



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARIA AMÁLIA CAVINATO NASCIMENTO

“IMUNOLocalização de GALECTINA-3 NA
SÍNFISE PÚBLICA DE CAMUNDONGOS DURANTE A
PRENHEZ E PÓS-PARTO”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Maria Amália Cavinato Nascimento
Paulo Pinto Joazeiro
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Campinas, 2009

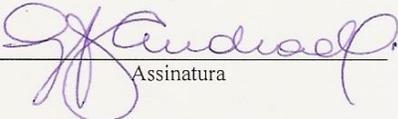
Campinas, 23 de outubro de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Celia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade


Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Roque Barreira


Assinatura

Profa. Dra. Olga Maria de Toledo Correa

Assinatura

Profa. Dra. Elia Tamaso Espin Garcia Calzolari

Assinatura

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

N17i	<p>Nascimento, Maria Amália Cavinato Imunolocalização de galectina-3 na sínfise púbica de camundongos durante a prenhez e pós-parto / Maria Amália Cavinato Nascimento. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientador: Paulo Pinto Joazeiro. Mestrado (dissertação) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Sínfise púbica. 2. Galectina-3. 3. Prenhez. I. Joazeiro, Paulo Pinto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(scs/ib)</p>
-------------	--

Título em inglês: Immunolocalization of galectin-3 in mouse pubic symphysis during pregnancy and post-partum.

Palavras-chave em inglês: Pubic symphysis; Galectin-3; Pregnancy.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Paulo Pinto Joazeiro, Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade, Maria Cristina Roque-Barreira.

Data da defesa: 23/10/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

**Dedico este trabalho aos meus pais
Walter e Luzia e ao meu irmão Gregório**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UNICAMP e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade.

À CAPES e ao FAEPEX pelo apoio financeiro indispensável para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro, pela atenção, carinho, oportunidade e por acreditar no meu potencial.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas, por gentilmente me ceder os anticorpos essenciais para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade. Orientadora, mãe, amiga à quem eu devo grande parte da minha paixão pela Biologia Celular.

À Profa. Dra. Maria Cristina Roque-Barreira, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por ter aceitado fazer parte da minha pré banca e da banca e ter contribuído tão gentilmente com sugestões para o enriquecimento do meu trabalho.

À Profa. Dra. Olga Maria de Toledo Correa pela disponibilidade de fazer parte da minha pré-banca.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia.

Ao técnico e amigo Juvani, meu oráculo. A quem eu devo muito deste trabalho. Sem a sua atenção, paciência e carinho este trabalho não seria possível.

Às secretárias Rita (DHE) e Liliam (DBC), pela paciência e eficiência.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e a todas as suas funcionárias, pelo carinho e atenção.

À colega e amiga Renata, por toda dedicação e disponibilidade em me ajudar e me ensinar sempre.

A todos os amigos e colegas de departamento, em especial àqueles que estiveram ao meu lado tornando o trabalho e os dias no departamento muito mais agradáveis. Carla, pelas risadas, bobearias, companheirismo, comilanças, confiança e pelas intermináveis conversas. Julio, meu grande companheiro e amigo para todas as horas, pela diversão, por me jogar maravalha e ser tão responsável e divertido. Karina, Patrícia, Juarez, Patrick, Junia, Débora, Carol, Silvio, Petra, Aline, Marlúcia, Eliana e Camila, muito obrigada pela amizade e companheirismo.

Aos grandes e eternos amigos de graduação Alexandre, Tiago, Gabriela, Estevan, Fabiana, Amanda, Leonardo, Carolina, Rafael, Vinícius e Wagner, que mesmo estando longe sempre me apoiaram. Com vocês eu compartilhei os momentos mais divertidos e inesquecíveis da minha vida.

A grande amiga Tatianne, de quem me aproximei em Campinas, e que se tornou uma irmã. Por todas as risadas, baladas e descoladas.

Aos amigos Marcos e Rafael, por me acolherem de braços abertos na minha chegada e estadia em Campinas

Ao meu irmão Gregório, pelo amor e cumplicidade.

E finalmente, e mais importante, aos meus pais, Walter e Luzia, pelo amor, suporte, dedicação, desprendimento. A eles devo tudo que sou e tudo que conquistei.

“Como se pode ver, não são as respostas que movem o mundo,
mas sim as perguntas.” (Autor desconhecido)

RESUMO:

É reconhecido que a sínfise púbica de algumas espécies de mamíferos, incluindo camundongos, passa por transformações estruturais durante a prenhez e no período pós-parto. Estas transformações incluem o surgimento de um ligamento interpúbico e o amolecimento deste tecido nos dois últimos dias antes do parto. Este ligamento permite a separação dos ossos púbicos, garantindo a passagem segura do feto pelo canal de parto. Após o parto ocorre a involução deste ligamento. Ambos os períodos de remodelação tecidual envolvem grandes modificações da matriz extracelular e de seus componentes, bem como um balanço entre proliferação e morte celular programada.

A galectina-3, uma lectina animal com especificidade de ligação por β -galactosídeos, é uma proteína amplamente distribuída entre diferentes tipos de células e tecidos, podendo ser encontrada dentro das células tanto no núcleo quanto no citoplasma, ou ainda na superfície celular ou no espaço extracelular. Através de interações específicas com diversos ligantes intra e extracelulares, a galectina-3 participa de numerosos processos fisiológicos e patológicos, como por exemplo, desenvolvimento, reações imunes, controle do ciclo celular, apoptose e metástase.

Este estudo teve como objetivo localizar a expressão de galectina-3 nas populações celulares que compõem esta articulação durante o período de prenhez, a fim de investigar seu possível envolvimento nos processos de remodelação da sínfise.

Foi observado que a galectina-3 está presente em todas as populações celulares que compõem a sínfise púbica e o ligamento interpúbico de todos os grupos estudados. Além disso, a galectina-3 é co-localizada com a α -actina de músculo liso em alguns tipos celulares. A quantificação da detecção de galectina-3 nos permitiu observar que ela é expressa em diferentes concentrações durante o período estudado.

Esses resultados nos permitiram concluir que a galectina-3 parece estar envolvida na remodelação da sínfise púbica, através de sua participação na ativação de células semelhantes a fibroblastos, no ciclo celular, na diferenciação e nos processos de morte celular programada.

ABSTRACT:

It is recognized that the pubic symphysis of some mammal species, including mice, undergoes structural transformations during pregnancy and post-partum. These transformations include the emerging of an interpubic ligament and softening of this tissue in the two last days of pregnancy. This ligament allows the pelvic bones separation, warranting fetus self passage through the birth channel. After delivery this ligament involutes. Both periods of tissue remodeling involve changes in extracellular matrix and its components, as so a balance between cell proliferation and death.

Galectin-3, an animal lectin with specificity for β -galactosídes, is widely spread among different types of cells and tissues, thus being found inside the cells in the cytoplasm and in the nucleus, on cell surface or in the extracellular space. Through specific interactions with a variety of intra and extracellular ligands galectin-3 participates of numerous physiological and pathological processes, like for example, development, immune reactions, cell cycle control, apoptosis and metastasis.

This research had the objective to localize galectin-3's expression in mouse pubic symphysis cells during pregnancy, and to investigate its involvement in the pubic remodeling process.

It was observed that galectin-3 is present in all pubic cells populations of all of the studied groups. Besides that, galectin-3 is colocalized with α -smooth muscle actin in some cell types. Quantifying of galectin-3 detection revealed that this protein is expressed in different concentrations during the studied period.

These results allowed us to conclude that galectin-3 seems to be involved in mouse pubic symphysis remodeling, probably working in the activation of fibroblast like cells, on cell cycle, on differentiation and in the processes of programmed cell death.

Conteúdo

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA SÍNFISE PÚBLICA DO CAMUNDONGO	13
1.2 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO RELAXAMENTO INTERPÚBLICO DE CAMUNDONGO DURANTE A PREENHEZ E PÓS-PARTO	14
1.3 BIOATIVIDADE DAS CÉLULAS DA SÍNFISE PÚBLICA	15
1.4 EXPRESÃO DAS GALECTINAS NO SISTEMA MÚSCULO-ESQUELÉTICO	17
2. OBJETIVOS:	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS:	26
3.1 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO CONVENCIONAL	27
3.2 MÉTODO IMUNOPEROXIDASE INDIRETA	28
3.3 MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	29
3.4 CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DE PROTEÍNAS PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING	29
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4. RESULTADOS:	32
4.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS TECIDOS QUE COMPÕEM A SÍNFISE PÚBLICA	33
4.2 A GALECTINA-3 ESTÁ PRESENTE EM TODOS OS TIPOS CELULARES QUE COMPÕEM A SÍNFISE PÚBLICA E O LIGAMENTO INTERPÚBLICO DURANTE O PERÍODO ESTUDADO	35
4.3 A GALECTINA-3 ESTÁ LOCALIZADA TANTO NO NÚCLEO QUANTO NO CITOPLASMA DAS POPULAÇÕES CELULARES QUE COMPÕEM A SÍNFISE E APARECE CO-LOCALIZADA COM A ALFA ACTINA DE MÚSCULO LISO EM ALGUMAS OCASIÕES	37
4.3.1. Imunoexpressão de Galectina-3	37

4.3.2 Co-localização de galectina-3 e alfa actina de musculo liso	39
4.4 ASPECTOS QUANTITATIVOS DA EXPRESSÃO DA GALECTINA-3 ENTRE OS GRUPOS ESTUDADOS	40
5. <i>DISCUSSÃO</i>	42
6. <i>CONCLUSÕES:</i>	50
7. <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</i>	52
8. <i>FIGURAS</i>	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA SÍNFISE PÚBICA DO CAMUNDONGO

Os maiores componentes do sistema músculo-esquelético são os ossos, os tecidos cartilagosos, os tecidos fibrosos, o tecido adiposo e o músculo esquelético. Esses tecidos se distinguem dos demais por diversos aspectos incluindo as moléculas orgânicas produzidas por suas células, que desempenham papéis chave na homeostase dos organismos (Freemont & Hoyland, 2007).

As articulações ou juntas são uniões funcionais que ocorrem entre todas as partes rígidas do esqueleto, sejam ossos ou cartilagens e são consideradas componentes do sistema músculo-esquelético. Elas permitem, não somente a união entre essas estruturas, mas também a mobilidade entre essas partes. O termo sínfise, de origem grega, significa “crescendo junto”, é uma denominação bastante apropriada para descrever a articulação que está localizada na confluência dos ossos púbicos (Gamble et al., 1986; Gray, 1988). A classificação anatômica da articulação entre ossos púbicos é variável entre mamíferos bem como depende da espécie, idade, sexo e estágio reprodutivo do indivíduo estudado (Ortega et al, 2003).

A sínfise púbica de camundongos é uma articulação não sinovial e anfiartrodial na qual os ossos púbicos são conectados por um disco fibrocartilaginoso situado entre dois coxins de cartilagem hialina (Gamble et al, 1986). Esta estrutura é revestida dorsal e ventralmente por tecido conjuntivo denso que se continua com o pericôndrio das cartilagens. O conjunto confere grande estabilidade à articulação. A sínfise púbica é importante por que mantém a integridade mecânica da região pélvica e, como a maioria das articulações, serve como uma barreira à invasão tumoral (Gamble et al, 1985).

Os tecidos músculo-esqueléticos estão em constante remodelação, e até o que se sabe, cada um deles apresenta uma população de células-tronco que permite a regeneração e o reparo destes tecidos durante a vida dos organismos (Freemont & Hoyland, 2007).

1.2 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO RELAXAMENTO INTERPÚBICO DE CAMUNDONGO DURANTE A PREENHIZ E PÓS-PARTO

O relaxamento da região púbica durante a gestação foi documentado pela primeira vez por Le Gallois em 1812, que percebeu que as cabeças dos fetos de cobaia eram aproximadamente duas vezes maiores do que o canal pélvico da mãe e que a passagem segura dos fetos por este canal decorria da formação de um ligamento extensível entre os dois ossos púbicos. (Thoms, 1936).

De fato, durante a prenhez a separação dos ossos pélvicos se faz necessária para a passagem segura dos fetos pelo canal de parto em cobaias e camundongos (Talmage, 1947 a-b; Hall, 1947; Ham, 1972). Para isso, os tecidos que compõem a sínfise púbica passam por intenso processo de remodelação durante o período gestacional e logo após o parto. Em algumas espécies de mamíferos, especialmente camundongos (Hall, 1947; Crelin, 1969), cobaias (Talmage, 1947) e morcegos (Crelin, 1969), ocorre uma “transformação” da sínfise púbica em um ligamento extensível, caracterizado tanto pela deposição de matriz extracelular, quanto pela expansão e diferenciação de populações celulares do tecido conjuntivo. As modificações da sínfise nestes modelos compreendem a separação dos ossos púbicos, induzida especialmente pelo estrógeno, e o relaxamento da região central fibrocartilaginosa, atribuído à relaxina (Sherwood, 2005).

Inicialmente neste processo as extremidades mediais dos ossos púbicos e os coxins cartilagosos são parcialmente reabsorvidos. Nessas condições os condrócitos e fibroblastos da sínfise secretam quantidades crescentes de componentes de matriz. Ao mesmo tempo inicia-se a deposição de fibras colágenas altamente organizadas, ao longo do eixo da sínfise, formando um ligamento interpúbico (Hall 1947; Pinheiro et al, 2004). Estudos morfológicos e morfométricos dessa região em camundongos mostram que, durante a prenhez, a transição fibrocartilaginosa passa por transformações radicais, começando por uma estrutura de 0,2mm e alcançando 3mm no final do período gestacional (Talmage, 1947 a-b; Hall, 1947; Frieden & Hisaw, 1953; Storey, 1957; Krock et al., 1958; Schwabe et al., 1978; Whal et al., 1977; Sherwood, 1994).

Análises histológicas das alterações que ocorrem na sínfise púbica de camundongos prenhes sugerem que os condrócitos da sínfise púbica não correspondem a células fixas e completamente diferenciadas, mas estejam submetidas a um estado de modulação. Além disso,

acredita-se que sob determinados estímulos hormonais, os condrócitos possam ser revertidos a um estado semelhante de fibroblastos ou de células mesenquimais (Crelin, 1969).

