

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

2008

RIBEIRÃO PRETO

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, César, 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 difíceis 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, entusiasmos, 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 μ M-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 Fc ϵ RI. A distribuição de componentes de *Lipid Rafts* relacionados ao processo de ativação celular via Fc ϵ RI (Lyn, LAT e GD1b) foi modificada pelo tratamento dessas células com Gal-1 (10 μ M), por 1 hora. As células RBL-2H3 tratadas com Gal-1(10 μ M-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 Fc ϵ RI. O valor máximo de inibição (80%) da liberação de β -HEX foi atingido quando as células foram tratadas com 10 μ M 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 Fc ϵ RI, foram fracamente marcados com o anticorpo AD1 e apresentaram uma distribuição citoplasmática difusa. Entretanto, células tratadas com Gal-1 (10 μ M - 24 horas) e estimuladas via Fc ϵ RI 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 mastócitos 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. Interestingly, 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 $Fc\epsilon RI$ 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 $Fc\epsilon RI$. 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 <i>E. coli</i> | 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 carboidratos 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 <i>ruffles</i> produzidos pela ativação dessas células via FcεRI | 67 |
| Figura 19. Gal-1 interferiu na distribuição de componentes de <i>lipid rafts</i> 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 | 2 β -mercaptoetanol |
| b-FGF | <i>Fibroblast Growth Factor</i> |
| β -HEX | Beta-hexosaminidase |
| CAM-GAL-1 | Gal-1 derivatizada com iodocetamida |
| CPT | Camptotecina |
| CTMC | <i>Connective Tissue Mast Cell</i> |
| DAG | Diacilglicerol |
| DIC | Microscopia de contraste diferencial de interferência |
| DO | Densidade óptica |
| DRC | Domínio de reconhecimento de carboidrato |
| ERK | <i>Extracelular-signal-regulated kinase-1</i> |
| Fc ϵ RI | Receptor de alta afinidade para IgE |
| Fc γ RIIB | Receptor de baixa afinidade para IgG |
| FLC γ | 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 | <i>Growth-factor-receptor bound protein 2</i> |
| IL | Interleucina |
| INF γ | Interferon γ |
| InsP3 | Inositol-1,4,5trifosfato |
| IP | Iodeto de propídeo |
| ITAM | <i>Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif</i> |
| ITIM | <i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i> |
| LAT | <i>Linker for activation of T cell</i> |

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

| | |
|------|---|
| Vav | <i>Guanine nucleotide exchange factor</i> |
| VEGF | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| RESUMO | <i>i</i> |
| ABSTRACT | <i>iii</i> |
| Lista de figuras | <i>iv</i> |
| Lista de Abreviaturas e siglas | <i>vi</i> |
| 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 (FcγRI) | 26 |
| 3.3) Ativação das células RBL-2H3 independente da via receptor FcγRI | 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 hemaglutinação | 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 (<i>Differential Interference Contrast</i> - 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 <i>Lipids rafts</i> , 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 - <i>Passive Cutaneous Anaphylaxis</i>) 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 <i>lipids rafts</i> | 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 – <i>Passive Cutaneous Anaphylaxis</i>) 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 sanguíneos 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 glicoestruturas 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.

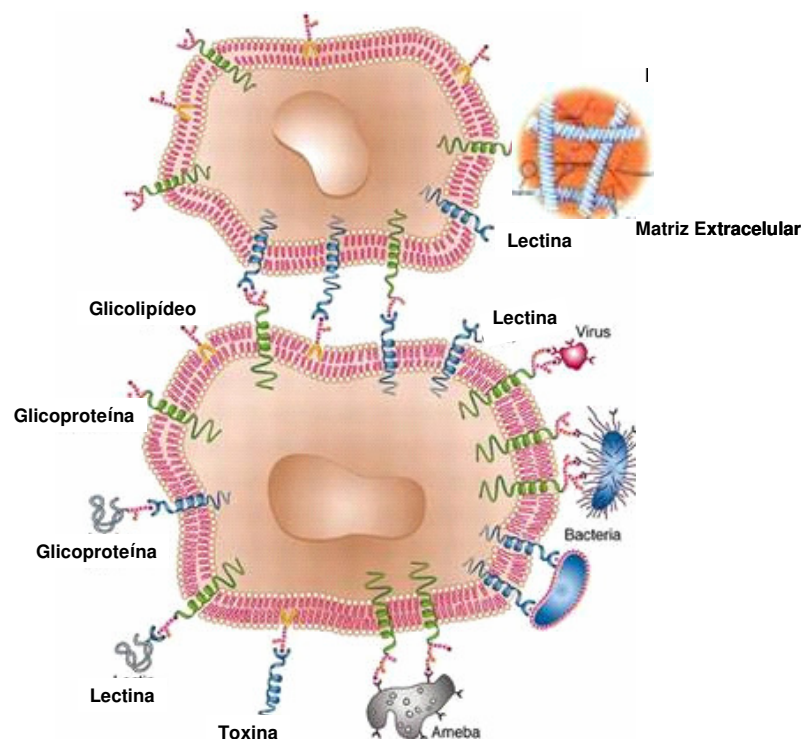


Figura 1. Interação entre lectinas e glicanas. Lectinas estabelecem interações célula-célula e/ou célula-matriz extracelular através do reconhecimento específico de glicoconjugados. A interação lectina-carboidrato pode promover a ligação de moléculas bioativas em componentes celulares. As lectinas podem 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 estudada 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).




| Tipo | Estrutura | Membros |
|----------------|---|--|
| 1 DRC |  | 1, 2, 5, 7, 10, 11, 14, 15 Monômeros ou dímeros com 2 DRC idênticos |
| Tipo Quimérica |  | 3 Ligação com ligantes carboidratos e não-carboidratos |
| 2 DRC |  | 4, 6, 8, 9, 12 Ligação com 2 ligantes diferentes (carboidratos) |

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 membrana 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 participar 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 μ M (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 2 β -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 (INF γ) 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 fosfolípido 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 ($T_{\text{h}}-17$) e não de células $T_{\text{h}}2$ 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 iniciais 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 – *Connective 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 Alzheimer, 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 aracônico, como a PGD₂ (Prostaglandina-D2), leucotrienos como o LTC₄ e LTB₄, PAF (*Platelet Activating 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-1 β , 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; WYMAN *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 quatro 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 Activation Motif*), que são seqüências que contém resíduos de tirosina que serão fosforilados, iniciando assim a transdução de sinal. No receptor Fc ϵ RI, os ITAMs estão localizados nos domínios citoplasmáticos das subunidades β e γ (KINET, 1990; RIVERA; GILFILLAN, 2006).

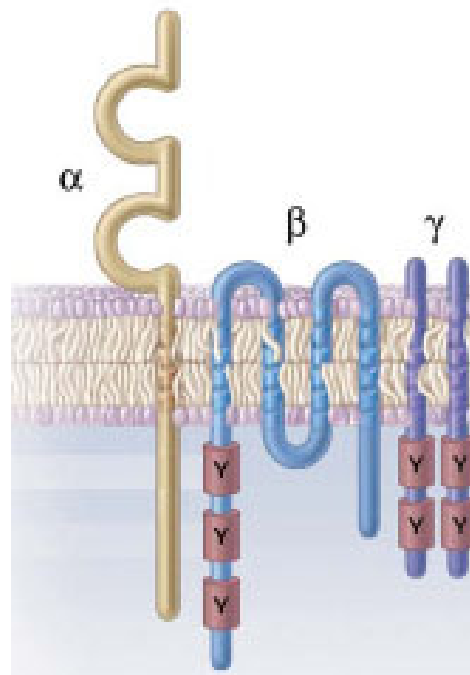


Figura 3. Estrutura do receptor de alta afinidade para IgE (Fc ϵ RI). O tetrâmero que compõem o receptor é formado por uma subunidade α , responsável pelas regiões de ligação com a IgE; uma subunidade β , a qual possui quatro porções transmembrana com domínios intra e extracelulares e duas subunidades 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, conseqüentemente 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, esfingomiéline, 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 Fc ϵ RI (ZHANG *et al.*, 1996; SIRAGANIAN *et al.*, 2002).

