de vários mediadores (pré-formados, neo-formados e neo-sintetizados) (SAITOH *et al.*, 2000; GILFILAN; TKACZYK, 2006).

Para a liberação dos mediadores pré-formados armazenados nos grânulos citoplasmáticos, a FLCγ é translocada para a membrana, onde hidroliza

fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) produzindo 2 segundos mensageiros: inositol-1,4,5 trifosfato ($InsP_3$) e o diacilglicerol (DAG). O $InsP_3$ promove a liberação de Ca^{+2} do retículo endoplamático e o DAG ativa a proteína quinase C (*Protein kinase C* – PKC), a qual é responsável pela fosforilação de várias proteínas alvos, resultando na liberação dos grânulos (TKACZYK *et al*., 2003; RIVERA; GILFILLAN, 2006).

Na produção de mediadores neo-formados e neo-sintetizados, ocorre a ativação das GTPases Ras/Rac que ativam a cascata MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) e ERK (*extracelular-signal-regulated kinase-1*). Por esta via, ocorre à ativação da fosfolipase A2 (FLA2) para a produção dos mediadores neo-formados, que são produzidos apartir do metabolismo de fosfolipídios de membrana. Já para os mediadores neo-sintetizados, há ativação da proteína JNK (*JUN amino-terminal kinase*) que fosforila os fatores de transcrição responsáveis pela produção de citocinas e fatores de crescimento, os quais são produzidos e liberados após 8-12 horas após a ativação dos mastócitos (HIRASAWA *et al*., 1995; ZHANG *et al*., 1997; RIVERA; OLIVEIRA, 2007).

Os eventos da cascata de sinalização estão ilustrados na Figura 4.

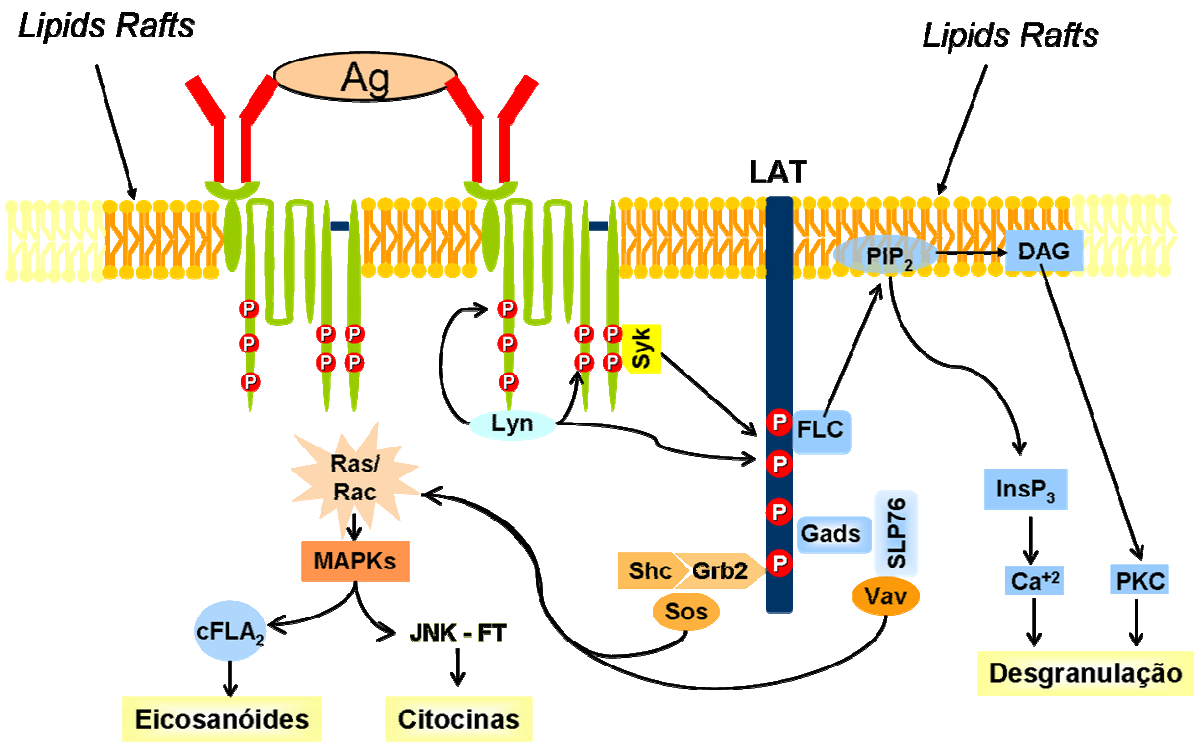

Figura 4. Esquema da via de transdução de sinal em mastócitos. O intercruzamento dos receptores FcεRI por meio de um antígeno multivalente desloca o receptor para os *lipid rafts*. A fosforilação (P) dos resíduos de tirosina, localizada nos ITAMs das subunidades γ e β do receptor, é realizada pela Lyn e Syk, as quais também são responsáveis pela fosforilação da LAT. A função da LAT é promover a propagação do sinal, pelo recrutamento de moléculas adaptadoras e enzimas formando uma plataforma molecular. A fosforilação da LAT resulta no recrutamento da FLC, a qual regula o influxo de cálcio e a ativação da PKC resultando na desgranulação. As moléculas adapatoras ativam as GTPases Ras/Rac as quais ativam a cascata de MAPK controlando assim a síntese de citocinas e eicosanoides. $InsP_3$:1,4,5 trifosfato; PIP2: fosfatidilinositol-4,5 bifosfato; DAG: diacilglicerol; PKC: proteína quinase C; FLC: Fosfolipase C. Modificado de MOLFETTA *et al.*, (2007).

Algumas enzimas exercem um importante papel nesta cascata de transdução de sinal, tais como as fosfolipases. Estas enzimas fazem à hidrólise de fosfolipides da membrana gerando eicosanóides e moléculas de sinalização (segundos mensageiros). Por exemplo, a fosfolipase A2 (FLA2) é responsável pela produção de eicosanóides, as fosfolipases C e D estão relacionadas com a produção de segundos mensageiros (BINGHAM; AUSTEN, 1999; RIVERA; GILFILLAN, 2006).

A ativação da fosfolipase C (FLC) gera a produção de DAG e $InsP_3$, ambos segundo mensageiros, pela metabolização de PIP_2 localizado nas membranas (TKACZYK *et al.*, 2003; RIVERA; OLIVEIRA, 2007).

A fosfolipase D (FLD) faz a hidrólise da fosfatidilcolina, outro fosfolipide de membrana, produzindo 2 segundos mensageiros: o DAG que vai ativar a PKC; e o ácido fosfatídico que está relacionado com alterações morfológicas e o processo de exocitose (PENG; BEAVEN; 2005; RIVERA; OLIVEIRA, 2007). A FLD apresenta as isoformas 1 e 2; a FLD1 está localizada nos grânulos e envolvida no processo de desgranulação; a FLD2 é localizada nas membranas e sua atividade está relacionada com as alterações morfológicas durante a ativação celular (BROWN *et al.*, 1998; CHOI *et al.*, 2002).

A ativação dos mastócitos pela via FcεRI, por meio da interação do antígeno com a IgE específica ligada aos receptores FcεRI, é um processo extremamente regulado com o objetivo da manutenção da homeostasia, sendo iniciado simultaneamente aos sinais de ativação.

O estímulo inibitório da via FcεRI pode ser gerado por receptores inibitórios, os quais são expressos na membrana de mastócitos e possuem motivos ITIM (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) (KATZ, 2002; BRUHNS; FREMONT; DAERON, 2005). A fosforilação das tirosinas dos ITIMs promove o recrutamento e ativação de moléculas de sinalização negativa, as quais são responsáveis por reações de defosforilação, dentre estas moléculas podemos citar SHIP (*SH2-contaning 5' inositol phophatase*), PTEN *(Phosphatase and tensin homologue deleted on chromossome 10*), SHP-1 e -2 (*SH2-contaning inositol phophatase 1/2*) (ONO *et al.*, 1996; KIMURA *et al.*, 1997; HUBER *et al.*, 1998; FURUMOTO *et al.*, 2006; MERTSCHING, *et al.*, 2007).

Entre os receptores ITIMs , os quais podem interagir com o receptor FcεRI; podemos destacar: FcγRIIB (receptor de baixa afinidade para IgG); MAFA (*Mast cell*

function-associated antigen); PECAM-1 (ou CD31) (XU *et al*., 2001; LESOURNE, FRIDMAN, DAËRON, 2005; UDELL *et al*., 2006).

O processo de desgranulação ou exocitose também é regulado por um sistema de proteínas, as quais controlam a fusão das membranas dos grânulos com membrana plasmática e a consequente liberação dos mediadores pré-formados. Estas proteínas são denominadas SNAREs (S*oluble N-ethylmaleimide attachament protein receptors*), localizadas nos grânulos (v-SNAREs) e na membrana plasmática (t-SNAREs). As SNAREs formam um complexo multimolecular com a presença de GTPases e a interação de outras moléculas permitindo assim que a fusão dos grânulos e da membrana apenas ocorra após a ativação via FcεRI e consequente aumento do cálcio intracelular (PAUMET *et al*., 2000; PURI *et al*., 2003; BLANK; RIVERA, 2004).

1.5 Lectinas, galectinas e mastócitos

O efeito das lectinas na desgranulação de mastócitos foi verificado em várias espécies, como coelhos, camundongos, ratos e hamsters (LAUGUNOFF; MARTIN; READ, 1983). A desgranulação dos mastócitos pela concavacilina A (Con A) é um processo não citóxico e inibido por altas concentrações de carboidratos (KELLER, 1973; SHIBASAKI *et al.,* 1992). O possível mecanismo para explicar este efeito da Con A seria o favorecimento intercruzamento das moléculas de IgE na membrana celular através da ligação de resíduos de manose das glicanas da imunoglobulina, de maneira similar a induzida pelo complexo antígeno-IgE-receptor (LEUG; PEARCE, 1984).

MORENO *et al*. (2003) verificaram a ação das seguintes lectinas em mastócitos: Fator quimiotático de neutrófilo derivado de macrófago (MNCF,

Macrophage-derived neutrophil chemotatic factor), uma lectina animal que se liga a D-Galactose, e da KM+ uma lectina vegetal ligante a D-manose extraída da *Artocarpus integrifolia*. Neste estudo mostrou-se que ambas as lectinas induziram a desgranulação, sendo que a KM+ ativou tanto células de linhagem de mastócitos (RBL-2H3) sensibilizadas com IgE ou não, enquanto a MNCF ativou apenas as células sensibilizadas.

Em relação às galectinas, alguns estudos mostraram os efeitos da Gal-3, antes denominada εBP, em mastócitos. FRIGERI; LIU (1992) demonstraram que os níveis de expressão de Gal-3 aumentaram com a ativação celular desencadeada via FcεRI. Em trabalhos subseqüentes, mostraram que a Gal-3 induziu a liberação de mediadores químicos em células RBL-2H3 (*Rat Basophilic Leukemia Cells*) sendo este efeito inibido por glicanas (FRIGERI; ZUBERI; LIU, 1993; ZUBERI; FRIGERI; LIU, 1994). Estes resultados sugerem que a Gal-3 possa realizar a agregação dos receptores FcεRI pelo reconhecimento de glicanas no receptor FcεRI (LIU, 1993).

Recentemente, foi demonstrado que a Gal-3 é importante para liberação de mediadores em mastócitos, pois os mastócitos de camundongos deficientes para o gene da Gal-3 apresentaram baixos níveis de liberação de histamina e de IL-4 (CHEN *et al*., 2006). Outro estudo demonstrou que Gal-3 induz apoptose em células RBL-2H3 por mecanismo dependente de estresse oxidativo, alteração da permeabilidade mitocondrial e ativação de capases 3 e 7, sem promover a desgranulação dessas células (SUZUKI *et al.,* 2008).

Os efeitos da Gal-1 em mastócitos, ainda não estão bem definidos na literatura. RABINOVICH *et al.* (2000b) relataram que a Gal-1 inibiu o edema, o extravasamento de neutrófilos e foi verificado-se poucos mastócitos desgranulados em patas de ratos tratadas com fosfolipase A2. SENA *et al*., (2006) mostraram um

aumento da expressão de Gal-1 em pólipos nasais tratados com glicocorticóides, sendo a Gal-1 localizada em mastócitos. Recentemente, foi demonstrado que a Gal-1 não é capaz de promover a desgranulação de células RBL-2H3 e nem a indução de exposição de fosfatidilserina na superfície dessas células (SUZUKI *et al.,* 2008).

