

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

EDNÉA OLIVEIRA DE ABREU

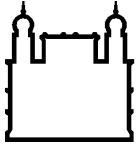
Estudo dos fatores envolvidos no processo de atrofia tímica observado em camundongos deficientes para o gene da galectina-3.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dra. Déa Maria Serra Villa Verde

RIO DE JANEIRO

2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Ednéa Oliveira de Abreu

Estudo dos fatores envolvidos no processo de atrofia tímica observado em camundongos deficientes para o gene da galectina-3.

ORIENTADOR: Dra. Déa Maria Serra Villa Verde

Aprovada em:

EXAMINADORES:

Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira - Presidente

Dr. Alexandre Morrot

Dr. Roger Chammas

Dr. Vinícius Cotta de Almeida - Revisor e Suplente

Dra. Eliane Côrrea de Santana

Rio de Janeiro, 12 de setembro de 2012.

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

A162

Abreu, Ednéa Oliveira de

Estudos dos fatores envolvidos no processo de atrofia tímica observado em camundongos deficientes para o gene da galectina-3 / Ednéa Oliveira de Abreu. – Rio de Janeiro, 2012.
xv, 79f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2012.
Bibliografia: f. 59-79

1. Timo. 2. Atrofia. 3. Galectina-3. I. Título.

CDD 612.43

“... pareço ter sido apenas uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato de descobrir de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade permanecia misterioso diante de mim”

(Isaac Newton)

AGRADECIMENTOS

Faltam-me palavras para agradecer a todos que tiveram participação direta e indireta na realização deste trabalho. Posso somente oferecer toda minha gratidão.

Em primeiro lugar a Deus, sempre presente, por ter me proporcionado não apenas o privilégio de estar chegando ao final de mais uma etapa importante da minha vida, como também por ter me dado forças para alcançá-la (Tu és o meu Deus, e eu te darei graças; Tu és o meu Deus, e eu te exaltarei – Salmos 118:28).

A toda minha família pela compreensão, força e incentivo, principalmente aos melhores pais do mundo Elias e Creunice, os amo incondicionalmente.

A todos os membros do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, os que já foram e os que ainda permanecem. Foi um imenso prazer conhecê-los e é um privilégio fazer parte dessa equipe. Agradeço à minha orientadora Dra. Déa que desde a iniciação científica tem me apoiado e incentivado. Aos membros do grupo da galectina-3 Danielle e Tiago, e também a Ailin e Luiz que apesar de não fazerem parte oficialmente do grupo da galectina-3 contribuíram imensamente para a realização deste trabalho. Ao chefe do laboratório Dr. Wilson Savino e a todos os pesquisadores que sempre contribuem com discussões e sugestões. A Elaine, Marina, Sidneia, Celso e Valmir que estão sempre trabalhando para nos auxiliar. Tomei a liberdade de citar o nome de apenas alguns, mas o meu sentimento de gratidão se estende a todos.

Ao Dr. Vinícius Frias e ao Rafael do Laboratório de Inflamação do Instituto Oswaldo Cruz pela colaboração nas análises de radioimunoensaio.

Ao Dr. Vinícius Cotta de Almeida pela revisão desse trabalho, pela discussão e excelentes sugestões para prosseguimento do mesmo.

A CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e ao PAPES/FIOCRUZ - Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz, pelo apoio financeiro concedido.

“Falhamos ao traduzir exatamente o que se sente na nossa alma: o pensamento continua a não poder medir-se com a linguagem.”

(Henri Bergson)

SUMÁRIO

Índice de Figuras e Tabelas -----	ix
Abreviaturas e Siglas -----	xi
Resumo -----	xiv
Abstract -----	xv
1. Introdução -----	1
1.1. Timo-----	1
1.1.1. Componentes do microambiente tímico-----	3
1.1.2. Entrada de precursores e diferenciação intratímica de células T-----	6
1.1.3. Importância da migração intratímica no processo de diferenciação de timócitos-----	11
1.1.4. Involução tímica-----	12
1.2. Lectinas-----	16
1.2.1. Galectinas-----	17
1.3. Galectina-3-----	20
1.3.1. Estrutura, localização e distribuição tecidual-----	20
1.3.2. Funções biológicas da galectina-3-----	22
1.3.3. Galectina-3 e o sistema imune-----	25
2. Justificativa e Objetivos -----	28
2.1. Justificativa e objetivo geral-----	28

2.1. Objetivos específicos -----	28
3. Materiais e Métodos -----	29
3.1. Animais -----	29
3.2. Reação em cadeia da polimerase -----	29
3.2.1. Genotipagem dos animais Gal-3 ^{-/-} -----	29
3.2.2. PCR Quantitativo em Tempo Real – Análise de enzimas de síntese de corticosterona -----	31
3.3. Dosagem de corticosterona por radioimunoensaio -----	31
3.4. Citometria de fluxo -----	32
3.5. Análise da morte celular -----	33
3.6. Análise da proliferação -----	34
3.7. Histologia convencional -----	34
3.8. Imunofluorescência -----	34
3.9. Análise da celularidade da medula óssea -----	35
3.10. Análise da celularidade de órgãos linfoides secundários -----	35
3.11. Análise estatística -----	36
4. Resultados -----	37
4.1. Efeito da ausência de galectina-3 na expressão de moléculas relacionadas à atrofia tímica -----	37
4.2. Análise do fenótipo dos timócitos de animais Gal-3 ^{-/-} -----	39
4.3. Efeito da ausência da galectina-3 nas taxas de morte celular e proliferação de	

timócitos de camundongos Gal-3 ^{-/-} -----	41
4.4. Análise da morfologia do timo e do compartimento epitelial-----	44
4.5. Análise da celularidade da medula óssea e órgãos linfoides secundários -----	46
5. Discussão -----	49
6. Conclusões -----	57
7. Perspectivas -----	58
8. Referências Bibliográficas -----	59

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.1. Corte de timo corado com Hematoxilina-Eosina -----	2
Figura 1.2. Representação esquemática demonstrando os diferentes tipos celulares que compõem o microambiente tímico -----	4
Figura 1.3. Representação esquemática da timopose -----	8
Figura 1.4. Involução tímica crônica -----	14
Figura 1.5. Representação esquemática das enzimas que participam da via de biossíntese de glicorticoides em camundongos e humanos -----	15
Figura 1.6. Classificação e estrutura das galectinas -----	18
Figura 1.7. Funções intracelulares e extracelulares da galectina-3 -----	24
Figura 1.8. Galectina-3 e o timo -----	27
Figura 3.1. Genotipagem dos camundongos Gal-3 ^{-/-} -----	30
Figura 4.1. Animais Gal-3 ^{-/-} apresentam aumento da expressão de enzimas de síntese de GC na adrenal e no timo -----	38
Figura 4.2. Animais Gal-3 ^{-/-} apresentam aumento dos níveis séricos e intratímicos de corticosterona -----	39
Figura 4.3. Animais WT e Gal-3 ^{-/-} apresentam o mesmo perfil de subpopulações definidas por CD4 e CD8 -----	40
Figura 4.4. Subpopulações de células duplo-negativas estão alteradas nos animais Gal-3 ^{-/-} -----	41
Figura 4.5. Análise das taxas de morte celular -----	42
Figura 4.6. Diminuição das taxas de proliferação espontânea em algumas supopulações de timócitos na ausência de galectina-3 -----	43

Figura 4.7. Diminuição das taxas de proliferação espontânea em todas as supopulações de timócitos duplo-negativos na ausência de galectina-3 -----	44
Figura 4.8. Análise da morfologia do timo -----	45
Figura 4.9. Ausência de galectina-3 leva à desorganização do compartimento epitelial -	46
Figura 4.10. Análise da celularidade da medula óssea de animais Gal-3 ^{-/-} -----	47
Figura 4.11. Animais Gal-3 ^{-/-} apresentam diminuição de celularidade em alguns órgãos linfoides periféricos -----	48
Figura 4.12. Análise das subpopulações de células definidas pelos marcadores CD4 e CD8 de órgãos linfoides periféricos de animais Gal-3 ^{-/-} -----	48
Tabela 3.1. Sequência de <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR -----	33

ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK – Tampão de Lise Cloreto de Amônio

AIRE – Regulador de Autoimunidade (do inglês, *autoimmune regulator*)

APC – Célula Apresentadora de Antígeno

Bcl-2 – *B-cell lymphoma-2*

BrdU – Bromodeoxiuridina

CCL – Ligante de quimiocinas com motivo C-C

CCR – Receptor de quimiocinas com motivo C-C

CD – Grupamento de Diferenciação

CLP – Progenitor Linfoide Comum

CMJ – Junção Córtrico-Medular

CRD – Domínio de Reconhecimento ao Carboidrato

cTEC – Célula Epitelial Timíca Cortical

CXCL – Ligante de quimiocinas com motivo C-X-C

CXCR – Receptor de quimiocinas com motivo C-X-C

DC – Célula Dendrítica

DN – Timócitos Duplo-Negativos

DP – Timócitos Duplo-Positivos

ECM – Matriz Extracelular

ETP – Progenitor Timíco (do inglês, *early thymic precursor*)

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

Gal-3 – Galectina-3

Gal-3^{-/-} – Camundongos geneticamente deficientes para a expressão do gene da galectina-3

GAPDH – Glicerol-3 Fosfato Desidrogenase

GC – Glicorticoide

H&E – Hematoxilina e Eosina

HSC – Células Tronco Hematopoéticas

IFN – Interferon

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

ISP – Timócito Simples-Positivo Imaturo

K – Citoqueratina

LSC – Linfonodos Subcutâneos

LSK – Progenitores com Fenótipo Lin⁻ SCA-1⁺ cKit^{hi}

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

MMP – Metaloproteinases de Matriz

MPP – Progenitor Multipotente

mTEC – Célula Epitelial Timíca Medular

ND – Domínio N-terminal

NK – Célula *Natural killer*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pDP – Pré Duplo-Positivo

PTR – Células Fagocíticas do Retículo Tímico (do inglês, *phagocytic cells of the thymic reticulum*)

PVS – Espaço Perivascular

RAG – Gene Ativador de Recombinação

RPL-13 – Proteína Ribossomal L-13

SCA-1 – Antígeno de Células Tronco

SCF – Fator Derivado de Células Tronco

SP - Timócitos Simples-Positivos

TCR – Receptor Clonal de Células T

TEC – Células Epiteliais Tímicas

TES – Espaço Epitelial Tímico

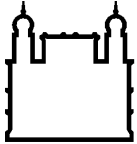
TNC – Célula *Nurse* Tímica

TNFR – Receptor de Fator de Necrose Tumoral

Treg – Célula T Reguladora

VLA – Antígeno de Aparecimento Tardio (*Very late antigen*)

WT – Camundongos tipo selvagem; não alterados geneticamente (*wild type*)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

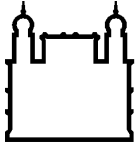
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A galectina-3 (Gal-3), lectina solúvel ligante de β -galactosídeos, é encontrada em diferentes compartimentos celulares, modulando diversos processos biológicos, como proliferação e apoptose. No timo, órgão linfóide central onde as células T se diferenciam, está presente no córtex e na medula. Interage com glicoproteínas de superfície celular e componentes da matriz extracelular (ECM), influenciando a migração de timócitos, fundamental para sua diferenciação, com propriedades *de-adésivas*. Em estudos prévios, notamos uma acentuada diminuição da massa e celularidade do timo de animais deficientes para o gene da Gal-3 (Gal-3^{-/-}). Considerando a capacidade da Gal-3 em modular processos biológicos que podem estar envolvidos neste fenômeno, tivemos por objetivo avaliar fatores envolvidos com o processo de atrofia tímica observado na ausência de Gal-3. Primeiramente, verificamos a possibilidade da Gal-3 modular a expressão dos genes StAR e CYP11A1, que codificam proteínas envolvidas na síntese de glicocorticoides, hormônios capazes de causar atrofia tímica. Observamos aumento da expressão de StAR na adrenal e de ambos os genes no timo dos animais Gal-3^{-/-}, correlacionando com os maiores níveis de corticosterona no soro e no timo desses animais. Por citometria de fluxo, analisamos possíveis alterações nas subpopulações de timócitos e não observamos diferenças significativas nas porcentagens de subpopulações de células definidas pelos marcadores CD4 e CD8. Porém, ao analisarmos o subgrupo de células duplo-negativas (DN), demonstramos um aumento de timócitos DN1 e diminuição de DN3, isolados de animais Gal-3^{-/-}. Em números absolutos observamos uma diminuição significativa dos timócitos em todas as subpopulações analisadas. Na análise das taxas de morte celular, através da marcação por anexina V, apesar de não haver diferença significativa nos timócitos totais, houve aumento de morte nos timócitos duplo-positivos (DP) de animais Gal-3^{-/-}. Por outro lado, na análise de proliferação espontânea por incorporação de bromodeoxiuridina, observamos diminuição de proliferação nos timócitos totais, sendo significativa nas células DN, DP e simples-positivas (SP)CD4. A análise morfológica do timo de animais Gal-3^{-/-} mostrou manutenção das regiões corticais e medulares, porém, observamos a presença de estruturas semelhantes a corpúsculos de Hassall na medula. Além disso, análise por imunofluorescência revelou desorganização da rede epitelial tímica desses animais, com detecção de extensas áreas sem células epiteliais. Ao analisarmos a celularidade de outros órgãos linfóides, observamos diminuição no número de células totais da medula óssea, baço e linfonodos mesentéricos, mas não nos linfonodos subcutâneos. Em conjunto, nossos dados sugerem que a Gal-3 contribui para a manutenção da homeostase do timo, modulando a diferenciação, proliferação e morte de timócitos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Galectin-3 (Gal-3), a soluble β -galactoside-binding lectin, is found at different subcellular compartments, modulating various biological processes, such as proliferation and apoptosis. In the thymus, the central lymphoid organ in which T cells differentiate, this lectin is found in the cortex and in the medulla. Gal-3 interacts with glycoproteins on the cell surface and in extracellular matrix components (ECM), influencing thymocyte migration, which is fundamental for their differentiation, with de-adhesive properties. In previous studies, we noted a serious decrease in thymus weight and cellularity in Gal-3 deficient mice (Gal-3^{-/-}). Considering Gal-3 ability to modulate biological processes that may be involved in this phenomenon, the aim of this project was to evaluate factors involved in the process of thymic atrophy observed in the absence of Gal-3. We first verified a possible modulation in the expression of StAR and CYP11A1 genes, which encode proteins involved in the synthesis of glucocorticoids, hormones that can cause thymic atrophy, by Gal-3. We observed an increase in the expression of StAR in the adrenal and of both genes in the thymus of Gal-3^{-/-} mice, correlating with the increased levels of corticosterone in the serum and thymus of these animals. We analyzed by flow cytometry possible alterations in thymocyte subpopulations and we did not observe significant differences in the percentages of cell subsets defined by CD4 and CD8. However, the analysis of double-negative (DN) cells showed an increase of DN1 and a decrease in DN3 thymocytes isolated from Gal-3^{-/-} animals. In absolute numbers we observed a significant decrease in all thymocyte subpopulations analyzed. In the analysis of cell death ratio by annexin V labeling, although no significant differences were seen in total thymocytes, there was an increase in double-positive (DP) thymocyte death in Gal-3^{-/-} animals. On the other hand, the spontaneous proliferation analysis by bromodeoxyuridin incorporation showed a decrease in proliferation of total thymocytes, being statistically significant in DN, DP and simple-positive (SP)CD4 cells. The morphological analysis of the thymus of Gal-3^{-/-} mice showed well defined cortical and medullary regions, but we observed the presence of structures similar to Hassall's bodies in the medulla. Moreover, immunofluorescence analysis showed evident epithelial network disorganization with extensive TEC-free areas. We also analyzed the cellularity of other lymphoid organs and observed a decrease in the number of total bone marrow, spleen and mesenteric lymph node cells but not in subcutaneous lymph nodes. Taken together, our data suggest that Gal-3 contributes to the maintenance of thymus homeostasis, modulating thymocyte differentiation, proliferation and cell death.

1. INTRODUÇÃO

As galectinas, membros da superfamília das lectinas, são proteínas que se ligam a sequências específicas de carboidratos reconhecendo glicoconjugados presentes nos tecidos animais. Essas moléculas são capazes de modular diversos processos biológicos, alguns destes podendo influenciar, inclusive, o funcionamento do sistema imune, como por exemplo, a adesão, a migração, proliferação e apoptose. Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que na ausência de galectina-3, molécula encontrada no meio intra e extracelular e expressa por diversos tipos celulares e tecidos, há uma diminuição significativa da massa do timo, órgão onde os linfócitos T passam por um complexo processo de diferenciação, de sua massa relativa e do número de timócitos.

Neste trabalho, procuramos definir a influência da galectina-3 no processo de atrofia tímica, através da avaliação de parâmetros que podem influenciar a manutenção da celularidade neste órgão, utilizando como modelo de estudo, animais deficientes para o gene da galectina-3.

1. 1. Timo

O timo é o órgão linfóide primário, situado no mediastino anterior, onde precursores de células T oriundos da medula óssea passam por um complexo processo de diferenciação. É um órgão bilobado e cada lobo é envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, que origina septos dividindo o parênquima em múltiplos lóbulos. Cada lóbulo apresenta duas regiões histológicas bem definidas, uma externa denominada córtex, onde predominam os linfócitos T em diferenciação (timócitos), e uma interna, denominada medula, na qual a quantidade de timócitos é menor e, desta forma, é possível uma melhor observação das células que compõem o microambiente tímico (Möröy & Karsunky, 2000; Crivellato *et al.*, 2004) (Figura 1.1). Este microambiente é composto por diversos tipos celulares não-linfóides e moléculas de matriz extracelular (ECM), apresentando ainda proteínas solúveis como citocinas, quimiocinas e algumas lectinas que possuem diversas funções como adesão, morte celular e migração (Baum *et al.*, 1995a ; Savino *et al.*, 2002; Savino *et al.*, 2004).

Os componentes do microambiente tímico formam uma rede tridimensional que controla as etapas do processo de maturação dos linfócitos T como, a proliferação, diferenciação, rearranjo dos genes do receptor clonal de células T (TCR), assim como,

os processos de seleção positiva e negativa dos timócitos. Estes fenômenos ocorrem devido à emissão de diversos sinais que são fundamentais para o desenvolvimento e também para a manutenção das subpopulações de linfócitos T (von Boehmer, 2004; Petrie & Zuniga-Pflucker, 2007).

O amadurecimento dos linfócitos T é acompanhado de diversas mudanças fenotípicas na expressão de marcadores de membrana, tais como CD3, CD4, CD8, CD25, CD44, relacionados aos diferentes estágios de maturação dos timócitos (Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007; Savino & Dardenne, 2000). Além disso, a migração das células pelo órgão é fundamental para sua maturação, sendo um processo multivetorial, dependente da sua interação com componentes do microambiente como as glicoproteínas de ECM, através dos receptores β_1 integrinas, e moléculas solúveis como quimiocinas e galectinas (Villa-Verde *et al.*, 1994; Savino *et al.*, 2004).

Além de ser o sítio da timopoese, uma das características do timo é a variação que ocorre no órgão e em seu microambiente durante a vida, devido a diversas influências, resultando na redução do tamanho, massa, celularidade e gradual declínio de sua integridade e função (Taub & Longo, 2005).

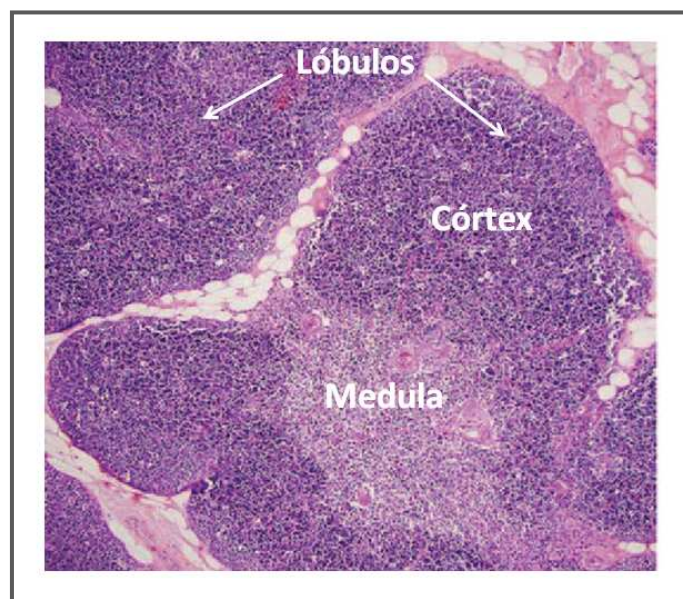


Figura 1.1. Corte de timo corado com Hematoxilina-Eosina. Foto histológica demonstrando a região cortical, mais externa, composta principalmente por linfócitos, e a região medular, mais interna, composta em sua maioria por células epiteliais (Adaptado de Nishino *et al.*, 2006).

1. 1.1. Componentes do Microambiente Tímico

O microambiente tímico é formado por componentes celulares, como as células epiteliais corticais e medulares, macrófagos, células dendríticas, células fagocíticas reticulares, fibroblastos e componentes não-celulares, como as moléculas de ECM, quimiocinas e citocinas (Savino *et al.*, 2002) (Figura 1.2). A interação entre os timócitos em desenvolvimento e o microambiente é fundamental para a formação de linfócitos T imunocompetentes (Bommhardt *et al.*, 2004), porém os timócitos também exercem influência sobre o microambiente (*cross-talk*), sendo, portanto, essa interação necessária para o desenvolvimento de ambos (Holländer *et al.*, 2006).

O principal componente celular do estroma tímico são as células epiteliais tímicas (TEC) que formam um tecido heterogêneo em termos de função, fenótipo e morfologia. A distinção das subpopulações de TEC que se encontram na região cortical (cTEC) das que se encontram na região medular (mTEC) pode ser feita através do uso de alguns marcadores, como os filamentos intermediários de citoqueratina 5 (K5), citoqueratina 8 (K8), citoqueratina 13 (K13), citoqueratina 18 (K18) e citoqueratina 19 (K19), além dos marcadores MTS44 e MTS10. Em camundongos, a região cortical possui, em maioria, TEC com fenótipo $K8^+K18^+K5^-K13^-K19^-MTS44^+$, ao passo que na medula apresentam-se células $K8^-K18^-K5^+K13^+K19^+MTS10^+$, tendo sido descritas células com fenótipo $K8^+K5^+$ na junção córtico-medular (CMJ) (Meireles-de-Souza *et al.*, 1993; Klug *et al.*, 1998; Blackburn *et al.*, 2002, Derbinski *et al.*, 2001, Savino *et al.*, 2003). As TEC secretam proteínas de ECM, como laminina, fibronectina e colágeno do tipo IV, e expressam receptores para moléculas de ECM, como as integrinas VLA- 5 e VLA-6 (Villa-Verde *et al.*, 1994). Estas células são as principais produtoras de citocinas e secretam os hormônios tímicos timosina $\alpha 1$, timopoetina e timulina (Savino & Dardenne, 2000).

As cTEC expressam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II. Estas células, entre outras funções, são responsáveis pelo recrutamento de precursores hematopoéticos do sangue, comprometimento desses precursores com a linhagem T, polarização da migração de timócitos e participação no processo de seleção positiva (Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007). Um tipo particular de TEC encontrado na região cortical mais externa é a célula *nurse* tímica (TNC), um complexo linfoepitelial que corresponde a uma estrutura multicelular formada por uma TEC que abriga, em camundongos, até 200 timócitos em diferenciação (Wekerle &

Ketelsen, 1980). A entrada de timócitos no complexo é reduzida com o uso de inibidores de microtúbulos e microfilamentos, indicando que tais estruturas estão envolvidas na ligação e internalização dessas células em desenvolvimento. São internalizados pelas TNC principalmente timócitos que apresentam o fenótipo $\alpha\beta\text{TCR}^{\text{low}}\text{CD4}^+\text{CD8}^+\text{CD69}^-$, essas células proliferam no interior das TNC e tem o seu fenótipo alterado, passando a ser $\alpha\beta\text{TCR}^{\text{low}}\text{CD4}^+\text{CD8}^+\text{CD69}^+$. As TNCs propiciam um microambiente favorável à maturação e diferenciação de timócitos imaturos, pois expressam moléculas de ECM, como laminina, fibronectina e colágeno do tipo IV, moléculas do MHC de classes I e II e também secretam hormônios, como a timulina, hormônio capaz de aumentar a proliferação de timócitos. Além disso, parecem atuar no processo de seleção positiva e participam, juntamente com os macrófagos, da eliminação das células que sofrem apoptose durante o processo de diferenciação (Wekerle & Ketelsen, 1980; Villa-Verde *et al.*, 1995; Samms *et al.*, 1999; Pezzano *et al.*, 2001; Webb *et al.*, 2004).