A formação do ligamento interpúbico tem sido relacionada essencialmente a um processo de crescimento primário, no qual as células condrogênicas que saem de suas lacunas e os fibroblastos resultantes se arranjam de forma transversal ao longo do eixo das fibras colágenas (Crelin, 1969; Moraes et al., 2004). Após o parto, ocorre uma nova reorganização do tecido interpúbico, que resulta na involução do ligamento e no crescimento de um tecido fibrocartilaginoso. Ambos os períodos de remodelação tecidual envolvem grandes modificações da matriz extracelular e de seus componentes, alterando a composição e estrutura dos componentes colagênicos (Pinheiro et al., 2004), bem como a concentração e a disposição das proteoglicanas e glicosaminoglicanas (Pinheiro et al., 2003 & 2005), das fibras elásticas e dos elementos do citoesqueleto (Moraes et al., 2004). A remodelação tecidual também envolve um balanço dinâmico entre proliferação e morte celular programada (Veridiano et al., 2007).

Sabe-se que combinações de estrógeno e relaxina desempenham um papel central nas mudanças químicas e morfológicas que acontecem na sínfise púbica, cérvix, útero e nas glândulas mamárias durante a prenhez (Sherwood, 1994, para contribuições originais). A matriz extracelular desses tecidos também é susceptível a profundas mudanças, dentre as quais estão a remodelação e degradação das fibras colágenas, causadas pela ação de proteases – principalmente metaloproteinases (Rosa et al., 2008) - aumento na concentração de polissacarídeos hidratados, alterações no metabolismo de proteoglicanas e na tomada de água (Pinheiro et al., 2004-2005).

1.3 BIOATIVIDADE DAS CÉLULAS DA SÍNFISE PÚBLICA

O emprego de traçadores radioativos, *in vitro*, demonstrou que tanto os condrócitos e fibrocondrócitos das porções cartilaginosas (McMurtry et al., 1978) quanto os fibroblastos do ligamento interpúbico (Samuel et al., 1996; Kapila et al., 2008) expressam grande número de receptores para relaxina-2. Além disso, foi demonstrado que as células que apresentam maior número de receptores para relaxina também apresentam grande número de receptores α para estrógeno. Assim como o estrógeno, a relaxina é conhecida por ser um importante mediador da remodelação da matriz extracelular (Kapila et al., 2008). Ela age através da alteração da

concentração e organização de moléculas chave da matriz, da modulação de sua síntese, ou do aumento de sua degradação, associada à ativação da expressão de MMPs (Bani, 1997).

Postula-se que a relaxina atue de maneira parácrina no trato reprodutivo, causando remodelação do colágeno durante a prenhez (Bateman et al., 1998). Estudos *in vitro* de fibroblastos de derme humana sob efeito de um homólogo da relaxina favorecem a idéia de que esse hormônio atue sobre o colágeno (Bateman et al., 2009). A relaxina age como um potente modulador de fibroblastos, diminuindo significativamente a expressão do colágeno e, desta forma, contribui para a sua remodelação. A adição de relaxina a estas células aumenta os níveis de RNAm e das enzimas colagenases e diminui a concentração dos inibidores de MMPs; conseqüentemente, há queda da síntese e secreção do colágeno (Bateman et al., 1998).

Além disso, durante o processo de remodelação que ocorre na sínfise durante a prenhez, os fibroblastos do ligamento interpúbico passam a expressar grandes quantidades de α -actina de músculo liso, assumindo características fenotípicas de células semelhantes à miofibroblastos (Moraes et al., 2004). A diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos acontece da seguinte maneira: para repovoar tecidos danificados, os fibroblastos adquirem um fenótipo migratório através do desenvolvimento *de novo* de “pacotes” contráteis. Essas fibras de stress *in vivo* são inicialmente compostas por actinas citoplasmáticas e geram forças de tração relativamente fracas (Hinz et al., 2007). Estas células passam então a serem denominadas proto-miofibroblastos (Tomazek et al, 2002) . A aquisição de aparatos contráteis ocorre em resposta a mudanças na composição, organização e propriedades mecânicas da matriz extracelular (Hinz & Gabbiani, 2003b), e às citocinas liberadas no local por células inflamatórias e residentes (Werner & Groose, 2003). Com o aumento do stress na MEC gerado por sua própria atividade de remodelação, os “proto-miofibroblastos” transformam-se em “miofibroblastos diferenciados” que passam a expressar α -actina de músculo liso (α SMA) o marcador mais utilizado para sua caracterização. A expressão de α SMA é precisamente controlada pela ação conjunta de fatores de crescimento (como o TGF β 1), por proteínas especializadas da MEC bem como pela expressão de variantes do splicing da fibronectina, e do microambiente mecânico. A incorporação de α SMA nas fibras de stress aumenta significativamente a atividade contrátil de fibroblastos, e marca a fase contrátil da remodelação do tecido conjuntivo (Hinz et al., 2007).

Reconhecidamente, a remodelação de órgãos pélvicos durante a prenhez está intimamente relacionada a patologias no sistema urogenital durante o processo de envelhecimento,

particularmente no que diz respeito às falhas na homeostase de componentes da matriz extracelular (Liu *et al.*, 2004). Portanto, estudos que enfoquem o comportamento de condrócitos e fibroblastos, durante as extensas transformações pelas quais passam a sínfise púbica, podem contribuir para o conhecimento de aspectos da modulação celular no tecido conjuntivo que ocorrem em órgãos do aparelho reprodutor.

1.4 EXPRESÃO DAS GALECTINAS NO SISTEMA MÚSCULO-ESQUELÉTICO

Dentre as várias moléculas que exercem importante papel na interação célula matriz do tecido conjuntivo se destacam as galectinas, incluídas dentre as lectinas, de origem animal (Friedrichs *et al.*, 2008). Elas são definidas por seqüências de aminoácidos altamente conservadas evolutivamente e por reconhecerem β -galactosídeos (Barondes *et al.*, 1994b). São encontradas desde em espongiários, fungos, nematóides, insetos, vertebrados- inclusive em mamíferos (Hirabayashi, 1997)-, e foram identificadas mesmo em vírus (Cooper *et al.*, 1999). São encontradas na superfície celular e na matriz extracelular (Hughes, 1999), bem como no citoplasma e núcleo das células (Li *et al.*, 2006; Davidson *et al.*, 2002)

Os membros da família das galectinas compartilham uma seqüência cerne que consiste de aproximadamente 130 aminoácidos, que constituem o domínio de ligação a açúcares que contém β -galactosídeos. Estudos cristalográficos determinaram a estrutura da maioria das galectinas como apresentando dobramento globular constituído de duas folhas β -pregueadas. Cada uma dessas folhas é formada por cinco e seis fitas antiparalelas (Rini & Lobsanov, 1999; Houzelstein *et al.*, 2004). A ampla distribuição das galectinas, tanto em relação às espécies, quanto aos tecidos, sugere que elas desempenham diversos papéis nos organismos.

A comparação entre as seqüências polipeptídicas das diferentes galectinas sugere a divisão dessas glicoproteínas em subfamílias, baseadas no conteúdo e na organização dos seus domínios (Hirabayashi *et al.*, 2002). A família das galectinas compreende cerca de 14 membros, dentre os quais os mais bem estudados são as galectinas 1 e 3. As galectinas são conhecidas por participarem de diversos eventos biológicos, como embriogênese (Van Den Brûle *et al.*, 1997) , adesão e proliferação celular (Moutsatsos *et al.*, 1987; Kubawara *et al.*, 1996; Ochieng *et al.*, 1999) apoptose (Yang *et al.*, 1996; Akahani *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999; Mataresse *et al.*, 2000 Lin *et al.*, 2001; Moon *et al.*, 2001), *splicing* de mRNA (Dagher *et al.*, 1995; Mathieu *et al.*,

2005), colonização bacteriana e modulação da resposta imune (Lippert et al., 2008). Além disso, as galectinas desempenham papéis importantes em vários estados patológicos, incluindo doenças autoimunes, reações alérgicas, inflamação (Frigeri et al., 1993; Almkvist & Karlsson, 2004), progressão tumoral (Honjo et al., 2000; Mathieu et al., 2005), aterosclerose e complicações do diabetes (Nakahara et al., 2007)

Dentre as galectinas, a galectina-3 tem sido a mais estudada, devido aos seus diferentes papéis nos tecidos conjuntivos (Catt & Harrison, 1985) A molécula de galectina-3 é um monômero de aproximadamente 31kDa (Rini & Lobsanov, 1999). É uma glicoproteína solúvel, de ampla distribuição tecidual, sendo encontrada na pele, epitélio do trato respiratório e digestivo, em túbulos renais, em cardiomiócitos, em condrócitos hipertróficos, no fígado, monócitos, macrófagos, em fibroblastos e em uma grande diversidade de tumores (Van den Brùle et al, 1997, Colnot et al, 1999, 2001, Inohara et al, 1998).

O gene da gal-3 é composto por seis éxons e cinco introns (human locus 14q21-22). O exon I codifica a maior parte da seqüência 5' de RNAm não traduzida. O éxon II contém a outra porção da seqüência 5' não traduzida, além do sítio de iniciação de tradução da proteína e os primeiros 6 aminoácidos, incluindo a metionina inicial. A seqüência repetitiva do produto gênico N-terminal é codificada pelo exon III. Os éxons IV, V e VI codificam a porção C-terminal da proteína (Yang et al., 2008; Stock et al., 2003).

A estrutura da galectina-3 parece única entre todas as galectinas dos vertebrados. Ela é uma proteína quimérica constituída por uma única cadeia polipeptídica que forma três domínios distintos: um pequeno domínio amino-terminal composto por 12 aminoácidos responsável pelo endereçamento celular; um domínio semelhante à cadeia α_1 do colágeno do tipo II, contendo repetitivas seqüências de aminoácidos ricas em tirosina, prolina e glicina, que serve como substrato para a ação de metaloproteinases da matriz (gelatinases, MMP-2 e MMP-9 e colagenase-3, MMP-13) e um domínio carboxi-terminal com uma estrutura globular ligante de carboidrato (Yoshii et al, 2002, Ochieng et al, 1998).

O domínio N-terminal é altamente conservado entre as moléculas de galectina-3 isoladas de diferentes espécies. Além disso, a seqüência de aminoácidos apresenta cerca de 25% de homologia com algumas ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRNPs), o que corresponde ao mesmo grau de homologia que as hnRNPs apresentam entre si (Barboni et al., 2000) Apesar do domínio N-terminal não apresentar atividade de reconhecimento de

carboidratos, ele é essencial para a completa atividade biológica da galectina-3 (Barboni et al., 2000) Este domínio é reconhecido por ser responsável pela formação de homodímeros, pentâmeros (Yang et al, 2008a) ou hexâmeros (Almkvist & Karlsson, 2004). Gong e colaboradores (1999) afirmam que a deleção da porção NH₂ da galectina-3 está relacionada a perda da localização intranuclear desta proteína.

O domínio C-terminal, composto por cerca de 130 aminoácidos formando uma estrutura globular, acomoda todo o sítio de ligação à carboidratos, sendo responsável pela atividade de lectina da galectina-3 (Seetharaman et al., 1998., Hsu et al., 1992) Estudos recentes, obtidos por ressonância nuclear magnética sugerem uma provável interação entre o domínio N-terminal e o sítio de reconhecimento de carboidratos da galectina-3 (Yang et al., 2008). No domínio C-terminal da galectina-3 existe uma seqüência NWGR (Asp-Trp-Gly-Arg). Esta seqüência também é encontrada na família Bcl-2 de repressores de apoptose, e é responsável pela homo e heterodimerização dos polipeptídeos. A galectina-3 interage com a Bcl-2 e exibe atividade anti apoptótica (Yang et al., 1996, Yang et al., 2008)

Por conter um seqüência de ligação a carboidratos, a gal-3, assim como muitos outros membros da família das galectinas, age como um receptor para ligantes contendo especialmente seqüências de poli-N-acetilactosaminas, que, por sua vez, consistem em muitas unidades dissacarídicas: de N-acetilglicosaminas unidas por ligação β 1,3 a resíduos de β 1,4 galactose. A molécula de gal-3 também parece ter afinidade por resíduos de açúcares complexos, como ácido acetil neuramínico e fucose, quando unidos às caudas de poli-N-acetilactosaminas (Houzelstein et al., 2004)

A molécula de galectina-3 pode ser fosforilada nos resíduos de serina 6 e 12. A localização subcelular desta galectina está correlacionada com a sua fosforilação (Mathieu et al., 2005). A galectina-3 fosforilada em sua porção N-terminal pode ser encontrada tanto no citoplasma quanto no núcleo, enquanto que a sua forma não fosforilada é exclusiva do núcleo (Gong et al., 1999). Isso sugere que a fosforilação pode ser necessária para o transporte da galectina para o núcleo (Cowles et al, 1990). A galectina-3 humana é fosforilada pela caseína-quinase apenas em sua serina-6, e a fosforilação reduz significativamente a sua habilidade de ligação por seus ligantes, o que implica que a fosforilação funciona como uma forma de regulação da ligação da galectina-3 (Yoshii et al., 2002). As diversas funções da galectina-3

parecem estar associadas aos seus ligantes presentes nos diferentes tipos celulares e tecidos (Melo et al., 2007).

A galectina-3 é sintetizada nos polirribossomos livres do citoplasma e não apresenta seqüência sinal de translocação para o retículo endoplasmático (Mehul & Hughes, 1997). Apesar de não atravessar a rota retículo/Golgi, existe abundante evidência da existência de gal-3 no ambiente extracelular. Desta maneira, as galectinas parecem pertencer a uma pequena categoria de proteínas (que também inclui FGF-1 e -2) que são secretadas por mecanismos distintos daqueles que envolvem a clássica exocitose mediada por vesículas (Cooper, 2002). Mehul e Hughes (1997) sugerem que a galectina-3 seja secretada pelas células através de uma via nova e não completamente entendida chamada ectocitose, que é independente da via clássica, da qual participam RE e Golgi. Acredita-se que a informação para a secreção por esta via não clássica esteja contida na porção N-terminal da molécula, visto que fragmentos de gal-3 que contém apenas a porção C-terminal, não são secretados para o ambiente extracelular (Krześlak & Lipińska, 2004).