Finalmente, considerando-se que há poucos relatos na literatura sobre os efeitos de Gal-1 em mastócitos, foi proposto a realização deste estudo para investigar o papel de Gal-1 exógena e/ou endógena sobre alguns aspectos morfológicos e funcionais de mastócitos. Uma vez que, essa galectina exerce um importante papel na homeostasia de leucócitos e na modulação do processo inflamatório (ILARREGUI *et al.*, 2005; STOWELL *et al.,* 2008).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da galectina-1 em mastócitos com ênfase nos seguintes aspectos:

- Detecção da ligação de galectina-1 à superfície das células RBL-2H3.
- Avaliação dos potenciais efeitos citotóxicos e apoptótico da galectina-1 em células RBL-2H3.
- Análise morfológica de células RBL-2H3 tratadas com galectina-1 e estimuladas ou não via FcεRI.
- Investigação do impacto da galectina-1 exógena e endógeno sobre o processo de desgranulação dos mastócitos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Células RBL-2H3

As células utilizadas nos ensaios foram às da linhagem de mastócitos de rato RBL-2H3 (*Rat Basophilic Leukemia Cells*) descritas por BARSUMIAN *et al.*, (1981), as quais foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular dos Mastócitos (FMRP-USP).

As células foram cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DEMEM) suplementado com 15% de soro fetal bovino, 0,434 mg/mL de glutamina, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 0,25µg/mL de anfotericina B (Invitrogen, Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e mantidas à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2.

O subcultivo celular foi realizado em garrafas de 25 ou 75 cm^2 (Costar-Corning Incorporated, NY, EUA) à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2. Geralmente, após 3 a 4 dias de cultivo, as células foram submetidas ao procedimento de subcultivo. Para isto, as mesmas foram tratadas com tripsina-EDTA (Invitrogen, Gibco, Carlsbad, CA, EUA) por 10 minutos nas mesmas condições de cultivo. As células não-aderentes foram lavadas com meio de cultura por 2 vezes (100g – 5 minutos). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em meio de cultura para a quantificação de células viávies em câmara de Newbauer na presença de azul de tripan.

3.2 Ativação das células RBL-2H3 via receptor de alta afinidade para a IgE (FcεRI)

As células RBL-2H3 foram inicialmente sensibilizadas com o anticorpo monoclonal de rato IgE anti-TNP na diluição de 1:5000, em meio de cultura, por 16-

18 horas. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e estimuladas com 50ng/mL do antígeno DNP-HSA (Dinitrofenol conjugado a albumina do soro humano, na proporção 48:1 - Sigma-aldrich, St Louis, Missouri, EUA) por 45 minutos. Em alguns experimentos, a ativação via receptor FcεRI foi realizada na ausência da sensibilização com IgE, por meio de 0,05μg/mL do anticorpo monoclonal anti subunidade α do receptor FcεRI (BC4). Os materiais citados acima foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular dos Mastócitos (FMRP-USP).

3.3 Ativação das células RBL-2H3 independente da via receptor FcεRI

As células RBL-2H3 sensibilizadas ou não com IgE anti-TNP foram estimuladas com 0,5μg/mL de ionóforo de cálcio A23187 (Sigma-aldrich, St Louis, Missouri, EUA) por 45 minutos a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO_2.

3.4 Produção da Galectina-1 Recombinante Humana (Gal-1)

3.4.1 Obtenção do extrato bruto bacteriano da produção de Gal-1 Recombinante Humana Dimérica e Monomérica

A Gal-1 foi obtida de cultura de bactérias (*E. coli* cepa M-15) transformadas com plasmídio PQU-50 contendo o gene completo da galectina-1 (dimérica) ou gene mutado na posição 5 (Ser-Val – Monomérica) conforme descrito por CHO; CUMMINGS (1995). As bactérias citadas foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Richard Dale Cummings, chefe do Laboratório de Glicobiologia e do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade Emory de Atlanta, Georgia – EUA.

As bactérias foram cultivadas em 200 mL de meio LB Broth Base (Invitrogen, Gibco, Carlsbad, CA, EUA) com ampicilina (50µg/mL) (USB Corporation, EUA) em um agitador (200 rpm) à 37°C, por 16-18 horas. Após este período, e constatado o crescimento bacteriano, foram transferidos 25mL desta cultura para 1L de meio LB, previamente autoclavado contendo 500µL de amplicilina (50µg/mL). Em seguida, esta suspensão bacteriana foi incubada em agitador (200 rpm) à 37°C por 2 horas. Após este período de incubação, mediu-se a densidade óptica (DO) em 600nm para averiguar a taxa de crescimento bacteriano, o qual foi considerado ótima quando foi atingida a faixa de DO (600 nm) entre 0.45-0.5. Em seguida, adicionou-se a cultura 0,36g de isopropil β-D-tiogalacto-piranozídeo (IPTG, Promega, WI, EUA) diluído em 1mL de meio LB, para a indução da expressão da galectina-1 (Gal-1) pelas bactérias. O cultivo foi novamente iniciado no agitador (37°C - 250 a 300 rpm) por 4 horas. Após este período de incubação, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 5000*g* por 15-20 minutos a 4°C. O *pellet* da cultura foi centrifugado a 3000g por 15-20 minutos a 4°C. Finalmente, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi armazenado a -70°C por até 2 semanas.

3.4.2 Purificação da Galectina-1 (Gal-1) em gel de agarose-lactose

A forma monomérica e dimérica de Gal-1 foram purificadas obdecendo o mesmo procedimento. Basicamente, o *pellet* bacteriano foi submetido ao descongelamento em banho de gelo e em seguida ressuspendido em um tampão de lise constituído por:

- 7mL de PBS estéril (Phosphate Buffered Saline – NaCl (136,8mM); KCl (2,7mM); Na_2HPO_4 (6,4mM); KH_2PO_4 (0,9mM) pH7,4.

- 14mM de β-mercaptoetanol (2-ME) (Merck-Schuchardt, Alemanha)

- 1 tablete de inibidores de proteases sem EDTA (Complete Mini, EDTA-free, Roche Diagnostics GmbH, M,Alemanha)

- 1mL de lisosima - 1mg/mL (Roche Diagnostics GmbH, M, Alemanha)

- 10µL de RNAse A Tipo 3A – 10mg/mL (Sigma-aldrich, St Louis, Missouri, EUA)

- 10µL de DNAse I Tipo IV – 10mg/mL (Sigma-aldrich, St Louis, Missouri, EUA)

O *pellet* das bactérias foi incubado por 30 minutos com o tampão de lise em banho de gelo. A amostra foi sonicada em 5 ciclos de 20 segundos cada, na potência de 40W (Sonics Vibra cell; SONICS & MATERIALS INC.), sendo que entre os ciclos, a suspensão foi mantida em repouso por 15 segundos. O lisado bacteriano foi centrifugado a 10000*g* por 45 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e submetido a cromatografia de afinidade em coluna de agarose-lactose (Sigma-Aldrich) com 5 mL de leito. O material não-ligante foi eluído com tampão de equilíbrio (PBS, adicionado de 14mM de 2-ME pH 7,4), sendo coletado 20 frações de 2mL. O material ligante à coluna foi eluído com tampão de eluição (Tampão de equilíbrio adicionado de 100mM de lactose, pH 7,4), sendo coletado 10 frações de 0,5mL. O procedimento cromatográfico foi monitorado pela leitura da DO em 280nm (UV Mini 1240, Shimadzu) e por eletroforese em gel de poliacrilamida.

As concentrações protéicas das soluções de Gal-1 foram determinadas utilizando as leituras de densidade óptica (DO) em 280nm com um caminho óptico de 1cm. Os valores de DO obtidos foram convertidos para concentração (mg/mL) utilizando o coeficiente de extinção molar (ε = 1,17) desta molécula e a correção das diluições (fator de diluição = fD) pela seguinte fórmula:

Concentração da Gal-1 [mg/mL] = ε x fD x DO (280nm)

As frações cromatográficas obtidas do procedimento de purificação de Gal-1 em agarose-lactose foram analisadas por eletroforese (*SDS-PAGE-Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). As amostras em tampão redutor e dissociante foram aplicadas em gel de poliacrilamida (15%) e submetidas à corrida eletroforética a voltagem constante (150V). O gel foi corado com *Coomassie Brillhant Blue*. As seguintes amostras foram analisadas: lisado bacteriano bruto; material não-ligante no gel de agarose-lactose; frações cromatográficas. Uma mistura marcadores contendo proteínas com peso molecular conhecido foi utilizada como padrão de peso molecular (LMWH-*Low Molecular Weight Calibertion kit for Electroforesis* - GE, Amersham - Biosciences, Uppasala, Suécia).

As soluções da Gal-1 obtida da cromatografia em agarose-lactose foram mantidas em tampão de eluição, com a finalidade de preservar a atividade lectínica dessa proteína, e estocadas a -80°C até o momento do uso.

Para os ensaios, estas soluções foram submetidas ao procedimento de desalinização em cromatografia de exclusão molecular em coluna PD10 conforme instruções do fabricante (Sephadex-G25M; Pharmacia LKB, Uppasala, Suécia). As concentrações das soluções desalinizadas da Gal-1 foram determinadas pela densidade óptica conforme descrito acima.

Com o objetivo de avaliar o nível de preservação da atividade lectínica da Gal-1 purificada em resinas de agarose-lactose, amostras dessa proteína foram desalinizadas em coluna PD-10 e imediatamente re-cromatografadas em coluna de agarose-lactose. Neste último procedimento, a eluição da Gal-1 com tampão de lavagem foi considerado um indicador da perda da propriedade lectínica dessa proteína, pois nestas condições a Gal-1 não foi capaz de reconhecer a lactose e por isso não foi retida na resina de agarose-lactose.

Visando a obtenção de preparações de galectina estáveis e resistentes a oxidação para ensaios com períodos de incubação longos (24 horas), procedeu-se a derivatização dessa proteína com a iodoacetamida (WHITNEY *et al.,* 1986), um composto redutor alquilante que reage de modo covalente com os grupos sulfidrílicos, gerando a carboxiamidometil-galectina-1 (CAM-Gal-1). A solução de galectina-1 foi incubada com iodoacetamida (Protein-Iodoacetamide - Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA - 100mM) por 16-18 horas. Em seguida a suspensão foi submetida a cromatografia de exclusão molecular de acordo com a metodologia realizada por WHITNEY *et al*., (1986).

3.5 Controle da atividade lectínica de preparações de Gal-1 por hemaglutição

A oxidação dos grupos sulfidrílicos da Gal-1 e sua desnaturação podem promover a perda da atividade lectínica desta proteína, uma propriedade associadas com várias funções dessa molécula. Considerando que as soluções de Gal-1 purificadas foram estocadas a -80°C, e foram descongeladas ou derivatizadas com iodocetamida para uso, foi analisado o impacto desses procedimentos na atividade hemaglutinante desta lectina.

A hemaglutinação foi realizada na presença ou ausência de açúcar-hapteno específico para a Gal-1, a lactose (20mM). A sacarose (20mM) foi usada como hapteno controle. As hemácias desafiadas apenas com PBS foram consideradas como controle negativo. Diferentes concentrações de Gal-1 derivatizadas ou não foram testadas (10, 8, 5, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.065µM). Para cada amostra de Gal-1 (50µL) foram adicionados 50µL de suspensão de hemácias humanas a 3% em PBS, preparada a partir do sangue total heparinizado coletado de um doador sadio.

A aglutinação das hemácias foi verificada após 2 horas. Somente as preparações de Gal-1 que apresentaram atividade hemaglutinante na concentração de 1μM foram utilizadas nos diferentes ensaios.

Para a Gal-1 derivatizada procedeu-se o armazenamento dessas preparações a 4ºC, por até um mês, após a confirmação da preservação da propriedade hemaglutinante.

3.6 Análise da ligação da Gal-1 nas células RBL-2H3 com Gal-1 TexasRed, por citometria de fluxo.

A Gal-1 foi conjugada com o reagente fluorescente TexasRed conforme instruções do fabricante (kit Texas Red®-X; Invitrogen, Molecular Probes). Resumidamente, 200μL de uma solução de Gal-1 (10mg/mL), 100μL da solução do reativo fluorescente TexasRed (5mg/mL) e 20μL de tampão bicarbonato de sódio (1M, pH 8.3) foram misturadas. A reação de conjugação ocorreu por 1 hora sob agitação em temperatura ambiente e na ausência de luz. Após esta etapa, a Gal-1 conjugada com Texas Red (GalTR) foi separada do fluorocromo livre por cromatografia de exclusão molecular (Coluna G-25, GE, Amersham-Biosciences, Uppasala, Suécia).

Para o ensaio de ligação, uma suspensão de células RBL-2H3 ($1.0x10^6$ células/tubo), em meio DEMEM, foi incubada (37ºC, 5%CO_2) por 4 horas nas seguintes concentrações de Gal-1TR: 0; 2,5; 5; 10; 20 μg/mL. Após duas etapas de lavagens com PBS, as amostras foram adquiridas no citometro fluxo FACSCanto® (Becton Dickinson, CA, EUA) e analisadas como o auxílio do programa DIVA® (Becton Dickinson, CA, EUA).