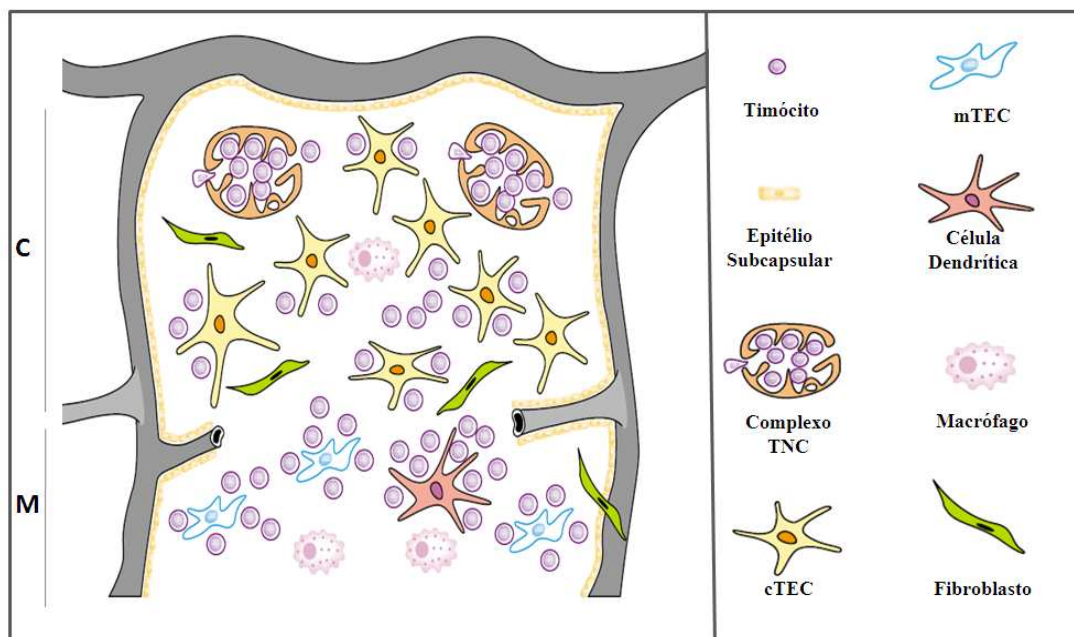


Figura 1.2. Representação esquemática demonstrando os diferentes tipos celulares que compõem o microambiente tímico (Adaptado de Savino *et al.*, 2002).

As mTEC expressam moléculas de MHC de classe I e II e são responsáveis pela atração de timócitos que passaram pelo processo de seleção positiva, pela migração de linfócitos T maduros para a periferia, assim como, pela indução de tolerância central

(Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007). Podemos encontrar na região medular de vários mamíferos, inclusive em humanos, um conjunto variado de TEC que desenvolvem um exacerbado processo de queratinização organizando-se em pequenas estruturas concêntricas chamadas de corpúsculos de Hassall. A participação dos corpúsculos na fisiologia tímica ainda é duvidosa. No entanto, algumas evidências sugerem sua participação na remoção de células mortas e, também, na geração intratímica, em especial, de células T reguladoras ao influenciarem a atividade das células dendríticas (DC) (Watanabe *et al.*, 2005).

Dentre as células não-epiteliais encontradas no microambiente tímico, estão vários tipos de células fagocíticas e apresentadoras de antígenos que se distribuem pelas diferentes regiões do órgão. Os macrófagos encontrados no timo possuem diversidade fenotípica, sendo encontrados em todo órgão, porém estão mais concentrados na região córtico-medular. Uma das formas de diferenciar os macrófagos corticais, medulares e da junção córtico-medular (CMJ) é a presença de lisosomos contendo restos de linfócitos fagocitados, estando estas estruturas presentes somente nos primeiros (Surh & Sprent, 1994). As DC são encontradas principalmente na região medular, ao longo dos vasos sanguíneos e na CMJ. A população de DCs tímicas também é heterogênea, sendo encontradas DCs plasmocitoides, importantes produtoras de Interferon α (IFN α), e DCs convencionais, as que possuem maior capacidade de apresentar antígenos para os linfócitos T através das moléculas de MHC de classe I e II. Essas células apresentam peptídeos tecido-específicos às células T em desenvolvimento, participando, do processo de seleção negativa dos timócitos, assim como da geração de células T reguladoras (Treg) (Kyewski & Derbinski, 2004; Proietto *et al.*, 2009). Encontramos, também, as PTR (*phagocytic cells of the thymic reticulum*), células que apresentam fenótipo similar aos macrófagos e expressam MHC de classe I e II (Papiernik *et al.*, 1983). Estas células podem ser isoladas a partir de culturas primárias de timo murino. Assim como as TEC, as PTR produzem moléculas de matriz extracelular como colágeno-IV, fibronectina e laminina, expressam receptores de fibronectina (VLA-4, VLA-5) e de laminina (VLA-6), e ainda interagem com timócitos através de ligantes e receptores de ECM (Ayres-Martins *et al.*, 2004). Outro tipo celular encontrado no microambiente são os fibroblastos, localizados nas regiões ricas em tecido conjuntivo, como os septos e a cápsula. Estas células também são capazes de produzir diferentes moléculas de ECM, como fibronectina, laminina, colágenos tipo I e tipo IV (Savino *et*

al., 2000). Ainda, são essenciais para a proliferação das TEC, uma vez que produzem os fatores de crescimento de fibroblasto (FGF) (Jenkinson *et al.*, 2003).

Além dos componentes celulares o microambiente tímico é composto por uma variedade de glicoproteínas de ECM. As moléculas de ECM são produzidas pelos diferentes tipos celulares presentes no microambiente, tendo papel importante na migração, adesão e diferenciação dos timócitos, e são reconhecidas pelas células tímicas através de receptores específicos. Grande parte destes receptores pertence à família das integrinas, que são glicoproteínas transmembranares heterodiméricas compostas de duas subunidades (α e β). Até o momento, foram descritas 18 subunidades α , e 8 subunidades β , formando, assim, 24 diferentes moléculas (Kinashi, 2007). Os timócitos expressam, principalmente, as integrinas denominadas VLAs (*very late antigens*) da família $\beta 1$, como por exemplo, os receptores VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$ ou CD49d/CD29) e VLA-5 ($\alpha 5\beta 1$ ou CD49e/CD29) para fibronectina, e o receptor VLA-6 ($\alpha 6\beta 1$ ou CD49f/CD29) para laminina. A distribuição destas moléculas, no entanto, se altera de acordo o estágio de diferenciação, refletindo uma influência distinta dos ligantes e receptores em cada etapa da maturação. Também fazem parte do componente não-celular do estroma tímico diferentes fatores de crescimento, quimiocinas e hormônios, moléculas solúveis que podem estar também associadas à ECM e representam um importante fator na regulação da resposta imune celular (Savino *et al.*, 2000; Savino *et al.*, 2004, Smaniotto *et al.*, 2005; Mendes-da-Cruz *et al.*, 2008).

1. 1.2. Entrada de Precusores e Diferenciação Intratímica de Células T

Os linfócitos T são derivados de células tronco hematopoéticas provenientes da medula óssea. Enquanto a maior parte das células hematopoéticas amadurece na própria medula, o processo de maturação dos linfócitos T ocorre no timo. Embora seja amplamente relatado que os progenitores das células T no timo não são capazes de sustentar seu desenvolvimento de forma indefinida, dados recentes sugerem que, em condições de deficiência no suprimento de progenitores vindos da medula óssea, o timo pode funcionar de forma autônoma, mantendo a diferenciação de timócitos e a geração de células T (Martins *et al.*, 2012; Peaudecerf *et al.*, 2012). Também é importante salientar que, além da colonização do timo por progenitores linfoides, o equilíbrio entre as taxas de proliferação e morte dos timócitos, e a emigração das células maduras, em

conjunto, contribuem para a manutenção da celularidade no órgão e a geração contínua de células T no decorrer da vida pós-natal (Petrie, 2003; Boehm & Bleul, 2006).

O evento que inicia o processo de diferenciação dos linfócitos T é a entrada dos precursores através de vasos sanguíneos presentes na CMJ (Yin et al., 2006). A colonização do timo por células linfóides progenitoras se inicia no dia 11,5 do desenvolvimento embrionário (E11,5) em camundongos; já em humanos, a colonização se inicia na oitava semana de gestação. A entrada de progenitores de células T no timo durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, antes da vascularização do timo, é independente de vasos sanguíneos, porém, durante os estágios mais tardios do desenvolvimento embrionário e no período pós-natal, a entrada dos precursores ocorre por uma via dependente de vasos sanguíneos (Rossi et al., 2005; Liu et al., 2006; Li, et al., 2007). Após a vascularização do timo, os progenitores são encontrados, principalmente, na CMJ e também nos espaços que circundam os vasos sanguíneos deste compartimento (Lind et al., 2001; Mori et al., 2007).

Ainda resta muito a ser elucidado em relação às etapas que regem a entrada de progenitores no timo. Apesar de acreditar-se que esse processo deva ocorrer de forma semelhante à entrada de linfócitos em órgãos linfóides secundários, havendo, portanto, o reconhecimento do endotélio vascular, rolamento das células, adesão firme ao endotélio e a finalização do processo com o extravasamento destes progenitores para o interior do órgão (Schwarz & Bhandoola, 2006). Outro aspecto ainda não compreendido em sua totalidade é a identidade precisa dos progenitores que saem da medula óssea para entrar no timo. Existem muitas controvérsias em relação ao fenótipo dessas células (Chi et al., 2009). São candidatos a progenitores: as células tronco hematopoéticas (HSC), que podem originar todas as linhagens celulares sanguíneas e são auto-renováveis; o progenitor multipotente (MPP), que pode originar todas as linhagens hematopoéticas, porém não é auto-renovável, e o progenitor linfóide comum (CLP). Porém não está claro o quanto cada uma destas células seria fisiologicamente capaz de colonizar o timo através da corrente sanguínea. As células supracitadas, HSC, MPP e CLP, são denominadas fenotipicamente como progenitores LSK ($\text{Lin}^{-}\text{SCA-1}^{+}\text{cKit}^{\text{hi}}$), uma vez que não apresentam marcadores de diferenciação de linhagens celulares maduras, expressam SCA-1 (Antígeno de células tronco-1) e o receptor CD117 (cKit) que se liga ao SCF (Fator derivado de células tronco).

Uma vez os precursores tendo entrado no timo, através dos vasos sanguíneos presentes na CMJ, inicia-se o processo de diferenciação dos linfócitos T que, como dito

anteriormente, é acompanhado por diversas mudanças fenotípicas na expressão de marcadores de membrana (Figura 1.3). É possível avaliar o estágio de maturação através da análise desses marcadores. Os precursores dos linfócitos T, que chegam ao timo, não expressam os co-receptores CD4 e CD8, sendo, portanto, denominados de células duplo-negativas (DN). As células DN podem ainda ser subdivididas em quatro estágios sucessivos de desenvolvimento, tomando como base a expressão das moléculas CD44 (Pgp-1), receptor para ácido hialurônico e fibronectina, CD117 (cKit), receptor para SCF e CD25 (IL-2R α), cadeia alfa do receptor de IL-2 (Petrie & Zuniga-Pflucker, 2007).

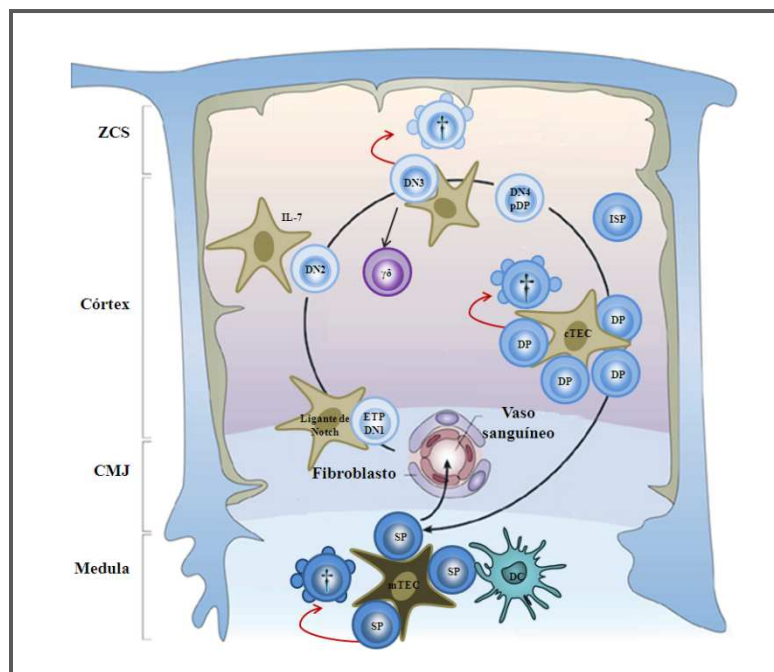


Figura 1.3. Representação esquemática da timopoese. Os estágios de diferenciação estão representados nas diferentes cores de setas, as setas pretas indicam progressão no desenvolvimento e/ou migração e as setas vermelhas indicam morte celular. O punhal (†) indica as populações que sofrem apoptose ou morte por falta de sinalização durante os processos de seleção. Os precursores linfoides (DN) entram no órgão através dos vasos sanguíneos situados na CMJ e migram para a região cortical mais externa. Os timócitos passam, então, para o estágio duplo-positivo (DP), migrando para a região medular onde se encontram os linfócitos nos estágios mais avançados de maturação com fenótipo simples-positivo CD4 ou CD8. CMJ – junção córtico-medular; SCZ – zona subcapsular; DP – duplo-positivo; pDP – pré-duplo-positivo; SP – simples-positivo; cTEC – célula epitelial tímica cortical; mTEC – célula epitelial tímica medular; DC – célula dendrítica; ETP – progenitor tímico; IL-7 – interleucina-7; ISP – Simples-positivo imaturo (Adaptado de Anderson *et al.*, 2007).

A subpopulação definida como DN1 ($CD44^+CD117^+CD25^-$) encontra-se na região cortical, onde ocorrem altos níveis de expressão do ligante de Notch, Delta-like 1. Os sinais transmitidos aos precursores via Notch são fundamentais para o comprometimento dessas células com a linhagem linfoide, pois quando a interação entre receptores Notch presentes nas células em desenvolvimento e seus ligantes (como Jagged1, Jagged2, Delta-like1 e Delta-like4) presentes nas TEC é bloqueada, ocorrem falhas no desenvolvimento dos linfócitos T, inviabilizando o início do rearranjo dos segmentos gênicos para produção do receptor de antígeno (Harman *et al.*, 2003; Schmitt *et al.*, 2004; Laiosa *et al.*, 2006). As células DN1 são capazes de gerar ambas as linhagens de linfócitos T, as que expressam TCR com cadeias $\gamma\delta$ e as que expressam as cadeias $\alpha\beta$ (Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007), e possuem alta capacidade de proliferação através da ação da Interleucina 7 (IL-7) via seu receptor, o heterodímero composto pelas moléculas CD127 e CD132 (Wang, 2006). A ação desta molécula é fundamental para o desenvolvimento e sobrevivência dos timócitos. Na ausência de IL-7 há uma diminuição da celularidade do timo com bloqueio na diferenciação dos linfócitos (von Freeden-Jeffry *et al.*, 1995). A IL-7 é produzida pelas TEC presentes na CMJ no timo adulto, local onde se encontram os timócitos nos estágios mais precoces de desenvolvimento (Alves *et al.*, 2009). As células DN2 ($CD44^+CD117^+CD25^+$) também possuem alta capacidade de proliferação. A expressão dos genes ativadores de recombinação (RAG) aumenta nessas células, ocorrendo assim o primeiro rearranjo dos genes para as cadeias de $TCR\gamma$ e $TCR\sigma$, porém não para a cadeia $TCR\beta$ (Capone *et al.*, 1998; Livak *et al.*, 1999). Os sinais via Notch, no estágio DN2, continuam atuando sobre as células em diferenciação (Schmitt *et al.*, 2004). Porém, algumas células DN2 permanecem com a capacidade de gerar DC e células *natural killer* (NK) (Lu *et al.*, 2005), o que sugere que em determinados locais do timo haja ausência de sinalização via Notch, o que permite o não comprometimento dessas células com a linhagem linfoide (Radtke *et al.*, 2000). As células no estágio DN3 ($CD44^{low}CD117^+CD25^+$) estão permanentemente comprometidas com a linhagem linfoide, uma vez que nesta etapa ocorre o rearranjo do gene $TCR\beta$. Neste estágio ocorre um processo denominado seleção β , onde as células que não finalizam o rearranjo do $TCR\beta$ morrem e as células cujo rearranjo do gene $TCR\beta$ foi bem sucedido expressam um receptor de célula T imaturo (pré-TCR) em suas superfícies e proliferam, além de aumentarem a expressão dos RNA mensageiros que codificam as moléculas CD4 e CD8. No próximo estágio de desenvolvimento, que envolve intensa proliferação, as células DN4 ($CD44^{low}CD25^-$)

expressam os co-receptores CD4 e CD8, apesar da expressão ser em baixos níveis; por isso alguns autores denominam este estágio de pré-duplo-positivas (pDP). As células passam então por um breve estágio, em que são chamadas de células simples-positivas imaturas (ISP), e expressam o co-receptor CD8 (Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007; Rothenberg *et al.*, 2008). Este estágio transitório evolui para as células duplo-positivas (DP). A transição das células DP, após o rearranjo dos genes do TCR, ocorre concomitantemente à reversão de polaridade da migração que passa a ser em direção à medula, onde passam pelo processo de seleção negativa. Assim, os timócitos fazem uma migração em forma de “U” no interior do lóbulo tímico (Witt & Robbins, 2005). As células no estágio DP representam a maior população dos timócitos, no entanto, apenas uma pequena porcentagem dessas células torna-se madura, passando a expressar somente uma das moléculas co-receptoras CD4 ou CD8, tornando-se, portanto simples-positivas (SP), já que passam por extensivos processos de seleção destinados a assegurar que os linfócitos T maduros que saírem do timo sejam capazes de reconhecer moléculas de MHC próprio e discriminar entre antígenos próprios e não-próprios. O processo de seleção ocorre em duas etapas, uma denominada de seleção positiva e a outra de seleção negativa, e depende de interações entre o microambiente e os timócitos (Chidgey & Boyd, 2001). A seleção positiva ocorre na região cortical sendo de fundamental importância a participação das cTEC (Fowlkes & Scweighoffer, 1995) e está relacionado à avididade das interações entre o complexo peptídeo-MHC das células apresentadoras de antígeno (APC) e o TCR dos timócitos. Sobrevivem e continuam no processo de amadurecimento os timócitos cuja interação TCR/peptídeo-MHC é moderada. Por outro lado os timócitos com TCRs que interagem avidamente com os complexos peptídeo-MHC das APCs morrem por apoptose. Ocorre o rearranjo final da cadeia α do TCR nas células positivamente selecionadas, as que obtiverem sucesso no rearranjo recebem sinais para proliferar, porém as que falham morrem por ausência de sinal. As células selecionadas nesse processo apresentam um repertório de TCR restrito ao MHC, estando este evento relacionado ao comprometimento dos timócitos em células T auxiliares CD4⁺ ou em células T citotóxicas CD8⁺ (Mick et al., 2004). Os timócitos, que receberam sinais para sobreviver, seguem sua diferenciação e são submetidos ao segundo processo de seleção que ocorre na região medular, a seleção negativa. Uma característica peculiar desta etapa de seleção é a expressão ectópica de auto-antígenos tecido-específicos. As células dendríticas medulares (mDC) apresentam às células T em desenvolvimento esses peptídeos tecido-específicos, e as células que os

reconhecem morrem por apoptose. Entretanto, a maioria desses antígenos não-tímicos não é sintetizada pelas mDC e sim por um grupo de mTEC, sob o controle do fator de transcrição AIRE (regulador de autoimunidade; do inglês, *autoimmune regulator*), sendo fornecidas às mDC por apresentação cruzada após morte das mTEC (Gallegos & Bevan, 2004; Gray *et al.*, 2007; revisado em Kyewsky & Derbinsky, 2004). Os processos de seleção permitem que as células T maduras que emigram do timo para os órgãos linfoides periféricos sejam capazes de diferenciar os peptídeos próprios dos não-próprios, evitando assim, reações autoimunes (DeVoss *et al.*, 2006).

1.1.3. Importância da Migração Intratímica no Processo de Diferenciação de Timócitos

Vale ressaltar que subpopulações distintas de timócitos ocupam diferentes regiões do timo, indicando que a diferenciação é acoplada com a migração das células em desenvolvimento através do estroma. A migração celular é fundamental para que a diferenciação ocorra normalmente, assim como para a saída dos timócitos maduros para o leito vascular (Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007). As subpopulações de TEC encontradas no córtex e na medula facilitam as diferentes etapas do desenvolvimento das células T. Nos eventos intratímicos, células T passam por uma rota migratória intratímica direcionando-se para o córtex e, posteriormente, para a medula. As moléculas que participam do processo de migração são produzidas por células que compõem o microambiente tímico, e seus correspondentes receptores, expressos pelos timócitos em desenvolvimento (Savino *et al.*, 2004).

À medida que migram, os timócitos entram em contato com vários componentes do microambiente tímico, como por exemplo, a interação direta célula-célula via ligantes e receptores de ECM, como fibronectina e laminina, e seus receptores tipo $\beta 1$ integrina, VLA4/VLA5 e VLA6, respectivamente (Savino *et al.*, 1993; Villa-Verde *et al.*, 1994). Enzimas capazes de quebrar componentes da ECM, as metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs), são importantes na degradação da ECM durante a migração celular em vários sistemas (Goetzl *et al.*, 1996). Nesse sentido, estudos demonstraram que as metaloproteinases, produzidas no timo pelos precursores de células T, participam da entrada dessas células facilitando a migração através dos tecidos que rodeiam o timo (Wilkinson *et al.*, 1999).

As quimiocinas combinadas a moléculas de adesão e de-adesão promovem a orientação da migração celular, induzindo os movimentos direcionais dos timócitos nos diferentes estágios de maturação, sendo expressas diferencialmente de acordo com a região do timo (Kim *et al.*, 1998; Savino *et al.*, 2004). O padrão de migração dos timócitos está relacionado à expressão sequencial de diferentes receptores de quimiocina (Takahama, 2006). Diversas quimiocinas são expressas no timo, entre elas podemos destacar: CCL17, CCL19, CCL20, CCL21, CCL25 e CXCL12 (Savino *et al.*, 2004; Ebert *et al.*, 2005). Vários estudos demonstraram a importância dessas quimiocinas no processo de diferenciação. As quimiocinas CCL17 e CCL20 estão envolvidas no tráfego de ou timócitos maduros (Kim & Broxmeyer, 1999). A falta de sinalização via CCR7, o receptor para as quimiocinas CCL19 e CCL21, gera um acúmulo de células na CMJ nos eventos iniciais da diferenciação de timócitos (Misslitz *et al.*, 2004). Porém, nos eventos tardios da diferenciação, a falta do receptor ou de seus ligantes leva ao acúmulo de células SP no córtex e sua diminuição na medula, indicando a importância das quimiocinas no processo de migração do córtex para a medula, porém a sua deficiência não impede a diferenciação das células DP em SP (Ueno *et al.*, 2004). Já a ausência de sinalização via o receptor CCR9, cujo ligante é a quimiocina CCL25, é importante na transição de DN para DP (Uehara *et al.*, 2006). A quimiocina CXCL12, a principal quimiocina presente no timo, age sobre timócitos imaturos DN e DP, células que expressam o receptor CXCR4 (Savino *et al.*, 2004). A importância desta quimiocina foi estudada em animais quimeras, onde o gene para o receptor CXCR4 foi condicionalmente inativado. Nesses animais, o desenvolvimento é bloqueado no estágio DN1, ou seja, os timócitos imaturos falham em sair da CMJ, o que demonstra a importância da CXCL12 na migração e no desenvolvimento das células T (Plotkin *et al.*, 2003).

1.1.4. Involução Tímica

O timo é um órgão vital para a manutenção da homeostase do sistema imune periférico. Ele gera células T *naïve* capazes de distinguir o próprio do não-próprio. A geração contínua dessas células parece ser essencial para manter a diversidade do repertório, aumentando a possibilidade da geração de clones de células capazes de reconhecer o grande número de antígenos que um indivíduo pode entrar em contato durante a sua vida. Entretanto, o timo sofre mudanças em sua estrutura que levam à

diminuição da massa do órgão e da timopoese e, conseqüentemente, um número cada vez menor de células T *naïve* na periferia. Este fenômeno, conhecido como involução ou atrofia tímica ocorre em muitas espécies de mamíferos, incluindo humanos e camundongos. Está associado ao envelhecimento, involução crônica, começando cedo em ambas as espécies, mas também pode ser observado em diferentes estados fisiológicos e patológicos, involução aguda, que ao contrário da involução crônica é transiente e reversível, persistindo a redução da função do timo até que o fator que esteja gerando o estresse fisiológico ser removido (Taub & Longo, 2005; Gruver & Sempowski, 2008).

Em humanos, uma redução significativa da massa do timo se inicia com um ano de idade e resulta em uma redução importante da massa do órgão na puberdade. Em camundongos, 2 semanas após o nascimento, é observada uma diminuição da proliferação dos timócitos. Uma redução visível do tamanho do timo é observada aproximadamente 6 semanas após o nascimento. Parece também haver uma relação entre a atrofia tímica e o sexo dos animais, com a mesma ocorrendo em uma taxa mais elevada em machos quando comparados a fêmeas (Aspinall & Andrew, 2000; Pido-Lopez *et al.*, 2001; Lynch *et al.*, 2009; Dowling & Hodgkin, 2009).

Na involução tímica crônica há um declínio nas funções imunes mediadas por células, estando os indivíduos com idade mais avançada sujeitos a redução na resistência a infecções, aumento na incidência de câncer e doenças autoimunes. Nesse processo, o timo passa por diversas mudanças em sua arquitetura, incluindo-se o aumento do espaço perivascular (PVS), possivelmente devido à perda do espaço epitelial tímico (TES) e do estroma. A atrofia tímica em humanos também está associada com diminuição da área ativa de timopoese e aumento na porcentagem de gordura. Inicialmente, o PVS aumenta por infiltração linfocitária, mas durante o processo de envelhecimento os linfócitos perivascularares são substituídos por tecido adiposo. A involução progressiva leva à perda da definição entre as regiões corticais e medulares e diminuição do número de timócitos na região cortical (Figura 1.4). Em camundongos, a redução da celularidade é acompanhada pela diminuição do tamanho do órgão com um leve aumento da porcentagem de tecido adiposo (Aspinall & Andrew, 2000; Haynes & Hale, 1998; Flores, *et al.* 1999).