Estudos imunohistoquímicos demonstraram que o primeiro passo para a secreção de gal-3 é o seu acúmulo na porção citoplasmática da membrana plasmática. Este passo é fortemente ativado por proteínas “heat-shock” e ionóforos de cálcio. Sugere-se que a transferência da proteína para os domínios da membrana é mediada pelas proteínas “heat-shock” e outras chaperonas moleculares, o que poderia ser um determinante para um aumento de secreção em altas temperaturas. No entanto o passo mais importante para a secreção desta proteína parece ser a captura desta pelos domínios de membrana. O próximo passo para a secreção da gal-3 é o estrangulamento de evaginações de domínios de membrana e a liberação de vesículas no ambiente extracelular, sendo que dentro destas vesículas as moléculas de galectina-3 estão protegidas contra proteólise. A microscopia eletrônica demonstrou que estas vesículas são pequenas (medindo aproximadamente 0.5 μm) e morfologicamente heterogêneas (Hess et al., 1999; Gasser et al., 2003; Pilzer et al., 2005; Stein & Luzio, 1991; Lee et al., 1993).

A localização intracelular da galectina-3 está diretamente ligada ao seu papel na regulação do “splicing” nuclear do pré-mRNA e na proteção contra a apoptose. Por outro lado, sua localização extracelular na superfície celular e no ambiente extracelular demonstra a sua participação na adesão célula-célula e célula-matriz. (Hubert et al, 1995; Yoshii et al, 2002). A aplicação da proteômica em dois estudos recentes identificou a Gal-3 como componente de

fagossomos em macrófagos e exossomos em células dendríticas. Quando presente em fagossomos, a Gal-3 parece não estar envolvida na via endossômica lisossômica, mas sim com os mecanismos de apoptose. Ela também parece estar envolvida com apoptose quando encontrada em exossomos, que são pequenas vesículas imunoestimuladoras apresentadoras de antígenos, secretadas por vários tipos celulares, como por exemplo, as células dendríticas (Liu et al., 2002). Esta molécula também pode ser encontrada na superfície celular e na matriz extracelular. Uma vez secretadas, elas passam a funcionar como citocinas ou como moduladoras da função de citocinas (Oliveira et al., 2007) e ainda podem interagir com diversas moléculas da matriz como laminina (Ochieng and Warfield), elastina (Ochieng et al., 1999), fibronectina (Sasaki et al., 1998), e glicoproteínas de superfície celular, incluindo integrinas (Fukumori et al., 2003) CEA (Cvejic et al., 2000), CD66 (Feuk-Lagerstedt et al., 1999) e 90/Mac-2BP (Inohara et al., 1996) participando dos processos de reconhecimento celular (Yang & Liu, 2003; Dumic *et al.*, 2006; Villa-Verde et al 1995 – 2002). As galectinas presentes no núcleo, estariam envolvidas com o splicing de pré-mRNA (Mathieu, et al. 2005), formação do spliceossomo (Wang et al, 1995) e síntese de DNA (Hirabayashi, 2004; Patterson et al, 2004; Inohara et al, 1998).

No processo inflamatório, bem como em reações alérgicas agudas, a galectina-3 extracelular é reconhecidamente uma molécula com atividade proinflamatória potente (Frigeri et al., 1993; Almkist and Karlsson, 2004). Essa molécula é expressa em várias células inflamatórias, incluindo mastócitos, neutrófilos, macrófagos e eosinófilos (Colnot et al., 1998; Hsu et al., 2000; Gil et al., 2006) Ela estimula a produção de superóxidos pelos neutrófilos, potencializando a produção de IL-1 induzida por LPS pelos monócitos, e promove a quimiotaxia dessas células (Mandrell et al., 1994; Mey et al., 1996).

Observou-se que a galectina-3 pode afetar os estromas celulares de células tumorais, criando um micro-ambiente favorável à proliferação celular, o que poderia implicar nos mecanismos de metástase (Inohara et al, 1998, Hirabayashi, 2004, Brustmann, 2008). Além disso, essa molécula está envolvida nos processos de adesão homotípica de células tumorais e na promoção da adesão de neutrófilos a laminina (Van den Brûle et al., 1995). Em um trabalho sobre carcinoma de ovário, Brustmann (2008) avalia a imunexpressão de galectina-3 através de reações imunocitoquímicas comparando variáveis clinico-patológicas. Ele observou que a galectina-3 está especialmente localizada no citoplasma das células cancerosas e relaciona essa localização da galectina com a agressividade tumoral no ovário.

Em um estudo sobre fibrose hepática, Freemont e Hoyland (2007) afirmaram que a galectina-3 está diretamente envolvida na ativação de miofibroblastos. TGF- β é considerado o principal fator de promoção do desenvolvimento de miofibroblastos, através da indução da expressão de α -SMA (Desmouliere et al., 1993; Ronnov-Jessen and Petersen, 1993), da expressão de proteínas da MEC (Werner & Grose, 2003), e de um grande número de proteínas do citoesqueleto que constroem o aparato contrátil dos miofibroblastos (Malmstrom et al., 2004). Desta forma parece que o TGF- β requer a presença de galectina-3 intracelular para estimular a ativação de miofibroblastos e a produção de procolágeno (Hoyland et al., 2006).

De modo geral, tem sido sugerido que a expressão da galectina-3 confere proteção à diferentes tipos celulares, seja permitindo sua multiplicação, ou conferindo resistência à morte celular programada. Ela parece funcionar como molécula anti-apoptótica, protegendo condrócitos e fibroblastos de diversos sinais de morte, como o receptor Fas, reagentes quimioterápicos, estaurosporina, fator de necrose tumoral, radiação, oxido nítrico e a perda da adesão da célula (Colnot et al, 1999, 2001, Yoshii et al, 2002, Inohara et al, 1998; Liu et al, 2002, Moon et al, 2001). A adesão celular é conhecida como estratégica na proteção contra a apoptose. Assim, a resistência a apoptose, resultante da expressão de galectina-3, pode ser potencializada pelo seu papel facilitador de mecanismos de adesão celular.

A galectina-3 desempenha um papel de proteção para os condrócitos através da manutenção da estrutura cartilaginosa, além de ser importante para a fisiologia dos ossos subcondrais. Na ausência de Gal-3, a capacidade dos condrócitos de sustentar uma alta taxa metabólica, necessária para a manutenção das características da cartilagem, é enfraquecida. Essa hipótese é reforçada pela demonstração de que a Gal-3 previne danos mitocondriais e a liberação do citocromo c, bem como a geração de espécies reativas de oxigênio. Além disso, a expressão de Gal-3 é maior em condrócitos de cartilagem osteoartrítica do que em condrócitos normais. Isso pode significar que a Gal-3 funciona como um “sinal de alerta” que permite alguma preservação da cartilagem (Boileau et al., 2007).

Yang e colaboradores (1996) sugerem que a Gal-3 regula a sobrevivência celular agindo dentro das células e interagindo com alguns componentes da via de sinalização da apoptose. No entanto, a possibilidade de que esta proteína participe de mecanismos de ação extracelulares ainda precisam ser descobertos. Já foi provado que a expressão de Gal-3 resulta em aumento de adesão à laminina, fibronectina e vitronectina (Neidhart et al., 2005). Sabendo que o aumento na

adesão celular protege as células de apoptose, a resistência à apoptose promovida pela superexpressão de Gal-3 pode ser devida ao aumento na adesão celular (Liu et al., 2002).

Estudos mostram que essa molécula pode ser encontrada na superfície de condrócitos maduros e hipertróficos da cartilagem articular humana (Guévremont et al, 2004). Nessa condição seu domínio semelhante ao do colágeno é um potencial substrato para ação das metaloproteinases, que podem estar envolvidas nos processos de remodelação da cartilagem. Além disso, a galectina-3 atua na regulação de moléculas adesivas da matriz extracelular, interagindo com seus diversos componentes, regulando a adesão dos condrócitos e modificando sinais internos (Guévremont et al, 2004, Ochieng et al, 1998).

No que diz respeito aos coxins cartilagosos da sínfise púbica, ficou evidenciado morfológicamente a dissolução da cartilagem hialina durante a prenhez e sua reorganização no pós-parto. Além disso, o processo de formação do ligamento interpúbico parece envolver mecanismos de diferenciação e desdiferenciação celulares. No entanto, desconhecem-se os mecanismos envolvidos na manutenção de tipos celulares que possam dar suporte a tal reorganização durante a prenhez e no pós-parto. Tendo em mente as funções pleiotrópicas da família da galectinas, particularmente da galectina-3, o presente projeto se propõe a estudar, por métodos imunoquímicos, a expressão desta glicoproteína na sínfise púbica de camundongos e deste modo evidenciar seu papel nos processos de remodelação desse tecido durante a prenhez.

2. OBJETIVOS:

Este trabalho teve como objetivo a caracterização e quantificação da galectina-3 nas diferentes populações celulares que compõem a sínfise púbica durante a prenhez, relacionando sua presença e localização tecidual aos processos que ocorrem durante a remodelação desta articulação neste período.

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

Para este trabalho, foram utilizados camundongos *Mus musculus* da variedade Swiss, obtidas do Laboratório Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP), de ambos os sexos, com aproximadamente 3 a 5 meses de idade. Esses animais foram mantidos no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Estadual de Campinas, em um ambiente de temperatura controlada (25 ± 2 °C constantes) e expostos à luz por um período diário de 12 horas (7:00 - 19:00 h), recebendo ração comercial e água *ad libitum*.

Grupos de cinco camundongos fêmeas virgens foram colocados em gaiolas junto a machos férteis de mesma linhagem e o tampão vaginal foi observado todas as manhãs durante o período de acasalamento. A manhã de detecção do tampão vaginal foi considerada como o primeiro dia de prenhez (D1). A coleta de sínfises e ligamentos interpúbicos dos cinco animais de cada grupo foram realizadas nos 12º (D12), 15º (D15), 18º (D18) e 19º (D19) dia de prenhez e no 3º (3DP) e 5º (5DP) dia pós-parto. Um grupo de cinco animais virgens nos quais foi detectada a fase de estro (Shorr, 1941) foi utilizado como controle. Todos os procedimentos envolvendo animais foram conduzidos sob protocolos aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal.

3.1 PROCESSAMENTO HISTOLOGICO CONVENCIONAL

Duas fêmeas foram utilizadas para cada grupo experimental. Após a coleta da sínfise púbica e/ou ligamento interpúbico, estes foram imersos em solução fixadora de Paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0.1M, durante uma noite (12 ou 16 horas) em geladeira. O material foi então desidratado em série crescente de etanol, diafanizado em xilol e embebido em parafina. Cortes de 5 µm foram obtidos em micrótomo rotativo e coletados em lâminas previamente silanizadas.

Os cortes foram então desparafinizados, hidratados e corados pela técnica do Tricrômico de Masson.

Os preparados histológicos foram observados em microscópio de luz comum Eclipse E800 (Nikon, Japão), e as imagens foram capturadas e analisadas com o programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, EUA).

3.2 MÉTODO IMUNOPEROXIDASE INDIRETA

Cinco fêmeas foram utilizadas para constituir os grupos de animais virgens, dos diferentes dias da prenhez e pós-parto para os ensaios de Imunoperoxidase. As amostras foram processadas de acordo com a seqüência descrita no item 3.1.

Após desparafinização, com intuito de promover a exposição de epítomos incubaram-se os preparados histológicos em tampão citrato de sódio (0.01M pH6.0), submetendo-os a dois ciclos de 1 minuto de exposição em microondas, em potência alta (Modelo NN 7809-BH, Panasonic do Brasil Ltda., Brasil), interrompidos por ciclos de igual duração. Após lavagem em PBS (0.01M pH 7.4) com intuito de bloquear a peroxidase endógena incubaram-se os cortes em solução 0.3% de H₂O₂ em PBS (0.01M pH 7.4) durante 30 minutos a temperatura ambiente. O bloqueio de virtuais reações inespecíficas foi feito utilizando-se solução de BSA 1% em PBS (0.01M pH 7.4) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se a incubação com anticorpo primário monoclonal anti-galectina-3 (IgG de rato obtido a partir de hibridoma secretor de Anticorpo anti galectina-3 – TIB 166, M3/38- produzido no Laboratório de Oncologia Experimental, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo– gentilmente cedido pelo Professor Roger Chammas - FMUSP) preparados em diluições 1:160 em tampão PBS pH 7,4 contendo 1% de BSA incubados durante uma noite em câmara úmida à 4°C; Alguns cortes foram utilizados como controle negativo da reação e para isso, ao invés de solução de anticorpo, foram incubados apenas com a solução na qual o anticorpo foi diluído.

Após esta etapa os cortes foram lavados e incubados com o anticorpo secundário (anti-imunoglobulinas de rato – Dako Corporation, CA, USA) conjugado a peroxidase, diluído na concentração de 1:200, durante 1 hora à temperatura ambiente, em câmara úmida. Posteriormente os preparados foram então incubados em solução contendo o conjugado marcador streptoavidina-peroxidase (LSAB-2; kit Dako) na diluição 1% em TBS 0,05M pH7.4. A reação foi revelada em solução reveladora de peroxidase contendo 0.05% de DAB (Sigma Company, St. Louis, USA) e 0.03% de H₂O₂ diluídos em TBS (0.05M pH 7.4). Após a revelação os cortes foram contra-corados em Verde de Metila (pH 4.4), desidratados em acetona, diafanizados em xilol e montados em Entelan.

Os resultados foram observados em microscópio de luz comum Nikon Eclipse E800, e as imagens foram capturadas e analisadas com o programa Image Pro Plus.

3.3 MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para esta reação, as porções mediais da sínfise púbica ou ligamento interpúbico de cinco fêmeas para cada grupo foram fixados em Metacan (metanol/clorofórmio/ácido acético glacial) durante 24h em geladeira. Após fixação as amostras de tecidos foram embebidas em parafina conforme descrito no item 3.1. Os preparados histológicos obtidos foram tratados para exposição de epítomos e incubados com anticorpos primários monoclonais anti galectina-3 e anti-alfa actina de músculo liso, obtido em rato (Sigma) preparados em diluições 1:160 e 1:200 de modo semelhante àquele descrito no item 3.2.

Após 16 horas os anticorpos primários foram revelados com emprego dos anticorpos secundários; anti rato obtido em coelho e conjugado ao fluorocromo FITC, e anti-camundongo obtido em cabra e conjugado com biotina, para revelação anticorpos primários monoclonais anti galectina-3 e anti-alfa actina, respectivamente. Os conjugados empregados foram diluídos na concentração 1:200, em PBS/BSA 1%, e os preparados foram incubados durante uma hora, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Os preparados incubados com anticorpos secundários biotinilado foram posteriormente tratados com solução de Texas Red-streptoavidina (Sigma Company) na diluição 1:100, por 45 minutos, em temperatura ambiente. Após lavagem em PBS 0.01M pH 7.4, os cortes foram expostos a solução de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) para coloração dos núcleos, diluída na concentração 1:600, em PBS 0.01M pH 7.4, durante 5 minutos, a temperatura ambiente, no escuro. Seguiu-se uma lavagem em PBS 0.01M pH 7.4, e as lâminas foram montadas em Vecta Shield.