3.7 Análise da viabilidade celular e do processo de apoptose em células RBL-2H3 tratadas com Gal-1

3.7.1 Análise da viabilidade celular

Os níveis de citotoxicidade de células RBL-2H3 tratadas com Gal-1, TDG (β-D-Tiogalactopiranosideo), açúcar hapteno inibidor da atividade lectínica, sacarose (hapteno controle) e Gal-1 na presença desses açúcares foram analisados pelo ensaio de MTT (3-[4,5-dimetilazol-2yl]-2,5-difeniltetrazom brometo - Sigma-Aldrich). A viabilidade celular foi indicada pela capacidade das células converterem o sal tetrazolio MTT de cor amarela em cristais de formazan de cor azul.

Nestes ensaios, foram utilizadas diferentes concentrações da Gal-1 (2,5; 5; 10; 20 e 40μM) e dos carboidratos (5; 10; 20; 40; 80mM). As análises de citotoxicidade das amostras contendo Gal-1 e os carboidratos foram realizadas obedecendo as seguites associações: Gal-1 (10μM) + TDG (20mM) e Gal-1 (10μM) + sacarose (20mM).

A camptotecina (CPT - 10μM – Sigma-Aldrich) foi utilizada como referência de morte celular. As células cultivadas apenas com meio de cultura DEMEM foram utilizadas indicador da máxima viabilidade celular (controle de viabilidade).

Todas as substâncias analisadas foram incubadas por 24 horas (37ºC, 5% CO_2) e o número de células utilizadas foi de $3x10^4$ células/poço. Após a incubação, foi adicionado 20μL de MTT (5mg/mL) por 4 horas, em seguida adicionou-se 50μL/poço de SDS (solução 20% em HCl 0,1N), para a solubilização dos cristais de formazan e a leitura colorimétrica foi realizada em 570nm no Leitor de Elisa (Spectramax Plus® – Molecular Devices, Sunnyvale, Ca, EUA). Os dados foram processados pelo programa Softmax® (Molecular Devices, Sunnyvale, Ca, EUA) e

os resultados expressos em porcentagem (%) de viabilidade celular em relação ao controle de proliferação.

3.7.2 Indução da exposição de fosfatidilserina na superfície de células RBL-2H3

As células RBL-2H3 ($1.0x10^6$ células/tubo) foram tratadas com Gal-1 (10μM) na presença ou na ausência de TDG (20mM), por 8 horas. Como controle negativo foi utilizado as células em meio de cultura.

Após este tratamento, as células foram lavadas com tampão de ligação (10m*M* HEPES – pH 7.4, 150m*M* NaCl, 5m*M* KCl, 1m*M* $MgCl_2$, 1,8m*M* $CaCl_2$) (300g por 5 minutos). As células foram incubadas com 100μL de anexina V conjugada com FITC (ICB-USP, São Paulo, Brasil) na diluição 1:500μL em tampão de ligação no banho de gelo, por 20 minutos. Finalmente, foram adicionados nas células 400μL de tampão de ligação e 4 μL de iodeto de propídeo (100μg/mL– Sigma-Aldrich). As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (citômetro FACSCanto - software DIVA-Becton Dickinson, CA, EUA).

3.7.3 Análise da alteração do contéudo de DNA em células RBL-2H3 tratadas com Gal-1, por citometria de fluxo

Este ensaio foi realizado conforme descrito em Nicolleti *et al.* (1991). Resumidamente, a suspensão de células RBL-2H3 ($1.0x10^6$ células/tubo) em meio DEMEM cultivadas (37ºC, 5%CO_2) foram tratadas por 8 horas com Gal-1 (10μM); Camptotecina (10μM - indutor de apoptose) e PBS (controle negativo).

Após os tratamentos, as células foram centrifugadas e o *pellet* foi ressupendido cuidadosamente com tampão citrato-triton-IP (0.1% citrato de sódio,

0.1% Triton X-100, iodeto de propídio 50µg/mL) e incubado por até 16-18 horas no escuro a 4°C. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (citômetro FACSCanto - software DIVA - Becton Dickinson, CA, EUA).

3.7.4 Análise do nível de indução de degradação de DNA em células RBL-2H3 tratadas com Gal-1 pela Reação de Tunel

As células RBL-2H3 ($1.0x10^6$ células/tubo) em meio de cultura (DEMEM) foram tratadas com 10µM de Gal-1 (37ºC, 5%CO_2) por 8 horas. A reação de TUNEL foi realizada como descrito no manual o *kit In situ Cell Death Detection Fluorescein* (Roche Diagnostics GmbH, M, Alemanha).

Após o tratamento, as células foram centrifugadas a 400*g* por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com 200µL de paraformaldeído 4% por 1 hora (T.A.), sob agitação. Em seguida, as células foram lavadas com PBS (400*g* - 10 minutos). Novamente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas com 1mL de etanol 70% gelado e mantidas por 2 minutos em gelo para a permeabilização. No tubo utilizado como indicador de degradação de DNA foi adicionado 30U de DNAse I tipo IV (Sigma-Aldrich) por 10 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas a 400*g* por 10 minutos T.A, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1mL da solução BSA 1% em PBS.

Finalmente, em cada tubo foram adicionados 50µL do Reagente de TUNEL (FITC-dUTP) e incubados por 1 hora em câmara úmida 37°C no escuro. Após esta incubação, as células foram lavadas com 250µL de PBS e as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (citômetro FACSCanto - software DIVA -Becton Dickinson, CA, EUA).

3.7.5 Determinação do nível de degradação de DNA em células tratadas com Gal-1, por eletroforese em gel de agarose (*DNA laddering*)

Uma suspensão de células RBL-2H3 ($1.0x10^6$ células/poço) em meio DEMEM foram cultivadas (37ºC, 5%CO_2) em atmosfera umedecida por 16-18 horas em placa de cultura de 6 poços. As células foram lavadas com PBS e tratadas Gal-1 (10µM); camptotecina 10µM (Sigma-Aldrich), usado como indutor de apoptose ou PBS (controle negativo), por 8 horas.

Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 1 hora a 37°C com tampão de lise (10mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 2mM EDTA, pH 8) e 0,5% de SDS na presença de 10µL de RNAse A tipo 3A (5 µg/mL). Em seguida, foram adicionados 10µL de proteinase K (100µg/mL – Invitrogen) em cada reação e incubados a 50°C por 2 horas. O conteúdo de DNA das células foi extraído por sucessivas extrações com fenol-clorofórmio. Na fração aquosa resultante foi adicionada 10µL de acetato de sódio (3M), 250µL etanol absoluto e homogeineizou-se por inversão, sendo incubada por -20°C por 8-12 horas. O DNA precipitado foi submetido a centrifugação (5 minutos a 10000*g*) e lavado com etanol 70% (v/v) (5 minutos a 10000*g*). O DNA extraído foi ressuspendido em tampão TE (10mM Tris-HCl and 1mM EDTA, pH 7.5) e armazenado a 4°C. As amostras foram diluídas no tampão de amostra e aplicadas em um gel de agarose (1,5%). A eletroforese foi realizada com o tampão TBE (89mM Tris-HCl, 89mM ácido bórico,2mM EDTA, pH 8.4) a 50mV por 3 horas. Após a corrida, o gel foi lavado com água destilada, corado com brometo de etídio (10 minutos) e descorado por 15 minutos em água destilada. Após este procedimento, o gel foi vizualizado e fotografado com o auxílio de um fotodocumentador EPIChem^3 Darkroom (UVP Inc., Upland, EUA).

3.7.6 Análise ultraestrutural de células RBL-2H3 tratadas com Gal-1, por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As células RBL-2H3 ($1.0x10^6$ células/poço) em meio DEMEM foram cultivadas (37ºC, 5%CO_2) em placa de cultura de 6 poços por 72 horas. O meio de cultura foi reposto 24 horas antes do tratamento com Gal-1 (10µM), camptotecina (10µM - indutor de apoptose) e PBS por 8 horas.

Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformolaldeído 2% (EM Sciences) e glutaraldeído 2% (Ladd Research Industries, Burlington, Vermount), contendo 0,05% $CaCl_2$ em tampão cacodilato 0,1M pH 7,4 por 1 hora a temperatura ambiente, sendo pós-fixadas por 2 horas com 1% de tetróxido de Ósmio (OsO_4) (EM Science) em tampão cacodilato e depois lavadas com água Mili-Q. As amostras foram desidratadas em uma série crescente de etanol (30,50,70,90,95 e 100%), removidas pela adição de óxido de propileno e finalmente incluídas na resina EMBED 812 (EM Sciences). Os cortes finos foram obtidos com navalha de diamante, montados em grades de cobre e contrastados com acetato de uracila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) por 10 minutos. As grades foram observadas com o microscópio eletrônico de transmissão PHILPS EM 208.

3.8 Avaliação dos efeitos da Gal-1 na morfologia e distribuição dos grânulos em células RBL-2H3, por microscopia

As células RBL-2H3 obtidas de culturas confluentes foram transferidas para placas de 24 poços ($3.0x10^4$ células/poço), contendo lamínulas circulares de 13mm (Knittel Glase) pré-tratadas com HCl (6N, por 1 hora) e esterilizadas por calor. Após 16-18 horas de cultivo, as células foram lavadas com PBS e submetidas ou não aos ensaios e finalmente analisadas por diferentes técnicas microscópicas.

A participação da propriedade lectínica da Gal-1 nas potenciais ações biológicas desta proteína sobre células RBL-2H3 foi investigada pelo uso de preparações de Gal-1 contendo TDG, um açúcar hapteno inibidor das funções dessa lectina e a sacarose foi utilizada como açúcar hapteno controle.

3.8.1 Microscopia de contraste diferencial de interferência (*Differential Interference Contraste* - DIC)

As células foram tratadas com Gal-1 (10μM) por 15 e 30 minutos (37ºC, 5%CO_2) ou com PBS (Controle negativo).

Após a incubação, as células foram lavadas (3x) com 500μL de PBS e fixadas com a solução de glutaraldeído 2% em PBS por 45 minutos em temperatura ambiente. Novamente, as lamínulas foram submetidas ao procedimento de lavagem com PBS e montadas em lâminas com Permount (Fisher Scientific, EUA). As lâminas foram observadas no microscópio *Nikon Eclipse E800* (Nikon Instruments Inc, Melville, NY, EUA) com sistema de contraste diferencial de interferência (DIC). As imagens foram adquiridas com o auxilio da câmera digital Nikon DXM 1200 (Nikon Instruments Inc.).

3.8.2 Microscopia de Eletrônica de Varredura (MEV)

Neste ensaio, utilizamos as células RBL-2H3 sensibilizadas ou não com IgE e tratadas com Gal-1 (10μM) ou com PBS (controle negativo) por 1 hora. Em alguns poços, as células foram tratadas conforme descrito acima e estimuladas via receptor FcεRI (item 3.2).

Após os tratamentos, as células foram lavadas com PBS e fixadas com glutaraldeído 2% em PBS por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as

lamínulas foram lavadas duas vezes com tampão cacodilato (Electron Microscopy Sciences; Hatfield, PA) 0,1M pH 7,4 e pós-fixadas com de tetróxido de Ósmio 1% (OsO_4) (EM Science) em tampão cacodilato por 2 horas. Em seguida, as células foram lavadas com água Mili-Q e incubadas com uma solução de tiocarbohidrazida (TCH) (EM Science) por 10 minutos em temperatura ambiente. Após esta incubação, as lamínulas foram lavadas cinco vezes com água Milli-Q e incubadas com de OsO_4 1% em água Milli-Q por 30 minutos à temperatura ambiente. As incubações com TCH e com OsO_4 1% foram repetidos 2 vezes. As lamínulas foram desidratadas em bateria crescente de etanol (30, 50, 70, 90, 95 e 100%) e secas pelo ponto crítico com CO_2 líquido (BAL-TEC-CPD 030 – Critical Point Dryer, Alemanha). Após a desidratação, as lamínulas foram fixadas com cola de prata (EM Science) sobre um suporte de alumínio e cobertas com vapor de ouro (BAL-TEC-SCD 050 Sputter Coater). As amostras foram examinadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5200 (Tóquio, Japão).