Após a ativação, a Sky e a Lyn vão promover a fosforilação da LAT (*Linker for activation 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 FLC γ (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 FLC γ é translocada para a membrana, onde hidroliza

fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) produzindo 2 segundos mensageiros: inositol-1,4,5 trifosfato (InsP₃) e o diacilglicerol (DAG). O InsP₃ promove a liberação de Ca⁺² do retículo endoplasmático 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 (*extracellular-signal-regulated kinase-1*). Por esta via, ocorre à ativação da fosfolipase A2 (FLA2) para a produção dos mediadores neo-formados, que são produzidos a partir do metabolismo de fosfolípidios 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.

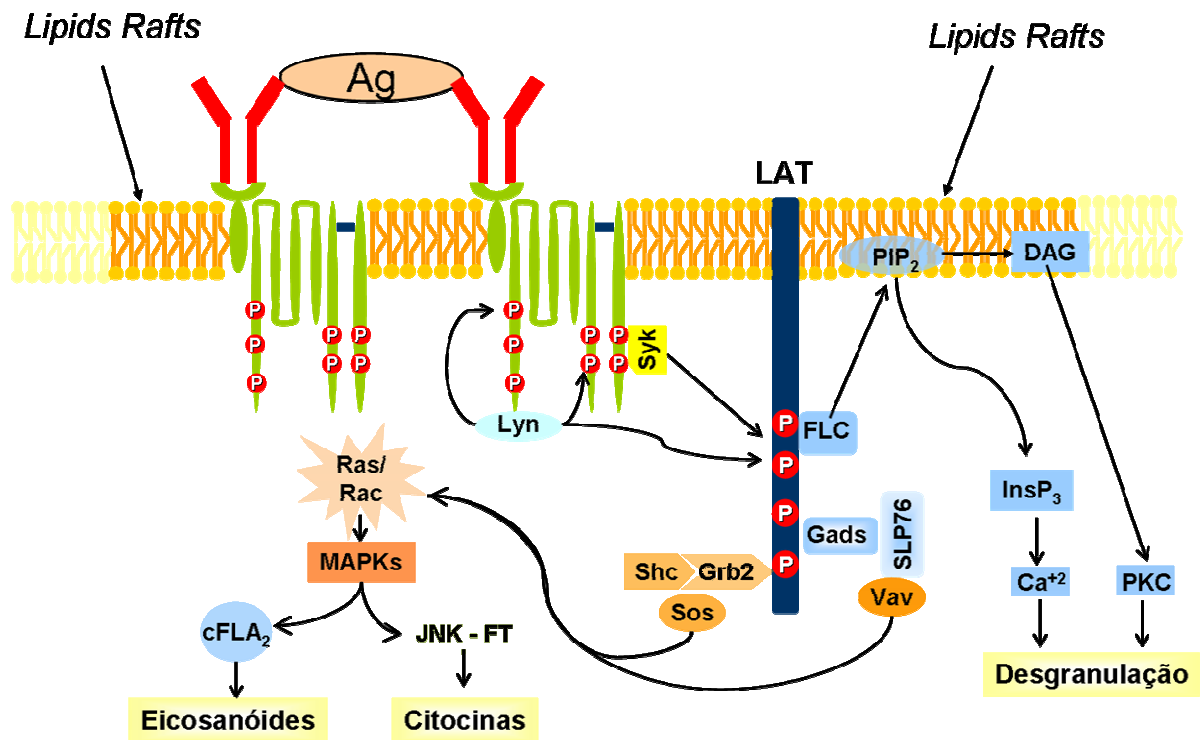


Figura 4. Esquema da via de transdução de sinal em mastócitos. O intercruzamento dos receptores FcεRI por meio de um antígeno multivalente desloca o receptor para os *lipid rafts*. A fosforilação (P) dos resíduos de tirosina, localizada nos ITAMs das subunidades γ e β do receptor, é realizada pela Lyn 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 adaptadoras ativam as GTPases Ras/Rac as quais ativam a cascata de MAPK controlando assim a síntese de citocinas e eicosanóides. InsP₃: 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 fosfolípidos 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 InsP₃, ambos segundo mensageiros, pela metabolização de PIP₂ localizado nas membranas (TKAGZYK *et al.*, 2003; RIVERA; OLIVEIRA, 2007).

A fosfolipase D (FLD) faz a hidrólise da fosfatidilcolina, outro fosfolípido 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-containing 5' inositol phosphatase*), PTEN (*Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*), SHP-1 e -2 (*SH2-containing inositol phosphatase 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 (*Soluble N-ethylmaleimide attachment 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 citotóxico 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 ϵ BP, em mastócitos. FRIGERI; LIU (1992) demonstraram que os níveis de expressão de Gal-3 aumentaram com a ativação celular desencadeada via Fc ϵ RI. 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 Fc ϵ RI pelo reconhecimento de glicanas no receptor Fc ϵ RI (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).

Conclusão

6 CONCLUSÃO

O estudo da interação entre Gal-1 e mastócitos possibilitou a elaboração das seguintes proposições:

- ✓ Gal-1 interage com glicoconjugados de células RBL-2H3.
- ✓ Gal-1, via o reconhecimento de carboidratos, induz a exposição de fosfatidilserina nas superfícies de células RBL-2H3 na ausência de apoptose e desgranulação.
- ✓ Células RBL-2H3 não estimuladas e tratadas com Gal-1 apresentaram ondulações nas porções apicais das membranas plasmáticas. A Gal-1 inibiu a formação dessas ondulações em células RBL-2H3 estimuladas via Fc ϵ RI.
- ✓ Células RBL-2H3 estimuladas ou não via Fc ϵ RI e tratadas com Gal-1 apresentaram modificações na distribuição de constituintes de *lipids rafts*.
- ✓ O tratamento de células RBL-2H3 estimuladas via Fc ϵ RI com a forma dimérica da Gal-1 provocou a inibição da desgranulação dessas células. Este efeito inibitório foi dependente da concentração dessa lectina e do tempo do tratamento.
- ✓ A Gal-1 exógena apresentou localização semelhante aos grânulos em células estimuladas e não estimuladas.
- ✓ Animais deficientes do gene da Gal-1 foram mais responsivos a reação de anafilaxia cutânea passiva, mediada por IgE, em comparação com os animais selvagens.
- ✓ Os resultados obtidos sugerem que a Gal-1 pode participar da homeostase e da modulação de funções de mastócitos em processos inflamatórios e alérgicos.