A involução tímica aguda é caracterizada pela diminuição do tamanho do timo, causada por uma perda aguda de timócitos DP, e diminuição da saída de células T *naïve* para a periferia. É observada em diferentes estados fisiológicos e patológicos, incluindo

puberdade, gravidez, inflamação, alteração dos níveis de glicocorticoides (GC), condições psicológicas, exercício, infecções, estresse emocional e físico, exposição a alérgenos e/ou substâncias tóxicas, desnutrição, alcoolismo, quimioterapia, radioterapia, barulho, trauma, etc.

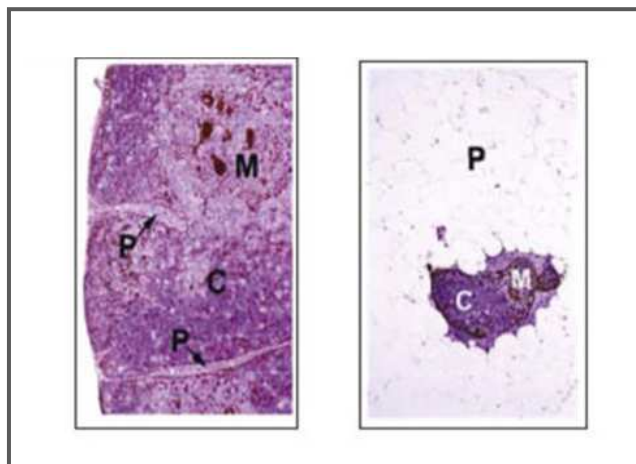


Figura 1.4. Involução tímica crônica. Cortes de timo de doadores marcados com anticorpo anti-citoqueratinas e contracorados com Hematoxilina-Eosina. O timo proveniente de doador idoso, painel da direita, apresenta aumento do espaço perivascular (P) e diminuição do córtex (C) e medula (M) em relação ao timo do doador jovem representado no painel da esquerda (Lynch *et al.*, 2009).

Dentre os fatores supracitados damos destaque à alteração dos níveis de GC, pequenas moléculas lipofílicas com efeitos potentes em uma grande variedade de vias metabólicas e secretórias, tendo influência profunda na fisiologia de muitos tecidos. Diversos estudos, incluindo alguns realizados em nosso laboratório, têm demonstrado a importância das alterações desses hormônios como um fator contribuinte no estabelecimento da atrofia tímica, estando envolvidas tanto na atrofia tímica crônica quanto aguda. Os GC são produzidos em altos níveis primariamente na zona fasciculada do córtex da adrenal, embora a produção hormonal também ocorra no cérebro, trato gastro-intestinal e timo, sendo produzidos por células epiteliais tímicas e timócitos (Lechner *et al.*, 2001; Jondal *et al.*, 2004; Qiao *et al.*, 2008). As enzimas limitantes para a síntese de GC são a proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR), e a citocromo P450 (CYP11A1). Enzimas adicionais requeridas para a síntese de GC são 3 β -hidroxiesteroide-desidrogenase (3 β -HSD), citocromo P450 21-hidroxilase (CYP21), CYP11B1 e citocromo P450 17-hidroxilase (CYP17) (Figura 1.5). Nas adrenais de camundongos existe apenas uma pequena expressão da enzima formadora de cortisol

CYP17, o que torna a corticosterona a principal forma ativa de GC em camundongos, em contraste ao cortisol, o principal GC em humanos. Além das enzimas de síntese, participam da via de biossíntese de GC as enzimas 11 β -HSD, subtipos 1 e 2 relacionadas, respectivamente, à ativação e inativação de corticosterona *in vivo* (Figura 1.5) (Qiao *et al.*, 2008).

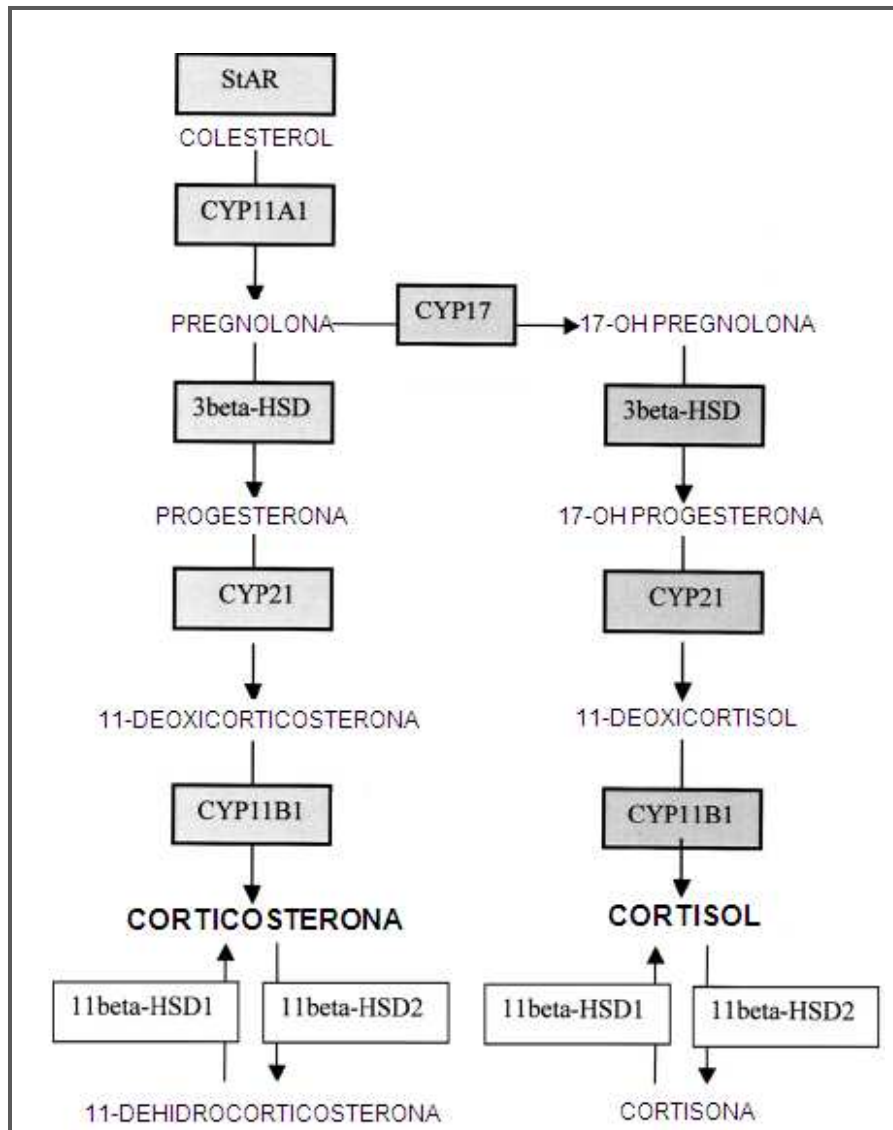


Figura 1.5. Representação esquemática das enzimas que participam da via de biossíntese de glicocorticoides em camundongos e humanos. (Qiao *et al.*, 2008).

Os mecanismos específicos associados à perda da atividade do timo e com o processo de involução tímica crônica, assim como da involução aguda, ainda não são bem compreendidos. Porém, apesar de controvérsias, há uma série de hipóteses que tentam explicar este fenômeno, como por exemplo: um possível declínio no suprimento

de progenitores de células T provenientes da medula óssea que migram para o timo; alterações no rearranjo produtivo do TCR; perda de células que compõem o microambiente tímico; alterações nos níveis de hormônios intratímicos e/ou circulantes, citocinas e/ou fatores de crescimento (Taub & Longo, 2005), podendo ser incluídas, moléculas capazes de influenciar eventos que contribuem para a manutenção da celularidade do órgão. A galectina-3 (Gal-3), molécula que pertence à família das lectinas, está presente no timo e diversos estudos têm demonstrado a sua capacidade de influenciar eventos biológicos como proliferação, apoptose, migração celular, entre outros, eventos estes fundamentais não somente para a manutenção da celularidade, como para a homeostase do timo. A seguir, apresentaremos uma descrição de alguns aspectos relacionados à estrutura e funções desta molécula, abordando também sua atuação no sistema imune.

1. 2. Lectinas

Complexos de estruturas contendo carboidratos são encontrados em moléculas que compõem a matriz extracelular, assim como na superfície de todas as células de mamíferos. Estas estruturas estão envolvidas em funções fisiologicamente importantes, como o desenvolvimento embrionário normal, diferenciação celular, crescimento, inibição por contato, reconhecimento célula-célula, sinalização celular, interação patógeno-hospedeiro durante uma infecção, resposta imune, desenvolvimento de doenças, metástase, tráfego e localização intracelular, etc. (Laderach *et al.*, 2010; Ghazarian *et al.*, 2011). Muitos desses papéis biológicos são mediados através do reconhecimento dos carboidratos por proteínas conhecidas como lectinas (Gabiús, 2006), moléculas sem atividade enzimática que se ligam a sequências específicas de carboidratos. Essa ligação modifica a fisiologia da membrana e/ou induz sinalização levando a diversas respostas bioquímicas celulares, através da decodificação da informação biológica contida nas células (Sharon & Lis, 1993).

O primeiro relato sobre essas moléculas remonta do século XIX. Stillmark (1888) relatou diversos fenômenos bioquímicos observados a partir de experimentos utilizando extratos de sementes da mamona (*Ricinus communis*) e de quatro outros vegetais pertencentes à família Euphorbiaceae. Ele observou em seus estudos que esses extratos eram capazes de aglutinar hemácias de diversos animais. A proteína responsável pelos fenômenos observados foi chamada ricina.

As lectinas animais fazem parte de um importante grupo de moléculas que participam da defesa imunitária, especialmente da imunidade inata, atuando na primeira linha de defesa (Gabiús & Wu, 2007). Têm habilidade de reconhecer carboidratos endógenos, ou de agentes infecciosos (Drickramer & Taylor, 1993) podendo ser classificadas em quatro famílias distintas:

- Lectinas tipo C – Dependentes de cálcio para ligação aos carboidratos são encontradas no soro, ECM e membranas celulares.
- Lectinas tipo P - Dependentes de P^{-3} , têm funções em enzimas lisosomais.
- Lectinas tipo I – Possuem domínio estrutural imunoglobulínico que se liga a carboidratos independentemente da presença de cálcio.
- Lectinas tipo S – São lectinas solúveis também chamadas de galectinas que se ligam a β -galactosídeos. São encontradas no núcleo, citoplasma e superfícies celulares, bem como no meio extracelular. As galectinas são alvo de vários estudos relacionados à Imunologia, participando em processos inflamatórios e na regulação da homeostase de células que compõem o sistema imune.

1.2.1. Galectinas

As galectinas, como supracitado, são uma família de lectinas animais solúveis evolutivamente conservadas e amplamente distribuídas no reino animal, estando presentes em vertebrados, invertebrados e protistas (Elola *et al.*, 2007). Ligam-se a glicanas contendo β -galactosídeos de forma independente de cálcio e são definidas por possuírem pelo menos um domínio de reconhecimento ao carboidrato (CRD) com aproximadamente 130 aminoácidos. Apesar de todo CRD se ligar a glicanas contendo um dissacarídeo comum (Gal- β (1-4)-NacGlc;LacNAc), cada galectina possui preferência de ligação a determinados carboidratos devido a variações na sequência de seu CRD (Rabinovich & Vidal, 2011).

Em mamíferos existem quinze galectinas descritas até o momento (Liu & Rabinovich, 2010). Essas moléculas estão distribuídas em três grupos de acordo com Hirabayashi e Kasai (1993) (Figura 1.6):

- Galectinas protótipo – contém uma única sequência CRD localizada na porção C-terminal, podendo se encontrar na forma de monômeros ou homodímeros ligados de forma não-covalente. Neste grupo estão incluídas as galectinas -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15.

- Galectina quimérica - contém uma porção C-terminal, onde se encontra o seu CRD e uma porção N-terminal rica em aminoácidos prolina, tirosina e glicina, por onde pode se ligar a outras moléculas de galectina-3 e formar oligômeros. Apenas a galectina-3 pertence a este grupo.
- Galectinas com sequências repetidas – apresentam duas sequências CRD distintas, porém homólogas, ligadas por uma sequência de aproximadamente 70 aminoácidos. Neste grupo se encontram as galectinas -4, -6, -8, -9, -12.

As galectinas podem ser encontradas no núcleo, citoplasma, ligadas a glicoproteínas da superfície celular, ou ainda em espaços extracelulares, interagindo com glicoproteínas da ECM (Leffler, 2004). Possuem papel importante em diversos eventos biológicos, incluindo adesão, crescimento celular, apoptose, embriogênese e fisiologia da placenta, crescimento tumoral, *splicing* de pré-mRNA, inflamação, imunomodulação (Rabinovich et al., 2002; Liu, 2005).


Classificação	Estrutura
<p>Protótipo galectinas -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15</p>	
<p>Quimérica galectina -3</p>	
<p>Seqüências repetidas galectinas -4, -6, -8, -9, -12</p>	

Figura 1.6. Classificação e estrutura das galectinas. Classificação feita a partir do número e disposição do domínio de reconhecimento ao carboidrato (CRD). Cada grupo apresenta diferentes galectinas, exceto o grupo quimérico, que possui como única representante a galectina-3 (Adaptado de Liu & Rabinovich, 2010).

Algumas galectinas já foram caracterizadas em órgãos do sistema imune. A galectina-1 foi identificada em órgãos linfoides periféricos como linfonodos (Baum *et al.*, 1995b) e baço (Rabinovich *et al.*, 1996), sendo também encontrada no timo, com capacidade de induzir apoptose em subpopulações específicas de timócitos (Baum *et al.*, 1995a). A galectina-3 foi detectada na superfície de macrófagos e monócitos (Sato & Hughes, 1994). Particularmente, em nosso laboratório, foi também demonstrada a presença de galectina-3 no timo (Villa-Verde *et al.*, 2002), sendo secretada por células epiteliais tímicas, incluindo as TNC e por células fagocíticas do retículo tímico, e capaz de modular interações entre timócitos e células do microambiente, com propriedades *de-adesivas*. As galectinas-8 e -9 também foram caracterizadas no timo, sendo produzidas por TEC, com capacidade de induzir apoptose em timócitos (Wada *et al.*, 1997, Tribulatti *et al.*, 2007).

No sistema imune, as galectinas podem exercer influências em células que compõem tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo, levando células, como os neutrófilos, células dendríticas, monócitos/macrófagos, eosinófilos e mastócitos, a responder a gradientes quimiotáticos, migrarem, sintetizarem e liberarem mediadores pró- e anti-inflamatórios, reconhecer e fagocitar microrganismos e células apoptóticas (Cerliani *et al.*, 2011). Podem também levar ao desenvolvimento da resposta imune adaptativa, como a ativação, sinalização e sobrevivência de células T e B, ou controlando o balanço da produção de citocinas (Di Lella *et al.*, 2011). Além disso, alguns trabalhos vêm demonstrando a influência de galectinas na geração de linfócitos B de memória ativados por IL-4 (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2004), e na diferenciação de linfócitos B1 peritoniais em plasmócitos (Oliveira *et al.*, 2009).

A multiplicidade e a diversidade de funções descritas para as galectinas em diferentes células e tecidos tornaram essas lectinas alvo de estudos não só na glicobiologia como também na medicina e farmacologia (Dumic *et al.*, 2006). Dentre os estudos desenvolvidos com estas moléculas, a galectina-3 (Gal-3) figura como uma das lectinas mais estudadas devido à sua participação na homeostase de processos inflamatórios, imunorreguladores e em células que compõem o sistema imune.

1.3.Galectina-3

1.3.1.Estrutura, localização e distribuição tecidual

A Gal-3, proteína anteriormente conhecida como antígeno Mac-2, CBP-35, εBP, RL-29, HL-29, L-34 e LBP, possui peso molecular que varia entre 29 a 35 kDa dependendo da espécie. O gene LGALS3, que codifica a Gal-3, está localizado no cromossomo 14 locus q21-q22, é composto por seis éxons e 5 íntrons tanto em humanos quanto em camundongos. A Gal-3 é a única representante do grupo de galectinas quiméricas devido à sua estrutura singular entre todas as galectinas de vertebrados. A molécula é formada por uma única cadeia polipeptídica cuja sequência de aminoácidos sugere uma quimera de dois domínios distintos tanto funcionalmente, quanto estruturalmente. O primeiro, o domínio N-terminal (ND), altamente conservado nas diferentes espécies, composto por repetições de sequências de nove aminoácidos, é rico em prolina, glicina e tirosina (110-130 aminoácidos) (Dumic *et al.*, 2006). Estudos recentes demonstraram que participa juntamente com o CRD na ligação a oligossacarídeos através do resíduo 102 de tirosina (Tyr¹⁰²) e resíduos adjacentes (Barboni *et al.*, 2000). Essa é também a região pela qual moléculas de Gal-3 podem se ligar formando oligômeros (Massa *et al.*, 1993), podendo formar pentâmeros na presença de ligantes multivalentes (Yang *et al.*, 2008). O segundo, o domínio C-terminal, composto por 130 aminoácidos, forma uma estrutura globular que comporta, no seu interior, o CRD que é responsável pela atividade de lectina desta molécula (Brisdal *et al.*, 2001). A especificidade de ligação a carboidratos da Gal-3 purificada tem sido extensivamente estudada. A proteína se liga a cadeias de Galβ1→3(4)GlcNAc e a afinidade por cadeias de polilactosaminas sem ramificação ou glicanas de tipo complexo ramificadas é maior em relação a dissacarídeos simples. A fucosilação, a sialilação ou a substituição por galactose com ligação do tipo α1→3 ou N-acetilgalactosamina no resíduo de galactose terminal das unidades de lactosamina não afetam a ligação da Gal-3, porém a substituição do penúltimo resíduo N-acetilglucosamina reduz drasticamente a sua ligação (Haudek *et al.*, 2010).

Cada galectina possui um padrão específico de expressão em várias células e tecidos. A Gal-3 é encontrada em diversos tecidos, tanto em condições normais como patológicas. Tem sido observada a sua expressão em uma série de tecidos normais, porém, sua expressão é principalmente observada em tecidos de origem epitelial e em

células do sistema imunológico (Danguy *et al.*, 2002). Em humanos, pode ser detectada precocemente em diferentes células embrionárias, tais como células epiteliais da mucosa intestinal, gástrica, pele, túbulos excretores renais, células cardíacas, hepáticas, cartilagenosas e da notocorda (van Den Brûle *et al.*, 1997). Em tecidos adultos, tem sido detectada em células inflamatórias (macrófagos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos), fibroblastos, células dendríticas e de Langerhans, uma ampla variedade de células epiteliais (timo, intestino, rim, pele, mama, glândulas salivares), células de Schwann (Dumic *et al.*, 2006), é expressa em linfócitos T e B ativados (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2009).

Após sua síntese, a Gal-3 está localizada predominantemente no citoplasma, porém pode ser transportada para o núcleo ou secretada para o espaço extracelular, podendo encontrar-se na superfície da célula ou no meio extracelular. A capacidade de encontrar-se em compartimentos celulares distintos sugere a multifuncionalidade desta molécula (Krzeslak & Lipinska, 2004). Porém, a sua localização depende de vários fatores, como o tipo celular, o status de proliferação da célula, condições de cultivo e progressão neoplásica (Dumic *et al.*, 2006).

Galectinas citosólicas parecem não se utilizar da via clássica de secreção, através do retículo endoplasmático-Golgi, como faz a maioria das proteínas extracelulares solúveis presentes em eucariotos, uma vez que não apresentam sinal secretório clássico que permite a inserção no retículo endoplasmático. A Gal-3 atinge a superfície celular por um processo ainda pouco entendido, denominado ectocitose. Nesse processo, a molécula é concentrada em invaginações da membrana plasmática que se lançam para fora e liberam a galectina das vesículas externalizadas (Hughes, 2001; Cooper, 2002). Essa rota secretória não-clássica evita que as galectinas liguem-se a oligossacarídeos presentes nas proteínas em formação no complexo retículo-endoplasmático-Golgi (Rabinovich *et al.*, 2002). Tem sido proposto que a porção N-terminal possa conter informações de segmentação para a secreção pela via não-clássica (Menon & Hughes, 1999). Estudos demonstraram que a deleção dos 11 primeiros aminoácidos de uma sequência inicial de aminoácidos que precedem um domínio rico em repetições de prolina e glicina, também conhecido como pequeno domínio N-terminal bloqueia a secreção da Gal-3 (Gong *et al.*, 1999). Outro possível mecanismo pelo qual Gal-3 citosólica atinge o meio extracelular seria pela necrose da célula, constituindo um processo passivo de secreção (Sato & Nieminen, 2004).

1.3.2. Funções biológicas da galectina-3

A galectina-3 participa de diversos processos biológicos. Por ser encontrada em diferentes tipos celulares e em diferentes compartimentos intracelulares e também no meio externo, a função desta lectina é dependente do tipo celular onde é expressa e da sua localização. No compartimento intracelular, a Gal-3 tem sido associada a diversos eventos incluindo apoptose, proliferação e diferenciação. Já extracelularmente, esta molécula tem sido associada à adesão e migração celular e também à apoptose, porém com efeito contrário à molécula encontrada intracelularmente (Figura 1.7).

Muitas moléculas encontradas no citosol têm sido descritas como ligantes da Gal-3, permitindo assim a participação desta molécula em diferentes eventos biológicos. Um dos papéis atribuídos à Gal-3 intracelular é a sua atividade anti-apoptótica por ser capaz de interagir com proteínas citosólicas da família de Bcl-2. Isso ocorre via porção C-terminal, pois possui em seu CRD a sequência de aminoácidos Asn-Trp-Gly-Arg, igual à encontrada no domínio BH1 da proteína Bcl-2, proteína anti-apoptótica que atua bloqueando a saída do citocromo *c* da mitocôndria, sequência esta que é crucial na atividade anti-apoptótica de Bcl-2 (Yang *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2000; Krzészak & Lipinska, 2004; Liu & Rabinovich, 2005). Estudos demonstraram que a ação anti-apoptótica da Gal-3 intracelular ocorre pela regulação de várias vias sinalizadoras intrínsecas, devido à translocação desta molécula para a membrana da mitocôndria após um estímulo apoptótico, prevenindo a perda de integridade da membrana mitocondrial e bloqueando a liberação do citocromo *c*, reduzindo a ativação da caspase 3 (Yu *et al.*, 2002). A Gal-3 também é capaz de interagir com outras moléculas que regulam a morte celular por apoptose, indicando que provavelmente outras vias responsáveis pela regulação da apoptose têm a participação da Gal-3; como por exemplo, a apoptose mediada pelo receptor CD95 (APO-1/Fas), molécula cuja via de sinalização promove a ativação sequencial de várias caspases (Fukumori *et al.*, 2004) e *nucling*, molécula pró-apoptótica (Liu *et al.*, 2004). Estudos demonstraram que células apresentando a via extrínseca da apoptose, via de sinalização da apoptose do tipo I, mediada por Fas /TNFR1 expressavam a Gal-3. Enquanto as células que apresentavam a via intrínseca da apoptose, mitocondrial, com via de sinalização do tipo II, não expressavam esta molécula. Havendo conversão da via de sinalização de apoptose do tipo II para o tipo I após a transfecção do cDNA da Gal-3 em células do tipo II. Esses dados sugerem que possivelmente um dos efeitos anti-apoptóticos desta molécula em linfócitos T seja

mediado por sua interação com o receptor CD95, já que os timócitos e linfócitos T ativados têm um fenótipo do tipo I (Fukumori *et al.*, 2004). Ainda no citoplasma, a Gal-3 é capaz de se ligar a proteína K-Ras ativada, uma das mais importantes oncoproteínas Ras de tumores humanos (Elad-Sfadia *et al.*, 2004, Shalom-Feuerstein *et al.*, 2005), e atuar na ativação da proteína AKT, uma quinase que regula a proliferação celular e apoptose em células cancerígenas, suprimindo-a ou ativando-a dependendo do tipo celular (Lee *et al.*, 2003, Oka *et al.*, 2005).

A Gal-3 encontrada no núcleo, em algumas células, pode participar do processamento de RNA. Por estar associada a complexos de ribonucleoproteína que participam do processamento, induzindo o *splicing* do pré-RNA mensageiro (pré-mRNA) (Dagher *et al.*, 1995), assim como na regulação de fatores de transcrição, e do ciclo celular e conseqüentemente da proliferação da célula, podendo tanto inibi-la quanto estimulá-la, dependendo do tipo celular em que está sendo expressa. A Gal-3 participa de uma importante via intracelular que regula a proliferação (inclusive a proliferação de timócitos nos primeiros estágios de desenvolvimento), morfologia, motilidade e desenvolvimento orgânico, homeostase tecidual e crescimento de tumor, a via de Wnt, através da interação com β -catenina. Essa interação pode promover a ativação transcricional dos genes de ciclina D1 e c-Myc (Shimura *et al.*, 2004; Shimura *et al.*, 2005; Dumic *et al.*, 2006; Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007). A Gal-3 parece regular também a expressão de outras moléculas envolvidas no ciclo celular, como por exemplo, as ciclinas A e E através da inibição da expressão das mesmas, e do estímulo das proteínas inibitórias p21^{WAF1/CIP1} e p27^{KIP1} (Kim *et al.*, 1999). Aliando estas funções ao efeito anti-apoptótico da Gal-3 intracelular, esta molécula, em determinadas células, se torna capaz de controlar o crescimento de populações celulares (Dumic *et al.*, 2006).