3.8.3 Microscopia de Fluorescência

As células sensibilizadas com IgE foram tratadas com Gal-1 (10µM) ou com preparações contendo Gal-1 (10µM) e TDG (20mM) ou sacarose (20mM) por 24 horas (37°C, 5%CO_2). Após estes tratamentos, as células foram estimuladas ou não com DNP-HSA. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e fixadas com solução de paraformaldeído 2% (Electron Microscopy Sciences; Hatfield, PA) por 20 minutos, lavadas com PBS e com uma solução 0,1M de glicina (Sigma-Aldrich) em PBS. Em seguida, as células foram permeabilizadas com uma solução de Triton-X-100 (0,3%) e para o bloqueio de sítios inespecíficos foi utilizado IgG irrelevante (5µg/mL) por 1 hora. Novamente as células foram lavadas com PBS (5 vezes de 5

minutos) e foram incubadas com os diferentes anticorpos primários diluídos em PBS - 1% BSA por 1 hora. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS (5 vezes de 5 minutos) e foram tratadas com os diferentes anticorpos secundários ou corantes por 1 hora.

Finalmente, as células foram lavadas com PBS (5 vezes de 5 minutos) e montadas sobre lâminas de vidro com Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences; Hatfield, PA). No controle foi omitido o anticorpo primário. O material foi observado no microscópio confocal Leica SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e analisado com o programa de captura e processamento de imagem *Leica Microsystems SP5*.

Os anticorpos e corantes utilizados são descritos abaixo:

Anticorpos primários:

Anticorpo policlonal purificado por afinidade anti-Galectina-1 (10µg/mL) produzido em galinha, reconhece a galectina-1 recombinante humana mas não a galectina-1 de rato.

Anticorpo monoclonal AD-1 produzido em camundongo (7µg/mL), reconhece a proteína CD63 presente na membrana de grânulos, lisossomos e na membrana plasmática.

IgG de burro utilizado no bloqueio de sítios inespecificos (5µg/mL) (Jackson Immunoresearch, West Groove, EUA).

Anticorpos secundários:

Anticorpo policlonal de burro anti-IgG de galinha (5,7µg/mL), conjugado com Alexa 488 (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, EUA).

Anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo (5,7µg/mL), conjugado com Alexa 594 (Invitrogen, Molecular Probes).

Corantes:

Faloidina conjugada com Alexa 594 (Invitrogen, Molecular Probes), utilizada na concentração de 2,6U/mL.

DAPI (4,6-diamidine-2-phenylindole, dihydrochloride - Invitrogen, Molecular Probes) utilizado na concentração de 0,5µM.

3.9 Avaliação da distribuição dos componentes dos *Lipids rafts*, por fracionamento subcelular em gradiente de sacarose

As células RBL-2H3 ($5x10^7$ células) foram cultivadas em placa de Petri de 14,5cm de diâmetro por 24 horas. Estas células foram tratadas ou não com Gal-1 (10µM) por 45 minutos. Algumas células foram tratadas com Gal-1 (10µM – 1hora) e estimuladas com o anticorpo monoclonal anti-BC4 específico para a cadeia α do FcεRI (0,5µg/mL). Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS (2x) e retiradas da placa com o tampão de lise com os seguintes componentes: NaCl (150mM); MES (2-[N-Morpholino] ethanesulfonic acid – Sigma-Aldrich - 25 mL pH 6.5); EDTA (5mM); Na_3VO_4 (1mM); PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonila - Sigma-Aldrich - 2mM); inibidor de protease (Sigma-Aldrich) e Triton X-100 (0,05% v/v). A suspensão de células foi homogeneizada utilizando o homogeneizador de Dounce (30 strokes). Em um tubo de centrifuga (Beckman -13mL), o lisado celular foi distribuído sobre o volume de 2,6mL de sacarose 80% (w/v) diluída em solução de MNEV [NaCl (150mM); MES (25mM – pH 6.5); EDTA (5mM); Na_3VO_4 (1mM)] e homogeneizada em vórtex, obtendo uma solução de sacarose 40%. Em seguida, foram adicionados 5,2mL de uma solução de sacarose 30% (w/v) em MNEV,

contendo inibidor de proteases (diluição 1:100) e PMSF (1mM). Sobre a sacarose 30% foram adicionados 2,6mL de sacarose 5% (p/v) em MNEV, inibidor de proteases (1:100) e PMSF (1mM). As amostras foram submetidas a centrifugação em ultra-centrifuga (Beckman Instruments, Miami, Florida, EUA) utilizando o rotor 40-Ti a 38000rpm a 4°C com aceleração máxima, por 20 horas.

Após a centrifugação, o tubo foi mantido no gelo e 10 alíquotas (1,3mL) foram coletadas consecutivamente apartir da porção superior do tubo. Amostras (2μL) de cada uma das 10 frações foram adsorvidas sobre membranas Hybond (GE, Amersham – Biosciences, Uppasala, Suécia). Em seguida, as membranas foram incubadas para a realização do bloqueio com uma solução de BSA 4% (p/v) em TBS/Tween [*Western Blot Washing Buffer* NaCl (150mM); Tris-HCl (1mM – pH 7,5) e Tween-20 (0,05% - v/v)], por 1 hora em temperatura ambiente sob suave agitação. Após a realização do bloqueio, as membranas foram lavadas com a solução TBS/Tween e incubadas com os anticorpos primários (Anti-LAT; Anti-Lyn, Anti-GD1b e Anti Gal-1) diluído na solução 0,5% de BSA em TBS/Tween por uma hora a temperatura ambiente. Novamente, as membranas foram lavadas (5 vezes) com TBS/Tween e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (4μg/mL - 1:20000) diluído em TBS/Tween, por uma hora. Após este período, as membranas foram lavadas (10 vezes – TBS/Tween) e submetidas ao processo de detecção por quimioluminescência pelo kit ECL (*Enheced Chemiluminescence* - GE, Amersham – Biosciences, Uppasala, Suécia). A quantificação dos resultados foi realizada utilizando o programa Adobe Photoshop 7.0.

3.10 Investigação do papel da Gal-1 na desgranulação de células RBL-2H3

A desgranulação das células RBL-2H3 foi avaliado pela atividade da enzima β-hexosaminidase. Esta enzima é uma hidrolase ácida que está localizada nos grânulos destas células, consequentemente é liberada após a ativação celular. A β-hexosaminidase cliva o substrato NAG (p-nitophenil-N-acetil-β-glucosamina, Sigma-Aldrich), liberando o cromóforo p-Nitrofelato de coloração amarela, o qual é quantificado através de um método colorimétrico (CHURCH *et al.,* 2003).

Células RBL-2H3 ($3.0x10^4$ células/poço) foram cultivadas (37ºC, 5%CO_2) em atmosfera umedecida por 16-18 horas em placa de cultura de 96 poços. As células foram sensibilizadas e estimuladas dependentes ou não da via FcεRI conforme descrito nos itens 3.2 e 3.3.

Para avaliar a ação da Gal-1 no processo de desgranulação, as células RBL-2H3 foram submetidas aos seguintes tratamentos:

- **Análise da capacidade indutora**

Curva de concentração: as células RBL-2H3 sensibilizadas ou não com IgE foram estimuladas com Gal-1 (Gal-1 derivatizadas – CAM-Gal-1) nas seguintes concentrações (μM): 10; 8; 4; 1; 0,25; 0,0625 por 45 minutos.

- **Análise da capacidade inibitória**

Curva de concentração: as células RBL-2H3 sensibilizadas com IgE foram incubadas com a Gal-1 (Gal-1 derivatizada – CAM-Gal-1) nas seguintes concentrações: 1; 2; 4; 6; 8; 10 μM, por um período de 24 horas, em seguida as células foram estimuladas com DNP-HSA (item 3.2).

Curva de tempo: as células RBL-2H3 sensibilizadas com IgE e incubadas com a Gal-1 (Gal-1 derivatizadas – CAM-Gal-1) na dose de 10μM por 0,5; 1; 2; 4; 8;

12; 16; 18; 20; 22; 24 horas, em seguida, as células foram estimuladas com DNP-HSA (item 3.2).

Importância do DRC, da forma dimérica e da ativação via FcεRI: as células RBL-2H3 sensibilizadas ou não com IgE foram incubadas com a Gal-1 (Gal-1 derivatizada - CAM-Gal-1) dimérica (10μM), Gal-1 monomérica (10μM), Gal-1 termicamente inativada (10μM) e Gal-1 associada com TDG, açúcar hapteno inibidor, ou sacarose (20mM) durante o período de 24 horas antes do estímulo com DNP-HSA ou ionóforo de cálcio (Itens 3.2 e 3.3).

As células foram lavadas com tampão Tyrode's (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM $NaHCO_3$, 0.37 mM NaH_2PO_4, 0.1 mM $MgCl_2$, 1.3 mM $CaCl_2$, 10 mM Hepes pH 7.3) suplementado com 0.1% BSA (Sigma-Aldrich). A estimulação foi realizada como descrito nos itens 3.2 e 3.3, sendo realizada por 45 minutos. Após a estimulação, os sobrenadantes foram transferidos para outros poços da mesma placa. As células aderidas foram solubilizadas com Triton X-100 1% diluído em tampão Tyrode's. Alíquotas de 25μL foram retirados de cada poço e incubadas, a 37°C, com 25μL do substrato da enzima (NAG) na concentração de 8mM diluído em tampão citrato – ácido cítrico 0,1M (pH 4,5) por 30 minutos.

A reação foi inibida pela adição de 50μL de tampão glicina (NaCl 0,2M, NaOH 0,2M, glicina 0,2M, pH 10). A concentração de β-hexosaminidase foi determinada pela densidade óptica em 405nm em leitor de placas Elisa (Spectramax Plus – Molecular Devices, Sunnyvale, Ca, EUA), utilizando o programa Softmax. O valor de total (100%) de β-hexosaminidase de cada poço foi determinado pela soma das leituras do sobrenadante mais o solubilizado em 1% de Triton X-100. Baseando-se no valor total, calculou-se a liberação de β-hexosaminidase a partir da leitura de seu

respectivo sobrenadante. Para o cálculo de desvio padrão de cada ponto foi considerado os valores de 3 repetições.

3.11 Análise da anafilaxia cutânea passiva (PCA - *Passive Cutaneous Anaphylaxis)* em camundongos deficientes para o gene da Gal-1.

Os animais galectina-1 deficientes foram gentilmente doados pelo Professor Richard Dale Cummings. O *background* destes animais é o camundongo C57BL/6, o qual foi utilizado como controle selvagem. Este ensaio foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-PCARP-USP - Protocolo nº 08.1.424.53.5).

Os animais (selvagens e deficientes em galectina-1) foram anestesiados e os dorsos tricotomizados. Após 48 horas, foi administrado intradermicamente (ID) uma solução de IgE anti-DNP (Sigma-Aldrich - 0,1µg/animal) ou PBS em sítio delimitado nos dorsos dos animais. O desafio antigênico foi realizado 24 horas após a sensibilização pela administração intravenosamente de 200µL de DNP–HSA (1mg/mL) em 3% de azul de Evans (Sigma-Aldrich) diluídos em PBS estéril. Após 30 minutos do desafio, os animais foram sacrificados, a pele do dorso foi retirada para a determinação do extravasamento do corante. As amostras de pele foram tratadas com 1 mL de KOH (1M) por 16-18 horas e foram adicionados 4 mL de uma mistura (13:8) de acetona e H_3PO_4 (0,6N). Alíquotas de cada amostra foram colocadas em placa de 96 poços e a absorbância foi medida em 620 nm em leitor de placas Elisa (Spectramax Plus-Molecular Devices, Sunnyvale, Ca, EUA), utilizando o programa Softmax. Os valores foram convertidos em concentração (µg/mL de azul de Evans) pelo uso de diluições seriadas (0,3 - 20µg/mL) de azul de Evans em salina como padrões.

3.12 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa Graph Pad Prism (versão 4 Prism, Graph Pad, USA). Utilizou-se a análise de variância entre os grupos (ANOVA) “one-way”, e o teste complementar de Bonferroni, considerando-se um nível de significância $p<0.05$.

.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção de Galectina-1 Recombinante Humana

As preparações de Galectina-1 recombinante humana (Gal-1) purificada foram obtidas por cromatografia de afinidade em colunas de agarose-lactose de lisados de bactéria transformadas com o gene da galectina-1. A produção média da Gal-1 purificada foi de 40mg/L de cultura de bactérias transformadas. A Figura 5 apresenta o perfil cromatográfico da purificação da Gal-1 monitorado pela DO em 280nm.

A preservação da propriedade lectínica da Gal-1 purificada foi avaliada por meio da re-cromatografia desta proteína em colunas de agarose-lactose. Os dados obtidos do procedimento de re-cromatografia indicaram que a Gal-1, previamente purificada, foi detectada apenas após a adição de lactose 100mM em tampão de lavagem (Figura 6A). A análise eletroforética das frações cromatográficas demonstrou que a proteína apresentou alto grau de homogeneidade e migrou com massa molecular aparente de 14,9kDa (Figura 6B). Estes resultados demonstram que a proteína obtida estava quantitativamente ativa e pura.