Os resultados foram observados em microscópio de luz comum Nikon Eclipse E800, e Microscópio de varredura laser confocal LSM 510 da Zeiss (Zeiss Alemanha). As imagens foram capturadas e analisadas com o programa Image Pro Plus.

3.4 CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DE PROTEÍNAS PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING

Cinco fêmeas foram utilizadas para cada grupo experimental. Após o sacrifício, as sínfises foram retiradas e o material foi fixado por congelamento em nitrogênio líquido e mantido sob refrigeração

a -80°C até a realização do processamento. No dia do procedimento uma sínfise de cada grupo foi levada a uma solução tampão para extração de proteínas. As amostras foram sonicadas e centrifugadas em 3000RPM a -4°C por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi retirado e uma porção deste foi utilizada para a quantificação de proteínas da amostra pelo método de Bradford, utilizando-se de curva padrão, soluções de 0 a 100% de BSA. Após leitura da absorbância em espectrofotômetro, calculou-se a quantidade de proteínas em cada uma das amostras. Seguiu-se então uma corrida eletroforética (SDS-PAGE) em gel 12.5%. Um slot foi utilizado para cada grupo experimental e cada um deles recebeu 25µg de proteína dissolvidas em tampão de amostra. A técnica de eletroforese foi realizada em amperagem constante de 25mA por 25 minutos e 35mA por aproximadamente 45 minutos. Seguiu-se a este procedimento a transferência de proteínas do gel para uma membrana de PVDF durante 2 horas sob amperagem constante de 220mA, em banho de gelo.

A membrana resultante foi então lavada em tampão TBS-T e os sítios inespecíficos foram bloqueados em solução de TBS-T/BSA 1% durante 1 hora em temperatura ambiente, sob agitação. Após lavagem, as membranas foram então incubadas em anticorpo primário monoclonal anti galectina-3 (IgG de rato obtido a partir de hibridoma secretor de Anticorpo anti galectina-3 – TIB 166, M3/38- produzido no Laboratório de Oncologia Experimental, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo– gentilmente cedido pelo Professor Roger Chammas –FMUSP), preparado na diluição 1:1000 em TBS-T/BSA 1%, overnight, em geladeira, sob agitação constante. Na manhã seguinte, após lavagem em tampão, as membranas foram incubadas em anticorpo secundário (anti-imunoglobulinas de rato - Dako) conjugado a peroxidase, diluído na concentração de 1:1000, durante 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após esse procedimento, as membranas foram lavadas em tampão e incubadas em solução contendo o conjugado marcador streptoavidina-peroxidase (LSAB-2; kit Dako Corporation, CA, USA) na diluição 0.1% em TBS-T. A reação foi revelada em solução de peroxidase contendo 0.05% de DAB (Sigma Company, St. Louis USA) e 0.03% de H₂O₂ diluídos em TBS (0.05M pH 7.4). As membranas foram então fotografadas e as bandas foram quantificadas pelo programa UN-SCAN-IT gel 6.1 que mede a quantidade de pixels por banda.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos pela técnica de western blotting foram apresentados como médias \pm desvio padrão. A significância da diferença entre as médias foi medida através de análise de variância (ANOVA) e teste t de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Para obtenção dos resultados foram utilizadas cinco amostras independentes.

4. RESULTADOS:

4. 1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS TECIDOS QUE COMPÕEM A SÍNFISE PÚBICA

A análise da sínfise púbica de animais virgens ao microscópio de luz permitiu a caracterização dos componentes típicos desta articulação representados por uma região central fibrocartilaginosa que se insere em suas extremidades em dois coxins de cartilagem hialina que, por sua vez, se continuam nos ossos púbicos (Fig. 1). A região central é envolta por um tecido conjuntivo denso que é contínuo ao pericôndrio que envolve as regiões de cartilagem hialina (Fig. 2). A região de cartilagem hialina é composta por condrócitos hipertróficos, condroblastos e uma matriz extracelular densa e basófila. Os condrócitos hipertróficos são células volumosas, com núcleos esféricos, que quando corados pelo tricromico de Masson mostram-se corados fortemente em roxo. Os condroblastos, por estarem localizados na porção mais periférica da cartilagem, apresentam forma mais elíptica, com núcleo ovóide. A porção correspondente ao pericôndrio apresenta fibroblastos alongados, com núcleos de cromatina densa. Interpostos aos condrocitos hipertróficos e condroblastos segue-se uma zona de transição formada por condrócitos não totalmente diferenciados, arredondado e com núcleos volumosos.

A região central é composta por uma fibrocartilagem típica, com características intermediárias entre cartilagem hialina e tecido conjuntivo denso (Fig. 2). Essa região é constituída por condrócitos e células semelhantes a fibroblastos, que apresentam núcleos cujos maiores eixos estão orientados perpendicularmente ao maior eixo da sínfise. A matriz desta região é menos compacta quando comparada à cartilagem hialina e as fibras de colágeno que a compõem se arranjam entre as células, também acompanhando o eixo maior da sínfise.

A partir do D12 (Figuras 3, 4 e 5), torna-se evidente a presença de um ligamento interpúbico que separa os ossos púbicos. A separação dos ossos que se observa no D15 (Figuras 6, 7 e 8) da prenhez é marcada pela reabsorção gradual das porções cartilaginosa e óssea da sínfise, desdiferenciação de alguns condrócitos, contribuindo para o aumento da zona de transição fibrocartilaginosas entre os coxins cartilagem hialina (Figura 7). As células da zona de transição assumem aspecto mais alongado, semelhante ao de fibroblastos da região central. Esta por sua vez apresenta matriz extracelular de composição semelhante a do ligamento, onde a matriz é menos compacta e apresenta fibras colágenas típicas. As células mais abundantes desta região têm fenótipo semelhante ao de fibroblastos, com forma alongada (Figura 8). No D15 da

preñez as células do ligamento em formação se dispõem com o seu maior eixo paralelo ao eixo do ligamento. As fibras colágenas da matriz, são dispostas de maneira mais frouxa, sendo que é possível observar o “crimp” destas fibras.

No D18 de prenhez são marcantes os aspectos morfológicos que podem ser associados ao relaxamento do ligamento interpúbico (Figuras 9,10 e 11). No final da prenhez os coxins cartilagosos mostram aspectos residuais, se comparados aos de animais virgens, porém ainda apresentam volumosos condrócitos hipertróficos, inseridos em uma matriz territorial basófila. No final da prenhez não é possível a observação de uma zona de transição fibrocartilaginosa típica, pois, nesta fase, a maioria das células desta região assume aspecto alongado semelhante ao de miofibroblastos típicos arranjados entre fibras de colágeno de aspecto esgarçado. A região central apresenta menor densidade celular. Na matriz é possível à observação do “crimp” das fibras colágenas, que dão ao tecido um aspecto ondulado.

No D19 de prenhez, que corresponde ao dia do parto, o relaxamento do ligamento interpúbico atinge o grau máximo o qual pode ser associado aos aspectos típicos de reabsorção de estruturas cartilagosas e a um maior esgarçamento da matriz extracelular do ligamento (Figuras 12, 13 e 14).

No 3DP podem-se notar aspectos da remodelação que podem ser associados ao início da involução do ligamento interpúbico (Figuras 15 e 16). A região correspondente aos coxins de cartilagem hialina, existentes nos animais virgens e notados até o D12, volta a se organizar e apresentar condrócitos hipertróficos na transição desta região. Embora neste período ainda não se observe uma transição fibrocartilaginosa típica, nota-se que algumas células da região cartilaginosa assumem um aspecto mais arredondado, típico dos condrócitos não totalmente diferenciados desta região. A região central passa a ser composta por um tecido mais celular e mais compacto do que aquele presente antes do parto.

No 5DP (Figuras 17 e 18), a articulação volta a ter características morfológicas que se assemelham as do D12. A região central mostra aspectos e arranjo de células e matriz extracelular com características de fibrocartilagem. As células semelhantes à miofibroblastos dão lugar a células cujo fenótipo se assemelha a fibroblastos e condrócitos levemente alongados. A zona de transição fibrocartilagem-cartilagem hialina ainda não se apresenta definida de modo semelhante. A região de cartilagem hialina parece completamente recomposta passando a revestir novamente a porção ventral dos ossos púbicos.

4. 2. A GALECTINA-3 ESTÁ PRESENTE EM TODOS OS TIPOS CELULARES QUE COMPÕEM A SÍNFISE PÚBICA E O LIGAMENTO INTERPÚBICO DURANTE O PERÍODO ESTUDADO

A técnica de imunoperoxidase revelou que a galectina-3 está presente em todos os tipos celulares dos tecidos que formam a sínfise púbica e o ligamento interpúbico dos animais estudados, porém existe um padrão de distribuição e localização desta glicoproteína de acordo com o período da gestação em questão.

Em animais virgens (Figuras 19-24) observou-se marcação positiva para galectina-3 em grande parte dos condrócitos hipertróficos, localizados nos coxins de cartilagem hialina (Figura 19). Nesta região a marcação aparecia distribuída por todo o citoplasma das células, e às vezes, no núcleo. Não houve marcação extracelular nesta região. Também não foi observada marcação positiva no citoplasma dos condrócitos das regiões periféricas da cartilagem hialina em contato com o pericôndrio (Figura 20). Na zona de transição a marcação positiva para galectina-3 foi observada preferencialmente distribuída pelo citoplasma dos condrócitos e na região perinuclear de alguns fibroblastos (Figura 21). Em alguns condrócitos a glicoproteína parecia estar contida em grânulos citoplasmáticos (Figura 22). A região central fibrocartilaginosa (Figuras 23 e 24) apresentou marcação positiva para galectina-3 distribuída apenas pelo citoplasma de algumas células semelhantes a fibroblastos. Tanto na região de transição quanto na região central, não houve marcação de elementos da matriz extracelular. Na medula dos ossos púbicos observou-se marcação positiva no citoplasma de algumas células endoteliais e do sangue.

Em animais no D12 (Figuras 25-27), observou-se um padrão semelhante de marcação para galectina-3 em comparação ao grupo dos animais virgens. Na região de cartilagem hialina os condrócitos hipertróficos apareceram com o citoplasma marcado (Figura 25). Porém, nesta região, não se observou marcação nuclear. Alguns condrócitos da porção mais periférica da cartilagem hialina apresentaram marcação citoplasmática (Figura 26). Em nenhuma das regiões cartilaginosa observou-se marcação nuclear. A região central fibrocartilaginosa apresentou alguns fibroblastos com o citoplasma positivamente marcado (Figura 27).

No D15 (Figuras 28-31), há evidências da reabsorção da porção cartilaginosa e a formação do ligamento interpúbico (Figura 28). Na região remanescente de cartilagem hialina

observou-se marcação positiva para galectina-3 tanto no citoplasma quanto no núcleo dos condrócitos hipertróficos, porém alguns destes condrócitos não apresentaram nenhum tipo de marcação (Figura 29). Na região de transição alguns condrócitos apresentaram o citoplasma positivamente marcado (Figura 30). Este mesmo padrão foi observado em algumas células semelhantes à fibroblastos do ligamento em formação (Figura 31).

No D18 (Figuras 32-35), a região de cartilagem hialina aparece praticamente reabsorvida. Nesta região, alguns condrócitos apresentam marcação positiva citoplasmática para galectina-3, outros apresentam apenas marcação nuclear, e há ainda aqueles que não apresentam marcação (Figura 33). Na região de transição é possível notar que a maior quantidade de células marcadas está situada na região adjacente ao ligamento interpúbico (Figura 34). Na região do ligamento interpúbico a marcação positiva ocorre no citoplasma de algumas células semelhantes à miofibroblastos (Figura 35), Não foi possível a observação de marcação positiva de matriz extracelular em nenhuma das regiões analisadas.

No D19, observa-se uma forte marcação para galectina-3 em todas as regiões que compõem a sínfise. A região de cartilagem hialina remanescente apresenta marcação positiva tanto no citoplasma quanto no núcleo dos condrócitos hipertróficos (Figuras 36 e 37). Porém, em alguns locais parece que condrócitos pertencentes aos mesmos grupos isógenos não apresentam o mesmo padrão de marcação (Figura 37). A região de transição, composta por condrócitos não completamente diferenciados, apresenta tanto células com marcação dispersa por todo o citoplasma quanto células completamente marcadas (Figuras 38 e 39). A região central do ligamento (Figuras 40 e 41), constituída por uma matriz frouxa e células semelhantes à miofibroblastos, apresenta praticamente todas as células marcadas. Esta marcação parece predominantemente citoplasmática, porém em algumas células, também se observa marcação nuclear. Em nenhuma das regiões foi possível observar marcação de componentes da matriz extracelular.

No 3DP (Figuras 42-45), há evidências de que a sínfise apresenta processo de regressão. A região de cartilagem hialina mostra aspectos que podem ser associados à reestruturação tecidual (Figura 42), e as células que compõem esta região apresentam um padrão granular de marcação citoplasmática para galectina-3 (Figura 43). A zona de transição apresenta células tanto com marcação nuclear positiva, quanto células com o mesmo padrão granular dos condrócitos da região cartilaginosa (Figura 44). O ligamento interpúbico apresenta uma matriz mais densa.

Grande parte das células semelhantes à miofibroblastos pertencentes a esta região apresentam marcação positiva para galectina-3. Em algumas destas células, a proteína parece estar localizada em grânulos citoplasmáticos. Em outras, a marcação parece predominantemente nuclear. Além disso, algumas regiões não apresentam marcação (Figura 45).

No 5DP (Figuras 46-48), a sínfise retoma características semelhantes à de um animal virgem. O ligamento involui e a região central volta a ser composta por fibrocartilagem, povoada por células alongadas, semelhantes à fibroblastos. Nenhuma destas células apresentou marcação positiva para galectina-3 (Figura 48). Tanto a região de transição, quanto a região de cartilagem hialina apresentaram poucas células marcadas (Figura 46). A principal marcação positiva foi observada nos condrócitos adjacentes aos ossos púbicos (Figura 47).