Referências Bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, N.; GABIUS, H. J.; SABESAN, S.; OSCARSON, S.; BREWER, C. F. Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-3. **Glycobiology**, v.14, p. 817-825, 2004.
- ASHWELL, G.; MORELL, A. G. Membrane glycoproteins and recognition phenomena. **Trends in Biochemical Science**, v. 2, p. 76-78, 1972.
- BALDINI, A.; GRESS, T.; PATEL, K.; MURESU, R.; CHIARIOTTI, L.; WILLIAMSON, P.; BOYD, Y.; CASCIANO, I.; WELLS, V.; BRUNI, C. B.; MALLUCCI, L.; SINISCALCO, M. Mapping on human and mouse chromosomes of the gene for the beta-galactoside-binding protein, an autocrine-negative growth factor. **Genomics**, v.15, p. 216-218, 1993.
- BARONDES, S. H.; CASTRONOVO, V.; COOPER, D. N.; CUMMINGS, R. D.; DRICKAMER, K.; FEIZI, T.; GITT, M. A.; HIRABAYASHI, J.; HUGHES, C.; KASAI, K. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell**, v. 76, p. 597-578, 1994.
- BARSUMIAN, E. L.; ISERSKY, C.; PETRINO, M. G.; SIRAGANIAN, R. P. IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and non-releasing clones. **European Journal of Immunology**, v. 11, p. 317-323, 1981.
- BASCIANO, L. K.; BERENSTEIN, E. H.; KMAK, L.; SIRAGANIAN, R. P. Monoclonal antibodies that inhibit IgE binding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 11823-11831, 1986.
- BAUM, L. G.; SEILHARMER, J. J.; PANG, M.; LEVINE, W. B.; BEYNON, D.; BERLINER, J. A. Synthesis of an endogenous lectin, galectin-1, by human endothelial cells is up regulated by endothelial cell activation. **Glycoconjugate Journal**, v. 12, p. 63-68, 1995.
- BAUM, L. G.; BLACKALL, D. P.; ARIAS-MAGALLANO, S.; NANIGIAN, D.; UH, S. Y.; BROWNE, J. M.; HOFFMANN, D.; EMMANOUILIDES, C. E.; TERRITO, M. C. BALDWIN, G. C. L. Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. **Clinical Immunology**, v. 109, p. 295-307, 2003.
- BIANCO, G. A.; TOSCANO, M. A.; ILARREGUI, J. M.; RABINOVICH, G. A. Impact of protein-glycan interactions in the regulation of autoimmunity and chronic inflammation. **Autoimmunity Reviews**, v. 5, p. 349-356, 2006.
- BINGHAM, C. O. 3RD; AUSTEN, K. F. Phospholipase A2 enzymes in eicosanoid generation. **Proceedings of the Association of American Physicians**, v. 111, p. 516-524, 1999.
- BLANK, U.; RA, C.; MILLER, L.; METZGER, H.; KINET, J.P. Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. **Nature**, v. 337, p. 187-189, 1989.
- BLANK, U.; CYPRIEN, B.; MARTIN-VERDEAUX, S.; PAUMET, F.; POMBO, I.; RIVERA, J.; ROA, M.; VARIN-BLANK, N. SNAREs and associated regulators in the control of exocytosis in the RBL-2H3 mast cell line. **Molecular Immunology**, v. 38, p. 1341-1345, 2002.
- BLANK, U.; RIVERA, J. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. **Trends in Immunology**, v. 25, p. 266-273, 2004.
- BLASER, C.; KAUFMANN, M.; MULLER, C.; ZIMMERMANN, C.; WELLS, V.; MALLUCCI, L.; PIRCHER, H. α -galactoside binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-

induced proliferation of T cells. **European Journal of Immunology**, v. 28, p. 2311-2319, 1998.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). **Blood**, v. 9, p. 1194-1198, 1954.

BREWER, C. F.; MICELI, M. C.; BAUM, L. G. Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 12, p. 616-623, 2002.

BROUCKAERT, G.; KALAI, M.; KRYSKO, D. V.; SAELENS, X.; VERCAMMEN, D.; NDLOVU, M.; HAEGEMAN, G.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, p. 1089-1100, 2004.

BROWN, F. D.; THOMPSON, N.; SAQIB, K. M.; CLARK, J. M.; POWNER, D.; THOMPSON, N. T.; SOLARI, R.; WAKELAM, M. J. Phospholipase D1 localises to secretory granules and lysosomes and is plasma-membrane translocated on cellular stimulation. **Current Biology**, v. 8, p. 835-838, 1998.

BRUHNS, P.; FREMONT, S.; DAERON, M. Regulation of allergy by Fc receptors. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, p. 662-669, 2005.

BURD, P.R.; ROGERS, H.W.; GORDON, J.R.; MARTIN, C.A.; JAYARAMAN, S.; WILSON, S.D.; DVORAK, A.M.; GALLI, S.J.; DORF, M.E. Interleukin 3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 170, p. 245-257, 1989.

CAMBIER, J. C. Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). **Journal of Immunology**, v. 155, p. 3281-3285, 1995.

CAMBY, I.; BELOT, N.; LEFRANC, F.; SADEGHI, N.; DE LAUNOIT, Y.; KALTNER, H.; MUSELLE, S.; DARRO, F.; DANGUY, A.; SALMON, I.; GABIUS, H. J.; KISS, R. Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. **Journal of Neuro pathology and Experimental Neurology**, v. 61, p. 585-596, 2002.

CAMBY, I.; LE MERCIER, M.; LEFRANC, F.; KISS, R. Galectin-1: a small protein with major functions. **Glycobiology**, v. 16, p. 137R-157R, 2006.

CASE, D.; IRWIN, D.; IVESTER, C.; HARRAL, J.; MORRIS, K.; IMAMURA, M.; ROEDERSHEIMER, M.; PATTERSON, A.; CARR, M.; HAGEN, M.; SAAVEDRA, M.; CROSSNO, J.; YOUNG, K.A.; DEMPSEY, E.C.; POIRIER, F.; WEST, J.; MAJKA, S. Mice deficient in galectin-1 exhibit attenuated physiological responses to chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 292, p. L154-L164, 2007.

CHANG, Y. Y.; CHEN, S. J.; LIANG, H. C.; SUNG, H. W.; LIN, C. C.; HUANG, R. N. The effect of galectin 1 on 3T3 cell proliferation on chitosan membranes. **Biomaterials**, v. 17, p. 3603-3611, 2004.

CHANG-HONG, R.; WADA, M.; KOYAMA, S.; KIMURA, H.; ARAWAKA, S.; KAWANAMI, T.; KURITA, K.; KADOYA, T.; AOKI, M.; ITOYAMA, Y.; KATO, T. Neuroprotective effect of

oxidized galectin-1 in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Experimental Neurology**, v. 194, p. 203-211, 2005.

CHEN, R.; FAIRLEY, J. A.; ZHAO, M. L.; GIUDICE, G. J.; ZILLIKENS, D.; DIAZ, L. A.; LIU; PATTERSON; WANG, 2002, Z. Macrophages, but not T and B lymphocytes, are critical for subepidermal blister formation in experimental bullous pemphigoid: macrophage-mediated neutrophil infiltration depends on mast cell activation. **Journal of Immunology**, v. 169, p. 3987-3992, 2002.

CHEN, H. Y.; SHARMA, B. B.; YU, L.; ZUBERI, R.; WENG, I. C.; KAWAKAMI, Y.; KAWAKAMI, T.; HSU, D. K.; LIU; PATTERSON; WANG, 2002, F. T. Role of galectin-3 in mast cell functions: galectin-3-deficient mast cells exhibit impaired mediator release and defective JNK expression. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 4991-4997, 2006.

CHO, M.; CUMMINGS, R. D. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 5198-5206, 1995.

CHO, M.; CUMMINGS, R. D. Galectin-1: oligomeric structure and interactions with polylectosamine. **Trends in glycoscience and glycotecnology**, v. 9, p. 47-56, 1997.

CHOI, W. S.; KIM, Y. M.; COMBS, C.; FROHMAN, M. A.; BEAVEN, M. A. Phospholipases D1 and D2 regulate different phases of exocytosis in mast cells. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 5682-5689, 2002.

CHUNG, C. D.; PATEL, V. P.; MORAN, M.; LEWIS, L. A.; MICELI, M. C. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 3722-3729, 2000.

CHURCH, M. K.; SHUTE, J. K.; SAMPSON, A. P. Cap 13, p. 186-209: Mast cell-Derived Mediators *in* ADKINSON, N. F.; YUGINGER, J. W.; BUSSE, W. W.; BOCHER, B. S.; HOLGATE, S. T.; SIMONS, F. E. R. **Middleton's Allergy: Principles and Practices**, e-edition, 6th edition (ISBN 0323014259-Book/Eletronic Media), 2003.

COHEN, J. J.; DUKE, R. C.; FADOK, V. A.; SELLINS, K. S. Apoptosis and programmed cell death in immunity, **Annual Review of Immunology**, v. 10, p. 267-293, 1992.

COLUMBO, M.; BOCHNER, B. S.; MARONE, G. Human skin mast cells express functional beta 1 integrins that mediate adhesion to extracellular matrix proteins. **Journal of Immunology**, v. 154, p. 6058-6064, 1995.

COOPER, D. N.; BARONDES, S. H. God must love galectins; he made so many of them. **Glycobiology**, v. 9, p. 979-984, 1999.