Quando liberada para o meio extracelular a Gal-3 exibe diversos efeitos parácrinos e autócrinos. Por exemplo, ao contrário da Gal-3 intracelular, esta molécula quando no meio extracelular, ao interagir com ligantes β -galactosídeos na superfície celular, é capaz de induzir apoptose através da ativação de caspase-3 (Fukumori *et al.*, 2003). Pode ainda influenciar a adesão celular, estando esse efeito baseado na propriedade de multivalência desta lectina, que é capaz de originar uma molécula com mais de um CRD, pois após o reconhecimento de seus ligantes na superfície da célula a Gal-3 pode sofrer oligomerização, através da auto-organização da região N-terminal; baseia-se também na habilidade da Gal-3 se ligar a glicoproteínas, componentes glicosilados da ECM, como a laminina, fibronectina, colágeno IV (Liu, 2000;

Rabinovich *et al.*, 2002, Sato & Nieminen, 2004), e integrinas (Liu & Rabinovich, 2005). A adesão está relacionada à migração celular, que é especialmente importante na progressão tumoral e metástase (Danguy *et al.*, 2002). Além da adesão e da migração, a Gal-3 extracelular pode influenciar a ativação celular através da ligação a gliconjugados presentes na superfície das células. Essa interação pode desencadear uma cascata de eventos de sinalização transmembranar e atuar como molécula quimioatraente para alguns tipos celulares, modulando vários processos biológicos como a manutenção de homeostase celular, organogênese, angiogênese e reações imunes (Hsu & Liu, 2004; Ochieng *et al.*, 2004; Liu & Rabinovich, 2005).

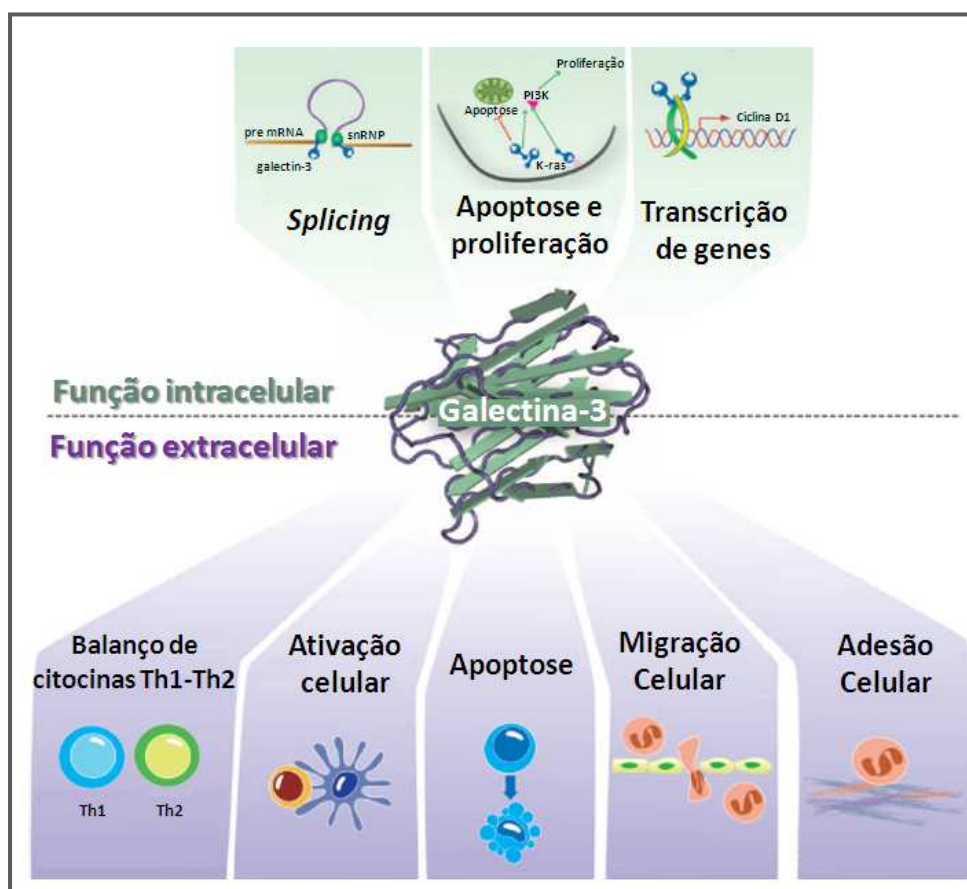


Figura 1.7. Funções intracelulares e extracelulares da galectina-3. A Gal-3 controla processos intracelulares que incluem viabilidade e progressão do ciclo celular e expressão gênica. No meio extracelular interage com glicoreceptores específicos modulando diversos processos biológicos, como, ativação celular, diferenciação, produção de citocinas, adesão, migração celular e modulação da apoptose (Adaptado de Sundblad *et al.*, 2011).

1.3.3. Galecina-3 e o sistema imune

A Gal-3 é expressa em diversos tipos celulares que compõem o sistema imune, tanto de forma constitutiva quanto em resposta a invasões microbianas. Apresenta vários efeitos sobre as células do sistema imune, sendo capaz de modular a sobrevivência e a ativação destas células, bem como a produção de citocinas do tipo Th1 e Th2 (Hsu *et al.*, 2009; Vasta, 2009). Quase todas as células que compõem o sistema imune inato – incluindo neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos, células dendríticas e monócitos/macrófagos de diferentes tecidos – expressam esta lectina, embora em níveis diferenciados (Sundblad *et al.*, 2011).

Os neutrófilos possuem baixos níveis de expressão de Gal-3, porém, podem ser ativados por esta molécula (Farnworth *et al.*, 2008). Os níveis de Gal-3 extracelular são regulados positivamente em macrófagos, que expressam e secretam altos níveis desta lectina, e em outros tipos celulares que circundam o microambiente, induzindo assim, o recrutamento dos neutrófilos a sítios inflamatórios, possivelmente devido à capacidade que a Gal-3 possui de induzir a adesão de neutrófilos à laminina e a células endoteliais (Kuwabara & Liu, 1996; Sato *et al.*, 2002). Gal-3 é capaz de promover a ativação de neutrófilos através da interação com glicoproteínas presentes na superfície dessas células, induzindo o aumento da expressão de superóxidos, de maneira dose-dependente e degranulação (Yamaoka *et al.*, 1995; Fernandez *et al.*, 2005). Tem sido observada a expressão de Gal-3 em eosinófilos mediando nessas células a ativação dependente de Ig-E. Recentemente foi demonstrado que Gal-3 favorece a adesão e o rolamento de eosinófilos isolados de pacientes alérgicos, em análises feitas *in vitro* sob condições de fluxo, podendo independentemente ou em cooperação com selectinas e integrinas, participar ou aumentar a cascata de adesão para promover o recrutamento dessas células para os sítios de inflamação (Rao *et al.*, 2007). Nos mastócitos, a Gal-3 está presente no meio intracelular, sendo fundamental para regulação da função destas células. Estudos realizados com mastócitos isolados de camundongos deficientes em Gal-3 demonstraram que eles produzem baixos níveis de grânulos com mediadores inflamatórios e citocinas quando ativadas por ligação cruzada do receptor de IgE na superfície celular (Chen *et al.*, 2006). Em células dendríticas, a Gal-3 induz a adesão a linfócitos ativados, facilitando a apresentação antigênica, podendo possuir um importante papel na resposta imune adaptativa (Chen *et al.*, 2005). Ainda, a Gal-3 pode induzir a migração de monócitos de forma carboidrato-dependente, e atrair macrófagos

do sangue periférico e alveolares (Sano *et al.*, 2000) e induzir a produção de IL-1 por monócitos humanos (Jeng *et al.*, 1994). A Gal-3 parece influenciar a fagocitose de macrófagos, visto que, ao serem isolados de camundongos deficientes em Gal-3, eles apresentaram defeito na fagocitose de eritrócitos opsonizados e timócitos apoptóticos (Sano *et al.*, 2003).

Em contraste com sua alta expressão em algumas células que compõem o sistema imune inato, no sistema imune adaptativo, a Gal-3 é fracamente expressa nas células não-ativadas, como foi demonstrado em células B. Estas, quando em repouso, não expressam Gal-3, porém, células que tiveram a diferenciação e/ou ativação induzida por IL-4 e CD40, e células B isoladas de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*, passam a expressar a molécula (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2004). Semelhante às células B, as células T em repouso não expressam Gal-3, sendo a expressão induzida por ativação das células com anticorpo monoclonal anti-CD3 (Joo *et al.*, 2001). Apesar do papel da Gal-3 em infecções virais que acometem células T não estar muito bem definido, sabe-se que esta molécula é abundantemente expressa em células T infectadas com o vírus T linfotrófico humano (HTLV) e o vírus da imunodeficiência humana do tipo I (HIV-1) (Hsu *et al.*, 2009). Linfócitos T reguladores (Treg) circulantes e linfócitos T CD4⁺ efetores transfectados com o fator de transcrição específico para linfócitos Treg (FOXP3) expressam tanto o RNAm da Gal-3 quanto a própria proteína (Pfoertner *et al.*, 2006). Foi visto também que os linfócitos T CD4⁺ de memória (CD4⁺ CD45RA⁻ CD62L⁺) apresentam uma maior expressão da Gal-3 do que os linfócitos T CD4⁺ *naïves* (CD4⁺ CD45RA⁺ CD62L⁺) (Haining *et al.*, 2008). A Gal-3, quando no meio extracelular, é capaz de induzir a apoptose em células T, incluindo linhagens de leucemias de células T e células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) (Stillman *et al.*, 2006). Pode também interagir diretamente com o complexo TCR na superfície da célula e esta interação é inibida por N-acetil-lactosamina (Demotte *et al.*, 2008). Estudos utilizando camundongos deficientes para o gene da Gal-3 sugerem que esta lectina está localizada na sinapse imunológica em linfócitos T CD4⁺ e regula negativamente a ativação dependente do TCR, através de um mecanismo de sinalização intracelular (Chen *et al.*, 2009). A expressão da Gal-3 já foi detectada em alguns subtipos de linfócitos T (Hsu *et al.*, 2009), assim como em timócitos de animais normais e infectados pelo *Trypanosoma cruzi* (Silva-Monteiro *et al.*, 2007). Nosso laboratório descreveu a presença da Gal-3 no microambiente tímico de camundongos, principalmente na junção córtico-medular e na medula (Figura 1.7A-D). A Gal-3, neste

órgão, é expressa por TEC e DC, tendo um papel *de-adesivo* nas interações de timócitos com estas células (Villa-Verde *et al.*, 2002). Observamos também que animais deficientes para o gene da Gal-3 ($\text{Gal-3}^{-/-}$) apresentam diminuição aparente do tamanho do timo, com diminuição significativa de sua massa e celularidade (Abreu, 2009) (Figura 1.8E).

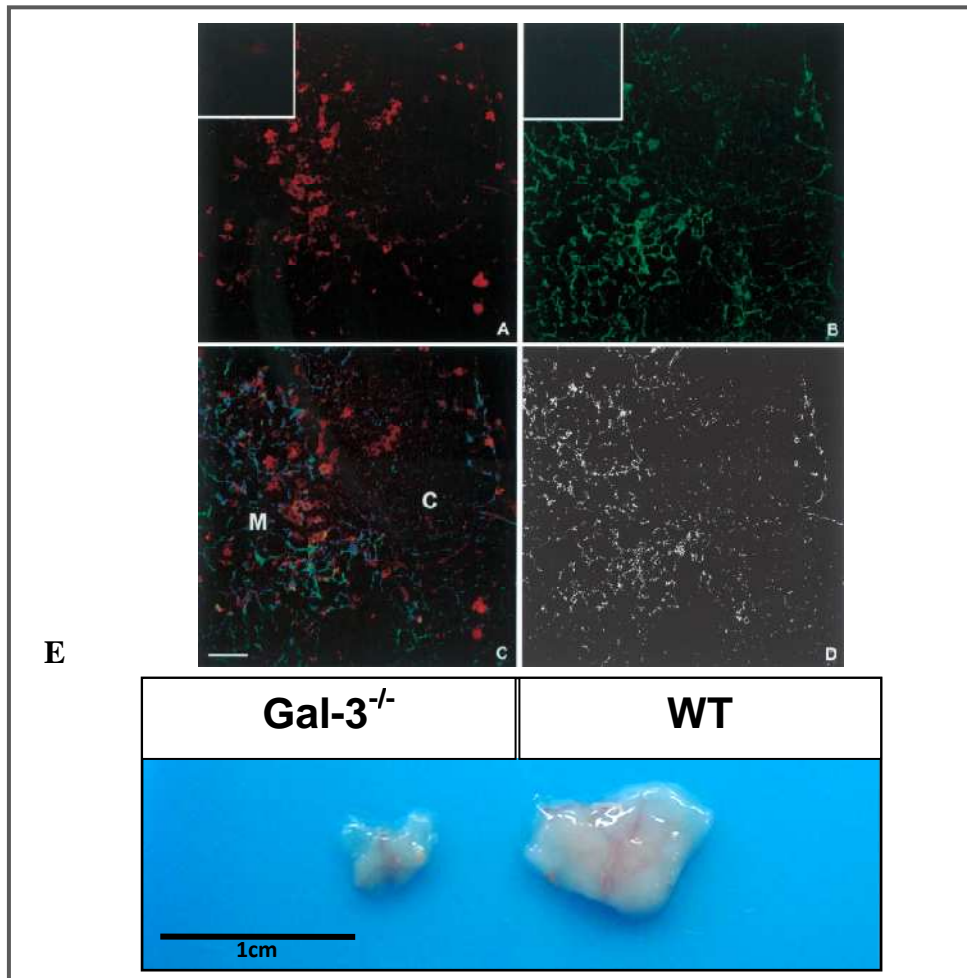


Figura 1.8. Galectina-3 e o timo. Dupla marcação de corte de timo de camundongo com anticorpo monoclonal anti-Gal-3 (vermelho) e anticorpo policlonal anti-citoqueratina total (verde). (A) A Gal-3 encontra-se distribuída por todo o timo, porém é encontrada principalmente na junção córtico-medular e medula. (B) A marcação com citoqueratina total mostra a distribuição clássica de células epiteliais tímicas. (C) Dupla marcação de (A) e (B), sendo as áreas de co-localização mostradas em azul (C = córtex; M = medula). (D) Imagem digital das áreas Gal-3^+ /citoqueratina⁺, mostradas em branco. Insetos em (A) e (B) representam os respectivos controles negativos. Barra = 65 μm . (Fonte Villa-Verde *et al.*, 2002). (E) Atrofia tímica apresentada pelos animais $\text{Gal-3}^{-/-}$. Foto comparativa de timos retirados de animais WT e $\text{Gal-3}^{-/-}$, onde podemos observar diminuição de tamanho no órgão do animal $\text{Gal-3}^{-/-}$ (Abreu, 2009).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1. Justificativa e Objetivo geral

Algumas das funções biológicas gerais atribuídas à Gal-3, como sua capacidade de interferir na migração celular, modular proliferação e apoptose, podem contribuir para a manutenção da homeostasia do timo, influenciando a produção de células T maduras. Por outro lado, a atrofia deste órgão tem recebido bastante atenção, não somente por suas implicações para a reconstituição do sistema imune, em situações em que o *pool* de linfócitos periféricos é depletado, mas também pela correlação entre involução tímica e declínio imunológico, refletindo-se no aumento da susceptibilidade a infecções e na incidência de doenças autoimunes. Nesse contexto, consideramos que o estudo dos fatores envolvidos na atrofia tímica observada na ausência da Gal-3 contribuirá para a elucidação do papel da Gal-3 no desenvolvimento do timo e sua possível influência sobre a produção de células T maduras. Assim, o objetivo geral deste trabalho é investigar o papel da Gal-3 sobre a fisiologia do timo, avaliando sua influência sobre alguns dos pontos cruciais para a manutenção da celularidade do órgão, utilizando como modelo de estudo camundongos deficientes para o gene da Gal-3.

2.1. Objetivos Específicos

- Avaliar as consequências da ausência da Gal-3 sobre a produção de glicocorticoides, cuja alteração está relacionada ao processo de atrofia aguda e/ou crônica do timo.
- Avaliar as consequências da ausência da Gal-3 sobre a manutenção da celularidade do timo, abordando a distribuição das principais subpopulações de timócitos e suas taxas de proliferação e morte celular.
- Avaliar as consequências da ausência da Gal-3 sobre a presença de alterações morfológicas e no componente epitelial do timo.
- Avaliar as consequências da ausência da Gal-3 sobre o número de células de outros órgãos linfoides.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Camundongos deficientes para o gene da Gal-3 (Gal-3^{-/-}) em fundo genético BALB/c, gentilmente cedidos pelo Dr. Fu-Tong Liu (Universidade da Califórnia, Davis, USA), e camundongos BALB/c (definidos aqui como WT, do inglês, *wild-type*), machos de 4-6 semanas de idade, mantidos no Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL/FIOCRUZ-RJ), foram utilizados durante todo este trabalho. É importante salientar que todos os protocolos relacionados ao uso desses animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ (CEUA, L-024/09) e estão incluídos no projeto do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, aprovado pela CTNBio (CQB: 105/99).

3.2. Reação em cadeia da polimerase

3.2.1. Genotipagem dos animais Gal-3^{-/-}

Utilizamos a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para confirmação do genótipo dos animais utilizados nos experimentos. A estrutura genômica da Gal-3 contém 6 éxons, onde os éxons de 4 a 6 codificam para a região carboxiterminal, responsável pela sua atividade de lectina. A estratégia utilizada para a inativação da Gal-3, para a construção do animal deficiente nesta molécula, foi a substituição, por recombinação homóloga, da área correspondente ao íntron entre os éxons 4 e 5 e de parte do éxon 5 pelo cassete Neo, sequência gênica que confere resistência ao antibiótico neomicina (Hsu *et al.*, 2000).

Extraímos o DNA genômico a partir de linfócitos obtidos de linfonodos subcutâneos de camundongos BALB/c WT e Gal-3^{-/-}, segundo o protocolo do Kit QIAamp DNA *Mini and Blood Mini Handbook* (Qiagen, Valencia, CA, USA). O DNA extraído foi quantificado e teve a sua pureza determinada por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A análise qualitativa do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1%. A sequência dos *primers* utilizados para amplificação do gene da Gal-3, assim como do gene GAPDH, utilizado como controle da reação, está descrita na tabela 3.1. A reação de PCR para genotipagem desses animais requer o uso de três *primers*: no animal selvagem as sequências dos primers 1 e 2 se alinham ao gene da Gal-3, amplificando

um produto de aproximadamente 490 pb; no animal deficiente para Gal-3 ocorre o alinhamento do *primer 3* na sequência do fragmento Neo inserido, amplificando um produto menor de aproximadamente 330 pb.

A reação de amplificação foi realizada utilizando SuperMix Platinum PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A concentração final de cada *primer* foi de 200 nM, sendo utilizado 1 µg de DNA genômico. Os ciclos de amplificação foram executados em termociclador com as seguintes condições: desnaturação inicial de 94 °C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95 °C por 15 segundos, emparelhamento dos *primers* (*annealing*) a 55°C durante 20 segundos e extensão do fragmento a 72 °C por 30 segundos. A extensão final foi realizada a 72 °C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%. A revelação foi feita através da adição de 2 µl de brometo de etídeo ao gel e a visualização realizada em transiluminador com ultravioleta. Como marcador de tamanho molecular, utilizou-se o padrão 100 pb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Nossos testes confirmaram que os camundongos Gal-3^{-/-} em uso neste estudo são geneticamente modificados conforme originalmente descritos (Figura 3.1).

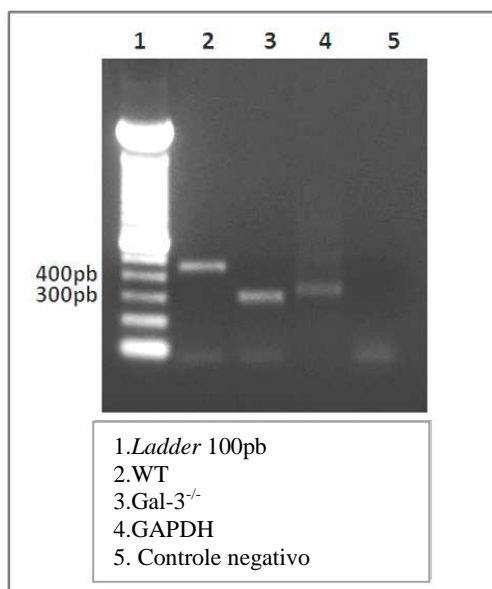


Figura 3.1. Genotipagem dos camundongos Gal-3^{-/-}. A confirmação do genótipo dos animais utilizados neste estudo foi realizada através da técnica de PCR. Controle da reação de PCR: gene constitutivo GAPDH; controle negativo: ausência de amostra.

3.2.2. PCR quantitativo em tempo real – Análise de enzimas de síntese de corticosterona

O timo e as adrenais obtidos de animais WT e Gal-3^{-/-} foram triturados em homogeneizador de tecido para extração do RNA total utilizando o RNeasy Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). A quantificação foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Para síntese do cDNA foram utilizadas amostras equivalentes em 1 µg de RNA, utilizando o SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), na presença de *primer* randômico, de acordo com a recomendação do fabricante.

Para realização das análises de expressão gênica por PCR em tempo real, foram utilizadas 100 ng de amostras de cDNA diluídas em Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), no sistema Step One Plus (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). O método de PCR foi realizado a 95 °C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto. A expressão constitutiva do gene RPL-13 serviu para verificar a uniformidade das amostras utilizadas. A especificidade dos produtos da reação foi verificada através da curva de dissociação. Os dados foram analisados por ABI Prism SDS v1.3.1 *software*. Todos os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer Express 3.0 specific for 7500 FAST Real Time PCR System, estando a sequência dos *primers* utilizados para amplificação dos genes das enzimas de síntese de glicocorticoides (GC) e do gene RPL-13 presentes na tabela 3.1. Os níveis de expressão gênica relativos foram calculados a partir do método de análise comparativa $C_t (2^{-\Delta CT})$.

3.3. Dosagem de corticosterona por radioimunoensaio

Amostras de soro e timo foram obtidas simultaneamente de animais WT e Gal-3^{-/-}. As amostras de sangue foram colhidas por punção cardíaca, imediatamente após os animais serem eutanasiados em câmara de CO₂, no período da manhã. A disponibilidade plasmática de GC segue um padrão circadiano, caracterizado em roedores, por baixos níveis pela manhã e altos níveis à noite (Balsalobre *et al.*, 2000). Após centrifugação por 15 minutos, a 450 g, o sobrenadante recolhido foi mantido a -80 °C. As amostras de timo foram obtidas dos animais e conservadas a -20 °C. Depois de descongelados os timos foram ressuspensos em 150 µL de PBS sendo a seguir

tritutados em homogeneizador de tecido, na velocidade 6, por aproximadamente 5 minutos. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C.

A quantificação do hormônio foi realizada através da técnica de radioimunoensaio (RIA, Radio Imune Assay) em *kit ImmuChem Double Antibody Corticosterone* (MP Biomedicals, Orangeburg, NY, USA). Neste ensaio foi avaliada a capacidade do hormônio presente nas amostras competir com amostras do hormônio marcado radioativamente (I^{125}) pela ligação ao anticorpo específico. O produto da reação foi analisado em comparação com uma curva padrão. A quantificação foi realizada em contador gama ISOMEDIC-ICN 4/600 (Steris, Mentor, OH, USA).

3.4. Citometria de fluxo

A análise do fenótipo das principais subpopulações de timócitos, assim como de linfócitos em diferentes órgãos linfoides secundários (baço, linfonodos subcutâneos e linfonodos mesentéricos), foi realizada por citometria de fluxo utilizando anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44, anti-CD25 de camundongo (BD, St Diego, CA, USA), conjugados a fluorocromos diversos. Como controle da marcação desses anticorpos foram utilizados Igs não-relacionadas conjugadas aos fluorocromos correspondentes (BD, St Diego, CA, USA).

Depois de isoladas, as células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante Trypan Blue (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) para exclusão de células mortas. Após a contagem, as células foram distribuídas em uma concentração de 1×10^6 células por poço em placas de 96 poços com fundo em V (Nunc, Waltham, MA, USA), e foram incubadas por 15 minutos com 2 μ L de soro normal de camundongo para bloqueio de ligações inespecíficas. Após esse período, as células foram incubadas com 10 μ L de diferentes combinações de anticorpos por 30 minutos. As células foram também tratadas separadamente pelos anticorpos, além dos isotipos controle, para calibração e compensação do aparelho. Células não-marcadas foram utilizadas para controle da autofluorescência e análise de parâmetros indicadores de tamanho e granularidade. As células foram posteriormente lavadas em solução de PBS/SBF (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) a 10%, centrifugadas (450 g/5 minutos) e fixadas em uma solução de formaldeído a 1%. As amostras foram adquiridas em aparelho FACSCanto II (BD, St Diego, CA, USA) e analisadas com o auxílio do Software Summit 4.3 Software (Dako Cytomation, Via Real Carpinteria, CA, USA).

Gene (Primer)	Sequência
Galectina-3 <i>Primer 1</i> <i>Primer 2</i> <i>Primer 3</i>	5' GTAGGTGAGAGTCACAAGCTGGAGGCC 3' 5'CACTCTCAAAGGGGAAGGCTGACTGTC 3' 5'GGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGG 3'
StAR <i>Forward</i> <i>Reverse</i>	5'-TCACTTGGCTGCTCAGTATTGAC-3' 5'-GCGATAGGACCTGGTTGATGA-3'
CYP11A1 <i>Forward</i> <i>Reverse</i>	5'-GACCTGGAAGGACCATGCA-3' 5'-TGGGTGTACTCATCAGCTTTATTGA-3'
GAPDH <i>Forward</i> <i>Reverse</i>	5' CCATCACCATCTTCCAGGAG 3' 5' GCATGGACTGTGGTCATGAG 3'
RPL-13 <i>Forward</i> <i>Reverse</i>	5' CCAAGCAGGTACTTCTGGGCCGGAA 3' 5' CAGTGCGCCAGAAAATGCGGC 3'

Tabela 3.1: Sequência de *primers* utilizados nas reações de PCR.