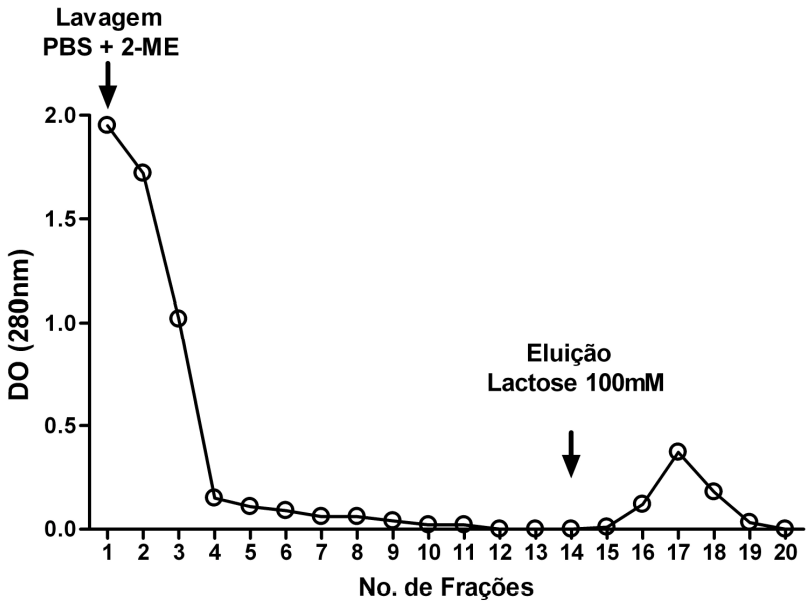

Figura 5. Perfil cromatográfico da purificação da Gal-1 a partir de extrato de *E. coli*. O lisado bacteriano bruto, obtido apartir de 2L de cultura, foi aplicado na coluna de agarose-lactose, como descrito em materiais e métodos. O material não ligante na coluna foi obtido pela lavagem desta com PBS acrescido de 2-ME (14mM) e o material ligante foi eluído com o tampão de lavagem acrescido de lactose (100mM-tampão de eluição). O procedimento cromatográfico foi monitorado pela absorbância em 280nm.

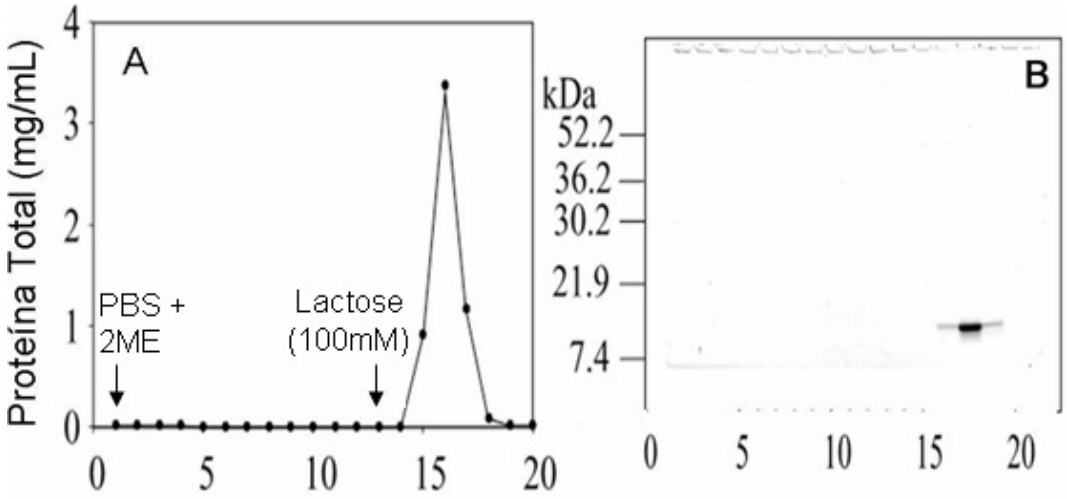

Figura 6. Perfil do procedimento de re-cromatografia das preparações da galectina-1 recombinante humana em coluna de agarose-lactose. (A) Preparações de Gal-1 obtidas, previamente, por afinidade em coluna de agarose-lactose foram novamente aplicadas nesta coluna. A etapa de lavagem foi realizada com PBS contendo 2-ME (tampão de lavagem) e a de eluição com tampão de lavagem contendo lactose (100mM). Foram coletadas 20 fracões. O processo de eluição foi monitorado pela determinação da concentração protéica (mg/mL) como descrito em materiais e métodos. (B) Análise eletroforética (SDS-PAGE) das frações cromatográficas obtidas do procedimento de re-purificação de Gal-1. As frações foram aplicadas em gel de poliacrilamida (15%) em condições redutoras e dissociantes. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue*. A massa molecular (MM) aparente da Gal-1 foi estimada com o auxílio de diferentes marcadores com MM de 52,2 a 7,4 kDa.

4.2 Análise da atividade hemaglutinante da Gal-1

As preparações de Gal-1 purificadas foram estocadas a -80°C até o momento do uso. Com a finalidade de analisar a preservação da capacidade da Gal-1 de reconhecer glicanas, nas amostras purificadas e estocadas ou submetida ao processo de derivatização com iodocetamida, foram realizados ensaios de hemaglutinação com estas preparações. Este ensaio foi utilizado como um indicador da qualidade da Gal-1 para os ensaios realizados nesse estudo.

As preparações de Gal-1, purificadas ou derivatizadas (CAM-Gal-1) que apresentaram atividade hemaglutinante detectável até 1μM foram utilizadas nos diferentes ensaios deste trabalho (Figura 7). Na presença de lactose (20mM), os efeitos hemaglutinantes da Gal-1 foram completamente inibidos em todas as concentrações testadas destas lectinas. Entretanto, o uso do açúcar hapteno controle não provocou nenhuma interferência detectável na reação de hemaglutinação de preparações de Gal-1. Além disso, a atividade hemaglutinante da CAM-Gal-1 foi preservada completamente após estocagem a 4ºC por 30 dias.

Portanto, as preparações de Gal-1 utilizadas nos demais ensaios deste trabalho estavam ativas e com perfil hemaglutinante homogêneo.

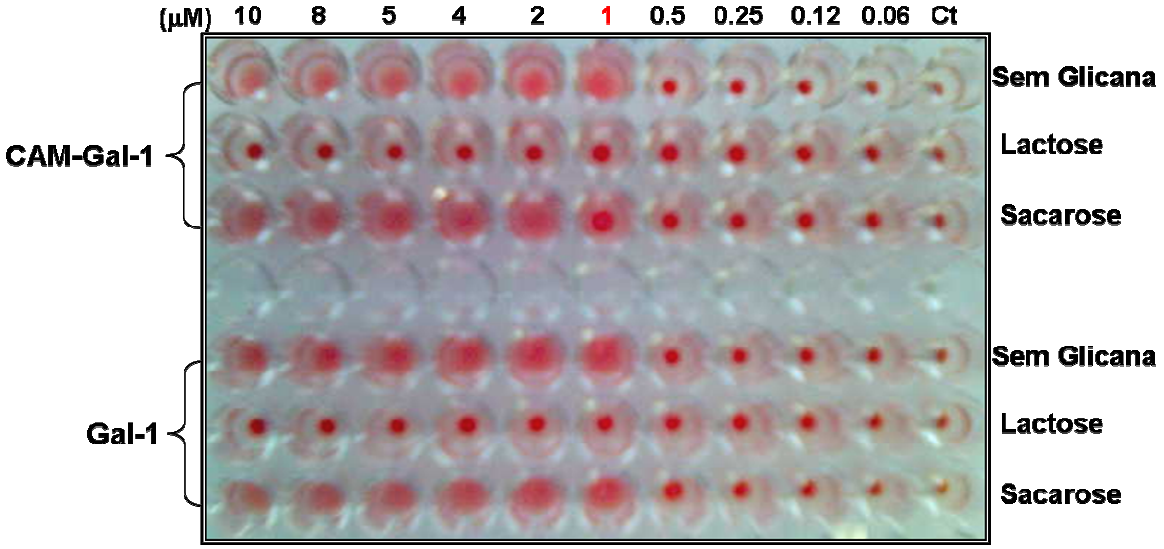

Figura 7. Perfil da atividade hemaglutinante das preparações de Gal-1 e CAM-Gal-1. Suspensões de hemácias humanas (3% em PBS) foram submetidas ao desafio com diferentes concentrações de Gal-1 ou CAM-Gal-1 (10, 8, 5, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625µM). A hemaglutinação foi realizada na presença ou ausência de lactose (20mM - açúcar-hapteno inibidor). A sacarose (20mM) foi usada como hapteno controle. As hemácias não desafiadas com Gal-1 ou CAM-Gal-1 foram consideradas como controle negativo de hemaglutinação (Ct). A aglutinação das hemácias foi registrada após 1 hora. O número destacado em vermelho representa a menor concentração hemaglutinante dessa lectina.

4.3 Análise da ligação da Galectina-1 em células RBL-2H3, por citometria de fluxo

Primeiramente avaliou-se a capacidade de ligação da Gal-1 em células RBL-2H3 pelo uso do derivativo fluorescente desta lectina (Gal-1TR). A ligação da Gal-1TR nestas células foi dose-dependente atingindo valores de saturação na concentração de 20µg/mL. Aproximadamente, 50% das células foram marcadas na dose de 2,5µg/mL de Gal-1TR (Figura 8). Com este resultado demonstramos que as células RBL-2H3 apresenta ligantes para Gal-1, este resultado permitiu o avanço deste estudo, pois a Gal-1 pode interagir com ligantes na superfície das células RBL-2H3.

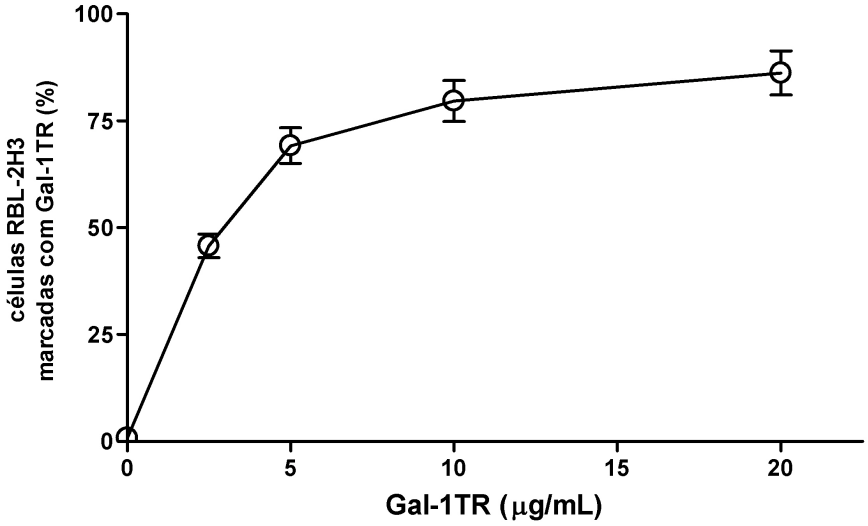

Figura 8. Gal-1 liga-se a superfícies de células RBL-2H3. As células RBL-2H3 ($1x10^6$/tubo) foram tratadas com as seguintes concentrações de Gal-1 derivatizada com o fluorocromo *Texas Red* (Gal-1TR): 0; 2,5; 5, 10 e 20μg/mL (4 horas - 37°C, 5%CO_2). A interação Gal-1TR e RBL-2H3 foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como média ± EPM (Erro Padrão da Média) das porcentagens de marcação de células RBL-2H3 tratadas com diferentes concentrações de Gal-1TR. Estes resultados são representativos de 2 experimentos independentes.

4.4 Avaliação da viabilidade celular e da apoptose de células RBL-2H3 tratadas com Gal-1

4.4.1 Avaliação da citotoxicidade (ensaio de MTT)

Após a determinação da capacidade de ligação da Gal-1 a superfícies de células RBL-2H3, a próxima etapa foi investigar o potencial citotóxico do tratamento dessas células com diferentes doses da Gal-1 e das glicanas utilizadas neste estudo. O ensaio de MTT foi utilizado para verificar a viabilidade celular durante o tratamento com Gal-1.

Os resultados mostraram que estas células permaneceram viáveis após o tratamento com várias concentrações de Gal-1 (2,5-40μM). Além disso, foi verificado que a Gal-1 não promoveu o aumento do número de células. Logo, a Gal-1 não promoveu citotoxicidade nestas células nas doses e condições analisadas (Figura 9).