4.3 A GALECTINA-3 ESTÁ LOCALIZADA TANTO NO NÚCLEO QUANTO NO CITOPLASMA DAS POPULAÇÕES CELULARES QUE COMPÕEM A SÍNFISE E APARECE CO-LOCALIZADA COM A ALFA ACTINA DE MÚSCULO LISO EM ALGUMAS OCASIÕES

A técnica de Imunofluorescência foi utilizada para confirmar a existência de galectina-3 no núcleo das populações celulares, bem como sua organização granular no citoplasma de alguns tipos celulares. Também, utilizou-se desta técnica para verificação da co-expressão de alfa-actina de músculo liso e galectina-3 nas populações celulares da sínfise.

4.3.1. Imunoexpressão de Galectina-3

Os resultados obtidos através desta técnica foram condizentes com àqueles observados através da imunoperoxidase. No entanto, a imunofluorescência forneceu algumas outras informações.

Em animais virgens (Figuras 49 e 50), a imunoperoxidase havia revelado marcação positiva tanto no núcleo quanto no citoplasma dos condrócitos hipertróficos da região de cartilagem hialina. No entanto, este padrão não foi observado pela técnica de imunofluorescência. Através desta, notou-se marcação positiva distribuída pelo o citoplasma de apenas alguns

condrócitos da região de cartilagem hialina (Figura 49). Não foi observada marcação nuclear nestas células. Os condrócitos da região de transição apareceram com o citoplasma fortemente marcado e em algumas células, observou-se também uma pequena marcação nuclear (Figura 50). Além disso, não houve marcação positiva na região central da sínfise.

No D12 (Figuras 51 e 52), apenas alguns condrócitos da região de cartilagem hialina apresentaram marcação positiva para galectina-3. Poucas destas células também apresentaram marcação nuclear (Figura 51). Na zona de transição, foi observada uma marcação positiva dispersa pelo citoplasma de alguns condrócitos. Na região central fibrocartilaginosa, algumas células semelhantes a fibroblastos apresentaram marcação positiva citoplasmática (Figura 52). Tanto na zona de transição quanto na região central, não foi observada marcação nuclear e nem extracelular.

No D15 (Figuras 53 e 54), a marcação para galectina-3 parecia qualitativamente mais intensa na maioria das regiões da sínfise. Esta glicoproteína foi encontrada tanto no citoplasma quanto no núcleo dos condrócitos hipertróficos da região de cartilagem hialina, bem como no citoplasma de algumas células do osso púbico (Figura 53). Quando no núcleo, esta parecia dispersa por todo o nucleoplasma exceto pela região dos nucléolos e quando no citoplasma, dispersa por toda a região citoplasmática. As células da zona de transição apresentam uma marcação predominantemente citoplasmática. Apenas algumas células também apresentaram marcação nuclear. Na região do ligamento (Figura 54), foram observadas poucas células marcadas, sendo que a marcação parecia qualitativamente menos intensa e predominantemente citoplasmática. Tanto na zona de transição quanto na região de formação do ligamento observou-se marcação de elementos da matriz extracelular.

No D18 (Figuras 55 e 56), as células da região de cartilagem hialina aparecem pouco marcadas. As células da zona de transição, por sua vez, apresentam o citoplasma fortemente marcado (Figura 55). Na região central (Figura 56), a glicoproteína parecia distribuída por todo o citoplasma das células semelhantes à miofibroblastos. A marcação nuclear para esta proteína foi observada em apenas alguns condrócitos da região de transição e células semelhantes à miofibroblastos.

No D19 (Figuras 57-59), os condrócitos da região de cartilagem hialina apresentaram-se com o citoplasma fortemente positivo para a marcação. Observou-se também marcação positiva em alguns dos núcleos destas células (Figura 57). Seguindo em direção a região central do

ligamento, a marcação para galectina-3 parece tornar-se perinuclear e concentrada em algumas regiões do citoplasma. Nesta região não foi observada nenhuma célula com marcação nuclear (Figura 58). Nas células semelhantes à miofibroblastos da região mais central (Figura 59), a glicoproteína parece dispersa pelo citoplasma das células semelhantes a miofibroblastos. Não foi observada marcação nuclear nas células desta região.

No 3DP (Figuras 60-62), observou-se forte marcação nuclear nos condrócitos da região de cartilagem hialina. Além disso, em algumas destas células, a galectina parecia estar localizada em alguns pontos específicos do núcleo (Figura 60). Na região de transição, obteve-se forte marcação positiva no núcleo dos condrócitos adjacentes à cartilagem hialina, sendo que a única região não positiva desta organela era aquela ocupada pelos nucléolos. Em algumas células também foi observada uma marcação predominantemente citoplasmática (Figura 61). Finalmente, as células semelhantes à miofibroblastos da região central apresentaram forte marcação dispersa pelo citoplasma de grande parte das células e nuclear em algumas delas (Figura 62).

No 5DP (Figuras 63 e 64), assim como observado pela imunoperoxidase, a galectina apresenta um padrão de marcação semelhante ao de animais virgens, com predominância no citoplasma e núcleo das células da região de transição e cartilagem hialina.

4.3.2 Co-localização de galectina-3 e alfa actina de musculo liso

Quanto à expressão de alfa-actina, em animais virgens (Figura 65), observou-se que esta proteína aparece especialmente distribuída no citoplasma dos condrócitos presentes na região de transição da sínfise, e, na maioria destas células, ela parece estar co-localizada com a galectina-3.

No D12 (Figura 66), observou-se que as células da região de transição apresentavam o citoplasma fortemente marcado. Outra região que apresentou forte marcação para esta proteína foi a região central, onde esta aparecia distribuída por todo o citoplasma das células semelhantes à miofibroblastos e, em algumas regiões co-localizada com a galectina-3.

No D15 (Figura 67), observou-se forte marcação de actina distribuída por todo o citoplasma de alguns condrócitos hipertróficos. Esta marcação era co-localizada com a de galectina-3, porém, com a sobreposição das imagens, esta última parecia qualitativamente mais intensa em relação à primeira. Além disso, ao contrário do observado para galectina-3, em nenhuma das células houve marcação positiva nuclear para actina. Na região de transição bem

como no ligamento em formação, também se observou co-localização das duas proteínas, sendo que a actina também parecia assumir um aspecto granular no citoplasma destas células.

Nos D18 (Figura 68) e D19 (Figura 69), observou-se marcação positiva para alfa actina no citoplasma dos condrócitos da cartilagem hialina e da zona de transição, bem como das células semelhantes à miofibroblastos do ligamento. Em todas essas regiões as proteínas pareciam co-localizadas. Porém, especialmente na região de transição, a galectina-3 parecia qualitativamente mais intensa do que a alfa-actina.

No 3DP (Figura 70), a α -actina foi observada distribuída uniformemente pelo citoplasma dos condrócitos da cartilagem hialina. Este foi o mesmo padrão observado para galectina-3, porém a segunda mostrava maior intensidade de fluorescência. Além disso, encontrou-se marcação positiva para actina também no citoplasma dos condrócitos da região de transição, sendo que neste local também houve co-expressão das duas proteínas. Não foi observada marcação evidente para α -actina nas células semelhantes à miofibroblastos.

Finalmente, no 5DP (Figura 71), a marcação para α -actina foi qualitativamente menos intensa em relação aos outros grupos estudados. Porém, nos locais onde ela foi localizada, como por exemplo, no citoplasma dos condrócitos da região de transição, ela parecia co-expressa com a galectina-3.

4.4 ASPECTOS QUANTITATIVOS DA EXPRESSÃO DA GALECTINA-3 ENTRE OS GRUPOS ESTUDADOS

Como as análises qualitativas sugeriam que havia uma diferença na expressão de galectina-3 nas populações celulares que compõem a sínfise púbica durante a gestação, utilizou-se do western blotting para verificar a existência desta diferença e, se existente, quantificá-la.

Inicialmente, as amostras foram submetidas a eletroforese (SDS-PAGE) e as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana para realização de uma reação imunoquímica. Por esta reação, observou-se que a galectina-3 está presente em todos os grupos estudados, porém, em concentrações diferentes (Figura 72). A análise densitométrica do “western blot” foi realizada para verificar se a diferença de expressão de galectina-3 era significativa. As médias das quantificações foram analisadas por ANOVA e pelo pós-teste T de Tukey. Os valores de p

maiores que 0.05 foram considerados significativos. A densidade relativa obtida pela imunoreação para galectina-3 em cada um dos dias de prenhez está resumida no gráfico 1.

Foi observado que em animais virgens (média arbitrária= 8.7) a expressão de galectina-3 é significativamente menor do que a de animais nos D15, D18, D19 e 3DP. Para animais no D12 (média arbitrária= 6.68), a expressão é significativamente menor do que a de todos os outros grupos. A média obtida para animais no D15 (14.45) foi significativamente menor do que a dos dias D18 e D19, 3DP e maior que a dos animais 5DP. No D18, a expressão de galectina-3 (média arbitrária= 17.39) é significativamente maior do que a dos animais virgens, D12, D15, e 5DP.

A análise estatística revelou que a maior expressão de galectina-3 é alcançada no D19 (média arbitrária= 25.68), e que esta média é significativamente maior do que a de todos os outros grupos estudados. Após o parto, inicia-se uma queda na expressão de galectina-3, sendo que a média no 3DP (21.9) é menor do que a obtida no D19, mas ainda é maior do que a dos outros grupos. Finalmente, no 5DP (média arbitrária= 12.25), ocorre uma brusca queda na expressão de galectina-3, havendo diferença significativa entre este grupo e os grupos D12, D15, D18, D19 e 3DP.

5. **DISCUSSÃO**

Em algumas espécies, o parto só é possível graças à remodelação da articulação interpúbica. É sabido que todos esses mecanismos de remodelação da sínfise púbica estão sob influência de hormônios como estrógeno, progesterona e relaxina (Sherwood 1994). Além disso, a remodelação tecidual também envolve um constante balanço entre proliferação e morte celular programada (Veridiano et al., 2007).

A análise morfológica permitiu a identificação de aspectos e etapas que resultam em uma reorganização tecidual possibilitando a passagem segura do feto pelo canal de parto, de modo semelhante aos aspectos classicamente descritos para modelos como camundongo e cobaia (Hall 1947; Crelin 1969; Sherwood 1994; Pinheiro et al, 2004; Ortega et al, 2003). Histologicamente, as mudanças envolvem a reabsorção de parte da cartilagem hialina e dos ossos que compõem a sínfise, o crescimento de um ligamento interpúbico e um rápido e pronunciado “amolecimento” deste tecido durante os dois últimos dias da prenhez. Essa modificação é marcada pela proliferação e diferenciação das células do tecido conjuntivo, aumento do peso e do comprimento do ligamento (Rodríguez et al., 2003). Inicialmente a formação do ligamento interpúbico é um processo de crescimento primário, onde as células condrogênicas saem de suas lacunas e os fibroblastos resultantes se arranjam transversalmente, orientando-se ao longo das fibras colágenas (Crelin, 1969). Após o parto, ocorre uma nova reorganização do tecido interpúbico, resultando em uma involução do ligamento e crescimento do tecido fibrocartilaginoso, particularmente do componente colagênico, fazendo com que a sínfise retorne a um estado semelhante ao de um animal virgem (Pinheiro et al., 2003). Ambos os períodos de remodelação tecidual envolvem grandes alterações da matriz extracelular e de seus componentes.

Em cobaias, é sabido que a remodelação da sínfise está relacionada a um processo que lembra a inflamação. Rodríguez et al. (2003), demonstraram que existe uma correlação entre a infiltração de leucócitos nesta região e o processo de remodelação do colágeno. Durante a prenhez e particularmente no pós-parto em camundongos, já foi demonstrado que o processo de remodelação que ocorre nesta região está relacionado a outros fatores, que não a um processo semelhante à inflamação. Estes resultados são condizentes com aqueles previamente obtidos em nosso laboratório que mostraram que, em nenhum momento, durante a prenhez do camundongo, ocorre infiltração leucocitária no ligamento interpúbico (Rosa et al 2007).

Tendo em mente o papel proposto para a Gal-3, na manutenção da viabilidade de condrocitos provenientes de cartilagens articulares (Boileau et al., 2008), julgamos que ela seria uma das

moleculas que poderia estar envolvida nos diversos processos que envolvem a remodelação da sínfise púbica durante a prenhez é a galectina-3. Esta proteína pertence a uma família de lectinas que se ligam a β -galactosídeos. Quando presente no meio extracelular, a galectina-3 se liga a glicanos presentes na superfície celular e na matriz extracelular, afetando uma grande variedade de processos biológicos. No entanto, a galectina-3 também pode estar presente no citoplasma e no núcleo, onde parece atuar sobre diversas funções celulares, como vias de sinalização intracelular, através de interações proteína-proteína com outros componentes celulares (Hsu & Liu, 2004; Yang et al., 2008 a). Algumas evidencias indicam que a galectina-3 desempenha importantes funções tanto em processos fisiológicos como patológicos, incluindo as respostas imune e inflamatória (Almkvist & Karlsson, 2004; Liu, 2000), controle da transcrição gênica através do *splicing* de mRNA (Dagher et al., 1995; Wang et al., 1995; Hubert et al., 1995 Davidson et al., 2002; Patterson et al., 2004) e da regulação de intermediários do ciclo celular (Lin et al., 2002; Maeda et al., 2004), apoptose (Yoshii et al., 2002; Fukumori et al., 2004; Shimura et al., 2005; Fukumori et al., 2006), entre outras diversas funções.

Os tecidos que compõem a sínfise são componentes do sistema músculo-esquelético (Freemont & Hoyland, 2007) e estão em constante, mesmo que basal processo de remodelação. Aliando este fato às funções pleiotrópicas da galectina-3, especialmente àquelas relacionadas à manutenção da homeostase tecidual, este estudo visou correlacionar a expressão de galectina-3 aos processos de remodelação que ocorrem na sínfise púbica durante a prenhez e no pós-parto.

A análise das reações imunohistoquímicas e imunoquímicas revelou que a galectina-3 está presente em todas as populações celulares que constituem a sínfise púbica durante a prenhez e no período pós-parto. Porém, o padrão de expressão e localização desta proteína varia conforme o período estudado, implicando seu envolvimento em diversos processos que regulam a remodelação desta articulação durante a prenhez.