DEMO, S. D.; MASUDA, E.; ROSSI, A. B.; THRONSET, B. T.; GERARD, A. L.; CHAN, E. H.; ARMSTRONG, R. J.; FOX, B. P.; LORENS, J. B.; PAYAN, D. G.; SCHELLER, R. H.; FISHER, J. M. Quantitative measurement of mast cell degranulation using a novel flow cytometric annexin-V binding assay. **Cytometry**, v. 36, p. 340-348, 1999.

DIAS-BARUFFI, M.; ZHU, H.; CHO, M.; KARMAKAR, S.; McEVER, R. P., CUMMINGS, R. D. Dimeric Galectin-1 Induces Surface Exposure of Phosphatidylserine and Phagocytic Recognition of Leukocytes without inducing Apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 41282-41293, 2003.

DODD, R. B.; DRICKAMER, K. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology**, v. 11, p. 71R-79R, 2001.

DOMBROWICZ, D.; LIN, S.; FLAMAND, V.; BRINI, A. T.; KOLLER, B. H.; KINET, J. P. Allergy-associated FcRbeta is a molecular amplifier of IgE- and IgG-mediated in vivo responses. **Immunity**, v. 8, p. 517-529, 1998.

EISEMAN, E.; BOLEN, J. B. Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. **Nature**, v. 355, p. 78-80, 1992.

FADOK, V. A.; VOELKER, D. R.; CAMPBELL, P. A.; COHEN, J. J.; BRATTON, D. L.; HENSON, P. M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **Journal of Immunology**, v. 148, p. 2207-2216, 1992.

FADOK, V.A.; BRATTON, D.L.; ROSE, D.M.; PEARSON, A.; EZEKEWITZ, R.A.; HENSON, P.M. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. **Nature**, v. 405, p.85-90, 2000.

FADOK, V. A.; DeCATHÉLINEAU, A.; DALEKE, D. L.; HENSON, P. M.; BRATTON, D. L. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 1071-1077, 2001.

FIELD, K. A.; HOLOWKA, D.; BAIRD, B. Structural aspects of the association of FcepsilonRI with detergent-resistant membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 1753-1758, 1999.

FISCHER, C.; SANCHEZ-RUDERISCH, H.; WELZEL, M.; WIEDENMANN, B.; SAKAI, T.; ANDRE, S.; GABIUS, H. J.; KHACHIGIAN, L.; DETJEN, K. M.; ROSEWICZ, S. Galectin-1 interacts with the $\alpha_5\beta_1$ fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, 37266-37277, 2005.

FODINGER, M.; FRITSCH, G.; WINKLER, K.; EMMINGER, W.; MITTERBAUER, G.; GADNER, H.; VALENT P.; MANNHALTER, C. Origin of human mast cells: development from transplanted hematopoietic stem cells after allogeneic bone marrow transplantation. **Blood**, v. 84, p. 2954-2959, 1994.

FOSTER, J. J.; GOSS, K. L.; GEORGE, C. L.; BANGSUND, P. J.; SNYDER, J. M. Galectin-1 in secondary alveolar septae of neonatal mouse lung. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, 291: L1142-9, 2006.

FRASCH, S. C.; HENSON, P. M.; KAILEY, J. M.; RICHTER, D. A.; JANES, M. S.; FADOK, V. A.; BRATTON, D. L. Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 23065-23073, 2000.

FRIGERI, L. G.; LIU; PATTERSON; WANG, 2002, F. T. Surface expression of functional IgE binding protein, an endogenous lectin, on mast cells and macrophages. **Journal of Immunology**, v. 148, p. 861-867, 1992.

FRIGERI, L. G.; ZUBERI, R. I.; LIU; PATTERSON; WANG, 2002, F. T. Epsilon BP, a beta-galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells. **Biochemistry**, v. 32, p. 7644-7649, 1993.

FUKUMORI, T.; TAKENAKA, Y.; YOSHII, T.; KIM, H. R.; HOGAN, V.; INOHARA, H.; KAGAWA, S.; RAZ, A. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. **Cancer Research**, v. 63, p. 8302-8311, 2003.

FURUMOTO, Y.; BROOKS, S.; OLIVERA, A.; TAKAGI, Y.; MIYAGISHI, M.; TAIRA, K.; CASELLAS, R.; BEAVEN, M. A.; GILFILLAN, A. M.; RIVERA, J. Cutting Edge: Lentiviral short hairpin RNA silencing of PTEN in human mast cells reveals constitutive signals that promote cytokine secretion and cell survival. **Journal of Immunology**, v. 176, p. 5167-5171, 2006.

GABIUS, H. J.; KAYSER, K.; ANDRÉ, S.; GABIUS, S. Glycobiology of host defense mechanism, *in* GABIUS, H. J. & GABIUS, S. **Glicoscience: status and perspectives**. Chapman & Hall GmbH, Weinheim, Alemanha, p. 497-05, 1997.

GALLI, S. J.; ZSEBO, K. M.; GEISSLER, E. N. The kit ligand, stem cell factor. **Advances in Immunology**, v. 55, p. 1-96, 1994.

GALLI, S. J. Mast cell and Basophils. **Current Opinion in Hematology**, v. 7, p. 32-39, 2000.

GALLI, S. J.; NAKAE, S.; TSAI, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 6, p. 135-142, 2005.

GAYTAN, F.; BELLIDO, C.; CARRERA, G.; AGUILAR, E. Differentiation of mast cells during postnatal development of neonatally estrogen-treated rats. **Cell and Tissue Research**, v. 259, p. 25-31, 1990.

GILFILLAN, A. M.; TKACZYK, C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. **Nature Reviews. Immunology**, v. 6, p. 218-230, 2006.

GITT, M. A.; BARONDES, S. H. Genomic sequence and organization of two members of a human lectin gene family. **Biochemistry**, v. 30, p. 82-89, 1991.

GORDON, J. R.; GALLI, S. J. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachectin. **Nature**, v. 346, p. 274-276, 1990.

HAHN, H. P.; PANG, M.; HE, J.; HERNANDEZ, J. D.; YANG, R. Y.; LI, L. Y.; WANG, X.; LIU; PATTERSON; WANG, 2002, F. T.; BAUM, L. G. Galectin-1 induces nuclear translocation of endonuclease G in caspase- and cytochrome c-independent T cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 11, p. 1277-1286, 2004.

HARTMANN, K.; METCALFE, D. D. Regulation and Dysregulation of mast cell survival and apoptosis. *In: Mast cells and Basophils*, 2000, MARONE, G.; LICHTENSTEIN, L. & GALLI, S. (editors), Chapter 4, 51-58pp, 1st Ed., Academic Press, Boston.

HE, J.; BAUM, L. G. Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 4705-4712, 2004.

HEAVEY, D. J.; ERNST, P. B.; STEVENS, R. L.; BEFUS, A. D.; BIENENSTOCK, J.; AUSTEN, K. F. Generation of leukotriene C₄, leukotriene B₄, and prostaglandin D₂ by immunologically activated rat intestinal mucosa mast cells. **Journal of Immunology**, v. 140, p. 1953-1957, 1988.

HEMLER, M. E. Tetraspanin functions and associated microdomains. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 6, p. 801-811, 2005.