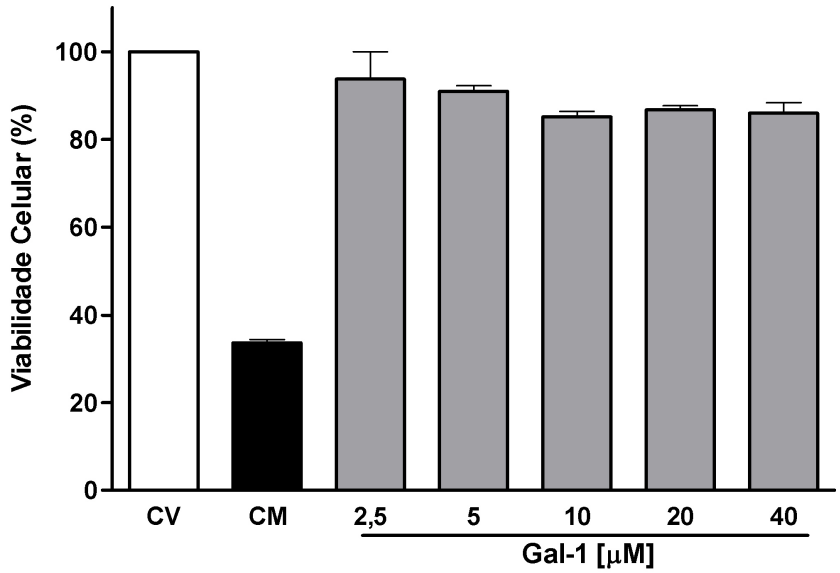

Figura 9. Células RBL-2H3 permaneceram viáveis após o tratamento com Gal-1. As células RBL-2H3 ($3.0x10^4$ células/poço) foram cultivadas em placa de 96 poços em meio DEMEM e incubadas com as seguintes concentrações de Gal-1 (μM): 2,5; 5; 10; 20 e 40, por 24 horas. CPT (10μM-CM) foi utilizada como indutor de morte celular e meio de cultura como controle de viabilidade celular (CV). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade (média ± EPM) em relação ao CV. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes.

Em alguns ensaios houve a necessidade de verificar se o efeito da Gal-1 é dependente do reconhecimento de carboidratos, logo, usamos as glicanas TDG (β-D-Tiogalactopiranosideo) como açúcar hapteno inibidor para inibir algumas atividades biológicas da Gal-1. A sacarose foi usada como açúcar hapteno controle. Assim, verificou-se se o uso destas glicanas poderia alterar a viabilidade celular.

Os resultados da avaliação da citotoxicidade destas glicanas nas células RBL-2H3 mostraram que TDG e a sacarose em diferentes concentrações (5-80 mM) não provocaram redução significativa na viabilidade destas células (Figura 10). Além disso, demonstrou-se que o tratamento concomitante de células RBL-2H3 com Gal-1 (10μM) e TDG (20mM) ou Gal-1 (10μM) e sacarose (20mM), utilizado em ensaios de inibição da atividade da Gal-1, não causou efeito citotóxico significativo nessas células (Figura 11).

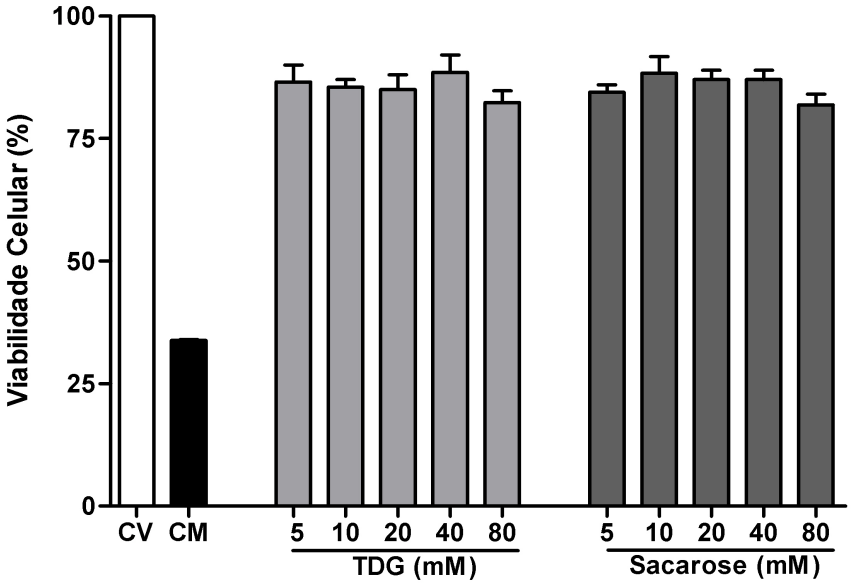

Figura 10. TDG e Sacarose não interferem na viabilidade das células RBL-2H3. As células RBL-2H3 ($3.0x10^4$ células/poço) foram cultivadas em placa de 96 poços em meio DEMEM e incubadas com TDG e sacarose nas seguintes concentrações (mM): 5; 10; 20; 40; 80 por 24 horas. CPT (10µM - CM) foi utilizada com indutor de citotoxicidade e meio de cultura como controle de viabilidade celular (CV). Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressos em porcentagem de viabilidade celular (média ± EPM) em relação ao CV.

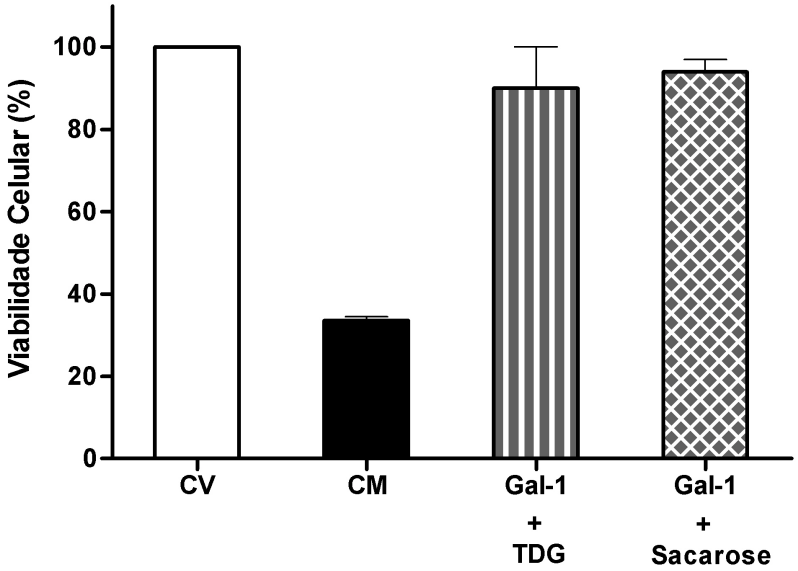

Figura 11. O tratamento de células RBL-2H3 com Gal-1 na presença de carboidratosa não provocou a morte dessas células. As células RBL-2H3 ($3.0x10^4$ células/poço) foram cultivadas em placa de 96 poços e tratadas com as seguintes associações: Gal-1 (10µM) + TDG (20mM) e Gal-1 (10µM) + sacarose (20mM) por 24 horas. CPT (10µM - CM) foi utilizada com indutor de citotoxicidade e meio de cultura como controle de viabilidade celular (CV). Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressos em porcentagem (média ± EPM) de viabilidade celular em relação ao CV.

4.4.2 Análise da exposição de fosfatidilserina na superfíce de células RBL-2H3, por citometria de fluxo

Os resultados acima permitem continuar os ensaios deste estudo, no entanto na literatura, estudos demostraram que a ligação da Gal-1 em leucócitos induz a exposição de fosfatidilserina (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; STOWELL *et al.*, 2007). A interação da Gal-1 com células RBL-2H3 poderia promover a exposição desse marcador de apoptose na superfície destas células?

Os resultados mostraram que as células RBL-2H3 tratadas com Gal-1 (10μM - 8 horas) apresentaram 41,3% de marcação positiva para anexinaV-FITC (Figura 12). Este efeito da Gal-1 foi bloqueado pela glicana sulfatada e específica TDG (β-D-Tiogalactopiranosideo - 20mM). A sacarose (glicana controle - 20mM) não interferiu na capacidade da Gal-1 de induzir a exposição de fosfatidilserina em células RBL-2H3 (Figura 12). Além disso, as células tratadas com Gal-1 apresentaram elevada viabilidade celular (95%) uma vez que mostraram marcação para iodeto de propídeo (IP) em níveis semelhantes a células não tratadas. Estes dados sugerem que o tratamento com Gal-1 induz a exposição de fosfatidilserina na superfície de células RBL-2H3 viavéis. Este evento foi dependente da capacidade da Gal-1 reconhecer glicoconjugados nas células RBL-2H3.

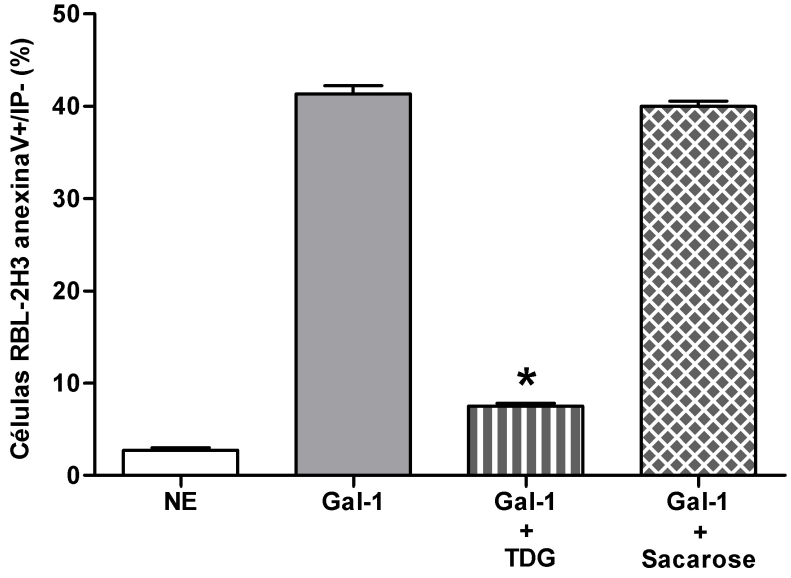

Figura 12. **A exposição de fosfatidilserina nas superfícies de células RBL-2H3 tratadas com Gal-1 foi dependente do reconhecimento de glicoconjugados.** As células RBL-2H3 ($1.0x10^6$ células/tubo) foram tratadas com Gal-1 (10µM) na presença ou ausência de TDG (20mM) por 8 horas. A sacarose foi usada com açúcar controle (20mM). A detecção da exposição de fosfatidilserina foi feita pela marcação celular com anexinaV-FITC. Os resultados foram analisados por citometria de fluxo e indicados pela porcentagem de células AnexinaV positivas e IP negativas (marcador de necrose). Os resultados foram expressos como média ± EPM e são representativos de 3 experimentos independentes. * $p<0,001$ em relação a Gal-1.

4.4.3 Avaliação da degradação de DNA pela reação de TUNEL e por análise eletroforética

A exposição de fosfatidilserina está associada à homeostase celular, indicando apoptose, senescência ou necrose de células, sendo um marcado de para reconhecimento de fagócitos (FADOK *et al.*, 2001; BROUCKAERT *et al.*, 2004). No entanto, dados da literatura mostram que galectinas podem induzir a exposição de fosfatidilserina em células independente do processo de apoptose (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; STOWELL *et al.*, 2007; STOWELL *et al.*, 2008).

Pelos estudos citados acima, houve a necessidade da avaliação do potencial apoptótico da Gal-1 sobre células RBL-2H3, adotando uma abordagem experimental múltipla. Assim, foi avaliado, o nível de degradação de DNA de células tratadas com

Gal-1 pela técnica de TUNEL e por análise eletroforética em gel de agarose *(DNA Laddering)*.

Os resultados da reação de TUNEL (Figura 13) mostraram que o tratamento com Gal-1 (10µM-8 horas) induziu baixa porcentagem (7,5%) de células TUNEL positivas (Figura 13). O controle positivo da reação utilizando DNAse (30U) apresentou um alto índice de fragmentação de DNA nessas células (62%).