3.5. Análise da morte celular

Para análise da morte celular, timócitos foram isolados e, após marcação com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 (BD, St Diego, CA, USA) conjugados a fluorocromos, as células foram ressuspendidas em Tampão Anexina 1X (BD, St Diego, CA, USA) e incubadas por 10 minutos com 1µL de Anexina conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD, St Diego, CA, USA). As amostras foram imediatamente adquiridas em aparelho FACSCanto II (BD, St Diego, CA, USA) e analisadas com o auxílio do Software Summit 4.3 Software (Dako Cytomation, Via Real Carpinteria, CA, USA).

3.6. Análise da proliferação

Timócitos, isolados de forma asséptica, foram contados e um total de 10^6 células foram incubadas durante 3 horas em meio RPMI (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) com 10% de SBF (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo $60\mu\text{M}$ de bromodeoxiuridina (BrdU) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), para análise das taxas de proliferação espontânea dos timócitos. Após esse período foi realizada a fenotipagem das células utilizando os anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44, anti-CD25 (BD, St Diego, CA, USA) conjugados a fluorocromos diversos. Após marcação das moléculas de superfície as células foram permeabilizadas utilizando o *kit* BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD, St Diego, CA, USA). Após permeabilização o BrdU incorporado ao DNA foi exposto através do tratamento das células com 100U de DNase I (Roche, Mannheim, BW, Germany) por 40 minutos à temperatura ambiente. Em sequencia, as células passaram por dois processos de lavagem e foram centrifugadas por 5 minutos a 450g, em cada lavagem. As células foram então incubadas com anti-BrdU conjugado a FITC (eBioscience, Inc, San Diego, CA, USA). As amostras foram adquiridas em aparelho FACSCanto II (BD, St Diego, CA, USA) e analisadas com o auxílio do Software Summit 4.3 Software (Dako Cytomation, St Diego, CA, USA).

3.7. Histologia convencional

Foi realizada análise histológica do timo ($n= 3$ animais/grupo) em cortes parafinados que foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (Sigma, Aldrich, St Louis, MO, USA). Para desparafinização e hidratação, os cortes foram incubados por 2 vezes durante 10 minutos em xilol (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil) e, posteriormente, levados a 3 recipientes diferentes contendo álcool absoluto por 2 minutos em cada. A seguir, os cortes foram deixados em água corrente por 1 minuto. Durante a coloração, os cortes foram colocados por 10 minutos em hematoxilina, lavados em água corrente por 1 minuto, e incubados em solução de eosina por 3 minutos.

3.8. Imunofluorescência

A análise do compartimento epitelial foi realizada por imunofluorescência. Camundongos BALB/c WT e Gal-3^{-/-} ($n= 3$ animais/grupo), foram eutanasiados sob

anestesia profunda em câmara de CO₂, seus timos retirados e congelados em Tissue Tek (Optimal Cutting Temperature Compound, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA). Os tecidos foram então cortados ao criostato (Leica CM 1850 - Leica Microsystems Inc; Buffalo Grove, IL, USA) originando secções de 5µm de espessura e foram fixadas com acetona gelada por 5 min e submetidas à técnica de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos anti-pan-citoqueratina (Dako, Via Real Carpinteria, CA, USA), ou IgGs (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) controles não-relacionadas. As secções de timo fixadas foram hidratadas com PBS por 5 minutos, incubadas com BSA a 2,5% diluída em PBS por 1 hora para o bloqueio de ligações inespecíficas. Posteriormente foram incubadas com o anticorpo primário *overnight* a 4 °C. Após esse período o excesso de anticorpo foi retirado em três etapas de lavagem com PBS. Os cortes foram posteriormente incubados por 45 minutos com o anticorpo secundário, conjugado a Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA). Após a incubação os cortes passaram por nova etapa de lavagem com PBS. As lâminas foram montadas com Fluoroshield contendo DAPI (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) para a marcação dos núcleos. As análises foram feitas ao microscópio de fluorescência Carl Zeiss Axio Imager Upright Microscope (Zeiss, Oberkochen, BW, Germany).

3.9. Análise da celularidade da medula óssea

As tíbias e os fêmures de animais WT e Gal-3^{-/-} foram retirados, sendo as epífises e diáfises maceradas em meio RPMI com 10% de SBF, para obtenção das células totais. As suspensões celulares foram centrifugadas a 450 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 1 mL de meio completo, para realização da contagem em câmara de Neubauer.

3.10. Análise da celularidade de órgãos linfóides secundários

Os linfonodos subcutâneos (LSC) (inguinais, axilares e braquiais) e linfonodos mesentéricos de cada animal, depois de retirados, foram macerados em homogeneizador de tecidos tipo *potter* de vidro contendo meio RPMI com 10% de SBF. No baço foi realizado um procedimento adicional para lise de hemácias. As células, após centrifugação, foram ressuspendidas em 1 mL de tampão ACK (0,15M de NH₄CL, 10mM de KHCO₃ e 0,1mM de Na₂EDTA), homogeneizadas lentamente e mantidas em

repouso por 7 minutos em temperatura ambiente. O material foi novamente homogeneizado e os grumos retirados. Foi realizada incubação por mais 3 minutos (com ACK) e lavado por 2 vezes com 10 mL de PBS/10% SBF. Ao final das lavagens, o precipitado foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI completo. Um total de 1×10^6 células por poço foram adicionadas a placas de 96 poços com fundo em V (Nunc, Waltham, MA, USA) e marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD, St Diego, CA, USA) e analisadas com o auxílio do Software Summit 4.3 Software (Dako Cytomation, St Diego, CA, USA).

3.11. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste Mann-Whitney utilizando-se o Software GraphPad Prism5. Os dados foram mostrados como média \pm erro padrão e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores de p foram menores que 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da ausência de galectina-3 na expressão gênica de moléculas relacionadas à atrofia tímica

Estudos têm demonstrado que hormônios GCs, que são relacionados à atrofia do timo, participando tanto em processos de atrofia crônica, relacionada à idade, quanto na atrofia aguda, associada a diversas alterações fisiológicas e patológicas, são capazes de modular a expressão de Gal-3 (Dumic *et al.*, 2000; Maldonado *et al.*, 2011). Sabendo-se que a Gal-3 é capaz de regular a transcrição gênica (Dumic *et al.*, 2006), decidimos investigar se na ausência desta molécula haveria diferenças na expressão dos genes correspondentes às enzimas limitantes para a síntese de GCs (StAR e CYP11A1) tiveram a expressão avaliada por PCR em tempo real. O RNA utilizado para análise da expressão desses genes foi obtido de extrato total das adrenais, principal local de síntese de GCs, e do timo, um dos órgãos onde ocorre produção ectópica desse hormônio, de ambos os grupos de animais. Apesar de nas adrenais não termos observado alteração significativa nos níveis de expressão de StAR, houve aumento significativo na expressão do gene CYP11A1 nos animais Gal-3^{-/-} (Figura 4.1A). Além disso, observamos aumento significativo na expressão de ambos os genes no timo desses animais (Figura 4.1B).

Para verificar se o aumento da expressão dos genes que codificam as enzimas limitantes da síntese de GCs estaria levando a um aumento destes hormônios nos camundongos Gal-3^{-/-}, analisamos por radioimunoensaio os níveis de corticosterona, principal GC ativo encontrado em camundongos. Os dados encontrados demonstram aumento dos níveis de corticosterona tanto no soro quanto no timo desses animais (Figura 4.2).

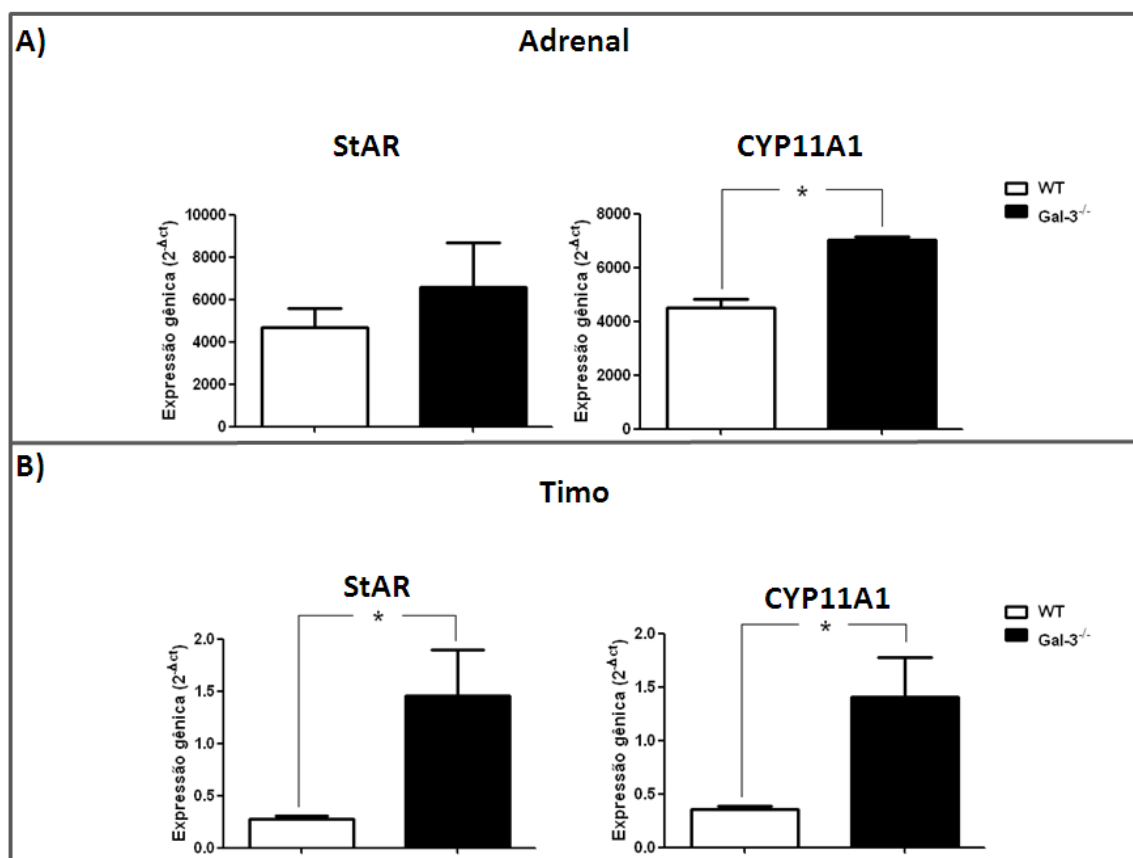


Figura 4.1. Animais Gal-3^{-/-} apresentam aumento da expressão de enzimas de síntese de GCs na adrenal e no timo. Análise da expressão dos genes StAR e CYP11A1 que codificam enzimas limitantes para a biossíntese de GCs, por PCR em tempo real nas adrenais (A) e no timo (B). Unidades relativas de expressão gênica mostradas como média ± erro padrão. n= 4 animais por grupo. *p< 0.05.

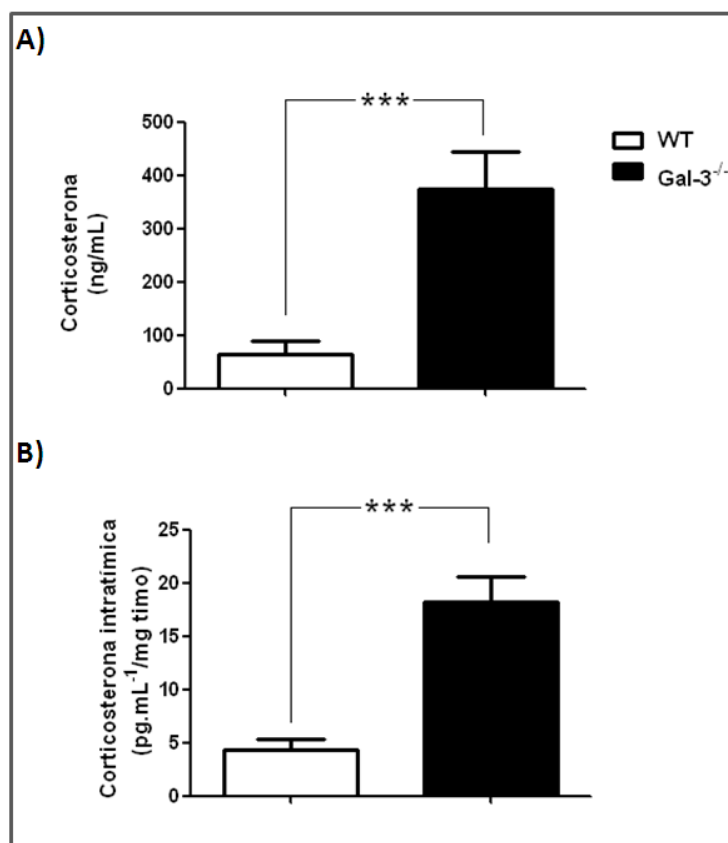


Figura 4.2. Animais Gal-3^{-/-} apresentam aumento dos níveis séricos e intratímicos de corticosterona. Análise por radioimunoensaio dos níveis séricos (A) e intratímicos (B) de corticosterona em animais WT e Gal-3^{-/-}. No timo a quantidade final de hormônio foi calculada através da razão entre os níveis de hormônio em pg/mL e a massa de cada timo em mg. Valores expressos em média \pm erro padrão. Dados representativos de dois experimentos (n= 9 animais WT; n= 10 animais Gal-3^{-/-}). ***p< 0.001.

4.2. Análise do fenótipo dos timócitos de animais Gal-3^{-/-}

Tendo em vista que o aumento nos níveis de GCs séricos e intratímicos está normalmente associado com a morte maciça de timócitos DP, decidimos verificar se a atrofia observada no timo de camundongos Gal-3^{-/-} estaria relacionada a alterações nas subpopulações de timócitos. Assim, realizamos a fenotipagem das

subpopulações de timócitos definidas pelos marcadores de membrana CD4 e CD8, assim como dos marcadores CD25 e CD44 para análise das subpopulações de timócitos DN, por citometria de fluxo.

Não observamos alterações na porcentagem das subpopulações de células definidas por CD4 e CD8 quando comparamos os dois grupos de animais. Porém, em números absolutos, os animais Gal-3^{-/-} apresentaram diminuição significativa em todas as subpopulações analisadas (Figura 4.3). Já na análise das subpopulações de timócitos DN, nós observamos um aumento significativo nas células DN1 e diminuição significativa das células no estágio DN3 nos animais Gal-3^{-/-} quando comparados com os animais controle. Em números absolutos estes animais apresentaram diminuição significativa em todas as subpopulações de DN (Figura 4.4).

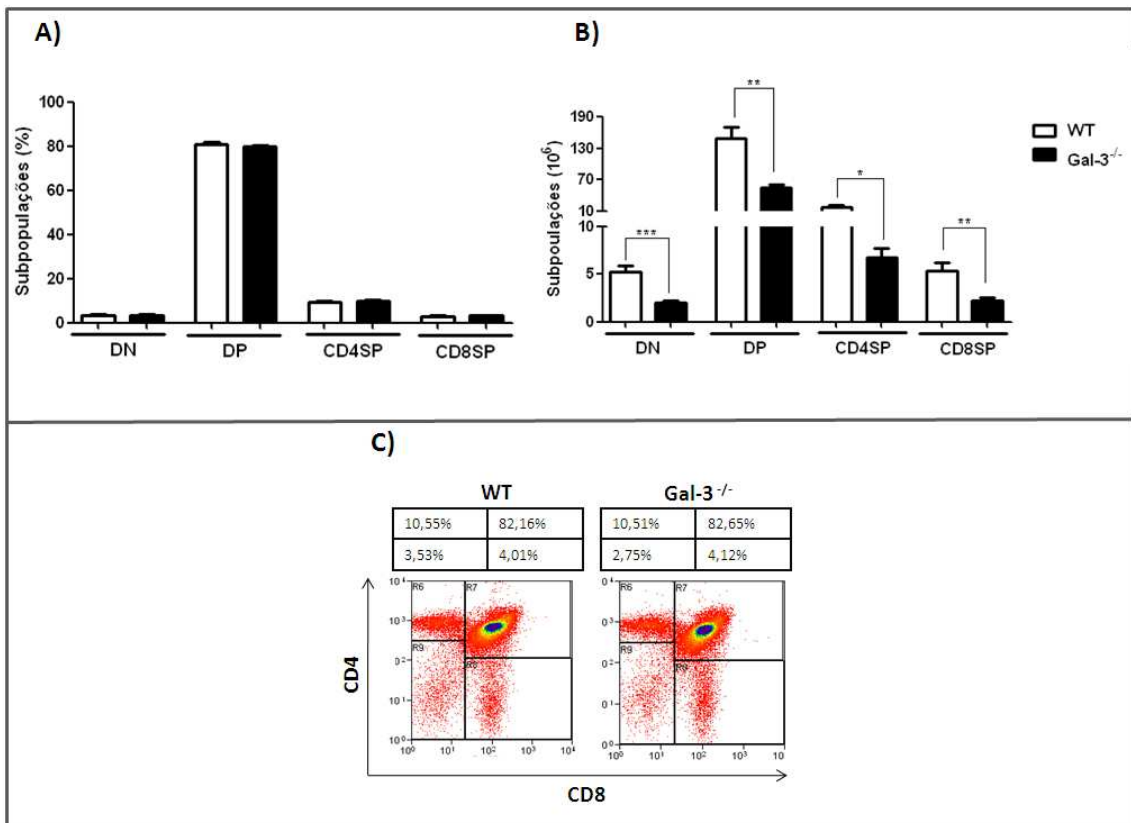


Figura 4.3. Animais WT e Gal-3^{-/-} apresentam o mesmo perfil de subpopulações definidas por CD4 e CD8. Avaliação por citometria de fluxo de subpopulações definidas pelos marcadores CD4 e CD8, em números percentuais (A) e absolutos (B). (C) Perfis representativos da marcação dos timócitos WT e Gal-3^{-/-} pelos anticorpos anti-CD4 e anti-CD8. Valores expressos em média ± erro padrão. Dados representativos de três experimentos (n= 14 animais/grupo). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

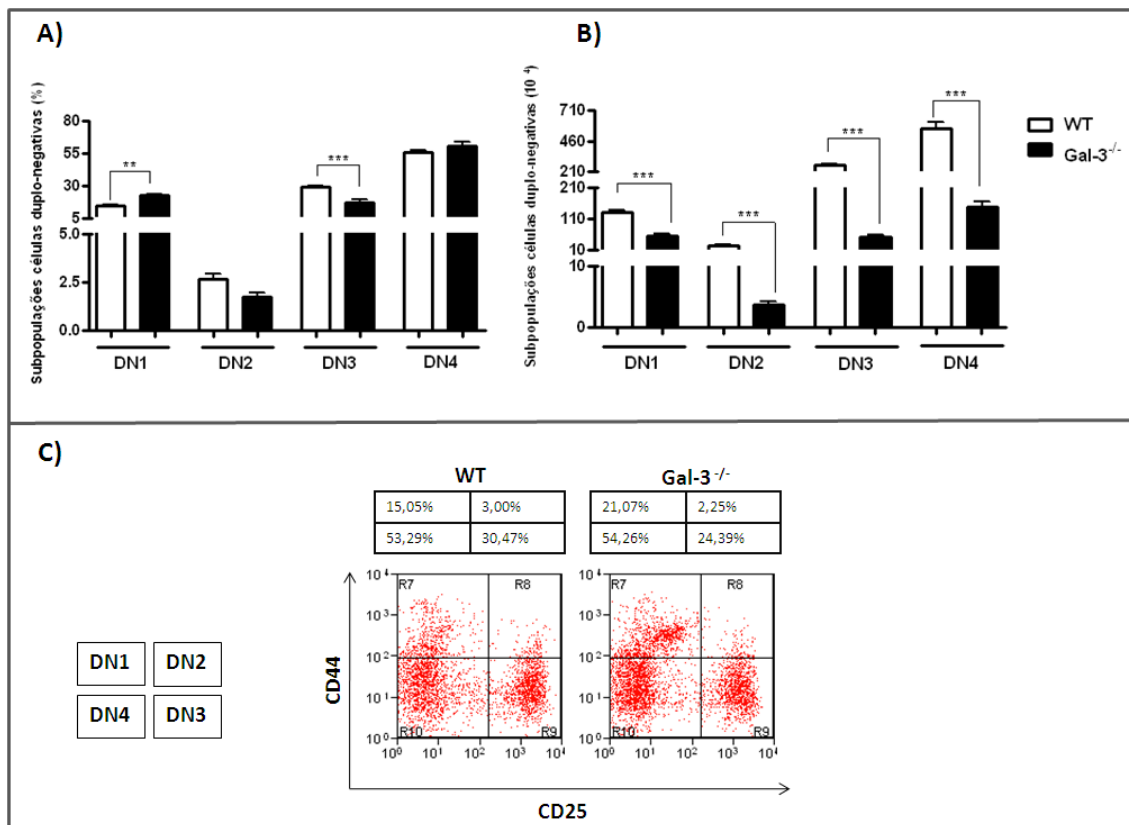


Figura 4.4. Subpopulações de células duplo-negativas estão alteradas nos animais Gal-3^{-/-}. Avaliação realizada por citometria de fluxo com o uso de anticorpos monoclonais anti-CD44 e anti-CD25. Tanto em números percentuais (**A**) quanto em números absolutos (**B**) observamos alterações nas subpopulações de DN. (**C**) Perfis representativos da marcação dos timócitos WT e Gal-3^{-/-} por anti-CD44 e anti-CD25 mostrando a diferença percentual entre as subpopulações de timócitos. Valores expressos em média \pm erro padrão. Dados representativos de dois experimentos (n= 10 animais/grupo). ** p < 0,01; *** p < 0,001.

4.3. Efeito da ausência da galeína-3 nas taxas de morte celular e proliferação de timócitos de camundongos Gal-3^{-/-}

Como a acentuada diminuição da massa do timo, assim como da sua celularidade, podem estar relacionadas a alterações nas taxas de morte e proliferação celulares, fenômenos que participam da manutenção da celularidade no timo, nós avaliamos possíveis alterações nessas taxas em timócitos isolados de animais WT e Gal-3^{-/-}, de 4-6 semanas.

Os resultados da análise de morte celular, através da marcação das células com anexina V, não mostraram, em números percentuais, alterações estatisticamente significativas nos timócitos totais entre os dois grupos de animais (Figura 4.5A). No entanto, a análise das diferentes subpopulações revelou aumento significativo da marcação por anexina V nos timócitos DP de camundongos Gal-3^{-/-} (Figura 4.5B).

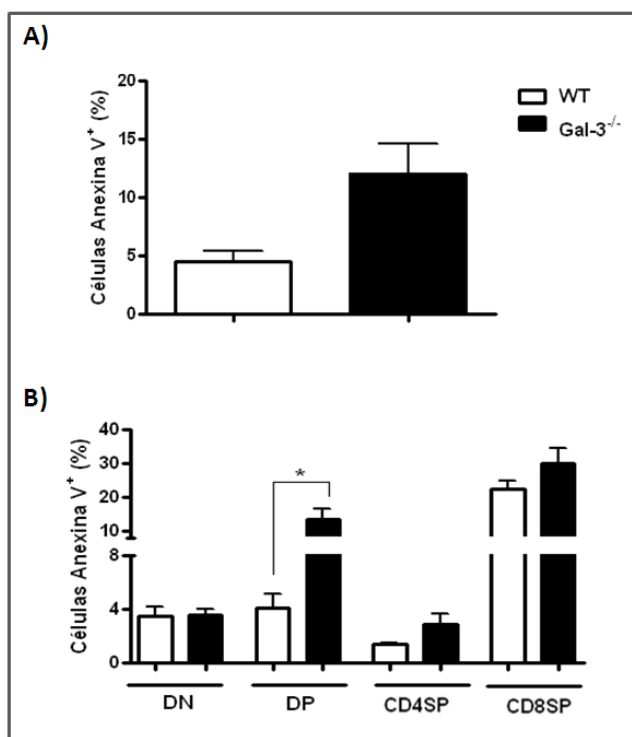


Figura 4.5. Análise das taxas de morte celular. Análise, por citometria de fluxo, da porcentagem de células anexina V⁺ nos timócitos totais isolados de cada grupo de animais (A) e nas subpopulações definidas pelos marcadores CD4 e CD8 (B). Valores expressos em média ± erro padrão. Dados representativos de um experimento (n= 5 animais/grupo); * p < 0,05.

Analisamos então a existência de diferenças na taxa de proliferação espontânea entre os timócitos desses dois grupos de animais. Para esta análise, os timócitos isolados dos animais foram incubados com BrdU e a análise da incorporação desse análogo da timidina nas diferentes subpopulações de timócitos foi feita por citometria de fluxo. Observamos uma diminuição dos níveis de proliferação espontânea em timócitos totais de animais Gal-3^{-/-} (Figura 4.6 A), mais especificamente nos timócitos DN, DP e CD4 SP (Figura 4.6 B).