As menores concentrações de galectina-3 foram encontradas em animais virgens, no D12 e no 5DP. Nestes dias da prenhez, a galectina foi preferencialmente expressa nas células da região de cartilagem hialina e da zona de transição. É sabido que os tecidos músculo-esqueléticos estão em constante remodelação, e até onde se sabe, cada um deles apresenta uma população de células-tronco que permite a regeneração e o reparo destes tecidos durante a vida dos organismos (Freemont & Hoyland, 2007). Além disso, a galectina-3 é reconhecida por regular as funções homeostáticas das células (Hsu & Liu, 2004). Desta forma, é possível presumir que a expressão

da galectina-3 em níveis basais, tanto no início da prenhez quanto nos primeiros dias após o parto estejam relacionados à manutenção das características bioquímicas e morfológicas dos tecidos que compõem a sínfise púbica.

A partir do D15, inicia-se a formação do ligamento interpúbico. Esse processo é caracterizado pela reabsorção das porções cartilaginosas e ósseas da sínfise e pelo crescimento de um tecido rico em fibras colágenas e populado por células alongadas semelhantes a fibroblastos. O crescimento do ligamento é acompanhado por um aumento na expressão de galectina-3 em todas as populações celulares que compõem a sínfise púbica. As taxas de expressão de galectina-3 aumentam significativamente até o D19, que é o dia que precede o parto.

A galectina-3 é um mitógeno capaz de estimular a proliferação de fibroblastos de forma parácrina, através da interação com glicoconjugados da superfície celular (Uematsu et al., 2008). O papel da galectina-3 endógena na regulação do crescimento e proliferação celular depende essencialmente do tipo celular em questão (Wang et al., 2004). Em alguns tipos celulares, a galectina-3 promove o crescimento e a diferenciação, enquanto que em outros ela promove o efeito contrário. O efeito positivo da galectina-3 sobre o crescimento celular foi demonstrado em diversos sistemas. O número de células de colônias de transfectantes de células Jurkat humanas com expressão de galectina-3 pareceu aumentar significativamente, quando comparado com culturas controle (Wang et al., 2004). Além disso, a galectina-3 parece interagir com fatores de transcrição específicos no núcleo de células de câncer de tireóide, aumentando a atividade transcricional destas células, contribuindo, desta forma para o crescimento celular.

Muitos estudos têm fornecido evidências de que a expressão de galectina-3 está correlacionada à proliferação celular. Culturas de fibroblastos 3T3 murinos, mantidas no estado quiescente, expressam baixos níveis de Gal-3. A estimulação das mesmas células para um estado proliferativo foi acompanhada por transcrição do gene, acúmulo do mRNA e expressão da proteína galectina-3. Evidências de que a Gal-3 endógena tem papel na proliferação celular foram obtidas por um estudo onde a expressão de Gal-3 é suprimida por um oligonucleotídeo antisense. Assim, células cancerosas de seio humano MDA-MB435 transfectadas com o cDNA da Gal-3 exibiram queda na proliferação celular, quando comparadas com transfectados controles (Liu et al., 2002).

Além disso, Veridiano et al. (2007) demonstraram que as taxas de proliferação das populações celulares da sínfise púbica aumentam até o D18, sendo que a maior porcentagem

destas células proliferativas é encontrada na região do ligamento interpúbico. Este fato sugere que pode haver uma correlação entre o aumento da expressão de galectina-3, a ativação de células semelhantes a fibroblastos e a deposição de colágeno, em favor da deposição de maior quantidade de matriz extracelular e da proliferação das células do ligamento interpúbico. Além disso, quando se adiciona galectina-3 à culturas quiescentes de fibroblastos normais de pulmão de humanos, observa-se o estímulo da síntese de DNA e a indução da proliferação celular (Maeda et al., 2002). Soma-se a isto o fato de que a galectina-3 atua sobre o tempo de vida de receptores de citocinas, provavelmente modulando o crescimento celular (Dumic et al., 2006).

A expressão de galectina-3 tanto no nível transcricional quanto no traducional é afetada por vários estímulos (Cowles et al., 1990). O aumento no número de moléculas mRNA e da proteína galectina-3 é observado em fibroblastos ativos quando comparados a células quiescentes. A expressão de galectina-3 também pode ser considerada um marcador de diferenciação. Sugere-se que a galectina-3 seja um regulador negativo da diferenciação terminal de condrócitos hipertróficos, agindo possivelmente como uma proteína de matriz anti apoptótica que mantém a ancoragem destas células à matriz extracelular (Ortega et al., 2005). Aliando este achado àquele inicial de Crelin (1969) onde ele sugere que os condrócitos que compõem a sínfise não são células completamente diferenciadas e que, sob determinados estímulos podem abandonar suas lacunas e assumir um aspecto semelhante ao de fibroblastos, é possível que a galectina-3 atue diretamente sobre as células da zona de transição da sínfise púbica. A atuação pode ser refletida tanto sobre a diferenciação das células da zona de transição em fibroblastos quanto no aporte de novas células para a zona de transição em favor da manutenção de um número constante de condrócitos pluripotentes nesta região.

Por outro lado, Veridiano et al.(2007) demonstraram que as taxas de apoptose seguem em um nível basal até o D18 e atingem o seu pico no D19. No entanto, no nosso material, a quantidade de galectina-3 cresce a partir do D15 e atinge o seu pico no D19.

Já foi reportado que células com superexpressão de galectina-3 apresentam aumento na resistência ao estímulo apoptótico induzido por anticorpo anti-Fas, estaurosporina, fator de necrose tumoral, radiação e óxido nítrico. Parece que esta proteína apresenta uma grande similaridade de seqüência com a proteína Bcl-2, uma conhecida supressora de apoptose (Yang et al., 2006; Akahani 1997).

Moon *et al.* (2001) demonstraram que a galectina-3 atua na inibição da apoptose mediada por radicais livres de nitrogênio em células BT549 de carcinoma de seio humano, através da manutenção da integridade mitocondrial, da inibição da saída do citocromo c da mitocôndria e da ativação da caspase (Fukumori *et al.*, 2006). Desta forma, a galectina-3 parece ser um regulador de apoptose associado a mitocôndria, assim como a Bcl-2. Estudos recentes demonstraram que a gal-3 se transloca para a membrana mitocondrial sob diversos estímulos apoptóticos (Mataresse *et al.*, 2000, Fukumori *et al.*, 2004). A gal-3 é enriquecida na membrana mitocondrial, onde ela previne o dano da organela e a liberação do citocromo c. A localização da galectina-3 é regulada pelas proteínas com as quais ela se liga. Uma destas é a sinexina, uma proteína de 51kDa da família das anexinas, que pode se ligar a fosfolípidos de membrana. A diminuição da concentração de sinexina inibe a atividade anti-apoptótica da gal-3, sugerindo que a translocação da gal-3 para a membrana mitocondrial é crucial para o desempenho desta função da gal-3 (Mataresse *et al.*, 2000; Yoshii *et al.*, 2002; Fukumori *et al.*, 2004).

Em adição a estes fatos, Boileau (2008) afirma em seus estudos sobre osteoartrite que a galectina-3 intracelular exerce um papel protetor sobre condrócitos provenientes de cartilagens articulares. Condrócitos que não expressam galectina-3 acumulam maior quantidade de glicogênio que condrócitos normais, o que indica que a galectina participa do controle da atividade metabólica destas células (Colnot *et al.*, 2001). A galectina-3 desempenha um papel de proteção para os condrócitos através da manutenção da estrutura cartilaginosa, além de ser importante para a fisiologia dos ossos subcondrais. Na ausência de Gal-3, a capacidade dos condrócitos de sustentar uma alta taxa metabólica, necessária para a manutenção das características da cartilagem, é enfraquecida. Essa hipótese é reforçada pela demonstração de que a Gal-3 previne danos mitocondriais e a liberação do citocromo c, bem como a geração de espécies reativas de oxigênio (Boileau *et al.*, 2008). Pesquisas também demonstraram que as proteínas da via Ihh (Indian Hedgehog) responsáveis pelo controle negativo da maturação de condrócitos aumentam em quantidade na ausência de galectina-3 e que esta ausência também acelera o processo de morte celular de condrócitos hipertróficos (Colnot *et al.*, 2001).

Estando a galectina presente no citoplasma das células citadas e sabendo que neste local, a galectina-3 está envolvida com processos de proteção celular a apoptose, é possível que a sua marcação intensa no D19 esteja mais relacionada à manutenção das características morfológicas e

bioquímicas do ligamento para a garantia da segurança do parto do que aos mecanismos anti-apoptóticos.

No 3DP, a quantificação de galectina-3, bem como os resultados das reações imunohistoquímicas demonstraram que a galectina-3 ainda aparece em grande quantidade em todos os tipos celulares que compõem a sínfise. Neste dia, ela aparece especialmente positiva no núcleo das células da cartilagem hialina e da zona de transição.

Já foi demonstrado que a galectina-3 pode ser encontrada na forma de uma proteína da matriz nuclear, ligada ao RNA e fitas simples de DNA, onde age como fator de *splicing*. Desta forma, é possível que a galectina-3 nuclear module diretamente a expressão gênica através da regulação da transcrição e/ou do *splicing* de mRNA (Krześlak & Lipińska, 2004). No núcleo, a galectina-3 se localiza no componente fibrilar denso e na periferia dos centros fibrilares do nucléolo (Patterson et al., 2004). Além disso, ela também já foi localizada no nucleoplasma, nos espaços intercromatínicos, e nas bordas da cromatina condensada (Hubert et al., 1995). É sabido que é na região de cromatina condensada que ocorre tanto a síntese do mRNA quanto os primeiros processos de *splicing* do pré-mRNA. A galectina-3 liga-se diretamente a Gemin-4, um componente do complexo SMN (do inglês Survival of Motor Neuron), que exerce diversos papéis na reunião de nucleoproteínas, incluindo a biogênese, transporte e reciclagem de snRNPs para o spliceossomo. Desta forma, a galectina-3 constitui uma parte da rede dinâmica dos vários fatores envolvidos no *splicing* e transporte de mRNA (Patterson et al., 2004; Liu et al; 2002).

Estando especialmente localizada no núcleo das células, é possível que no 3DP a galectina esteja agindo diretamente sobre moléculas de mRNA envolvidas com a tradução de moléculas importantes para a reestruturação da sínfise após o parto. Nossos resultados demonstraram que células adjacentes de um mesmo tecido, no mesmo dia de prenhez, ora apresentam marcação citoplasmática, ora apresentam marcação nuclear e em outras ocasiões aparecem tanto com o citoplasma quanto com o núcleo marcados positivamente para galectina-3.

Esse padrão de marcação pode ser explicado por diversas razões. Primeiro, a expressão de galectina-3 e de seus ligantes pode não ser coordenada. A afinidade de ligação por açúcares e o estatus de fosforilação da galectina-3 não são suficientes para que a galectina se ligue aos seus parceiros. É necessária uma coordenação temporal e espacial das duas moléculas, bem como uma conformação ideal tanto da galectina quanto de seu ligante para que a união ocorra quando eles se encontram (Dumic et al., 2006). A galectina-3 se associa ao complexo SMN (*survival of motor*

neuron) através da Gemin4. No citoplasma, este complexo protéico participa da montagem de snRNPs. No núcleo, ele libera as snRNPs para o pré-mRNA durante a formação do spliceossomo (Davidson et al., 2002). A associação da galectina-3 com o complexo SMN indica a possibilidade de que a galectina participa de processos relacionados à montagem do spliceossomo tanto no citoplasma quanto no núcleo e que ela se move entre estes dois compartimentos. Desta forma, os diferentes padrões de marcação citoplasmática e nuclear encontrados em nossos resultados podem ser devidos tanto ao desencontro da galectin-3 e seus ligantes em determinado período e local, quanto ao intensivo movimento desta molécula entre o citoplasma e o núcleo.

Outro tema abordado em nosso estudo foi a expressão de α -SMA pelas células que compõem a sínfise, especialmente aquelas que compõem o ligamento, e a verificação da co-expressão desta proteína com a galectina-3. Estudos publicados recentemente demonstraram que a expressão de galectina-3 em células estreladas do fígado está relacionada à diferenciação dessas células em miofibroblastos e, conseqüentemente à expressão de α -actina de músculo liso (Henderson, 2006). A expressão destes filamentos contráteis do citoesqueleto parece estar relacionada a manutenção da ligação dos ossos púbicos durante a prenhez e ao fechamento da articulação após o parto (Moraes et al., 2004). Nossos resultados demonstraram que a α -SMA aparece co-localizada com a galectina-3 em grande parte das células observadas, especialmente naquelas que compõem o ligamento interpúbico durante a prenhez. Sabendo que a galectina-3 está envolvida na ativação dos receptores membranosos do TGF- β (Henderson et al., 2005) e que o TGF- β é o maior regulador da diferenciação de fibroblastos (Hinz, 2007) é possível associar a expressão da galectina-3 à diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos através de sua participação na via de expressão de α -SMA, que desta forma atuaria sobre a remodelação da sínfise púbica durante a prenhez.

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que a galectina-3 é expressa em etapas críticas do processo de remodelação da sínfise púbica durante a prenhez e no pós-parto, podendo atuar em diversos mecanismos da remodelação fisiológica de tecidos condrogenicos desta articulação de indivíduos adultos. Além disso, a região de transição entre a porção de cartilagem hialina e a região de células semelhantes a fibroblastos, que é uma grande fonte de galectina-3, é primordial para a reposição e diferenciação das células desse ligamento.

6. CONCLUSÕES:

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

1. A expressão da galectina-3 está localizada em todas as populações celulares que compõem a sínfise púbica durante a prenhez e no pós-parto.
2. As análises quantitativas nos permitiram observar que existe uma diferença significativa na expressão desta proteína nos diferentes dias da prenhez.
3. Portanto, independentemente de sua localização intracelular, a galectina-3 parece participar diretamente dos eventos que regulam a remodelação tecidual da sínfise púbica durante a prenhez e no pós-parto.

7. REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS:

- AKAHANI S., MAKKER P. N., INOHARA H., KIM H. R. C., RAZ A. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. **Cancer Res.**, 57: 5272-6, 1997.
- ALMKVIST J., KARLSSON A., Galectins as inflammatory mediators. **Glycoconj. J.**, 19: 575-581, 2004.
- BANI D. Relaxin: a pleiotropic hormone. **Gen. Pharmac.**, 28 (1): 13-22, 1997.
- BARBONI E. A., BAWUMIA S., HENRICK K., HUGHES R. C. 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. **Glycobiology**, 10:1201-1208, 2000.
- BARONDES S. H., CASTRONOVO V., COOPER D. N., CUMMINGS R. D., DRICKAMER K., FEIZI T., GITT M. A., HIRABAYASHI J., HUGHES C., KASAI K., ET AL. Galectins: a family of animal beta-galactoside binding lectins. **Cell**, 76: 597-598, 1994b.
- BARONDES S. H., COOPER D. N., GITT M. A., LEFFLER H. Galectin : Structure and function of a large family of animal lectins. **J. Biol. Chem.**, 269: 20807-20810, 1994a Review.
- BARROS E.M.K.P., RODRIGUES C.J., RODRIGUES N.R., OLIVEIRA R.P., BARROS T.E.P., RODRIGUES, Jr A.J. Aging of the elastic and collagen fibers in the human cervical interspinous ligaments. **The Spine J.** 2:57-62, 2002.
- BERNARDES E.S., SILVA N.M., RUAS L.P., MINEO J.R., LOYOLA A.M., HSU D.K., LIU F.T., CHAMMAS R., ROQUE-BARREIRA M.C.. Toxoplasma gondii infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. **Am J Pathol.** 168 (6):1910-20, 2006.
- BOILEAU C., POIRIER F., PELLETIER J. P., GUÈVEREMONT M., DUVAL N., PELLETIER J. M., REBOUL P. Intracellular localization of galectin-3 has a protective role. **Ann Rheum Dis.**;67(2):175-81, 2008.
- BREWER C. F., Binding and cross-linking properties of galectins. **Bioch. Biophys. Acta**, 1572: 255-62, 2002.
- BRUSTMANN H., Epidermal growth factor receptor expression in serous ovarian carcinoma: an immunohistochemical study with galectin-3 and cyclin D1 and outcome. **Intern. Journ. Gynecol. Pathol.**, 27: 380-389, 2008.
- BÜLLESBACH E. E., SCHWABE C. A novel Leydig cell c-DNA-derived protein is a relaxin-like factor. **J. Biol. Chem.**, 270: 16011-15, 1995.

- BÜLLESBACH E. E., SCHWABE C. The chemical synthesis of the rat relaxin in the unexpected high potency of the synthetic hormone in the mouse. **Eur. J. Biochem.**, 241: 533-7, 1996.
- CALIFICE S, CASTRONOVO V, BRACKE M. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer. Tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. **Oncogene**, 23:7527-36, 2004.
- CATT J. W., HARRISON F. L. Selective association of an endogenous lectin with connective tissues. **J. Cell Sci.**, 73: 347-359, 1985.
- CHAMMAS R., JASIULIONIS M.G., VENTURA A.M., TRAVASSOS L.R., BRENTANI R.R.. Laminin-binding proteins in EJ-ras-transformed fibroblasts. **Braz J Med Biol Res.** ;29:1141-9, 1996.
- CHIHAI H. J., ESPEY L.L. Utilization of the relaxed symphysis pubis of guinea pigs for clues to mechanism of ovulation. **Endocrinology**, 93: 1441-5, 1973.
- COLNOT C., SIDHU S. S., BALMAIN N, POIRIER F. Uncoupling of chondrocyte death and vascular invasion in mouse galectin-3 null mutant bones. **Dev. Biol.**, 229:203-214, 2001.
- COLNOT C., SIDHU S.S., POIRIER F., BALMAIN N. Cellular and subcellular distribution of galectin-3 in the epiphyseal cartilage and bone of fetal and neonatal mice. **Cell. Mol. Biol.**, 45: 1191-1202, 1999.
- COLNOT C., RIPOCHE M. A., MILON G., MONTAGUTELLI X., CROCKER P. R., POIRIER F. Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. **Immunol.**, 94: 290-296, 1998.
- COOPER D. N. W., & BARONDES S. H. God must love galectins; he made so many of them. **Glycobiology**, 9: 979-984, 1999
- COOPER D. N. Galectinomics: finding themes in complexity. **Biochim. Biophys. Acta.** 1572: 209-231, 2002.
- COWLES E. A., AGRWAL N., ANDERSON R. L., WANG J. L., Carbohydrate-binding protein 35. Isoelectric points of the polypeptide and a phosphorylated derivative. **J. Biol. Chem.**, 265: 17706-17712, 1990.
- CRAIG S. S., KRISHNASWAMY P., IRANI A-M. A., KEPLEY C. L., LIU F-T, SCHWARTZ L. B. Immunoelectron microscopic localization of galectin-3, an IgE binding protein, in human mast cells and basophils. **Anat. Rec.**, 242: 211-219, 1995.
- CRELIN E. S, NEWTON E. V. The pelvis of free-tailed bat, sexual dimorphism and

pregnancy changes. **Anat. Rec.**, 164: 349-58, 1969.

- CRELIN E. S. The development of bony pelvic sexual dimorphism in mice. **Ann. NY Acad. Sci.**, 84: 481-511, 1960.
- CRELIN E. S. The development of bony pelvis and its changes during pregnancy and parturition. **Trans. NY Acad. Sci.**, 31: 1049-58, 1969.
- CRELIN E. S., LEVIN J. The prepuberal pubic symphysis and uterus in the mouse: their response to estrogen and relaxin. **Endo.**, 57: 730-47, 1955.
- CVEJIC D., SAVIN S., GOLUBOVIC S., PAUNOVIC I., TATIC S., HAVELKA M., Galectin-3 and carcinoembryonic antigen expression in medullary thyroid carcinoma: possible relation to tumor progression. **Histopathology**, 37: 530-535, 2000.
- DAGHER S. F., WANG J. L., PATTERSON R. J. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92: 1213-17, 1995.
- DAVIDSON P. J., DAVIS M. J., PATTERSON R. J., RIPOCHE M. A., POIRIER F., WANG J. L. Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. **Glycobiology**, 12 (5): 329-37, 2002.
- DELL'ACCIO F., VANLAUWE J., BELLEMANS J., NEYS J., BARI C., LUYTEN F. Expanded phenotypically stable chondrocytes persist in the repair tissue and contribute to cartilage matrix formation and structural integration in a goat model of autologous chondrocyte implantation. **J. Orthop. Res.**, 21: 123-31, 2003.
- DUMIC J., DABELIC S., FLÖGEL M., Galectin-3: an open ended story. **Bioch. Biophys. Acta**, 1760: 616-635, 2006.
- FERRAILOLO B.L., CRONIN M., BAKHIT C., ROTH M., CHESTNUT M., LYON R. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of a human relaxin in the mouse symphysis bioassay. **Endocrinology**, 125: 2922-6, 1989.
- FREEMONT A. J., HOYLAND J. A. Morphology, mechanisms and pathology of musculoskeletal ageing. **J. Pathol.**, 211: 252-59, 2007.
- FREEMONT A. J., HOYLAND J., Lineage plasticity and cell biology of fibrocartilage and hyaline cartilage: its significance in cartilage repair and replacement. **Eur. Jour. Rad.**, 57:32-36, 2006.
- FRIEDEN E. H., HISAW F. I. The biochemistry of relaxin. **Recent Prog. Horm. Res.**, 8: 333-78, 1953.
- FRIEDRICHS J., MANNINEN A., MULLER D. J., HELENIUS J. Galectin-3 regulates integrin $\alpha 2\beta 1$ -mediated adhesion to collagen-I and -IV. **J. Biol. Chem.**, 283 (47):

32264-72, 2008.

- FRIGERI LG, ZUBERI RI, LIU FT. Epsilon BP, a beta-galactoside– binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RT) and activates mast cells. **Biochemistry** 32:7644–9, 1993.
- FUKUMORI T., OKA N., TAKENAKA Y., MAKKER P. N., ELSAMMAN E., KASAI T., SHONO M., KANAYAMA H., ELLERHORST J., LOTAN R., RAZ A. Galectin-3 regulates mitochondrial stability and antiapoptotic function in response to anticancer drug in prostate cancer. **Cancer. Res.**, 66 (6): 3114-19, 2006.
- FUKUMORI T., TAKENAKA Y., OKA N., YOSHII T., HOGAN V., INOHARA H., KANAYAMA H., KIM H. R. C., RAZ A. Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways. **Cancer Res.** 64: 3376-79, 2004.
- FUKUMORI T., TAKENAKA Y., YOSHII T., KIM H.R., HOGAN V., INOHARA H., KAGAWA S., RAZ A. CD29 and CD7 mediate galectin-3 induced type II T-cell apoptosis. **Cancer. Res.** 63: 8302-8311, 2003.
- GAMBLE J. G., SIMMONS S. C., FREEDMAN M. The symphysis pubis. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, 203: 261-272, 1986.
- GARDNER E., GRAY D. J., O'RAHILLY R. Anatomia: Estudo regional do corpo humano. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.18-23; 433-435, 1988.
- GASSE O., HESS C., MIOT S., DEON C., SANCHEZ J. C., SCHIFFERLI J. A. Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. **Exp. Cell Res.**, 285: 243-57, 2003.
- GIL C. D., COOPER D., ROSIGNOLI G., PERRETTI M., OLIANI S.M. Inflammation-induced modulation of cellular galectin-1 and -3 expression in a model of rat peritonitis. **Inflamm Res.**, 55(3):99-107, 2006.
- GONG HC, HONJO Y, NANGIA-MAKKER P. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. **Cancer Res** 59:6239–45; 1999.
- GRAY H. Anatomia. 29ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988.
- GUÉVREMONT M., MARTEL-PELLETIER J., BOILEAU C., LIU F-T., RICHARD M., FERNANDES J-C, PELLETIER J-P. Galectin-3 surface expression on human adult chondrocytes: a potential substrate for collagenase-3. **Ann. Rheum. Dis.**, 63: 636-43, 2004.
- HALL K. The effects of pregnancy and relaxin on the histology of the pubic symphysis in the mouse. **J. Endocrinol.**, 5: 174-82, 1947.

- HAM A. W. *Histologia*. 6 ed. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro 1972.
- HASHEM G., ZHANG Q., HAYAMI T., CHEN J., WANG W., KAPILA S. Relaxin and β -estradiol modulate targeted matrix degradation in specific synovial joint fibrocartilages: progesterone prevents matrix loss. **Arthr. Res. Ther.** 8 (4), 2006.
- HENDERSON N.C., MACKINNON A. C., FARNWORTH S.L., POIRIER F., RUSSO F.P., IREDALE J.P., HASLETT C., SIMPSON K.J., SETHI T. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. **PNAS** 103(13): 5060-5065, 2006.
- HESS C., SADALLAH S., HEFTI A., LANDMANN R., SCHIFFERLI J. A. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. **J. Immun.**, 163: 4564-73, 1999.
- HINZ B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. **J. Invest. Dermatol.**, 127: 526-37, 2007.
- HIRABAYASHI J. Galectin: definition and history. <http://www.glycoforum.gr.jp> - 03/2004.
- HIRABAYASHI J., HASHIDATE T., NISHI N., NAKAMURA M., URASHIMA T., OKA T., FUTAI M., MULLER E. G., YAGI F., KASAI K. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. **Biochim. Biophys. Acta**, 1572: 232-254, 2002.
- HONJO Y, INOHARA H, AKAHANI S. Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. **Clin Cancer Res** 6:4635-40; 2000.
- HOUZELSTEIN D., GONÇALVES L. R., FADDEN A. J., SIDHU D. N., COOPER K. D., LEFFLER H., POIRIER F. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. **Mol. Biol. Evol.**, 21: 1177-1187, 2004.
- HSU D. K., LIU F. T. Regulation of cellular homeostasis by galectins. **Glycoconjugate J.**, 19: 507-15, 2004.
- HSU D. K. YANG R. Y., PAN Z., YU L., SALOMON D. R., FUNG-LEUNG W. P., LIU F. T. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. **Am. J. Pathol.**, 156: 1073-1083, 2000.
- HSU D. K., ZUBERI R. I., LIU F. T. Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein and S-type animal lectin. **J. Biol. Chem.**, 267: 14167-14174, 1992.
- HUBERT M., WANG S., WANG J., SÈVE A., HUBERT J. Intranuclear distribution of galectin-3 in mouse 3T3 fibroblast: Comparative Analyses by Immunofluorescence and

Immunoelectron microscopy. **Exp. Cell Res.**, 220: 397–406, 1995.

- INOHARA H., AKAHANI S., RAZ A. Galectin-3 stimulates cell proliferation. **Exp. Cell Res.**, 245: 481-489, 1998.
- KIM H. R. C., LIN H. M. BILIRAN H., RAZ A. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. **Cancer Res.**, 59: 4148-4154, 1999.
- KIM H., LEE J., HYUN J. W., PARK J. W., JOO H., SHIN T. Expression and immunohistochemical localization of galectin-3 in various mouse tissues. **Cell Biol. Int.**, 31: 655-62, 2007.
- KIWAKI K., NOVAK C. M., HSU D. K., LIU F. T., LEVINE J. A. Galectin-3 stimulates preadipocyte proliferation and is up-regulated in growing adipose tissue. **Obesity**, 15 (1) 32-9, 2007.
- KROC R. L., STEINETZ B. G., BEACH V. L. The effects of estrogens, proestrogens, and relaxin in pregnant and nonpregnant laboratory rodents. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 75: 942-80, 1958.
- KUBAWARA I., LIU F. T. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. **J. Immunol.**, 156: 3939:3944, 1996.
- KURIEN B. T., SCOFIELD R. H. Western Blotting. **Methods**, 38: 283-93, 2006.
- LEE T. L., LIN Y. C., MOCHITATE K., GRINNELL F. Stress-relaxation of fibroblasts in collagen matrices triggers ectocytosis of plasma membrane vesicles containing actin, annexins II and VI, and $\beta 1$ integrin receptors. **J. Cell Science**, 105: 167-77, 1993.
- LEFFLER H., CARLSSON S., HEDLUND M., QIAN Y., POIRIER F. Introduction to galectins. **Glycoconj. J.**, 19: 433-440, 2004.
- LI S. Y., DAVIDSON P. J., LIN N. Y., PATTERSON R. J., WANG J. L., ARNOYS E. J. Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. II. Identification of the signal for nuclear export. *Glycobiology*, 16 (7): 612-622, 2006.
- LIN H. M., MOON B. K., YU F. KIM H. R. Galectin-3 mediates genistein-induced G(2)/M arrest and inhibits apoptosis. **Carcinogen**, 21: 1941-1945, 2001.
- LIN H. M., PESTEL R. G., RAZ A., KIM H. R. C. Galectin-3 enhances cyclin D1 promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. **Oncogene**, 21: 8001-10, 2002.
- LIPPERT E., GUNCKEL M., BRENMÖEHL J., BATAILE F., FALK W., SCHOLMERICH J., OBERMEIER E., ROGLER G. Regulation of galectin-3 function in mucosal fibroblasts: potential role in mucosal inflammation. **Clin. Exp. Immun.** 152: 285-97,

2008.