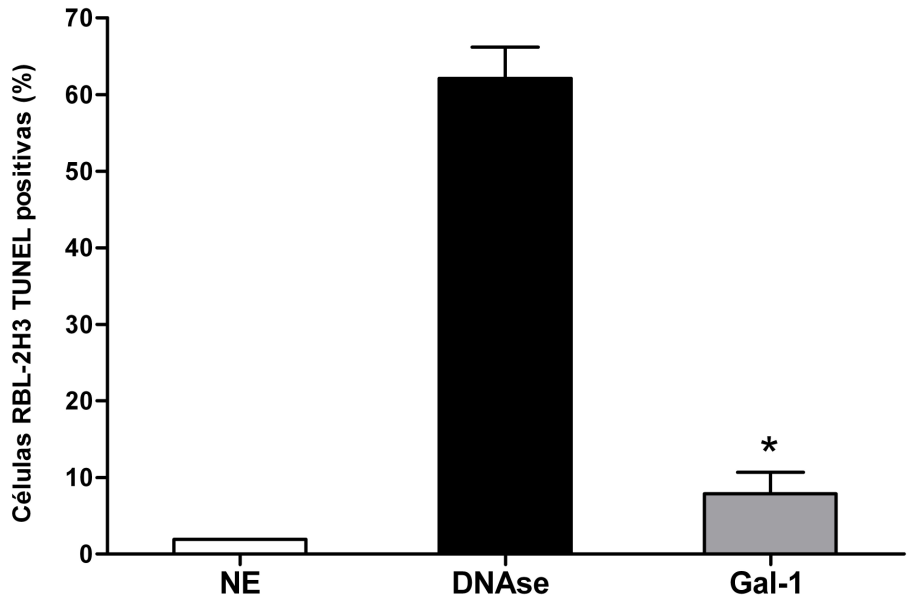

Figura 13. Células RBL-2H3 tratadas com Gal-1 não apresentaram degradação de DNA. Células RBL-2H3 ($1.0x10^6$ células/tubo) foram incubadas por 8 horas com Gal-1 (10µM) ou com apenas o mesmo volume do diluente (PBS - controle negativo - NE). Como referência de degradação de DNA, foram usadas células tratadas com DNAse I tipo IV (30U). Os resultados foram analisados por citometria de fluxo e expressos com porcentagem (média ± EPM) de células TUNEL positivas. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes. * $p<0,01$ em relação ao controle positivo (DNAse).

Na técnica do *DNA Laddering*, avaliou-se o perfil eletroforético de degradação de DNA em gel de agarose. Os resultados demonstraram que a Gal-1 (10µM - 8 horas), não promoveu degradação de DNA, pois foi detectada apenas uma banda de alto peso molecular desse ácido nucléico (Figura 14 - linha 2), perfil muito semelhante ao encontrado nas células sem tratamento (Figura 14 - linha 1). Ao

contrário, as células tratadas com camptotecina 10μM (CPT), um indutor clássico de apoptose, apresentaram uma intensa fragmentação de DNA (Figura 14 - linha 3). Entretanto, este efeito da CPT foi muito intenso e não permitiu a visualização do padrão oligonucleossomal de fragmentação de DNA característico do processo apoptótico, como descrito na literatura (COHEN *et al.*, 1992; STEWART, 1994).

Figura 14. Análise eletroforética do DNA de células RBL-2H3 tratadas com Gal-1. Suspensões de células RBL-2H3 ($1x10^6$ células) foram incubadas com Gal-1 (10μM), com o mesmo volume do diluente (PBS-controle negativo), com a camptotecina (CPT-10μM) usada com referência de apoptose. As incubações foram realizadas por 8 horas. A corrida foi realizada em gel de agarose (1,5%) a 60V por 3 hora e corado com brometo de etídio. A visualização do DNA e a captura da imagem foram realizadas no aparelho $EPIChem^3$ Darkroom.

4.4.4 Detecção de alteração do conteúdo de DNA celular, por citometria de fluxo

As células apoptóticas podem apresentar condensação de cromatina e fragmentação de DNA resultando numa diminuição do conteúdo normal (diploidia) desse ácido nucléico. Essa redução é conhecida como hipodiploidia e pode ser quantificada por citometria de fluxo utilizando fluoróforos que interagem com DNA, como o iodeto de propídio (NICOLETTI *et al.*, 1991).

Na Figura 15 são apresentados os resultados referentes interferência da Gal-1 no conteúdo de DNA das células. O tratamento com Gal-1 (10µM - 8 horas) não induziu redução no conteúdo de DNA em células RBL-2H3, apresentando baixa porcentagem de células hipodiplóides (10,6%), resultado semelhante (10,8%) ao encontrado em células não tratadas (NE). Entretanto, foi detectada a indução de elevada porcentagem (52%) de hipodiploidia em células tratadas com o indutor de apoptose, camptotecina (CPT - 10µM - 8horas). Logo, com base nestes dados pode-se sugerir que o tratamento com Gal-1 não promove alterações na diploidia das células.

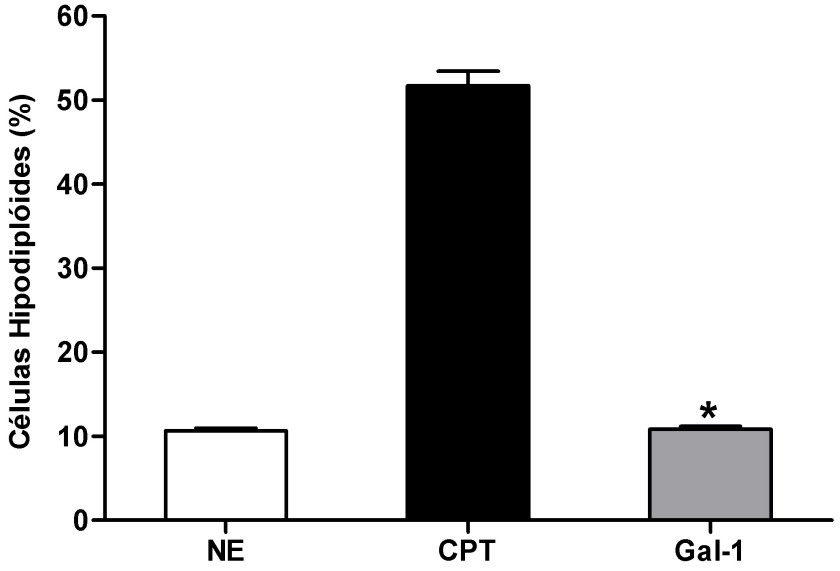

Figura 15. Gal-1 não alterou o conteúdo de DNA das células RBL-2H3. Células ($1x10^6$ células/tubo) foram tratadas com PBS (NE), com Gal-1 (10µM) e camptotecina (CPT - 10µM) por 8 horas. Os resultados foram analisados por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como média ± EPM e são representativos de 3 experimentos independentes. * $p<0,001$ em relação ao CPT.

4.4.5 Detecção de apoptose por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Finalmente, foi realizados experimentos de MET em células RBL-2H3 tratadas com Gal-1 visando à obtenção de dados ultraestruturais característicos de apoptose.

As micrografias ilustradas na Figura 16 mostraram que células tratadas com CPT (indutor de apoptose) apresentaram aspectos ultraestruturais característicos do processo apoptótico: 1) condensação da cromatina; 2) marginalização da cromatina na membrana perinuclear (Figura 16C); 3) presença de mitocrôndrias com perda de cristas e com inchaço ("*swoellen*") (Figura 16F). Ao contrário, células RBL-2H3 controle (Figura 16A) ou tratadas com Gal-1 (Figura 16B) apresentaram morfologias similares e não indicativas de apoptose, como cromatina não condensada e mitocôndrias preservadas (Figuras 16D e E respectivamente).

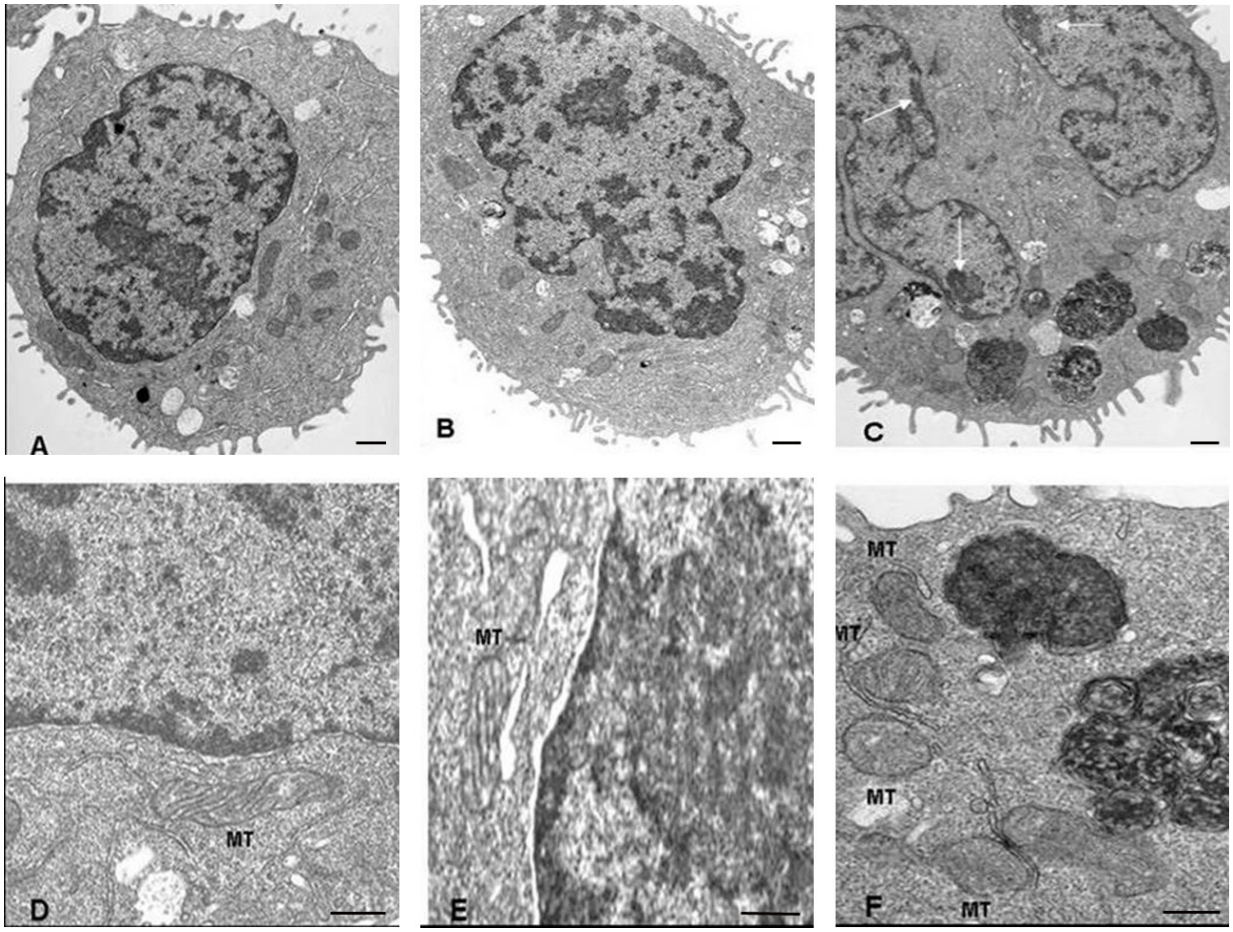

Figura 16. Gal-1 não induziu alterações ultraestruturais indicativas de apoptose em células RBL-2H3. As células RBL-2H3 ($1x10^6$ células/poço) tratadas ou não (A - controle negativo) com Gal-1 (10µM - B) por 8 horas não apresentaram características nucleares típicas do processo de apoptose. Células tratadas com camptotecina (CPT - 10µM - C) por 8 horas apresentaram cromatina condensada e marginalizada na membrana perinuclear (seta). As mitocôndrias (MT) de células tratadas com CPT apresentaram redução de cristas e inchaço (*swollen*) (F). As mitocôndrias de células tratadas ou não com Gal-1 estão preservadas (E e D, respectivamente). As grades foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão PHILPS EM 208. Barras: 500 nm.

Os resultados obtidos dos ensaios de Tunel, *DNA ladering*, hipodiploidia e MET mostraram que não foram detectadas fragmentação de DNA, alteração da diploidia ou aspectos ultraestruturais característicos de apotose em células tratadas com Gal-1. Além disso, a Gal-1 não promoveu efeito de citotoxicidade nas células RBL-2H3. Portanto, sugere-se que esta lectina promove a exposição de fosfatildilserina (marcador de fagocitose e apoptose) na superfície de céluas RBL-2H3, na ausência de alterações celulares características do processo de apoptose ou morte celular.

4.5 Avaliação morfológica de células RBL-2H3 tratadas com Gal-1, por DIC e MEV

As células RBL-2H3 apresentam uma morfologia definida caracterizada pela forma fusiforme. Entretanto, durante o processo de ativação destas células, ocorrem alterações na morfologia destas células, representada pela formação de ondulações da membrana plasmática (*Ruffles*) e pela perda a forma fusiforme característica, tornando-se mais esféricas e espalhadas pelo substrato. Nos itens anteriores, verificou-se que a Gal-1 pode ligar-se nas células RBL-2H3 promovendo uma alteração da distribuição da fosfatidilserina, um fosfolipides da membrana. Logo, estes eventos ou o tratamento das células com Gal-1 poderiam promover alterações morfológicas em células submetidas ou não a ativação via FcεRI?