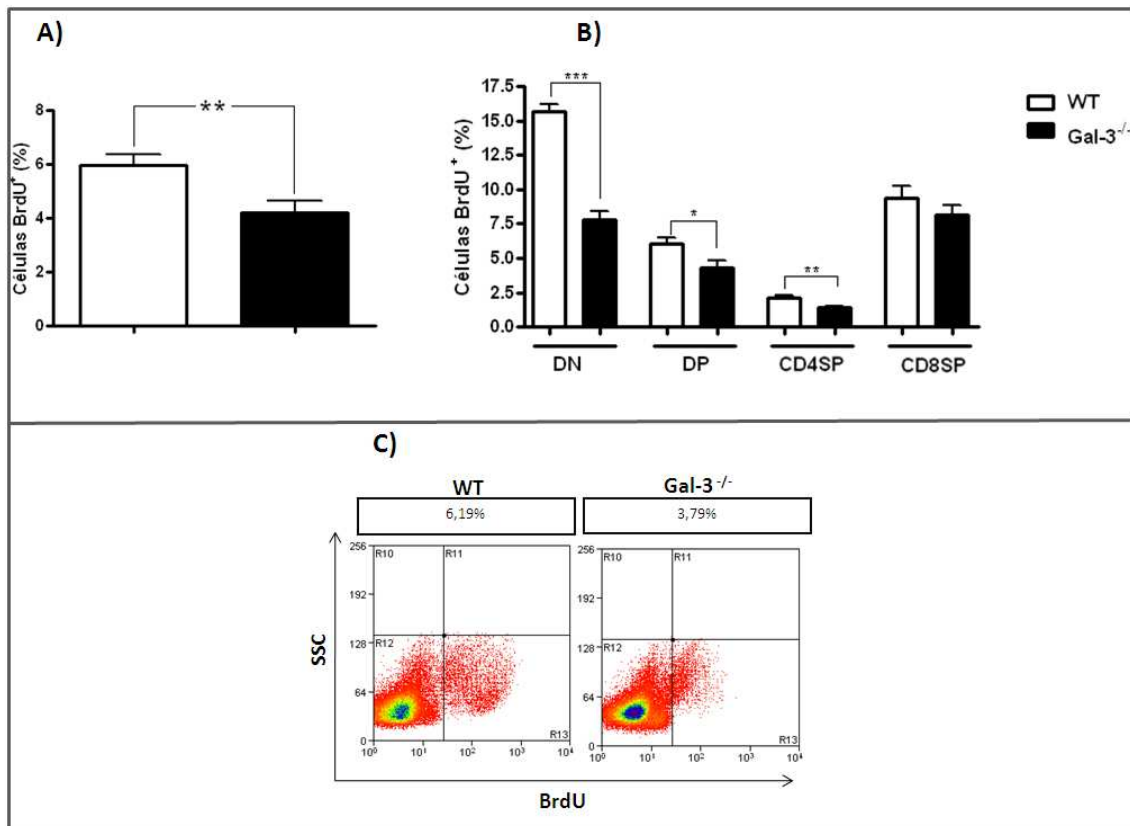


Figura 4.6. Diminuição das taxas de proliferação espontânea em algumas subpopulações de timócitos na ausência de galectina-3. Análise da incorporação de BrdU nos timócitos totais (A) e nas subpopulações definidas pelos marcadores CD4 e CD8 por citometria de fluxo (B). (C) Perfis representativos de células BrdU⁺ nos timócitos totais. Valores expressos em média \pm erro padrão. Dados representativos de dois experimentos. (n= 10 animais/grupo); * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Em seguida avaliamos os índices de proliferação espontânea nas diferentes subpopulações de DN, definidas pelos marcadores CD44 e CD25. Observamos que todas as subpopulações apresentavam diminuição de proliferação (Figura 4.7).

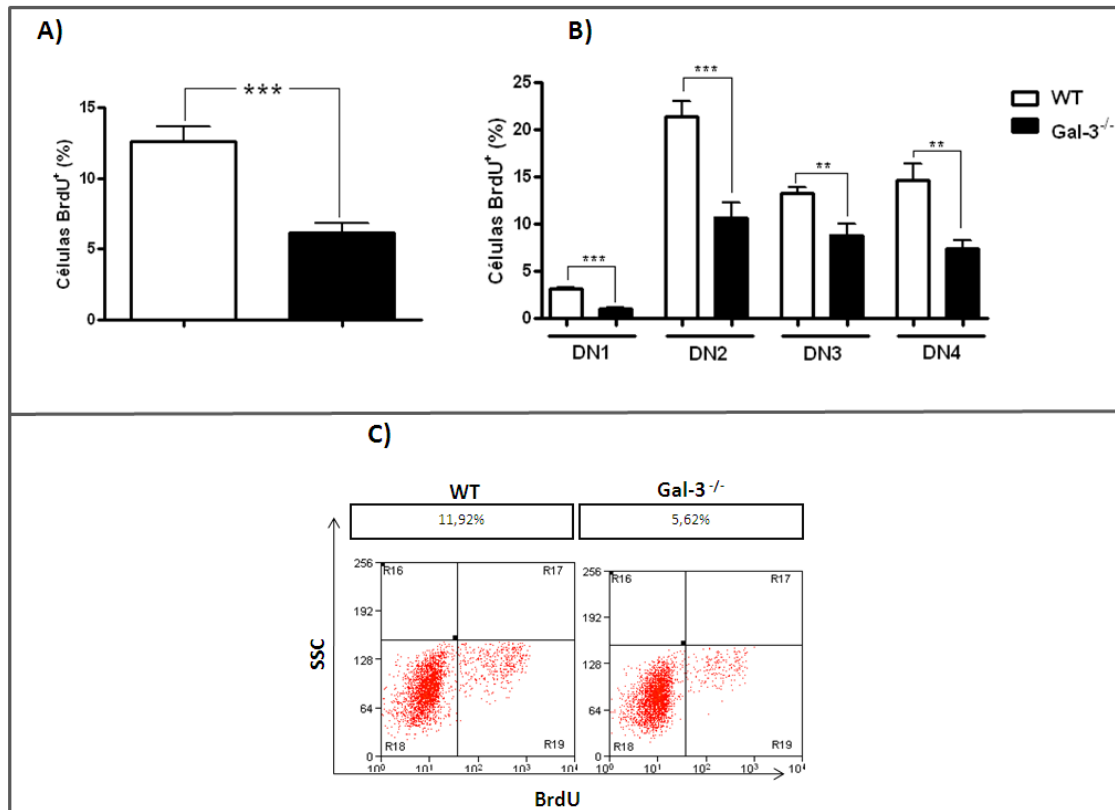


Figura 4.7. Diminuição das taxas de proliferação espontânea em todas as subpopulações de timócitos duplo-negativos na ausência de galectina-3. Análise da incorporação de BrdU nas células DN totais, (A) e nas subpopulações de DN definidas pelos marcadores CD44 e CD25 (B). (C) Perfis representativos de células BrdU⁺ nos timócitos duplo-negativos totais. Valores expressos em média ± erro padrão; Dados representativos de dois experimentos. (n= 10 animais/grupo); * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

4.4. Análise da morfologia do timo e do compartimento epitelial

A atrofia tímica frequentemente é acompanhada de alterações na morfologia do órgão. A manutenção de uma arquitetura adequada é fundamental para a homeostasia dos timócitos, uma vez que, a interação entre as células em desenvolvimento e o microambiente é fundamental no processo de diferenciação. Assim, para avaliarmos possíveis alterações morfológicas no timo dos camundongos Gal-3^{-/-} foram analisados cortes de timo parafinados e corados com Hematoxilina e Eosina. Foi realizada também a análise do componente epitelial, principal componente celular do microambiente tímico.

Na análise morfológica observamos a preservação das principais áreas histológicas, córtex e medula (Figura 4.8 A e B). Porém, notamos na região medular, a presença frequente de estruturas concêntricas, formadas por células epiteliais, semelhantes a corpúsculos de Hassall (Figura 4.8 D). Para análise do compartimento epitelial, cortes de timos de camundongos de ambos os grupos de animais foram submetidos à técnica de imunofluorescência indireta, sendo marcados com anticorpo anti-pan-citoqueratina. Nós observamos uma profunda desorganização da rede epitelial, com visível aumento de regiões livres de TEC (Figura 4.9 B e D), nos animais Gal-3^{-/-}.

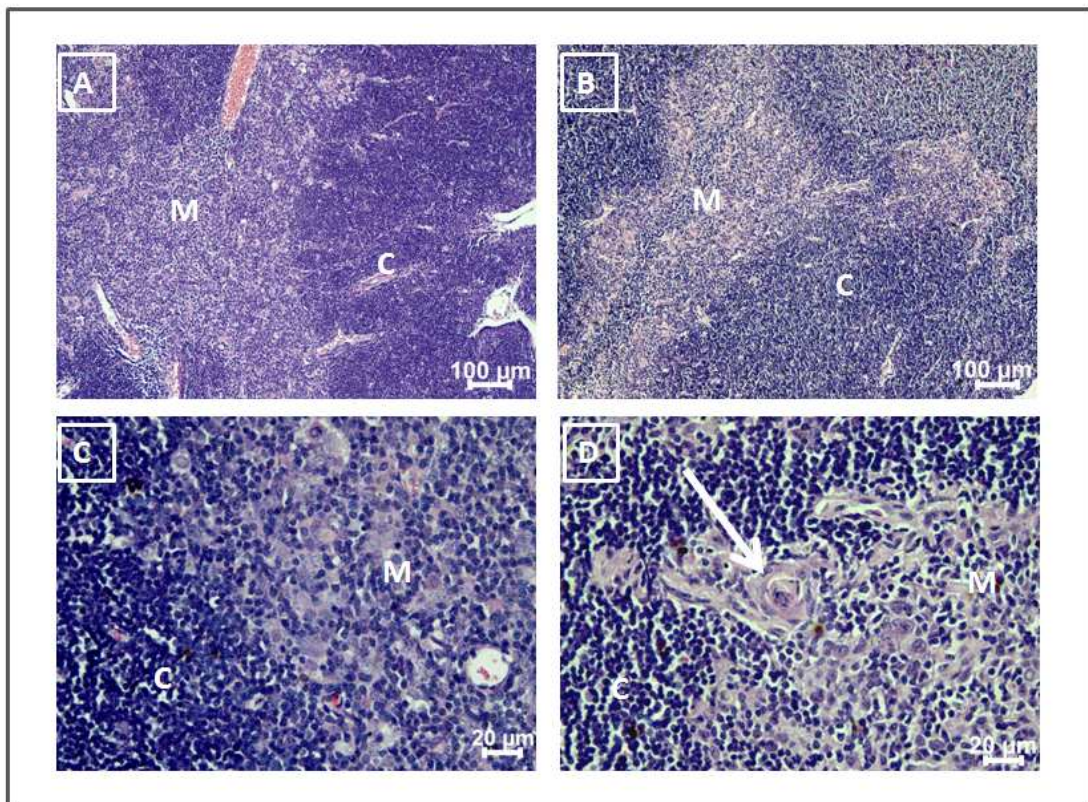


Figura 4.8. Análise da morfologia do timo. Os painéis (A) e (B) representam cortes parafinados de timo de camundongos WT e Gal-3^{-/-}, respectivamente, corados com Hematoxilina e Eosina (aumento de 10X). Os painéis (C) e (D) mostram regiões do timo dos animais WT e Gal-3^{-/-}, respectivamente (aumento de 40X). A seta branca indica estrutura concêntrica semelhante a corpúsculo de Hassall encontrada na região medular de animal Gal-3^{-/-}. Fotos representativas de lâminas de três animais/grupo.

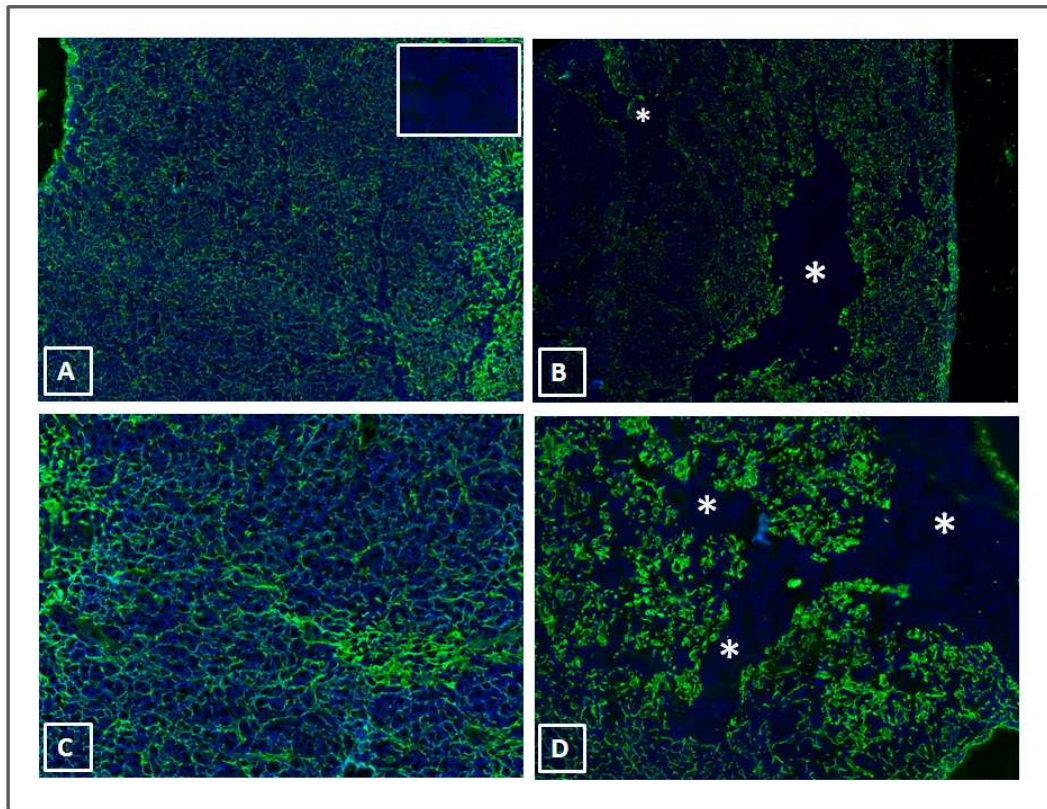


Figura 4.9. Ausência de galectina-3 leva à desorganização do compartimento epitelial. Análise realizada através de marcação por imunofluorescência indireta de cortes de timo de camundongos WT (A e C) e Gal-3^{-/-} (B e D), com anti-pan-citoqueratina ou IgG controle (inserto em A). Asteriscos representam regiões livres de epitélio (B e D). Fotos representativas de lâminas de três animais/grupo. Marcação em verde: anti-pan-citoqueratina e marcação em azul: DAPI.

4.5. Análise da celularidade da medula óssea e órgãos linfoides secundários

Outros dois fenômenos, além das taxas de morte e proliferação, importantes para manutenção da celularidade do timo são a entrada de precursores oriundos da medula óssea e a saída de linfócitos maduros para a periferia. Inicialmente investigamos se a ausência da Gal-3 poderia também alterar o número de células da medula óssea, da mesma forma que observamos no timo. A diminuição do número de células poderia refletir-se em uma oferta menor de precursores para colonizar o órgão. Obtivemos essas células através da maceração de epífises e diáfises de tíbias e fêmures de camundongos, como descrito em Materiais e Métodos. As células foram contadas ao microscópio óptico, sendo observada uma tendência à diminuição no número de células totais na medula óssea nos animais Gal-3^{-/-} (Figura 4.10).

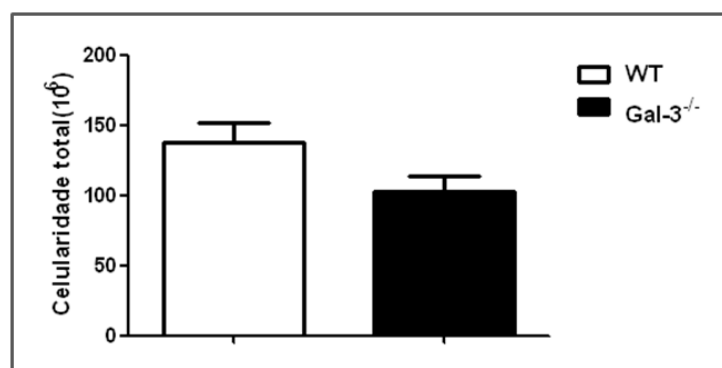


Figura 4.10. Análise da celularidade da medula óssea de animais Gal-3^{-/-}. As células foram obtidas dos dois grupos de camundongos, e contadas. Observamos uma tendência à diminuição do número de células totais de medula óssea nos animais Gal-3^{-/-}. Valores expressos em média ± erro padrão; Dados representativos de um experimento (n= 4 animais/grupo).

Investigamos também se a atrofia, observada na ausência da Gal-3 estaria relacionada a um aumento da saída de células para a periferia. Analisamos a celularidade e o fenótipo dos linfonodos subcutâneos (inguinais, axilares e braquiais), linfonodos mesentéricos e baço. Não observamos alterações significativas no número de células encontradas nos linfonodos subcutâneos, porém houve diminuição significativa no número de células nos linfonodos mesentéricos e baço (Figura 4.11). A análise da porcentagem das subpopulações CD4 e CD8 não revelou alterações significativas em nenhuma das subpopulações (Figura 4.12 A-C painel superior). No entanto, em números absolutos, observamos diminuição significativa nas células CD4 SP de linfonodos mesentéricos e de células CD4 SP e CD8 SP no baço de animais Gal-3^{-/-} (Figura 4.12 B e C), enquanto os linfonodos subcutâneos não apresentaram alteração nas subpopulações celulares (Figura 4.12 A).

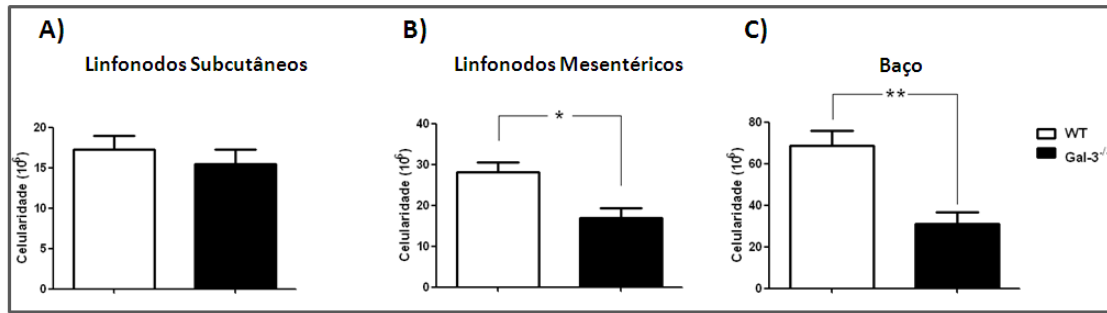


Figura 4.11. Animais Gal-3^{-/-} apresentam diminuição de celularidade em alguns órgãos linfoides periféricos. A celularidade dos linfonodos subcutâneos (inguinal, axilar e braquial) (A), linfonodos mesentéricos (B) e baço(C) foi avaliada por contagem em câmara de Neubauer. Experimento representativo de dois experimentos. (n= 6 animais/grupo). * p < 0,05; ** p < 0,01.

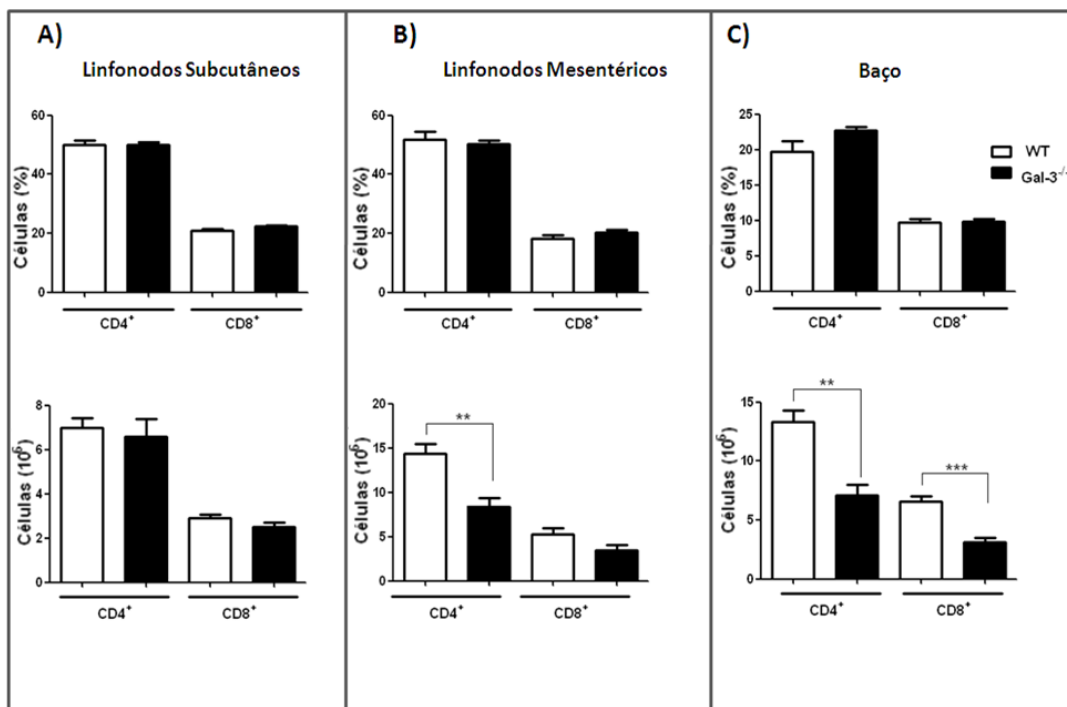


Figura 4.12. Análise das subpopulações de células definidas pelos marcadores CD4 e CD8 de órgãos linfoides periféricos de animais Gal-3^{-/-}. As células obtidas dos linfonodos subcutâneos (A), linfonodos mesentéricos (B) e do baço (C) foram marcadas com os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 e analisadas por citometria de fluxo. Valores expressos em média ± erro padrão; Experimento representativo de dois experimentos (n=6 animais/grupo). ** p < 0,01; *** p < 0,001.

5. DISCUSSÃO

Considerando-se que a galectina-3 é encontrada em diversos compartimentos celulares, assim como no meio extracelular, desempenhando funções diferenciadas dependendo de onde se encontra (Liu *et al.*, 2002; Ochieng *et al.*, 2004), os animais Gal-3^{-/-} representam uma excelente ferramenta para a compreensão de suas funções *in vivo*. Trabalhos recentes, utilizando esses camundongos em diferentes modelos de estudo, têm trazido informações importantes sobre o papel da Gal-3 na fisiologia e na patologia, como por exemplo, a sua participação no processo de diferenciação de células B, na progressão do câncer e do diabetes (Oliveira, *et al.*, 2007; Oliveira, *et al.*, 2009; Eude-le Parco, *et al.*, 2009; Mensah-Brown, *et al.*, 2009). Particularmente, relatos anteriores mostram a participação da Gal-3 na resposta imune inata e adaptativa, participando tanto da ativação quanto da diferenciação celular (Chen *et al.*, 2005). Um dos exemplos é sua influência sobre os linfócitos B. Foi demonstrado que a Gal-3 tem um importante papel na sobrevivência e diferenciação induzida por IL-4 em células B de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, influenciando sua diferenciação em plasmócitos (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2004). Foi descrito também que há uma possível aceleração da diferenciação dessas células em plasmócitos em animais Gal-3^{-/-} infectados por *Schistosoma mansoni* e que a diferenciação de células B1 em plasmócitos no peritônio, em condições fisiológicas, seja favorecida na ausência de Gal-3 (Oliveira *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2009). No entanto, não existem relatos na literatura sobre o papel da Gal-3 na diferenciação de timócitos. Nesse contexto, nosso grupo tem se dedicado a analisar a influência desta molécula em processos fisiológicos e patológicos envolvendo a diferenciação intratímica de linfócitos T (Villa-Verde *et al.*, 2002; Silva-Monteiro *et al.*, 2007). Analisando o timo dos animais Gal-3^{-/-}, observamos que o órgão apresenta atrofia importante, com diminuição de sua massa e celularidade. O presente trabalho teve como objetivo estudar alguns dos fatores envolvidos na atrofia tímica observada na ausência desta lectina e, assim, compreender melhor o papel da Gal-3 na fisiologia do timo.

A involução tímica é um processo que ocorre naturalmente com a idade, estando associada a uma série de condições fisiológicas e patológicas (Taub *et al.*, 2005), podendo ser citadas as alterações nos níveis de glicorticoides. Tem sido descrita a participação de GCs em processos de atrofia tímica em decorrência da idade, quando ocorre aumento da síntese de GCs em timócitos, bem como da expressão das enzimas

limitantes de sua síntese, codificadas pelos genes StAR e CYP11A1, ao mesmo tempo em que diminuem nas TEC (Qiao, 2008), e também em processos infecciosos, como por exemplo, na infecção por *Trypanosoma cruzi*. Como descrito em alguns estudos de nosso Laboratório, há aumento nos níveis séricos de corticosterona, principal GC encontrado em camundongos, durante a fase aguda da infecção por este parasita (Corrêa-de-Santana *et al.*, 2006), ocorrendo morte de timócitos DP, células sensíveis à ação deste hormônio (Savino, 2006). Demonstramos recentemente que o bloqueio de receptores de GC com RU486 é capaz de reverter parcialmente a atrofia tímica nos animais infectados (Farias-de-Oliveira *et al.*, 2013).