- HEMPSTEAD, B. L.; PARKER, C. W.; KULCZYCKI, A. Jr. The cell surface receptor for immunoglobulin E. Effect of tunicamycin on molecular properties of receptor from rat basophilic leukemia cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 10717-10723, 1981.
- HIRASAWA, N.; SANTINI, F.; BEAVEN, M. A. Activation of the mitogen-activated protein kinase/cytosolic phospholipase A2 pathway in a rat mast cell line. Indications of different pathways for release of arachidonic acid and secretory granules. **Journal of Immunology**, v. 154, p. 5391-5402, 1995.
- HOLLOWKA, D.; SHEETS, E. D.; BAIRD, B. Interactions between Fc(epsilon)RI and lipid raft components are regulated by the actin cytoskeleton. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 1009-1019, 2000.
- HOLLOWKA, D.; BAIRD, B. Fc(epsilon)RI as a paradigm for a lipid raft-dependent receptor in hematopoietic cells. **Seminars in Immunology**, v. 13, p. 99-105, 2001.
- HOLLOWKA, D.; GOSSE, J. A.; HAMMOND, A. T.; HAN, X.; SENGUPTA, P.; SMITH, N. L.; WAGENKNECHT-WIESNER, A.; WU, M.; YOUNG, R. M.; BAIRD, B. Lipid segregation and IgE receptor signaling: a decade of progress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1746, p. 252-259, 2005.
- HORIE, H. The galectin family of proteins. **Current Drug Targets**, v. 6, p. 373-374, 2005.
- HUANG C, SALI A, STEVENS RL. Regulation and function of mast cell proteases in inflammation. **Journal of Clinical Immunology**, v. 18, p. 169-183, 1998.
- HUBER, M.; HELGASON, C. D.; DAMEN, J. E., LIU; PATTERSON; WANG, 2002, L.; HUMPHRIES, R. K.; KRYSTAL, G. The src homology 2-containing inositol phosphatase (SHIP) is the gatekeeper of mast cell degranulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 1330-1335, 1998.
- HUDGIN, R.L.; PRICER, W.E.; ASHWELL, G.; STOCKERT, R.J.; MORELL, A.G. The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 5536-5543, 1974.
- HUGHES, R.C. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1473: 172-85, 1999.
- ILARREGUI, J. M.; BIANCO, G. A.; TOSCANO, M. A.; RABINOVICH, G. A. The coming of age of galectins as immunomodulatory agents: impact of these carbohydrate binding proteins in T cell physiology and chronic inflammatory disorders. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 64, p. 96-103, 2005.
- ION, G.; FAJKA-BOJA, R.; TOTH, G. K., CARON, M.; MONOSTORI, E. Role of p56lck and ZAP70-mediated tyrosine phosphorylation in galectin-1-induced cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, p. 1145-1147, 2005.
- IRANI, A. A.; SCHECHTER, N. M.; CRAIG, S. S.; DEBLOIS, G.; SCHWARTZ, L. B. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, p. 4464-4468, 1986.
- JAMUR, M. C.; VUGMAN, I. Rat peritoneal mast cell regranulation and acid phosphatase and trimetaphosphatase activity induced after stimulation by 48/80. A fluorescence,

- ultrastructural, and cytochemical study. **Cellular and Molecular Biology**, v. 34, p. 231-237, 1988.
- JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Binding of antibody to the gamma subunit of CepsilonRI in rat basophilic leukemia cells results in morphological changes without inducing histamine release. **Cell and Tissue Research**, v. 284, p. 153-159, 1996.
- JUSZCZYNSKI, P.; OUYANG, J.; MONTI, S.; RODIG, S. J.; TAKEYAMA, K.; ABRAMSON, J.; CHEN, W.; KUTOK, J. L.; RABINOVICH, G. A.; SHIPP, M. A. The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 13134-13139, 2007.
- KADOYA, T.; HORIE, H. Structural and functional studies of galectin-1: a novel axonal regeneration-promoting activity for oxidized galectin-1. **Current Drug Targets**, v. 4, p. 375-383, 2005.
- KADOYA, T.; OYANAGI, K.; KAWAKAMI, E.; HASEGAWA, M.; INAGAKI, Y.; SOHMA, Y.; HORIE, H. Oxidized galectin-1 advances the functional recovery after peripheral nerve injury. **Neuroscience Letters**, v. 380, p. 284-288, 2005.
- KARMAKAR, S.; CUMMINGS, R. D.; MCEVER, R. P. Contributions of Ca²⁺ to galectin-1-induced exposure of phosphatidylserine on activated neutrophils. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 28623-28631, 2005.
- KARLSSON, K. A. Microbial recognition of target-cell glycoconjugates. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 5, p. 622-635, 1995.
- KATZ, H. R. Inhibitory receptors and allergy. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, p. 698-704, 2002.
- KAWAKAMI, T.; GALLI, S. J. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. **Nature Reviews. Immunology**, v. 2, p. 773-786, 2002.
- KELLER, R. Concanavalin A, a model "antigen" for the in vitro detection of cell-bound reagenic antibody in the rat. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 13, p. 139-147, 1973.
- KIMURA, T.; ZHANG, J.; SAGAWA, K.; SAKAGUCHI, K.; APPELLA, E.; SIRAGANIAN, R. P. Syk-independent tyrosine phosphorylation and association of the protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 with the high affinity IgE receptor. **Journal of Immunology**, v. 159, p. 4426-4434, 1997.
- KINET J P. The high-affinity receptor for IgE. **Current Opinion in Immunology**. v. 2, p. 499-505, 1990.
- KITAMURA, Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. **Annual Review Immunology**, v. 7, p. 59-76, 1989.
- KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1572, p. 187-97, 2002.
- KRAFT, S.; FLEMING, T.; BILLINGSLEY, J. M.; LIN, S. Y.; JOUVIN, M. H.; STORZ, P.; KINET, J. P. Anti-CD63 antibodies suppress IgE-dependent allergic reactions in vitro and in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, p. 385-96, 2005.

- KULCZYCKI, A. JR.; McNEARNEY, T. A.; PARKER, C. W. The rat basophilic leukemia cell receptor for IgE. I. Characterization as a glycoprotein. **Journal of Immunology**, v. 117, p. 661-665, 1976.
- LAGUNOFF, D.; MARTIN, T. W.; READ, G. Agents that release histamine from mast cells. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 23, p. 331-351, 1983.
- LANTZ, C. S.; BOESIGER, J.; SONG, C. H.; MACH, N.; KOBAYASHI, T.; MULLIGAN, R. C.; NAWA, Y.; DRANOFF, G.; GALLI, S.J. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. **Nature**, v. 392, p. 90-93, 1998.
- LEFFLER, H.; CARLSSON, S.; HEDLUND, M.; QIAN, Y.; POIRIER, F. Introduction to galectins. **Glicoconjugate Journal**, v. 19, p. 433-440, 2004.
- LESOURNE, R.; FRIDMAN, W. H.; DAËRON, M. Dynamic interactions of Fc gamma receptor IIB with filamin-bound SHIP1 amplify filamentous actin-dependent negative regulation of Fc epsilon receptor I signaling. **Journal of Immunology**, v. 174, p. 1365-1373, 2005.
- LEUNG, K. B.; PEARCE, F. L. A comparison of histamine secretion from peritoneal mast cells of the rat and hamster. **British Journal of Pharmacology**, v. 81, p. 693-701, 1984.
- LEVRONEY, E. L.; AGUILAR, H. C.; FULCHER, J. A.; KOHATSU, L.; PACE, K. E.; PANG, M.; GURNEY, K. B.; BAUM, L. G.; LEE, B. Novel innate immune functions for galectin-1: galectin-1 inhibits cell fusion by Nipah virus envelope glycoproteins and augments dendritic cell secretion of proinflammatory cytokines. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 413-420, 2005.
- LIN, S.; CICALA, C.; SCHARENBERG, A. M.; KINET, J. P. The FcεRI subunit functions as an amplifier of FcεRI-mediated cell activation signals. **Cell**, v. 85, p. 985-995, 1996.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 637-674, 1998.
- LIU, F.T. S-type mammalian lectins in allergic inflammation. **Immunology Today**, v. 14, p. 486-490, 1993.
- LIU, F.T. Regulatory roles of galectins in the immune response. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 136, p. 385-400, 2005.
- LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Review. Cancer**, v. 5, p. 29-41, 2005.
- LIU, F. T.; PATTERSON, R. J.; WANG, J. L. Intracellular functions of galectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 263-273, 2002.
- LOPEZ-LUCENDO, M. F.; SOLIS, D.; ANDRE, S.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; KALTNER, H.; GABIUS, H. J.; ROMERO A. Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. **Journal of Molecular Biology**, v. 343, p. 957-970, 2004.
- MARSHALL, J. S. Mast-cell responses to pathogens. **Nature Review. Immunology**, v. 4, p. 787-799, 2004.