4.5.1 Microscopia de contraste diferencial de interferência (DIC)

Primeiramente, utilizamos a microscopia de contrate diferencial de interferência para verificar o efeito do tratamento da Gal-1 em células não estimuladas. O tratamento foi feito em pequenos intervalos de tempo (15-30minutos). As células RBL-2H3 incubadas com PBS (controle negativo) apresentaram aspecto fusiforme característico e indicativo da ausência de estimulação celular (Figura 17A). Entretanto as células tratadas com Gal-1 (10μM) por 15 ou 30 minutos (Figura 17B e C) apresentaram a formação de ondulações na membrana plasmática (*ruffles*) nas extremidades das células. Este padrão de formação de ruffles foi diferente dos apresentados em células ativadas (PFEIFFER *et al.*, 1985).

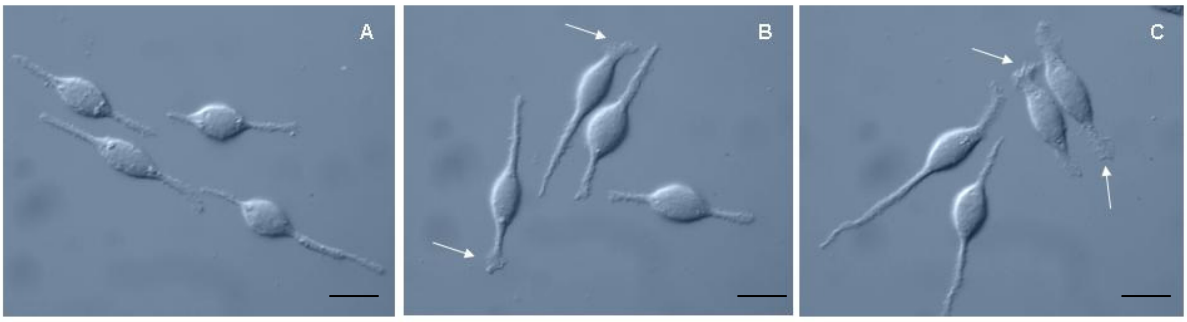

Figura 17. Gal-1 induziu alterações morfológicas nas células RBL-2H3. As células RBL-2H3 ($3.0x10^4$ células/poço) foram incubadas por 30 minutos na ausência de Gal-1 (PBS - controle negativo -A). As células foram tratadas com Gal-1 (10µM) por 15 (B) ou por 30 minutos (C). Após os tratamentos, as células foram fixadas com glutaraldeído 2% em PBS. As lâminas foram observadas por DIC ao microscópio Nikon Eclipse E800. As setas indicam as ondulações nas membranas plasmáticas. Aumento de 40x. Barras: 10µm.

4.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para uma análise mais detalhada das alterações morfológicas obtidas no item anterior (DIC), investigou-se as alterações das superfícies das células RBL-2H3 sensibilizadas ou não com IgE e tratadas com Gal-1 por MEV.

Os resultados mostraram que as células RBL-2H3 sensibilizadas ou não (controle negativo) com IgE (Figura 18A e B) apresentam-se fusiformes e com a superfície coberta de pequenas microvilosidades. As células RBL-2H3 sensibilizadas (Figura 18C) ou não (Figura 18D) com IgE e submetidas ao tratamento com Gal-1 (10µM-1 hora), permaneceram fusiformes e apresentaram ondulações na membrana plasmática (*ruffles*) localizadas nas extremidades das células. Desta maneira, os resultados da análise morfológica por DIC foram confirmados demonstrando a capacidade de Gal-1 induzir ondulações na membrana plasmática em tratamentos com curto período de tempo.

Com base nestes resultados, avaliou-se qual seria o efeito da Gal-1 (10µM - 1 hora) em células sensibilizadas ou não com IgE e ativadas via FcεRI, após o tratamento com Gal-1.

As micrografias da MEV mostraram que as células RBL-2H3 ativadas via FcεRI apresentaram profundas ondulações nas superfícies celulares e encontram-se espalhadas pelo substrato (Figura 18E e F). Estas alterações são características do processo de estimulação destas células. Interessantemente, o pré-tratamento com Gal-1 (10μM - 1 hora) induziu uma redução na profundidade dos *ruffles* promovidos pela ativação das células RBL-2H3 via FcεRI, utilizando DNP-HSA (Figura 18G) ou o anticorpo BC4 (Figura 18H).

Logo, os dados obtidos acima permitem sugerir que a Gal-1 pode promover alterações morfológicas nas células RBL-2H3 submetidas ou não ao processo de ativação celular via FcεRI. Estas alterações estão relacionadas com a formação de ondulações na membrana plasmática, denominadas *ruffles.*

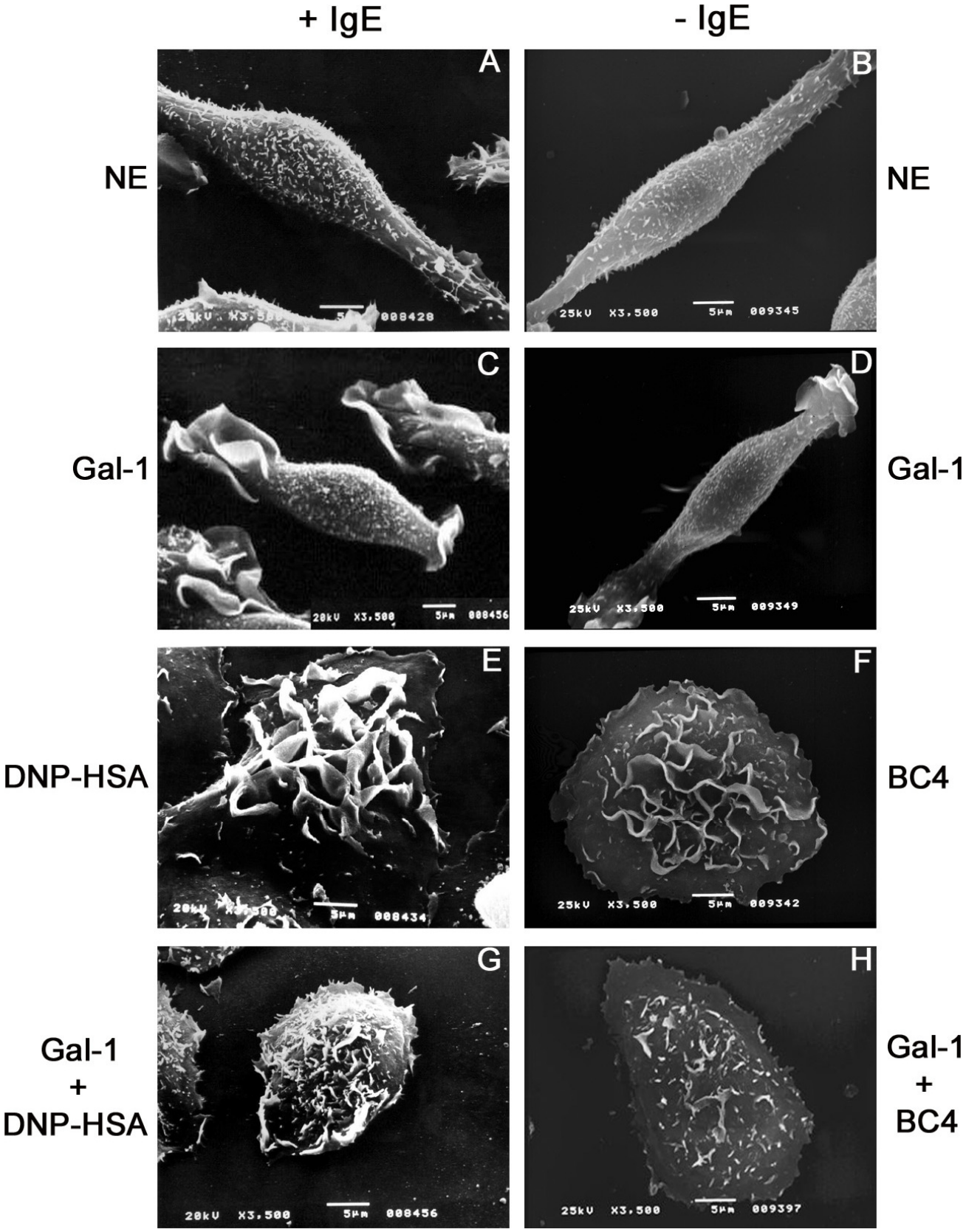
+ IgE
- IgE
A
B
NE
NE
C
D
Gal-1
Gal-1
E
F
DNP-HSA
BC4
G
H
Gal-1
+
DNP-HSA
Gal-1
+
BC4

Figura 18. Gal-1 induziu ondulações na superfície de células RBL-2H3 e modificou o padrão dos *ruffles* produzidos pela ativação dessas células via FcεRI. As células RBL-2H3 ($5.0x10^4$/poço) foram sensibilizadas ou não com IgE (NE - A e B) e tratadas com Gal-1 (10µM - 1 hora, C e D). As células RBL-2H3 sensibilizadas com IgE e desafiadas com DNP-HSA (50ng/mL - 45 minutos, E) ou estimuladas com anticorpo BC4 (0,5 µg/mL - 45 minutos, F) foram pré-tratadas com Gal-1 (10µM - 1 hora, G e H). As células foram observadas no microscópio eletrônico de varredura JOEL-JMS-5200. Aumento 3500X. Barras: 5µm.

4.6 Análise da distribuição dos componentes dos *lipids rafts*

Os dados obtidos até o momento mostram que a interação da Gal-1 com ligantes promoveu alterações na membrana plasmática, tais como a exposição de fosfatidilserina e alterações da morfologia tanto de células estimuladas ou não. Durante a ativação via FcεRI, um dos eventos iniciais é a reorganização da membrana plasmatica, promovendo a formação de microdomínios lipídicos constituídos de lipídios e proteínas (Lyn, LAT, Syk) essenciais para o início da transdução de sinal da via FcεRI (WILSON; PFEIFFER; OLIVER, 2000; HOLOWKA; SHEETS; BAIRD, 2000).

Baseado nestas evidências verificou-se a alteração da distribuição de componentes (Lyn; LAT, GD_{1b}) da via FcεRI nos lipids rafts, tanto em células estimuladas ou não e tratadas com Gal-1.

Os resultados ilustrados na Figura 19 mostram que por meio do procedimento de fracionamento subcelular em gradiente de sacarose (5 a 40%) foi possível resolver as frações dos lisados celulares resistentes a detergente e menos densas (*lipid rafts*) das frações mais densas não-*rafts*. As frações *lipid rafts* foram localizadas na metade superior do tubo de gradiente de sacarose como indicado pela marcação da proteína LAT, um conhecido marcador de *lipid rafts* (WILSON; PFEIFFER; OLIVER, 2000).

As frações subcelulares de RBL-2H3 estimuladas ou não com BC4 mostraram que a LAT foi localizada principalmente nas frações 3 e 4 (setas). Quando as células

foram tratadas com Gal-1 e não estimuladas apresentaram baixa marcação para a LAT, entre as frações 4 e 10, sendo a marcação mais intensa na fração 5 (Figura 19A). Entretanto, nos lisados de células pré-tratadas com Gal-1 (10μM – 45 minutos) e estimuladas com BC4, a marcação da LAT na fração *raft* 3 foi menor e mais intensa na fração raft 4 e na fração 5 em comparação as células estimuladas apenas com o BC4.

O perfil de distribuição da proteína Lyn, uma tirosina quinase responsável pela fosforilação das subunidades γ e β do receptor FcεRI, também foi avaliado. Esta proteína apresentou uma distribuição preferencial nas frações *raft* 3 e 4 e na fração 5 obtidas de células não estimuladas. O tratamento de células RBL-2H3 com Gal-1 (10μM - 45min) promoveu um deslocamento da proteína Lyn das frações *rafts* (3-4) para as frações 5 e 6 (Figura 19C). Já em células estimuladas com BC4, a Lyn foi detectada preferencialmente nas frações rafts (3-4) e no pré-tratamento com Gal-1 (10μM - 45min) seguido da estimulação com mAb BC4, houve um deslocamento desta proteína para as frações 4 e 5 (Figura 19D).

O gangliosídeo GD_{1b} é reconhecido pelo anticorpo mAbAA4, tendo um importante papel na ativação de células RBL-2H3. Este gangliosídeo, em células não estimuladas, mostrou-se distribuído entre frações 1-6. O tratamento de Gal-1 alterou esta distribuição deslocando os gangliosídeos principalmente para as frações 4-10 (Figura 19E). Já nas células estimuladas, os gangliosídeos encontram-se preferencialmente nas frações 2-5, mas em células pré-tratadas com Gal-1 (10μM - 45min.) e estimuladas com BC4 mostrou-se distribuído nas frações 3-10, (Figura 19F).

Verificou-se também que a Gal-1 apresentou um perfil de distribuição semelhante tanto em células não estimuladas tratadas com Gal-1 e pré-tratadas com