Alguns estudos têm demonstrado haver regulação da expressão de Gal-3 por parte dos GCs, podendo tanto levar ao aumento da expressão desta lectina quanto à sua diminuição, dependendo das condições de estudo e do tipo celular estudado. Análises *in vivo* realizadas em ratos submetidos à adrenalectomia mostraram diminuição da expressão de Gal-3 citoplasmática nas células de Clara, células secretoras não-ciliadas abundantes no trato respiratório inferior, e em macrófagos, sendo este efeito revertido após tratamento com dexametasona. É interessante notar que a diminuição da expressão de Gal-3 foi dependente do tipo celular, já que não houve alteração da expressão da lectina nas células ciliadas pulmonares (Maldonado *et al.*, 2011). No mesmo estudo, macrófagos peritoneais de ratos foram tratados *in vitro* com concentrações crescentes de dexametasona, apresentando aumento na expressão de Gal-3. Em controvérsia com estes dados, foi descrito que camundongos submetidos a um único episódio de estresse por imobilização tiveram diminuição da expressão de Gal-3 no fígado, baço e macrófagos peritoneais (Dumic *et al.*, 2000). É descrito que há aumento dos níveis de GCs em resposta ao estresse (Eskandari & Sternberg, 2002). Por outro lado, é conhecido que o timo sofre extenso controle neuroendócrino, apresentando alterações em seus componentes linfóides e do microambiente sob efeito hormonal. O timo foi descrito como sítio de produção de diversos hormônios, como prolactina, hormônio do crescimento, corticosterona, ocitocina, vasopressina, tendo sido demonstrada a presença de receptores para alguns destes hormônios em timócitos e TEC (Savino & Dardenne, 2000). Considerando os resultados dos estudos relatados acima, juntamente com o conhecimento de que uma das funções biológicas da Gal-3 é a capacidade de modular a expressão gênica, nós investigamos possíveis alterações na expressão de StAR e CYP11A1, genes que codificam enzimas limitantes na síntese de GCs, no timo e nas adrenais de animais Gal-3^{-/-} e animais controle. Utilizamos a técnica de PCR em tempo

real realizado a partir de cDNA sintetizado de amostras de RNA total isoladas dos animais. Apesar de não termos observado aumento significativo da expressão de StAR nas adrenais isoladas de animais Gal-3^{-/-}, houve aumento da expressão de CYP11A1, sendo este aumento suficiente para elevar, de forma significativa, os níveis de corticosterona séricos, como observado nas análises por radioimunoensaio. Já no timo destes animais a expressão de ambos os genes está significativamente aumentada e esse aumento também refletiu em elevação dos níveis intratímicos do hormônio (Figuras 4.2 e 4.3).

Os estudos anteriores, que mostram a modulação da expressão de Gal-3 por GCs, em conjunto com os obtidos neste trabalho sugerem que essas moléculas possam estar envolvidas em regulação gênica recíproca, principalmente se levarmos em consideração o fato de que elas possuem efeito antagônico na resposta imune. A Gal-3 é, em geral, considerada um poderoso sinal pró-inflamatório. Quando secretada ou exteriorizada, pode afetar células inflamatórias por um mecanismo autócrino ou parácrino, podendo ativar várias células linfoides e mieloides, incluindo a capacidade de promover a explosão respiratória em neutrófilos e monócitos, induzir a liberação de mediadores pelos mastócitos e promover a adesão de neutrófilos humanos à laminina e às células endoteliais (Dumic *et al*, 2006). Por sua vez, os GCs possuem ação anti-inflamatória conhecida, podendo inibir a liberação de citocinas e outras atividades de uma variedade de células que compõem o sistema imune, incluindo células dendríticas, granulócitos e monócitos/macrófagos, assim como linfócitos B e T (Butts & Sternberg, 2008). A possibilidade de uma regulação cruzada entre essas duas moléculas abre caminhos para estudos mais aprofundados nessa área.

Tendo em vista nossos resultados relacionados à produção de GCs pelos animais Gal-3^{-/-} e suas consequências anteriormente descritas sobre o timo, e ainda as funções conhecidas da Gal-3 sobre a migração, diferenciação, proliferação e morte celular, investigamos a existência de uma possível modulação sobre a diferenciação de timócitos na ausência da Gal-3. A partir da análise fenotípica dos timócitos em relação à expressão das moléculas CD4, CD8, CD25 e CD44, não observamos alterações na porcentagem das subpopulações definidas por CD4 e CD8. Em números absolutos, a depleção na celularidade observada no timo de camundongos Gal-3^{-/-} apresentou-se homoganeamente distribuída, enquanto a análise das subpopulações de células DN revelou aumento relativo de células no estágio DN1 e diminuição de células no estágio DN3. Entretanto, esse aumento não foi suficiente para manter ou elevar o número de

timócitos neste estágio de desenvolvimento, já que em números absolutos observamos diminuição significativa em todas as subpopulações de timócitos DN.

O aumento dos níveis séricos de GCs pode levar à involução tímica por morte de timócitos corticais, alterações em sua capacidade proliferativa, mudanças no microambiente, entre outras causas (Jondal *et al.*, 2004; Taub & Longo, 2005). Decidimos então avaliar, se as diferenças de celularidade encontradas nos animais Gal-3^{-/-} poderiam estar relacionadas a mudanças nas taxas de morte ou proliferação, que poderiam ser causadas tanto por efeito direto da ausência de Gal-3, quanto por efeito indireto, já que observamos aumento dos níveis de corticosterona tanto no soro quanto no timo na ausência desta lectina. Dados da literatura têm demonstrado a participação da Gal-3 e da corticosterona como moduladoras desses fenômenos que contribuem para a manutenção do número de células no timo. Em relação à morte celular, dados anteriores mostraram que a Gal-3 intracelular é capaz de proteger as células da apoptose, por interagir com *Bcl-2* (Yang *et al.*, 1996). Por outro lado, estudos recentes demonstraram que a Gal-3, quando adicionada a culturas de células mononucleares de sangue periférico e células T humanas de linhagem, é capaz de se ligar em receptores da superfície celular, induzindo a morte de forma carboidrato-dependente, induzindo também a morte de timócitos humanos, principalmente as células DN e DP (Fukumori *et al.*, 2003; Stillman *et al.*, 2006). Os efeitos de GCs sobre a manutenção da homeostase tímica também são controversos. Tem sido apontado um circuito intratímico parácrino/autócrino de grande importância na maturação e em eventos de seleção de timócitos. Sob condições normais, GCs endógenos previnem a morte de timócitos após interação TCR/peptídeo-MHC (Vacchio *et al.*, 1999). Já o aumento dos níveis séricos de corticosterona tem sido associado à morte maciça de células corticais, levando à atrofia do timo (Whyllie, 1980). Ao avaliarmos a ocorrência de uma possível modulação de morte celular nos timócitos de camundongos Gal-3^{-/-}, não observamos diferenças significativas na porcentagem de células anexina V positivas nos timócitos totais, porém, detectamos um aumento significativo de marcação nos timócitos DP. Esse achado sugere que a queda no número de células DP esteja relacionada a um maior índice de morte celular.

Em seguida, avaliamos se a capacidade proliferativa dos timócitos sofre alterações na ausência da Gal-3. Nossas análises de incorporação de BrdU revelaram diminuição na proliferação de todas as populações analisadas. Os resultados obtidos estão de acordo com relatos da literatura que descrevem a influência da Gal-3 na

proliferação de alguns tipos celulares como, por exemplo, em fibroblastos humanos, através de sua interação com glicoproteínas presentes na superfície celular (Inohara *et al.*, 1998), e o bloqueio da proliferação de células T quando a expressão de galectina-3 é inibida (Joo *et al.*, 2001). Além disso, é importante salientar os relatos de que GCs derivados de timócitos apresentam efeito anti-proliferativo em linhagens celulares transfectadas com receptor de GCs e em timócitos (Qiao *et al.*, 2008).

Ainda, nossos resultados sugerem que a diminuição em números absolutos, de todas as subpopulações timocitárias dos animais Gal-3^{-/-}, seja devida à diminuição da proliferação dos timócitos no seu estágio mais imaturo. O número de timócitos da população majoritária de células no timo, células DP, é dependente do equilíbrio entre a quantidade de células DN em proliferação e as células que sobreviveram ao processo de seleção positiva, que ocorre nesse estágio de desenvolvimento (Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007). A diminuição da proliferação observada nas DN pode estar sendo refletida em um menor número de células disponíveis para se diferenciar em células DP. Isto, aliado ao fato de a subpopulação de células DP, além de apresentar diminuição de proliferação, possuir aumento nas taxas de morte celular, diminuiria a oferta de células disponíveis para diferenciação em células SP.

A integridade da organização do microambiente tímico está associada à capacidade dos timócitos migrarem, proliferarem, sofrerem ou não apoptose decorrente dos processos seletivos, e originarem células T maduras (Takeoka *et al.*, 1996; Takeoka *et al.*, 1999; Varas *et al.*, 2000; Bommhardt *et al.*, 2004). Verificamos então se as alterações encontradas nas taxas de proliferação dos timócitos poderiam estar relacionadas não só à capacidade da Gal-3 de modular diretamente este processo, como supracitado, mas também a possíveis alterações no microambiente tímico determinadas pela ausência da Gal-3. Análises da morfologia tímica mostraram que o timo dos animais Gal-3^{-/-} possui as principais áreas histológicas preservadas, sendo possível identificar a região cortical e a medular. Entretanto, foi observada frequentemente a presença de células epiteliais dispostas em forma concêntrica na região medular, formando estruturas semelhantes a corpúsculos de Hassall. Essas estruturas não são facilmente encontradas no timo de camundongos e ratos, mas são localizadas com facilidade em timo de humanos e de cobaias (Farr *et al.*, 2002). Elas podem ser identificadas pela expressão de citoqueratinas específicas de alto peso molecular que são evidenciadas pelo anticorpo KL1, que marca o par K 3/10 (57/63 kDa) (Nicolas *et al.*, 1989). Estudos do nosso Laboratório demonstraram que o tratamento de

camundongos com altas doses de hidrocortisona aumentam o número de células KL1⁺ 24 horas após a injeção, sendo esse efeito reversível, uma vez que essas células não foram detectadas 7 dias após a injeção (Savino *et al.*, 1986). Dessa forma, os elevados níveis de corticosterona observados nos camundongos Gal-3^{-/-} poderiam estar levando ao aumento dessas estruturas na região medular, porém experimentos precisam ser realizados para confirmar a expressão de citoqueratinas de alto peso molecular nas mTEC destes animais.

A análise dos criocortes de timo dos camundongos Gal-3^{-/-} revelou profunda desorganização do compartimento epitelial com aumento da presença de áreas livres de TEC na região cortical. Dados semelhantes foram descritos anteriormente por nosso grupo em timos de camundongos idosos. A presença destas regiões livres de epitélio diminuiu muito após suplementação da dieta destes animais com zinco, elemento fundamental para a homeostasia do timo (influenciando o desenvolvimento de timócitos, de TEC, da produção de timulina, etc.), e que se encontra diminuído em indivíduos idosos (Dardenne *et al.*, 1993). As interações entre o epitélio tímico e timócitos são fundamentais para a diferenciação dos linfócitos T e para as células que compõem o microambiente tímico, fenômeno conhecido como *cross-talk* (Holländer *et al.*, 2006). As TEC influenciam de modo pleiotrópico este processo através da interação direta com os timócitos. Os estágios iniciais de desenvolvimento dessas células até o estágio DN3 são promovidos por sinais mediados por Notch e também pela IL-7, que são derivados de cTEC. Ao longo de seu desenvolvimento, os timócitos DN promovem a diferenciação de células do estroma tímico, levando à formação do microambiente tímico cortical. Estudos têm demonstrado que as TEC não se diferenciam em camundongos com deficiência no desenvolvimento a partir de DN1, permanecendo imaturas. Esses animais não formam um córtex tímico histologicamente normal e contém cistos. Entretanto, camundongos com deficiência a partir do estágio DN3 apresentam córtex histologicamente normal, sugerindo que a diferenciação dos estágios DN1 a DN3 regulam a diferenciação de precursores de TEC em cTEC presentes no microambiente cortical do timo (Takahama, 2006).

A diminuição da entrada de precursores ou aumento da saída de células do timo para a periferia também podem contribuir para a diminuição da celularidade do timo. Iniciamos então estudos visando à avaliação desses dois pontos que, além do equilíbrio entre as taxas de apoptose e proliferação, estão relacionados com a manutenção do número de células deste órgão. Em um estudo preliminar fizemos a análise do número

de células totais da medula óssea, e observamos uma tendência à diminuição em animais Gal-3^{-/-}. Nossos dados precisam ser ampliados com a realização de novos experimentos, nos quais pretendemos também avaliar a frequência de células com fenótipo de progenitores capazes de gerar células T. Porém, apesar de preliminares, nossos dados corroboram um estudo recente que demonstrou, por análise histomorfométrica, diminuição da densidade celular e alterações histológicas no microambiente da medula óssea de camundongos Gal-3^{-/-} (Brand *et al.*, 2011). Podemos ressaltar dois fatores interessantes deste estudo. O primeiro é que, mesmo havendo aumento no número de alguns progenitores multipotentes, incluindo alguns específicos para células mieloides, não foram observadas alterações na porcentagem do precursor linfóide comum (CLP), uma das células capazes de gerar células T (Saran *et al.*, 2010). O segundo é que, embora tenha sido observado aumento no número de alguns progenitores mieloides, na ausência da Gal-3, esses progenitores apresentaram diminuição da capacidade de se diferenciar em populações de células mieloides maduras (Brand *et al.*, 2011).

A última análise realizada no presente trabalho foi um possível aumento da saída de células para periferia, que poderiam levar à diminuição da celularidade do timo. Para avaliar alterações na saída de células na ausência de Gal-3 fizemos a contagem e analisamos o fenótipo dos seguintes órgãos linfóides periféricos: linfonodos subcutâneos (inguinais, axilares e braquiais), linfonodos mesentéricos e baço. Não encontramos alterações no número de células dos linfonodos subcutâneos, porém observamos diminuição significativa na celularidade dos linfonodos mesentéricos e do baço de animais Gal3^{-/-}. Não encontramos alterações na porcentagem de nenhuma das subpopulações analisadas, apesar de termos observado diminuição em números absolutos de células CD4 SP nos linfonodos mesentéricos, e diminuição em números absolutos de células CD4 SP e CD8 SP no baço. Apesar de não termos avaliado o número de células de fenótipo *naive*, a diminuição em números absolutos encontrada na periferia sem alteração na porcentagem das populações de linfócitos T pode ser um reflexo da diminuição em números absolutos do número de timócitos SP, tanto as CD4 quanto as CD8, presentes no timo dos camundongos Gal3^{-/-}. Além disso, este dado sugere que a atrofia encontrada no timo na ausência da Gal-3 não se deve ao aumento da saída de células do órgão para a periferia, pois, caso esse fato estivesse ocorrendo, provavelmente teríamos observado um aumento de celularidade nos órgãos linfóides periféricos, o que não ocorreu. Para um estudo mais aprofundado deste evento, seria

interessante a realização de injeções intratímicas de FITC, com posterior avaliação quantitativa da presença dos emigrantes tímicos recentes, marcados com FITC, na periferia.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que a deficiência de Gal-3 resulta em aumento da expressão de enzimas limitantes da biossíntese de glicorticoides, tanto nas adrenais quanto no timo, aumento este que se refletiu na elevação dos níveis de corticosterona no timo e no soro. Apesar de a atrofia tímica relacionada aos glicorticoides levar à depleção maciça de timócitos DP, não observamos alterações na distribuição relativa de subpopulações de células definidas por CD4 e por CD8, mesmo com o aumento de morte das células DP e de alterações nas porcentagens das subpopulações de DN. Nossos dados também apontam que a atrofia tímica observada na ausência da Gal-3 pode estar associada à diminuição das taxas de proliferação de timócitos, principalmente a das células DN, subpopulação mais imatura encontrada no timo. Por outro lado, parece não haver alterações na saída de células para a periferia, pois a celularidade dos órgãos linfóides periféricos dos animais Gal-3^{-/-} ou não se alterou ou estava diminuída quando comparada aos animais controle. Além disso, demonstramos que o compartimento microambiental do timo desses animais também foi afetado na ausência de Gal-3, revelando uma rede epitelial alterada, com presença frequente de estruturas semelhantes aos corpúsculos de Hassall e de extensas áreas livres de células epiteliais. Em conjunto, nossos resultados demonstram a importância da Gal-3 para a manutenção da homeostase do timo.

7. PERSPECTIVAS

Pretendemos dar continuidade a este trabalho ampliando os experimentos de análise de células duplo-negativas, fazendo uma análise mais acurada dos subgrupos de células duplo-negativas dentro das subpopulações, assim como, da celularidade da medula óssea, realizando uma avaliação do fenótipo e do número de precursores linfoides, com o uso de marcadores específicos. Pretendemos ainda avaliar a capacidade destas células colonizarem o timo, usando como modelo de estudo animais Gal-3^{-/-} irradiados que serão submetidos a injeções de precursores obtidos de animais selvagens e vice-versa. Além disso, pretendemos verificar o grau de influência do aumento de corticosterona na atrofia tímica observada nesses animais, usando o bloqueador de receptor de GCs RU486 ou, alternativamente, submetendo os animais Gal-3^{-/-} à adrenalectomia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abreu, EO. Influência da galectina-3 na fisiologia do timo. Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro. (2009). xiv; 68p.
2. Acosta-Rodriguez EV, Montes CL, Motran CC, Zuniga EI, Liu FT, Rabinovich GA & Gruppi A. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. (2004). *J Immunol*, **172**, 493-502.
3. Alves NL, Goff OR, Huntington ND, Sousa AP, Ribeiro VS, Bordack A, Vives FL, Peduto L, Chidgey A, Cumano A, Boyd R, Eberl G & Di Santo JP. Characterization of the thymic IL-7 niche in vivo. (2009). *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 1512-1517.
4. Anderson G, Lane PJL & Jenkinson J. Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. (2007). *Nat Rev Immunol*, **7**, 954-963.
5. Aspinall A & Andrew D. Thymic atrophy in the mouse is a soluble problem of thymic environment. (2000) *Vaccine*, **18**, 1629-1637.
6. Ayres-Martins S, Lannes-Vieira J, Farias-de-Oliveira DA, Brito JM, Villa-Verde DMS & Savino W. Phagocytic cells of the thymic reticulum interact with thymocytes via extracellular matrix ligands and receptors. (2004). *Cell Immunol*, **229**, 21–30.
7. Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G & Schibler U. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. (2000). *Science*, **289**, 2344–2347.
8. Barboni EA, Bawumia S, Henrick K, Hughes RC. Molecular modeling and mutagenesis studies of the N-terminal domains of galectin-3: evidence for participation with the C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding. (2000). *Glycobiology*. **10**, 1201-1208.
9. Baum LG, Pang M, Perillo NL, Wu T, Delegaene A, Uittenbogaart CH, Fukuda M & Seilhamer JJ. Human thymic epithelial cell express an endogenous lectin, galectin-1,

wich binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. (1995 a). *J Exp Med*, **181**, 877-887.

10. Baum LG, Seilhamer JJ, Pang M, Levine WB, Beynon D & Berliner JA. Synthesis of an endogenous lectin, galectin-1 by human endothelial cells is upregulated by endothelial cell activation. (1995b). *Glycoconjugate J*, **12**, 63-68.

11. Birdsall B, Feeney J, Burdett ID, Bawumia S, Barboni EA & Hughes RC. NMR solution studies of hamster galectin-3 and electron microscopic visualization of surface-adsorbed complexes: evidence for interactions between the N- and C-terminal domains. (2001). *Biochemistry*, **40**, 4859–4866.

12. Blackburn CC, Manley NR, Palmer DB, Boyd RL, Anderson G & Ritter MA. One for all and all for one: thymic epithelial stem cells and regeneration. (2002). *Trends Immunol*, **8**, 391-395.

13. Boehm T & Bleul CC. Thymus homing precursors and the thymic microenvironment. (2006). *Trends Immunol*, **27**, 477-484.

14. Bommhardt U, Beyer M, Hunig T & Reichardt HM. Molecular and cellular mechanisms of T Cell development. (2004). *Cell Mol Life Sci*, **61**, 263–280.

15. Brand C, Oliveira FL, Ricon L, Fermino ML, Boldrini C, Hsu DK, Liu FT, Chammas R, Borojevic R, Farina M & El-Cheikh MC. The bone marrow compartment is modified in the absence of galectin-3. (2011). *Cell Tissue Res*, **346**, 427-437.

16. Butts CL, Sternberg EM: Neuroendocrine factors alter host defense by modulating immune function. (2008). *Cell Immunol*, **252**, 7–15.

17. Capone M, Hockett RD Jr & Zlotnik A. Kinetics of T cell receptor beta, gamma, and delta rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44(+)CD25(+) Pro-T thymocytes. (1998). *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 12522-12527

18. Cerliani JP, Stowell SR, Mascanfroni ID, Arthur CM, Cummings RD & Rabinovich GA. Expanding the universe of cytokines and pattern recognition receptors: Galectins and glycans in innate immunity. (2011). *J Clin Immunol*, **31**, 10–21.
19. Chen HY, Sharma BB, Yu L, Zuberi R, Weng IC, Kawakami Y, Kawakami T, Hsu DK & Liu FT. Role of galectin-3 in mast cell functions: galectin-3-deficient mast cells exhibit impaired mediator release and defective JNK expression. (2006). *J Immunol*, **177**, 4991-4997.
20. Chen HY, Liu FT & Yang RY. Roles of galectin-3 in immune responses. (2005). *Arch Immunol Ther Exp*, **53**, 497–504.
21. Chi AW, Bell J, Zlotoff DA & Bhandoola A. Untangling the T branch of hematopoiesis tree. (2009). *Curr Opin Immunol*, **21(2)**, 121-126.
22. Chidgey AP & Boyd RL. Thymic stromal cells and positive selection. (2001). *APMIS*, **109**, 481–492.
23. Ciofani M & Zuniga-Pflucker JC. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. (2007). *Annu Rev Cell Dev Biol*, **23**, 463-493.
24. Cooper DNW. Galectinomics: finding themes in complexity. (2002). *Biochim Biophys Acta*, **1572**, 209-231.
25. Corrêa-de-Santana E, Paez-Pereda M, Theodoropoulou M, Kenji Nihei O, Gruebler Y, Bozza M, Arzt E, Villa-Verde DM, Renner U, Stalla J, Stalla GK & Savino W. Hypothalamus-pituitary-adrenal axis during *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice. (2006). *J Neuroimmunol*, **173**, 12-22.
26. Cotta-De-Almeida V, Bonomo A, Mendes-Da-Cruz DA, Riederer I, De Meis J, Lima-Quaresma KRF, Vieira-De-Abreu A, Villa-Verde DMS & Savino, W. *Trypanosoma cruzi* infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration. (2003). *Eur J Immunol* **33**, 2439-2448.

27. Cotta-De-Almeida V, Bertho AL, Villa-Verde DMS. & Savino W. Phenotypic and functional alterations of thymic nurse cells following *T. cruzi* infection. (1997). *Clin Immunol Immunopathol*, **82**, 125-131.
28. Crivellato E, Vacca A & Ribatti D. Settings the stage: an anatomist's view of the immune system. (2004). *Trends Immunol*, **25**, 210-217.
29. Dagher SF, Wang JL & Patterson RJ. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1213-1217.
30. Danguy A, Camby I & Kiss R. Galectins and cancer. (2002). *Biochim Biophys Acta*, **1572**, 285-293.
31. Dardenne M, Boukaiba N, Gagnerault MC, Homo-Delarche F, Chappuis P, Lemonnier D, Savino W. Restoration of the thymus in aging mice by in vivo zinc supplementation. (1993). *Clin Immunol Immunopathol*, **66**, 127-135.
32. Demotte N, Stroobant V, Courtoy PJ, Van Der Smissen P et al. Restoring the association of the T cell receptor with CD8 reverses anergy in human tumor-infiltrating lymphocytes. (2008). *Immunity*, **28**, 414-424.
33. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B & Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. (2001). *Nat Immunol*, **2**, 1032-1039.
34. DeVoss J, Hou Y, Johannes K, Lu W, Liou GI, Rinn J, Chang H, Caspi R, Fong L & Anderson MS. Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen. (2006). *J Exp Med*, **12**, 2727-2735.
35. Di Lella S, Sundblad V, Cerliani JP, Guardia CM, Estrin D, Vasta GR & Rabinovich. When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. (2011). *Biochemistry*, **50**, 7842-7857.
36. Dowling MR & Hodgkin PD. Why does the thymus involute? A selection-based hypothesis. (2009). *Trends Immunol*, **30**, 295-300.

37. Drickamer K & Taylor ME. Biology of animal lectins. (1993). *Annu Rev Cell Biol*, **9**, 237-264.
38. Dunic J, Dabelic S, Flöge, M., Galectin-3: an open-ended story. (2006). *Biochim Biophys Acta*, **176**,: 616-635.
39. Dunic J, Maravic G, Barisic K, Flögel M & Loaic G. Galectin-3 decreases in mice exposed to immobilization stress. (2000). *Stress*. **3**, 241-246.
40. Ebert LM, Schaerli P & Moser B. Chemokine-mediated control of T cells traffic in lymphoid and peripheral tissues. (2005). *Mol Immunol*, **42**, 799-809.
41. Elad-Sfadia G, Haklai R, Balan E, Kloog Y. Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 34922-34930.
42. Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, Vasta GR, Rabinovich GA. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. (2007). *Cell Mol Life Sci*, **64**, 1679-1700.
43. Eskandari F & Sternberg EM. Neural-immune interactions in health and disease. (2002). *Ann N Y Acad Sci*, **966**, 20–27.
44. Eude-le-Parco I, Gendronneau G, Dang T, Delacour D, Victor L, Thijssen VI, Edelmann W, Peuchmaur M & Poirier F. Genetic assessment of the importance of galectin-3 in cancer initiation, progression, and dissemination in mice. (2009). *Glycobiology*, **19**, 68–75.
45. Farias-de-Oliveira DA, Villa-Verde DMS, Panzenhagen PHN, Santos DS, Berbert LR, Savino W & De Meis J. Caspase-8 and caspase-9 mediate thymocyte apoptosis in *Trypanosoma cruzi* acutely-infected mice. (2013). *J Leukoc Biol*, **93**, no prelo.
46. Farnworth S., Henderson NC, Mackinnon AC, Atkinson KM, Wilkinson T, Dhaliwal K, Hayashi K, Simpson AJ, Rossi AG, Haslett C & Sethi T. (2008). Galectin-

3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function. *Am J Pathol*, **172**, 395-405.