- MARTIN, S. J.; REUTELINGSPERGER, C. P.; MCGAHON, A. J.; RADER, J. A.; VAN SCHIE, R. C.; LAFACE, D. M.; GREEN, D. R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, p. 1545-1556, 1995.
- MARTIN, S.; POMBO, I.; PONCET, P.; DAVID, B.; AROCK, M.; BLANK, U. Immunologic stimulation of mast cells leads to the reversible exposure of phosphatidylserine in the absence of apoptosis. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 123, p. 249-258, 2000.
- MATARRESE, P.; TINARI, A.; MORMONE, E.; BIANCO, G. A.; TOSCANO, M. A.; ASCIONE, B.; RABINOVICH, G. A.; MALORNI, W. Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 6969-6985, 2005.
- MENCIA-HUERTA, J. M.; LEWIS, R. A.; RAZIN, E.; AUSTEN, K. F. Antigen-initiated release of platelet-activating factor (PAF-acether) from mouse bone marrow-derived mast cells sensitized with monoclonal IgE. **Journal of Immunology**, v. 131, p. 2958-2964, 1983.
- MERTSCHING, E.; BAFETTI, L.; HESS, H.; PERPER, S.; GIZA, K.; ALLEN, L. C.; NEGROU, E.; HATHAWAY, K.; HOPP, J.; CHUNG, J.; PERRET, D.; SHIELDS, M.; SAXON, A.; KEHRY, M. R. A mouse Fc γ 1 protein that inhibits mast cells through activation of Fc γ RIIB, SH2 domain-containing inositol phosphatase 1, and SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatases. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, p. 441-447, 2008.
- METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 1033-1079, 1997.
- METZGER, H. The receptor with high affinity for IgE. **Immunological Reviews**, v. 125, p. 37-48, 1992.
- MOISEEVA, E. P.; SPRING, E. L.; BARON, J. H.; DE BONO, D. P. Galectin 1 modulates attachment, spreading and migration of cultured vascular smooth muscle cells via interactions with cellular receptors and components of extracellular matrix. **Journal of Vascular Research**, v. 36, p. 47-58, 1999.
- MOLFETTA, R.; PERUZZI, G.; SANTONI, A.; PAOLINI, R. Negative signals from Fc ϵ RI engagement attenuate mast cell functions. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, p. 219-229, 2007.
- MORENO, A. N.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Mast cell degranulation induced by lectins: Effect on neutrophil recruitment. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 132, p. 221-230, 2003.
- NADLER, M. J.; MATTHEWS, S. A.; TURNER, H.; KINET, J. P. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc ϵ RI: coupling form to function. **Advances in Immunology**, v. 76, p. 325-355, 2000.
- NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M. C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 139, p. 271-279, 1991.

NICKEL, W. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. **Traffic**, v. 6, p. 607-614, 2005.

NISHIKATA, H.; OLIVER, C.; MERGENHAGEN, S. E.; SIRAGANIAN, R. P. The rat mast cell antigen AD1 (homologue to human CD63 or melanoma antigen ME491) is expressed in other cells in culture. **Journal of Immunology**, v. 149, p. 862-870, 1992.

O'LUANAIGH, N.; PARDO, R.; FENSOME, A.; ALLEN-BAUME, V.; JONES, D.; HOLT, M. R.; COCKCROFT, S. Continual production of phosphatidic acid by phospholipase D is essential for antigen-stimulated membrane ruffling in cultured mast cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 3730-3746, 2002.

ONO, M.; BOLLAND, S.; TEMPST, P.; RAVETCH, J. V. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB. **Nature**, v. 383, p. 263-266, 1996.

ORLANDINI-CASTRO R. **O papel dos gangliosídeos derivados do GD_{1b} na organização dos lipids rafts e na modulação da sinalização via FcεRI em mastócitos**. 104f. Dissertação de mestrado- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2006

OZAKI, K.; INOUE, K.; SATO, H.; IIDA, A.; OHNISHI, Y.; SEKINE, A.; SATO, H.; ODASHIRO, K.; NOBUYOSHI, M.; HORI, M.; NAKAMURA, Y.; TANAKA, T. Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin-alpha secretion in vitro. **Nature**, v. 429, p. 72-75, 2004.

PACE, K. E.; LEE, C.; STEWART, P. L.; BAUM, L. G. Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. **Journal of Immunology**, v. 163, p. 3801-3811, 1999.

PACE, K. E.; HAHN, H. P.; PANG, M.; NGUYEN, J. T.; BAUM, L. G. CD7 delivers a pro-apoptotic signal during galectin-1-induced T cell death. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 2331-2334, 2000.

PANULA, P.; RINNE, J.; KUOKKANEN, K.; ERIKSSON, K. S.; SOLLNEN, T.; KALINO, H.; KEYA, M. Neuronal histamine deficit in Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 82, p. 993-997, 1998.

PAUMET, F.; LE MAO, J.; MARTIN, S.; GALLI, T.; DAVID, B.; BLANK, U.; ROA, M. Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8-containing secretory compartment. **Journal of Immunology**, v. 164, p. 5850-5857, 2000.

PENG, Z.; BEAVEN, M. A. An essential role for phospholipase D in the activation of protein kinase C and degranulation in mast cells. **Journal of Immunology**, v. 174, p. 5201-5208, 2005.

PEREZ-MONTFORT, R.; KINET, J. P.; METZGER, H. A previously unrecognized subunit of the receptor for immunoglobulin E. **Biochemistry**, v. 22, p. 5722-5728, 1983.

PERILLO, N. L.; PACE, K. E.; SEILHAMER, J. J.; BAUM, L. G. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. **Nature**, v. 378, p. 736-739, 1995.

PERILLO, N. L.; UITTENBOGAART, C. H.; NGUYEN, J. T.; BAUM, L. G. Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, p. 1851-1858, 1997.

- PERILLO, N. L.; MARCUS, M. E.; BAUM, L. G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. **Journal of Molecular Medicine**, v. 76, p. 402-412, 1998.
- PFEIFFER, J. R.; SEAGRAVE, J. C.; DAVIS, B. H.; DEANIN, G. G.; OLIVER, J. M. Membrane and cytoskeletal changes associated with IgE-mediated serotonin release from rat basophilic leukemia cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 101, p. 2145-2155, 1985.
- PLAUT, M.; PIERCE, J. H.; WATSON, C. J.; HANLEY-HYDE, J.; NORDAN, R. P.; PAUL, W. E. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. **Nature**, v. 339, p. 64-67, 1989.
- POMBO, I.; MARTIN-VERDEAUX, S.; IANNASCOLI, B.; LE MAO, J.; DERIANO, L.; RIVERA, J.; BLANK, U. IgE receptor type I-dependent regulation of a Rab3D-associated kinase: a possible link in the calcium-dependent assembly of SNARE complexes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 42893-42900, 2001.
- POWNER, D. J.; HODGKIN, M. N.; WAKELAM, M. J. Antigen-stimulated activation of phospholipase D1b by Rac1, ARF6, and PKCalpha in RBL-2H3 cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 1252-1262, 2002.
- PURI, N.; KRUHLAK, M. J.; WHITEHEART, S. W.; ROCHE, P. A. Mast cell degranulation requires N-ethylmaleimide-sensitive factor-mediated SNARE disassembly. **Journal of Immunology**, v. 171, p. 5345-5352, 2003.
- RABINOVICH, G. A.; IGLESIAS, M. M.; MODESTI, N. M.; CASTAGNA, L. F.; WOLFENSTEIN-TODEL, C.; RIERA, C. M.; SOTOMAYOR, C. E. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 4831-4840, 1998.
- RABINOVICH, G. A.; ALONSO, C. R.; SOTOMAYOR, C. E.; DURAND, S.; BOCCO, J. L.; RIERA, C. M. Molecular mechanisms implicated in galectin-1-induced apoptosis: activation of the AP-1 transcription factor and downregulation of Bcl-2. **Cell Death and Differentiation**, v. 7, p. 747-753, 2000a.
- RABINOVICH, G. A.; SOTOMAYOR, C. E.; RIERA, C. M.; BIANCO, I.; CORREA, S. G. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. **European Journal of Immunology**, v. 30, p. 1331-1339, 2000b.
- RABINOVICH, G. A.; RAMHORST, R. E.; RUBINSTEIN, N.; CORIGLIANO, A.; DAROQUI, M. C.; KIER-JOFFE, E. B. Induction of allogeneic T-cell hyporesponsiveness by galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms. **Cell Death and Differentiation**, v. 9, p. 661-670, 2002.
- RABINOVICH, G. A.; LIU; PATTERSON; WANG, 2002, F-T.; HIRASHIMA, M.; ANDERSON, A. An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, p. 143-158, 2007.
- RAZIN, E.; MENCIA-HUERTA, J. M.; STEVENS, R. L.; LEWIS, R. A.; LIU; PATTERSON; WANG, 2002, F-T.; COREY, E.; AUSTEN, K. F. IgE-mediated release of leukotriene C4, chondroitin sulfate E proteoglycan, beta-hexosaminidase, and histamine from cultured bone marrow-derived mouse mast cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 157, p. 189-201, 1983.

- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208-212, 1963.
- RIVERA, J.; GILFILLAN, A. M. Molecular regulation of mast cell activation. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, p. 1214-1225, 2006.
- RIVERA, J.; KINET, J. P.; KIM, J.; PUCILLO, C.; METZGER, H. Studies with a monoclonal antibody to the beta subunit of the receptor with high affinity for immunoglobulin E. **Molecular Immunology**, v. 25, p. 647-661, 1988.
- RIVERA, J.; OLIVERA, A. Src family kinases and lipid mediators in control of allergic inflammation. **Immunological Reviews**, v. 217, p. 255-268, 2007.
- ROTBLAT, B.; NIV, H.; ANDRE, S.; KALTNER, H.; GABIUS, H. J.; KLOOG, Y. Galectin-1(L11A) predicted from a computed galectin-1 farnesyl-binding pocket selectively inhibits Ras-GTP. **Cancer Research**, v. 64, p. 3112-3118, 2004.
- ROGERIO, A.P.; CARDOSO, C. R.; FONTANARI, C.; SOUZA, M. A.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; SILVA, E. V.; KOYAMA, N. S.; BASEI, F. L.; SOARES, E. G.; CALIXTO, J. B.; STOWELL, S. R.; DIAS-BARUFFI, M.; FACCIOLI, L. H. Anti-asthmatic potential of a D-galactose binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiology**, v. 17, p. 795-804, 2007.
- RUBINSTEIN, N.; ILARREGUI, J. M.; TOSCANO, M. A.; RABINOVICH, G. A. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. **Tissue Antigens**, v. 64, p. 1-12, 2004.
- SACCHETTINI, J. C.; BAUM, L. G.; BREWER, C. F. Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. **Biochemistry**, v. 40, 3009-3015, 2001.
- SAITOH, S.; ARUDCHANDRAN, R.; MANETZ, T. S.; ZHANG, W.; SOMMERS, C. L.; LOVE, P. E.; RIVERA, J.; SAMELSON, L. E. LAT is essential for Fc(epsilon)RI-mediated mast cell activation. **Immunity**, v. 12, p. 525-535, 2000.
- SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; DIAS-BARUFFI, M.; THOMAZ, S. M.; BELTRAMINI, L. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **Journal of Immunology**, v. 153, p. 1798-1807, 1994.
- SANTUCCI, L.; FIORUCCI, S.; RUBINSTEIN, N.; MENCARELLI, A.; PALAZZETTI, B.; FEDERICI, B.; RABINOVICH, G. A.; MORELLI, A. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 124, p. 1381-1394, 2003.
- SCHÄFER, T.; ZENTGRAF, H.; ZEHE, C.; BRÜGGER, B.; BERNHAGEN, J.; NICKEL, W. Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 is mediated by direct translocation across the plasma membrane of mammalian cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 6244-6251, 2004.
- SECOR, V. H.; SECOR, W. E.; GUTEKUNST, C. A.; BROWN, M. A. Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 191, p. 813-822, 2000.
- SENA, A. A.; PROVAZZI, P. J.; FERNANDES, A. M.; CURY, P. M.; RAHAL, P.; OLIANI, S. M. Spatial expression of two anti-inflammatory mediators, annexin 1 and galectin-1, in nasal polyposis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, p. 1260-1267, 2006.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, v. 177, p. 949-959, 1972.

SHARON, N.; LIS, H. Lectin biochemistry. New way of protein maturation. **Nature**, v. 23, p. 203-204, 1986.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. 246, p. 227-234, 1989.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American**, v. 268, p. 82-89, 1993

SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 2753-2764, 2007.

SHIBASAKI, M.; SUMAZAKI, R.; ISOYAMA, S.; TAKITA, H. Interaction of lectins with human IgE: IgE-binding property and histamine-releasing activity of twelve plant lectins. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 98, p. 18-25, 1992.

SIMPSON, J. K.; METCALFE, D. D. Mastocytosis and disorders of mast cell proliferation. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 22, p. 175-188, 2002.

SIRAGANIAN, R. P.; ZHANG, J.; SUZUKI, K.; SADA, K. Protein tyrosine kinase Syk in mast cell signaling. **Molecular Immunology**, v. 38, p. 1229-1233, 2002.

SIRAGANIAN, R. P. Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. **Current Opinion in Immunology**, v. 15, p. 639-646, 2003.

SMRZ, D.; DRÁBEROVÁ, L.; DRÁBER, P. Non-apoptotic phosphatidylserine externalization induced by engagement of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 10487-10497, 2007.

SMRZ, D.; LEBDUSKA, P.; DRÁBEROVÁ, L.; KORB, J.; DRÁBER, P. Engagement of phospholipid scramblase 1 in activated cells: implication for phosphatidylserine externalization and exocytosis. **Journal of Biological Chemistry**, v.283, p. 10904-10918, 2008.

STEWART, B. W. Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 86, p. 1286-1296, 1994.

STILLMAN, B. N.; HSU, D. K.; PANG, M.; BREWER, C. F.; JOHNSON, P.; LIU; PATTERSON; WANG, 2002, F. T.; BAUM, L. G. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induced T cell death. **Journal of Immunology**, v. 176, p. 778-789, 2006.

STOCKERT, R. J.; MORELL, A.G.; SCHEINBERG, I.H. Mamalian hepatic lectin. **Science**, v. 186, p. 365-366, 1974.

STOWELL, S. R.; DIAS-BARUFFI, M.; PENTTILA, L.; RENKONEN, O.; NYAME, A. K.; CUMMINGS, R. D. Human galectin-1 recognition of poly-N-acetyllactosamine and chimeric polysaccharides. **Glycobiology**, v. 14, p. 157-167, 2004.

STOWELL, S. R.; KARMAKAR, S.; STOWELL, C.; DIAS-BARUFFI, M.; McEVER, R. P.; CUMMINGS, R. D. Human Galectins-1, -2, and -4 Induce Surface Exposure of

Phosphatidylserine in Activated Human Neutrophils but Not Activated T Cells. **Blood**, v. 109, p. 219-227, 2007.

STOWELL, S. R.; QIAN, Y.; KARMAKAR, S.; KOYAMA, N. S.; DIAS-BARUFFI, M.; LEFFLER, H.; MCEVER, R. P.; CUMMINGS, R. D. Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. **Journal of Immunology**, v. 180, p. 3091-3102, 2008.

SYMONS, A.; COOPER, D. N.; BARCLAY, A.N. Characterization of the interaction between galectin-1 and lymphocyte glycoproteins CD45 and Thy-1. **Glycobiology**, v. 10, p. 559-563, 2000.