47. Farr AG, Dooley JL & Erickson M. Organization of thymic medullary epithelial heterogeneity: implications for mechanisms of epithelial differentiation. (2002) *Immunol Rev*, **189**, 20–27.

48. Fernandez GC, Ilarregui JM, Rubel CJ, Toscano MA, Gomez SA, Beigier Bompadre M, Isturiz MA, Rabinovich GA & Palermo MS. Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways. (2005). *Glycobiology*, **15**, 519-527.

49. Flores KG, Li J, Sempowski GD, Haynes BF, Hale LP. Analysis of the human thymic perivascular space during aging. (1999). *J Clin Invest*, **104**, 1031–1039.

50. Fowlkes BJ & Scweighoffer E. Positive selection of T cells. (1995). *Curr Opin Immunol*, **7**, 188-195.

51. Fukumori T, Takenaka Y, Oka N, Yoshii T, Hogan V, Inohara H, Kanayama HO, Kim HR & Raz A. Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways.(2004). *Cancer Research*, **64**, 3376-3379.

52. Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim HRC, Hogan V, Inohara H, Kagawa S & Raz A. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. (2003). *Cancer Research*, **63**, 8302-8311.

53. Gabius HJ & Wu AM. The emerging functionality of endogenous lectins: A primer to the concept and a case study on galectins including medical implications. (2007). *Chang Gung Med J*, **29**, 37-62.

54. Gabius HJ. Cell surface glycans: the why and how of their functionality as biochemical signals in lectin-mediated information transfer. (2006). *Crit Rev Immunol*, **26**, 43–79.

55. Gallegos AM, Bevan MJ. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. (2004). *J Exp Med*, **200**, 1039–1049.
56. Ghazarian H, Idoni B & Oppenheimer SB. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. (2011). *Acta Histochem*, **113**, 236-247.
57. Goetzl EJ, Banda MJ & Leppert D. Matrix metalloproteinases in immunity. (1996). *J Immunol*, **156**, 1-4.
58. Gong HC, Honjo Y, Nangia-Makker P, Hogan V, Mazurak N, Bresalier RS & Raz A. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. (1999). *Cancer Res*, **59**, 6239–6245.
59. Gray DH, Abramson J, Benoist C, Mathis D. Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. (2007). *J Exp Med*, **204**, 2521–2528.
60. Gruver AL, Sempowski GD. Cytokines, leptin, and stress induced thymic atrophy. (2008). *J. Leukoc. Biol.* **84**, 915–925.
61. Haining WN, Angelosanto J, Brosnahan K, Ross K, Hahn C, Russell K, Drury L, Norton S, Nadler L, Stegmaier K. High-throughput gene expression profiling of memory differentiation in primary human T cells. (2008). *BMC Immunol.* **9**: 44.
62. Harman BC, Jenkinson EJ & Anderson G. Entry into the thymic microenvironment triggers notch activation in the earliest migrant T cell progenitors. (2003). *J Immunol*, **170**, 1299–1303.
63. Haudek KC, Spronk KJ, Voss PG, Patterson RJ, Wang JL & Arnoys EJ. Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm.(2010). *Biochim Biophys Acta*, **1800**, 181-9.
64. Haynes BF, Hale LP. The human thymus. A chimeric organ comprised of central and peripheral lymphoid components. (1998). *Immunol Res*, **18**,175–192.

65. Hirabayashi J, Kasai K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. (1993). *Glycobiology*, **3**:297-304.
66. Holländer G, Gill J, Zuklys S, Iwanami N, Liu C & Takahama Y. Cellular and molecular events during early thymus development. (2006). *Immunol Rev*, **209**, 28–46.
67. Hsu DK & Liu FT. Regulation of cellular homeostasis by galectins. (2004). *Glycoconj J*, **19**, 507-515.
68. Hsu DK, Chen HY & Liu FT. Galectin-3 regulates T-cell functions. (2009). *Immunol Rev*, **230**, 114-127.
69. Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP *et al*. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses (2000). *Am J Pathol*, **156**, 1073-1083.
70. Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. (2001). *Biochimie*, **83**, 667-676.
71. Inohara H, Akahani S & Raz. Galectin-3 stimulates cell proliferation. (1998). *Exp Cell Res*, **245**, 294-302.
72. Jeng KCG, Frigeri, LG & Liu FT. An endogenous lectin, galectin-3 (εBP / Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes. (1994). *Immunol Lett*, **42**, 113-116.
73. Jenkinson WE, Jenkinson EJ & Anderson G. Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors. (2003). *J Exp Med*, **198**, 325-332.
74. Jondal M, Pazirandeh A & Okret S. Different roles for glucocorticoids in thymocyte homeostasis? (2004). *Trends Immunol*, **25**, 595-600.

75. Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. (2001). *J Leukoc Biol*, **69**, 555-564.
76. Kim CH & Broxmeyer HE. Cytokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. (1999). *J Leukoc Biol*, **65**, 6-15.
77. Kim CH, Pelus LM, White JR & Broxmeyer HE. Differential chemotactic behavior of developing T cells in response to thymic chemokines. (1998). *Blood*, **19**, 4434-4443.
78. Kim HR, Lin HM, Biliran H & Raz A. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. (1999). *Cancer Res*, **59**, 4148-4154.
79. Kinashi T. Integrin regulation of lymphocyte trafficking: lessons from structural and signaling studies. (2007). *Adv Immunol*, **93**, 185-227.
80. Klug DB, Carter C, Crouch E, Roop D, Conti CJ & Richie ER. Interdependence of cortical thymic epithelial cell differentiation and T-lineage commitment (1998). *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 11822-11827.
81. Krzeslak A & Lipinska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. (2004). *Cell Mol Biol Lett*, **9**: 305-328.
82. Kuwabara I, Liu FT. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. (1996). *J Immunol*, **156**, 3939-3944.
83. Kyewski B & Derbinski J. Self-apresentation in the thymus: an extended view. (2004). *Nat Rev Immunol*, **4**, 688-698.
84. Laderach DJ, Compagno D, Toscano MA, Croci DO, Dergan-Dylon S, Salatino M & Rabinovich GA. Dissecting the signal transduction pathways triggered by galectin-glycan interactions in physiological and pathological settings. (2010). *IUBMB Life*, **62**, 1-13.

85. Laiosa CV, Stadtfeld M, Xie H, De- Andres-Aguayo L & Graf T. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. (2006). *Immunity*, **25**, 731-744.
86. Lee YJ, Song YK, Song JJ, Siervo-Sassi RR, Kim HR, Li L, Spitz DR, Lokshin A & Kim JH. Reconstitution of galectin-3 alters glutathione content and potentiates TRAIL-induced cytotoxicity by dephosphorylation of Akt. (2003). *Exp Cell Res*, **288**, 21-34.
87. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. (2004). *Glycoconj J*, **19**, 433-440.
88. Li J, Iwanmi N, Hoa VQ, Furutani-Seiki M & Takahama Y. Noninvasive intravital imaging of thymocyte dynamics in medaka. (2007). *J Immunol*, **179**, 1605-1615.
89. Lin HM, Moon BK, Yu F & Kim HRC. Galectin-3 mediates genistein-induced G(2)/M arrest and inhibits apoptosis. (2000). *Carcinogenesis*, **21**, 1941-1945.
90. Lind EF, Prockop SE, Porritt HE & Petrie HT. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. (2001). *J Exp Med*, **194**, 127-134.
91. Liu C, Saito F, Liu Z, Lei Y, Uehara S, Love P, Lipp M, Kondo S, Manley N & Takahama Y. Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. (2006). *Blood*, **108**, 2531-2539.
92. Liu, F.T. Galectins: a new family of regulators of inflammation. (2000). *Clin Immunol*, **97**, 79-88.
93. Liu FT, Patterson, RJ & Wang, JL. Intracellular functions of galectins. (2002). *Biochim Biophys Acta* **1572**, 263-273.

94. Liu L, Sakai T, Sano N, Fukui K. Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor kappaB signalling. (2004). *Biochem J*, **380**, 31-41.
95. Liu FT & Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumor progression. (2005). *Nat Rev Cancer*, **5**, 29-41.
96. Liu FT & Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. (2010). *Ann NY Acad Sci*, **1183**, 152-182.
97. Livak F, Tourigny M, Schatz DG & Petrie HT. Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development. (1999). *J Immunol*, **162**, 2575-2580.
98. Lu M, Tayu R, Ikawa T, Masuda K, Matsumoto I, Mugishima H, Kawamoto H & Katsura Y. The earliest thymic progenitors in adults are restricted to T, NK, and dendritic cell lineage and have a potential to form more diverse TCRbeta chains than fetal progenitors. (2005). *J Immunol*, **175**, 5848-5856.
99. Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, Van-den-Brink MRM, Boyd R & Sempowski GD. Thymic involution and immune reconstitution. (2009). *Trends Immunol*, **30**, 366-373.
100. Maldonado CA, Sundblad V, Salatino M, Elia J, Garcia LN, Leimgruber C, Croci DO & Rabinovich GA. Cell-type specific regulation of galectin-3 expression by glucocorticoids in lung Clara cells and macrophages. (2011). *Histol Histopathol*. **26**, 747-759.
101. Martins VC, Ruggiero E, Schlenner SM, Madan V, Schmidt M, Fink PJ, von Kalle V & Rodewald HR. Thymus-autonomous T cell development in the absence of progenitor import. (2012). *J Exp Med*, **209**, 1409-1417.
102. Massa SM, Cooper DN, Leffler H, Barondes SH. L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity. (1993). *Biochemistry*, **32**, 260-267.

103. Meireles-de-Souza LR, Trajano V & Savino W. Is There an interspecific diversity of the thymic microenvironment? (1993). *Dev Immunol*, **3**, 123-135.
104. Mendes-Da-Cruz DA, De Meis J, Cotta-De-Almeida V & Savino W. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection alters the shaping of the central and peripheral T-cell repertoire (2003). *Microbes Infect*, **5**, 824-831,
105. Mendes-da-Cruz DA, Smaniotto S, Keller AC, Dardenne M & Savino W. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. (2008). *J Immunol*, **180**, 4639–4647.
106. Menon RP & Hughes RC. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. (1999). *Eur J Biochem*, **264**, 569-576.
107. Mensah-brown EPK, A Rabesi Z.; Shahin A.; Al Shamsi M, Arsenijevic N, Hsu DK, Liu FT & Lukic ML. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. (2009). *Clin. Immunol.* **130**, 83–88.
108. Mick VE, Starr TK, McCaughtry TM, McNeil LK & Hogquist KA The regulated expression of a diverse set of genes during thymocyte positive *in vivo*. (2004). *J Immunol*, **173**, 5434-5444.
109. Misslitz A, Pabst O, Hintzen G, Ohl L, Kremmer E, Petrie H. & Forster R. Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. (2004). *J Exp Med*, **200**, 481-491.
110. Mori K, Itoi M, Tsukamoto N, Kubo H & Amagai T. The perivascular space as a path of hematopoietic progenitor cells and mature T cell between the blood circulation and the thymic parenchyma. (2007). *Int Immunol*, **19**, 745-753.
111. Möroy T & Karsunky H. Regulation of pre-T-cell development. (2000). *Cell Mol Life Sci*, **57**, 957–975.

112. Nicolas JF, Reano A, Kaiserlian D & Thivolet J. Epithelial cell heterogeneity in mammalian thymus: Monoclonal antibody to high molecular weight keratins exclusively binds to Hassall's corpuscles. (1989). *Histochem J*, **21**, 357-364.
113. Nishino M, Ashiku SK, Kocher ON, Thurer RL, Boisselle MP & Hatabu H. The Thymus: a comprehensive review. (2006). *RadioGraphics*, **26**, 335-348.
114. Ochieng J, Leite-Browning ML, Warfield P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. (1998). *Biochem Biophys Res Commun*, **246**, 788-791.
115. Ochieng J, Furtak V & Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. (2004). *Glycoconj J*, **19**, 527-535.
116. Oka N, Nakahara S, Takenaka Y, Fukumori T, Hogan V, Kanayama HO, Yanagawa T & Raz A. Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells. (2005). *Cancer Res*, **65**, 7546-7553.
117. Oliveira, FL, Frazão, P, Chammas, R, Hsu, DK, Liu, FT, Borojevic, R, Takya, CM, El-Cheikh, MC. Kinetics of mobilization and differentiation of lymphohematopoietic cells during experimental murine shistosomiasis in galectin-3^{-/-} mice. (2007). *J Leucoc Biol* **82**, 300-310.
118. Oliveira FL, Chammas R, Ricon L, Fermino ML, Bernardes ES, Hsu DK, Liu FT, Borojevic R & El-Cheikh MC. Galectin-3 regulates peritoneal B1-cell differentiation into plasma cells. (2009). *Glycobiology*, **19**, 1248-1258.
119. Papiernik , Nabarra B, Savino W, Pontoux C, Barbey S, Thymic reticulum in mice. II. Culture and characterization of nonepithelial dendritic cells. Their role in the syngeneic stimulation of thymic medullary lymphocytes. (1983). *Eur J Immunol*, **13**, 147– 155.

120. Peaudecerf L, Lemos S, Galgano A, Krenn G, Vasseur F, Di Santo JP, Ezine S, Rocha B. Thymocytes may persist and differentiate without any input from bone marrow progenitors. (2012). *J Exp Med*, **209**, 1401-1408.
121. Petrie HT. Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. (2003). *Nat Rev Immunol*, **3**, 859-866.
122. Petrie HT & Zuniga-Pflucker JC. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. (2007). *Annu Rev. Immunol*, **25**, 649-679.
123. Pezzano M, Samms M, Martinez M & Guyden J. Questionable Thymic Nurse Cell. (2001). *Microbiol Mol Biol Rev*, **65**, 390–403.
124. Pfoertner S, Jeron A, Probst-Kepper M, Guzman CA, Hansen W, Westendorf AM, Toepfer T, Scradler AJ, Franzke A, Buer J & Geffer F. Signatures of human regulatory T cells: an encounter with old friends and new players. (2006). *Genome Biol* **7**, R54.
125. Pido-Lopez J, Imami N, Aspinall R. Both age and gender affect thymic output: more recent thymic migrants in females than males as they age. (2001). *Clin Exp Immunol*, **125**, 409–413.
126. Plotkin J, Prockop SE, Lepique A & Petrie HT. Critical Role for CXCR4 Signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. (2003). *J Immunol*, **171**, 4521–4527.
127. Proietto AI, Van Dommelen S & Wu L. The impact of circulating dendritic cells on the development and differentiation of thymocytes. (2009). *Immunol. Cell Biol*, **87**, 39–45.
128. Qiao S, Chen L, Okret S & Jondal M. Age-related synthesis of glucocorticoids in thymocytes. (2008). *Exp Cell Res*. **314**, 3027-3035.
129. Rabinovich GA & Vidal M. Galectins and microenvironmental niches during hematopoiesis (2011). *Curr Opin Hematol*, **18**, 443-451.

130. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu F. & Iacobelli S. Galectins and their ligands: amplifiers, silences or tuners of the inflammatory response? (2002). *Trends Immunol*, **23**, 313-320.
131. Rabinovich GA, Castagna LF, Landa CA, Riera CM & Sotomayor CE. Regulated expression of a 16 kDa galectin-like protein in activated rat macrophages. (1996). *J Leucoc Biol*, **59**, 363-370.
132. Radtke F, Ferrero I, Wilson A, Lees R, Aguet M & MacDonald, HR. Notch 1 deficiency dissociates the intrathymic development of dendritic cells and T cells. (2000). *J Exp Med*, **191**, 1085-1094.
133. Rao SP, Wang Z, Zuberi RI, Sikora L, Bahaie NS, Zuraw BL, Liu FT & Sriramarao P. Galectin-3 Functions as an Adhesion Molecule to Support Eosinophil Rolling and Adhesion under Conditions of Flow. (2007). *J Immunol*, **179**, 7800-7807.
134. Rossi FM, Corbel SY, Merzaban JS, Carlow DA, Gossens K, Duenas J, So L, Yi L & Ziltener HJ. Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. (2005). *Nat Immunol*, **6**, 626-634.
135. Rothenberg EV, Moore JE & Yui MA. Launching the T-cell-lineage developmental programme. (2008). *Nat Rev Immunol*, **8**, 9-21.
136. Samms M, Philip D, Emanus F, Osuji O, Pezzano M & Guyden JC. Lysosomal-mediated degradation of apoptotic thymocytes within thymic nurse cells. (1999). *Cell Immunol*, **197**, 108-115.
137. Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, Hirashima M & Liu FT. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. (2000) *J Immunol*, **165**, 2156-2164.
138. Sano H., Hsu DK, Apgar JR, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, Izui S. & Liu FT. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. (2003). *J Clin Invest*, **112**, 389-397.

139. Saran N, Lyszkiewicz M, Pommerencke J, Witzlau, Vakilzadeh R, Ballmaier M, vonBoehmer H & Krueger A. Multiple extrathymic precursor contribute to T-cell development with different kinetics. (2010). *Blood*, **115**, 1137-1144.
140. Sato S & Hughes RC. Control of Mac-2 surface expression on murine macrophage cell lines. (1994). *Eur J Immunol*, **24**, 216–222.
141. Sato S, Ouellet N, Pelletier I et al. Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. (2002). *J Immunol*, **168**, 1813–1822.
142. Sato S & Nieminen J. Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity. (2004). *Glycoconj J*, **19**, 583-591.
143. Savino W, Cirne-Lima EO, Soares JFT, Leite-de-Moraes C, Ono IPC & Dardene M. Hydrocortisone increases the numbers of KL1+ cells, a discrete thymic epithelial cell subset characterized by high molecular weight cytokeratin expression. (1986). *Endocrinology*. **126**, 2557-2564.
144. Savino W, Villa-Verde DMS & Lannes-Vieira J. Extracellular matrix proteins in intrathymic T cell migration and differentiation ? (1993). *Immunol Today*, **14**, 158-161.
145. Savino W & Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. (2000) *Endocr Rev*, **21**, 412-443.
146. Savino W, Dalmau SR & Cotta-de-Almeida V. Role of extracellular matrix-mediated interactions in thymocyte migration. (2000). *Develop Immunol*, **7**, 279-291.
147. Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Silva JS, Dardenne M & Cotta-de-Almeida V. Intrathymic T cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? (2002). *Trends Immunol*, **23**, 305–313.
148. Savino W, Ayres Martins S, Neves-dos-Santos S, Smaniotto S, Ocampo JS, Mendes-da-Cruz DA, Terra-Granado E, Kusmenok O & Villa-Verde DM. Thymocyte migration: na affair of multiple cellular interaction? (2003). *Braz J Med Biol Res*, **36**, 1015-1025.

149. Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Smaniotto S, Silva-Monteiro E & Villa-Verde DMS. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. (2004). *J Leukoc Biol*, **75**, 951-961.
150. Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. (2006). *PLoS Pathog*, **2**, 62, 472-483.
151. Schmitt TM, Ciofani M, Petrie HT & Zúñiga-Pflucker JC. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent Notch Receptor–Ligand Interactions. (2004). *J Exp Med*, **16**, 469–479.
152. Schwars BA & Bhandoola A. Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis. (2006). *Immunol Rev*, **209**, 47-57.
153. Shalom-Feuerstein R, Cooks T, Raz A, Kloog Y. Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells. (2005). *Cancer Res*, **65**, 7292-7300.
154. Sharon N & Lis H. Carbohydrates in cell recognition. (1993). *Sci Am*, **268**, 82-89.
155. Silva-Monteiro E, Lorenzato LR, Nihei OK, Junqueira M, Rabinovich GA, Hsu DK, Liu FT, Savino W, Chammas R & Villa-Verde DMS. Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. (2007). *Am J Pathol* **170**, 546-556,
156. Smaniotto S, de Mello-Coelho V, Villa-Verde DM, Pléau JM, Postel-Vinay MC, Dardenne M & Savino W. Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. (2005). *Endocrinology*, **146**, 3005-3017.
157. Stillman BN, Hsu DK, Pang M et al. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. (2006). *J Immunol*, **176**, 778–789.

158. Suhr CD & Sprent J. T-cell apoptosis detect in situ during positive and negative selection in the thymus. (1994). *Nature*, **372**, 100-103.
159. Sundbland V, Croci DO & Rabinovich GA. Regulated expression of galectin-3, a multifunctional glycan-binding protein, in haematopoietic and non-haematopoietic tissues. (2011). *Histol Histopathol*, **26**, 247-265.
160. Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. (2006). *Nat Rev Immunol*, **6**, 127-135.
161. Takeoka Y, Chen, SY, Yago H, Boyd R, Suehiro S, Shultz LD, Ansari AA & Gershwin, ME. (1996). The murine thymic microenvironment: changes with age. *Int Arch Allergy Immunol*, **111**, 5-12.
162. Takeoka Y, Taguchi N, Shultz L, Boyd RL, Naiki M, Ansari AA & Gershwin ME. (1999). Apoptosis and the thymic microenvironment in murine lupus. *J Autoimmun*, **13**, 325-334.
163. Taub DD & Longo DL. Insights into thymic aging and regeneration. (2005). *Immunol Rev*, **205**, 72-93.
164. Tribulatti, M.V.; Mucci, J.; Cattaneo, V.; Agüero, F., Gilmartin, T.; Head, S.R. & Campetella, O. Galectin-8 induces apoptosis in the CD4(high)CD8(high) thymocyte subpopulation. (2007). *Glycobiology*, **17**, 1404-1412.
165. Uehara S, Hayes SM, Li L, El-Khoury D, Canelles M, Fowlkes BJ & Love PE. Premature expression of chemokine receptor CCR9 impairs T cell development. (2006). *J Immunol*, **176**, 75-84.
166. Ueno T, Saito F, Gray DH, Kuse S, Hieshima K, Nakano H, Kakiuchi T, Lipp M, Boyd RL & Takahama Y. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. (2004). *J Exp Med*, **200**, 493-505.
167. Vacchio MS, Lee JY & Ashwell JD. Thymus-derived glucocorticoids set the thresholds for thymocyte selection by inhibiting TCR-mediated thymocyte activation. (1999). *J Immunol*. **163**, 1327-1333.

168. Van den Brule FA, Fernandez PL, Buicu C, Liu FT, Jackers P, Lambotte R & Castronovo V. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 during first trimester human embryogenesis. (1997). *Dev Dyn*, **209**, 399-405.
169. Varas A, Jimenez E, Sacedon R, Rodriguez-Mahou M, Maroto E, Zapata AG & Vicente A. Analysis of the human neonatal thymus: evidence for a transient thymic involution (2000). *J Immunol*, **164**, 6260-6267.
170. Vasta GR. Roles of galectins in infection. (2009). *Nat Rev Microbiol*, **7**, 424-438.
171. Villa-Verde DMS, Lagrota-Cândido JM, Vannier-Santos MA, Chammas R, Brentani RR & Savino W. Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment. IV. Modulation of thymic nurse cells by extracellular matrix ligands and receptors. (1994). *Eur J Immunol*, **24**, 659-664.
172. Villa-Verde DMS, Mello-Coelho V, Lagrota-Candido JM, Chammas R & Savino W. The thymic nurse cell complex: an in vitro model for extracellular matrix-mediated intrathymic T cell migration. (1995). *Braz J Med Biol Res*, **28**, 907-912.
173. Villa-Verde DM, Silva-Monteiro E, Jasiulionis MG, Farias-De-Oliveira DA, Brentani RR, Savino W & Chammas R. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. (2002). *Eur J Immunol*, **32**, 1432-1444.
174. von Boehmer H. Selection of T-cell repertoire: receptor-controlled checkpoints in T-cell development. (2004). *Adv Immunol*, **84**, 201-238.
175. von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE & Murray R. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. (1995). *J Exp Med*, **181**, 1519-1526.
176. Wada, J.; Ota, K.; Kumar, A.; Wallner, E.I. & Kanwar, Y. Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin. (1997). *J Clin Invest*, **99**, 2452-2461.

177. Wang H, Pierce LJ & Spangrude GJ. Distinct roles of IL-7 and stem cell factor in the OP9-DL1 T-cell differentiation cultures system. (2006). *Exp Hematol*, **34**, 1730-1740.
178. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito H, Wang YH, Cao W & Liu YJ. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD41CD251 regulatory T cells in human thymus. (2005). *Nature*, **436**, 1181-1185.
179. Webb O, Kelly F, Benitez J, Parker M, Martinez M, Samms M, Blake A, Pezzano M & Guyden JC. The identification of thymic nurse cells in vivo and the role of cytoskeletal proteins in thymocyte internalization. (2004). *Cell Immunol*, **228**, 119-129.
180. Wekerle H & Ketelsen UP. Thymic nurse cells Ia-bearing epithelium involved in T-lymphocyte differentiation? (1980). *Nature*, **283**, 402-404.
181. Wilkinson B, Owen JJ & Jenkinson EJ. Factors regulating stem cell recruitment to the fetal thymus. (1999). *J Immunol*, **162**, 3873-3881.
182. Witt CM & Robbins K. Tracking thymocyte migration *in situ*. (2005). *Semin Immunol*, **17**, 421-430.
183. Wylie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation (1980). *Nature*, **284**, 555-556.
184. Yamaoka A, Kuwabara I, Frigeri LG, & Liu FT. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. (1995). *J Immunol*, **154**, 3479-3487.
185. Yang RY, Hsu DK & Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. (1996). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6737-6742.
186. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. (2008). *Expert Rev Mol Med* **10(17)**, 1-24.

187. Yin X, Chtanova T, Ladi E & Robey EA. Thymocyte motility: mutants, movies and migration patterns. (2006). *Curr Opin Immunol*, **18**, 191-197.
188. Yu F, Finley RLJr, Raz A & Kim HRC. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. (2002) *J Biol Chem*, **277**, 15819-15827.