TAHARA, K.; TSUCHIMOTO, D.; TOMINAGA, Y.; ASOH, S.; OHTA, S.; KITAGAWA, M.; HORIE, H.; KADOYA, T.; NAKABEPPU, Y. DeltaFosB, but not FosB, induces delayed apoptosis independent of cell proliferation in the Rat1a embryo cell line. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, p. 496-507, 2003.

TANAKA, T.; OZAKI, K. Inflammation as a risk factor for myocardial infarction. **Journal of Human Genetics**, v. 51, p. 595-604, 2006.

TEICHBERG, V. I.; SILMAN, I.; BEITSCH, D. D.; RESHEFF, G. A beta-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, p. 1383-1387, 1975.

THEOHARIDES, T. C.; COCHRANE, D. E. Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress. **Journal of Neuroimmunology**, v. 166, p. 1-12, 2004.

TKACZYK, C.; BEAVEN, M. A.; BRACHMAN, S. M.; METCALFE, D. D.; GILFILLAN, A. M. The phospholipase C gamma 1-dependent pathway of Fc epsilon RI-mediated mast cell activation is regulated independently of phosphatidylinositol 3-kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, 278, p. 48474-48484, 2003.

TOSCANO, M. A.; COMMODARO, A. G.; ILARREGUI, J. M.; BIANCO, G. A.; LIBERMAN, A.; SERRA, H. M.; HIRABAYASHI, J.; RIZZO, L. V.; RABINOVICH, G. A. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant T_H2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. **Journal of Immunology**, v. 176, p. 6323-6332, 2006.

TOSCANO, M. A.; ILARREGUI, J. M.; BIANCO, G. A.; CAMPAGNA, L.; CROCI, D. O.; SALATINO, M.; RABINOVICH, G. A. Dissecting the pathophysiological role of endogenous lectins: glycan-binding proteins with cytokine-like activity? **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 18, p. 57-71, 2007.

UDELL, C. M.; SAMAYAWARDHENA, L. A.; KAWAKAMI, Y.; KAWAKAMI, T.; CRAIG, A. W. Fer and Fps/Fes participate in a Lyn-dependent pathway from Fc epsilon RI to platelet-endothelial cell adhesion molecule 1 to limit mast cell activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 20949-20957, 2006.

VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J.; FREEZE, H.; HART, G.; MARTH, J. **Essentials of Glycobiology**, 1st Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Inc., Boston. 1999.

VAN DER LEIJ, J.; VAN DEN BERG, A.; BLOKZIJL, T.; HARMS, G.; VAN GOOR, H.; ZWIERS, P.; VAN WEEGHEL, R.; POPPEMA, S.; VISSER, L. Dimeric galectin-1 induces IL-

10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. **The Journal of Pathology**, v. 204, p. 511-518, 2004.

VAN DER LEIJ, J.; VAN DEN BERG, A.; HARMS, G.; ESCHBACH, H.; VOS, H.; ZWIERS, P.; VAN WEEGHEL, R.; GROEN, H.; POPPEMA, S.; VISSER, L. Strongly enhanced IL-10 production using stable galectin-1 homodimers. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 506-513, 2007.

VESPA, G. N.; LEWIS, L. A.; KOZAK, K. R.; MORAN, M.; NGUYEN, J. T.; BAUM, L. G.; MICELI, M. C. Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation. **Journal of Immunology**, v. 162, p. 799-806, 1999.

VONAKIS, B. M.; GIBBONS, S. P.; ROTTÉ, M. J.; BROTHERS, E. A.; KIM, S. C.; CHICHESTER, K.; MACDONALD, S. M. Regulation of rat basophilic leukemia-2H3 mast cell secretion by a constitutive Lyn kinase interaction with the high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI). **Journal of Immunology**, v. 175, p. 4543-4554, 2005.

deWAARD, A.; HICKMAN, S.; KORNFELD, S. Isolation and properties of beta-galactoside binding lectins of calf heart and lung. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 7581-7587, 1976.

WANG, J. L.; GRAY, R. M.; HAUDEK, K. C.; PATTERSON, R. J. Nucleocytoplasmic lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 6, p. 75-93, 2004.

WEDEMEYER, J.; TSAI, M.; GALLI, S. J. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, p. 624-631, 2000.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p. 441-473, 1996.

WHITNEY, P. L.; POWELL, J. T.; SANFORD, G. L. Oxidation and chemical modification of lung beta-galactoside-specific lectin. **The Biochemical Journal**, v. 238, p. 683-689, 1986.

WILLIAMSON, P.; CHRISTIE, A.; KOHLIN, T.; SCHLEGEL, R. A.; COMFURIUS, P.; HARMSMA, M.; ZWAAL, R. F.; BEVERS, E. M. Phospholipid scramblase activation pathways in lymphocytes. **Biochemistry**, v. 40, p. 8065-8072, 2001.

WILSON, B. S.; PFEIFFER, J. R.; OLIVER, J. M. Observing FcepsilonRI signaling from the inside of the mast cell membrane. **The Journal of Cell Biology**, v. 149, p. 1131-1142, 2000.

WYMANN, M. P.; BJORKLOF, K.; CALVEZ, R.; FINAN, P.; THOMAST, M.; TRIFILIEFF, A.; BARBIER, M.; ALTRUDA, F.; HIRSCH, E.; LAFFARGUE, M. Phosphoinositide 3-kinase gamma: a key modulator in inflammation and allergy. **Biochemical Society transactions**, v. 31, p. 275-280, 2003.

XIAO, W.; NISHIMOTO, H.; HONG, H.; KITaura, J.; NUNOMURA, S.; MAEDA-YAMAMOTO, M.; KAWAKAMI, Y.; LOWELL, C. A.; RA, C.; KAWAKAMI, T. Positive and negative regulation of mast cell activation by Lyn via the FcepsilonRI. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 6885-6892, 2005.

XU, R.; ABRAMSON, J.; FRIDKIN, M.; PECHT, I. SH2 domain-containing inositol polyphosphate 5'-phosphatase is the main mediator of the inhibitory action of the mast cell function-associated antigen. **Journal of Immunology**, v. 167, p. 6394-6402, 2001.

YANG, R.Y.; HSU, D.K.; LIU, F.T. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 6737-6742, 1996.

YANG, R. Y.; LIU, F. T. Galectins in cell growth and apoptosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 267-276, 2003.

YASUDA, M.; HASUNUMA, Y.; ADACHI, H.; SEKINE, C.; SAKANISHI, T.; HASHIMOTO, H.; RA, C.; YAGITA, H.; OKUMURA, K. Expression and function of fibronectin binding integrins on rat mast cells. **International Immunology**, v. 7, p. 251-258, 1995.

ZHANG, J.; BERENSTEIN, E. H.; EVANS, R. L.; SIRAGANIAN, R. P. Transfection of Syk protein tyrosine kinase reconstitutes high affinity IgE receptor mediated degranulation in a Syk negative variant of rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, p. 71-79, 1996.

ZHANG, C.; BAUMGARTNER, R. A.; YAMADA, K.; BEAVEN, M. A. Mitogen-activated protein (MAP) kinase regulates production of tumor necrosis factor-alpha and release of arachidonic acid in mast cells. Indications of communication between p38 and p42 MAP kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 13397-13402, 1997.

ZHANG, W.; TRIBLE, R. P.; ZHU, M.; LIU, S. K.; MCGLADE, C. J.; SAMELSON, L. E. Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 23355-23361, 2000.

ZHANG, X. A.; BONTRAGER, A. L.; HEMLER, M. E. Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 25005-25013, 2001.

ZAPUELA, J. P.; AROCK, M.; MARS, L. T.; LIBLAU, R. S. Mast cells: new target for multiple sclerosis therapy? **Journal of Neuroimmunology**, v. 131, p. 5-20, 2002.

ZUBERI, R. I.; FRIGERI, L. G.; LIU, F.T. Activation of Rat Basophilic Leukemia Cells by eBP, an IGE-Binding Endogenous Lectin. **Cellular Immunology**, v. 156, p. 1-12, 1994.