- LIU F. T. Galectins: a new family of regulator of inflammation. **Clin. Immun.**, 97 (2): 79-88, 2000.
- LIU F. T., PATTERSON R. J., WANG J. L. Intracellular functions of galectins. **Biochim. Biophys. Acta**, 1572: 263-73, 2002.
- LIU, X., ZHAO, Y., GAO, J., PAWLYK, B., STARCHER, B., SPENCER, J.A., YANAGISAWA, H., ZUO, J., LI, T. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. **Nat Genet** 36(2), 178-182, 2004.
- LUKAYANOV P., FURTAK V., OCHIENG J. Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, 338: 1031-36, 2005.
- MAEDA N., KAWADA N., SEKI S., ARAKAWA T., IKEDA K., IWAO H., OKUYAMA H., HIRABAYASHI J., KASAI K., YOSHIZATO K. Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. **J. Biol. Chem.**, 278 (21): 18938-44, 2003
- MAEDA N., KAWADA N., SEKI S., IKEDA K., OKUYAMA H., HIRABAYASHI J., KASAI K., YOSHIZATO K. Involvement of galectin-1 and galectin-3 in proliferation and migration of rat hepatic stellate cells in culture. **Comp. Hepat.**, 3 (suppl 1): 2-3, 2004.
- MANDRELL R. E., APICELLA M. A., LINDSTEDT R., LEFFLER H. Possible interaction between animal lectins and bacterial carbohydrates. **Methods Enzymol.**, 236: 231-254, 1994.
- MANNING J. P., STEINETZ B. G., BUTLER M. C., PRIESTER S. The effect of steroids and relaxin on acid phosphatase in the pubic symphysis of the ovariectomized mouse. **J. Endocrin.**, 33: 501-06, 1965.
- MARNACH M. L., RAMIN K. D., RAMSEY P. S., SONG S. W., STENSLAND J. J., NA K. N. Characterization of the relationship between joint laxity and maternal hormones in pregnancy. **Obstet. Gynecol.**, 101: 331-5, 2003.
- MATARRESE P., TINARI N., SEMERARO M.L., NATOLI C., IACOBELLI S., M W. Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis. **FEBS Letters**, 473: 311-315, 2000.
- MATHIEU A, SAAL I, VUCKOVIC A. Nuclear galectin-3 expression is an independent predictive factor of recurrence for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. **Mod Pathol** 18:1264–71; 2005;

- McDONALD J. K., SCHWABE C. Relaxin-induced elevations of cathepsin B and dipeptidyl peptidase I in the mouse pubic symphysis, with localization by fluorescence enzyme histochemistry. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 380: 178-186, 1982.
- McMURTRY J. P., FLOERSHEIM G. L., BRYANT-GREENWOOD G. D. Characterization of the binding of I-labelled succinylated porcine relaxin to the human and mouse fibroblasts. **J. Reprod. Fert.**, 58: 43-9, 1980.
- MEHUL B. & HUGHES R. C. Plasma membrane targeting, vesicular budding and release of galectin-3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. **J. Cell Sci.**, 110: 1169-1178, 1997.
- MELO F.H., BUTERA D., MEDEIROS R.S., ANDRADE L.N., NONOGAKI S., SOARES F.A., ALVAREZ R.A., MOURA DA SILVA A.M., CHAMMAS R.. Biological applications of a chimeric probe for the assessment of galectin-3 ligands. **J Histochem Cytochem.** 55(10):1015-26, 2007.
- MEY A., LEFFLER H., HMAMA Z., NORMIER G., REVILLARD J. P. The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites. **J. Immunol.**, 156: 1572-1577, 1996.
- MONTCALM A. J., BOILEAU C., POIRIER F., PELLETIER J. P., GUÈVREMONT M., DUVAL N., PELLETIER J. M., REBOUL P. Extracellular localization of galectin-3 has a deleterious role in joint tissues. **Arthr. Res.**(doi: 10.1186/ar2130), 2007.
- MOON B., LEE J. Y., BATTLE P., JESSUP J. M., RAZ A., KIM H. C. Galectin-3 protects human breast carcinoma against nitric oxide – Induced Apoptosis. Implication of galectin-3 function during metastasis. **Am. J. Pathol.**, 159: 1055-60, 2001.
- MORAES S. G., PINHEIRO M. C., TOLEDO O. M. S., JOAZEIRO P. P. Phenotypic modulation of fibroblastic cells in mice pubic symphysis during pregnancy, partum and postpartum. **Cell Tiss Res.**, 315: 223-31, 2004.
- MOUTSATSOS I., WADE M., SHINDLER M., WANG J. L. Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 84: 6452-56, 1987.
- NAKAHARA S., RAZ A. Regulation of cancer-related gene expression by galectin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway. **Canc. Met.**, 26: 605-610, 2007.
- NAKAHARA S., HOGAN V., INOHARA H., RAZ A. Importin-mediated nuclear translocation of galectin-3. **J. Biol. Chem.**, 261 (51): 39649-59, 2006.
- NAQVI T., DUONG T. T., HASHEM G., SHIGA M., ZHANG Q., KAPILA S. Relaxin's induction of metalloproteinases is associated with the loss of collagen and glycosaminoglycans in synovial joint fibrocartilaginous explants. **Arthr. Res. Ther.**, 7: R1-

R11, 2005.

- NEDER L., MARIE S.K., CARLOTTI C.G. JR, GABBAI A.A., ROSEMBERG S., MALHEIROS S.M., SIQUEIRA R.P., OBA-SHINJO S.M., UNO M., AGUIAR P.H., MIURA F., CHAMMAS R., COLLI B.O., SILVA W.A. JR, ZAGO M.A.. Galectin-3 as an immunohistochemical tool to distinguish pilocytic astrocytomas from diffuse astrocytomas, and glioblastomas from anaplastic oligodendrogliomas. **Brain Pathol.**, 14(4):399-405, 2004.
- NEIDHART M., ZAUCKE F., VON KNOCH R., JÜNGEL A., MICHEL B. A., GAY R.E., GAY S. Galectin-3 is induced in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts after adhesion to cartilage oligomeric matrix protein. **Ann Rheum Dis.**, 64(3):419-24, 2005.
- OCHIENG J., GREEN B., EVANS S., JAMES O., WARFIELD P. Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1379: 97-106, 1998a.
- OCHIENG J., LEITE-BROWNING M. L., WARFIELD P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 246: 788-91, 1998b.
- OCHIENG J., WARFIELD P., GREEN-JARVIS B., FENTIE I. Galectin-3 regulates the adhesive interaction between breast carcinoma cells and elastin. **J. Cell Biochem.**, 75 (3): 505-514, 1999.
- OLIVEIRA F.L., FRAZÃO P., CHAMMAS R., HSU D.K., LIU F.T., BOROJEVIC R., TAKIYA C.M., EL-CHEIKH M.C.. Kinetics of mobilization and differentiation of lymphohematopoietic cells during experimental murine schistosomiasis in galectin-3 *-/-* mice. **J Leukoc Biol.**, 82(2):300-10,. 2007.
- ORTEGA H. H., MUÑOZ-DE-TORO M. M., LUQUE E. H., MONTES G. S. Morphological characteristics of the interpubic joint (symphysis pubica) of rats, guinea pigs and mice in different physiological situations. **Cells Tis. Organs**, 173: 105-114, 2003.
- ORTEGA N., BEHONICK D. J., COLNOT C., COOPER D. N., WERB Z. Galectin-3 is a downstream regulator of matrix metalloproteinase-9 function during endochondral bone formation. **Mol Biol. Cell**, 16: 3028-3039, 2005.
- PATTERSON R. J., WANG W., WANG J. L. Understanding the biochemical activities of galectin-1 and galectin-3 in the nucleus. **Glycoconj. J.**, 19: 543-9, 2004.
- PERILLO N. L., MARCUS M. E., BAUM L. G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. **J. Mol. Med.**, 76: 402-12, 1998.
- PHILLIPS B., KNISLEY K., WEITLAUF K. D., DORSETT J., LEE V., WEITLAUF H. Differential expression of two β -galactoside-binding lectins in the reproductive tracts of pregnant mice. **Biol. Reprod.**, 55: 548-58, 1996.

- PILZER D., GASSER O., MOSKOVISH O., SCHIFFERLI J. A., FISHELSON Z. Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. **Springer Semin. Immun.**, 27: 375-87, 2005.
- PINHEIRO M. C., JOAZEIRO P. P., MORA O. A., TOLEDO O. M. S. Ultrastructural and immunohistochemical analysis of proteoglycans in mouse pubic symphysis. **Cell Biol. Int.**, 27: 647-55, 2003.
- PINHEIRO M. C., MORA O. A., CALDINI E. G., BATTLEHNER C. N., JOAZEIRO P. P., TOLEDO O. M. S. Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans in the mouse pubic symphysis during pregnancy. **Cell Biol. Int.**, 29: 458-71, 2005.
- PINHEIRO M. C., MORAES S. G., BATTLEHNER C. N., CALDINI E. G., TOLEDO O. M. S. JOAZEIRO P. P. Histochemical and ultrastructural study of collagen fibers in mouse pubic symphysis during late pregnancy. **Micron**, 35: 685-93, 2004.
- RINI J. M., LOBSANOV Y. D. New animal lectin structures. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, 9: 578-584, 1999.
- ROACH H. I., AIGNER T., KOURI J. B. Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? **Apoptosis**, 9 (3): 265-77, 2004.
- ROCHA R. C. G., CHOPARD R. P. Nutrition pathways to the symphysis pubis. **J. Anat.**, 204: 209-15, 2004.
- RODRIGUEZ H. A., ORTEGA H. H., RAMOS J. G., MUÑOZ-DE-TORO M., LUQUE E. H. Guinea-pig interpubic joint (symphysis pubica) relation at parturition: Underlying cellular process that resemble an inflammatory response. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, 1:113-121, 2003.
- ROSA R.G., TARSITANO C.A.A, HYSLOP S., JOAZEIRO P.P. Mouse pubic relaxation during late pregnancy is not accompanied by the influx of granulocytes cells of a typical inflammatory response. **Microsc Res Tech.**, 71(3):169-78, 2008.
- SAMUEL C. S., BUTKUS A., COGHLAN J. P. BATEMAN J. F. The effect of relaxin on collagen metabolism in the nonpregnant rat pubic symphysis: the influence of estrogen and progesterone in regulating relaxin activity. **Endocrinology**, 137 (9): 3884-90, 1996.
- SAMUEL C. S., COGHLAN J. P., BATEMAN J. F. Effects of relaxin, pregnancy and parturition on collagen metabolism in the rat pubic symphysis. **J. Endocr.** 159: 117-25, 1998.
- SANO H., HSU D.K., APGAR J.R., KUWABARA I., YAMANAKA T., HIRASHIMA M., LIU F.T. Human galectin-3 is a novel novel chemoattractant for monocytes and macrophages. **J Immunol.** 165: 2156-2164, 2000.

- SASAKI T., BRAKEBUSCH C., ENGEL J., TIMPL R., Mac-2 binding protein is a cell-adhesive protein of the extracellular matrix which self-assembles into ring-like structures and binds beta 1 integrins, collagens and fibronectin. **EMBO J.** 17: 1606-1613, 1998.
- SCHWABE C., STEINETZ B., WEISS G., SEGALOFF A., McDONALD J. K., O'BYRNE E., HOCHMAN J., CARRIERE B., GOLDSMITH L. Relaxin. *Recent. Prog. Horm. Res.*, 34:123-211, 1978.
- SEETHARAMAN J., KANIGSBERG R., SLAABY H., LEFFLER H., BARONDES S. H., RINI J. M. X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1 resolution. **J. Biol. Chem.**, 273: 13047-13052, 1998.
- SHERWOOD O. D. Relaxin. In: *Physiology of reproduction*. Ed. KONOBIL, E. & NEILL, J.D. **Raven Press.**, 861-1009, 1994.
- SHIMURA T., TAKENAKA Y., FUKUMORI T., TSUTSUMI S., OKADA K., HOGAN V., KIKUCHI A., KUWANO H., RAZ A. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. **Cancer Res.**, 65 (9): 3535-37, 2005.
- SILVA-MONTEIRO E, REIS LORENZATO L, KENJI NIHEI O, JUNQUEIRA M, RABINOVICH GA, HSU DK, LIU FT, SAVINO W, CHAMMAS R, VILLA-VERDE D. M. Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Pathol.**, 170(2):546-56, 2007.
- STEIN J. M., LUZIO J. P. Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. **Biochem. J.**, 274: 381-6, 1991.
- STEINETZ B. G., O'BYRNE E. M., GOLDSMITH L. T., ANDERSON M. B. The source of relaxin in pregnant syrian hamster. **Endocrinology**, 122: 795-98, 1988.
- STOCK M., SCHÄFER H., STRICKER S., GROSS G., MUNDLOS S. Expression of galectin-3 in skeletal tissues is controlled by Runx2. **J. Biol. Chem.**, 278 (19): 17360-67, 2003.
- STOREY, E. - Relaxation in the pubic symphysis of the mouse during pregnancy and after relaxin administration, with special reference to the behavior of collagen. **J. Pathol. Bacteriol.**, 74: 147-162, 1957.
- TALMAGE R. V. A histological study of the effects of relaxin on the symphysis pubis of the guinea pig. **J. Exp. Zool.**, 106: 281-92, 1947 b.
- TALMAGE R. V. Changes produced in the symphyseal pubis of the guinea pig by the sex steroids and relaxin. **Anat. Record.**, 99: 91-113, 1947a.

- VAN DEN BRÛLE F. A., FERNANDEZ P. L., BUICU C., LIU F., JACKERS P., LAMBOTTE R., CASTRONOVO V. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 during first trimester human embryogenesis. **Dev. Dyn.**, 209: 399-405, 1997.
- VAN DEN BRÛLE F. A., BUICU C., SOBEL M. E., LIU F. T., CASTRONOVO V. Galectin-3, a laminin binding protein fails to modulate adhesion of human melanoma cells to laminin. **Neoplasma**, 42: 215-219, (1995).
- VERIDIANO A. M., GARCIA E. A., PINHEIRO M. C., NISHIMORI F. Y., TOLEDO O. M. S., JOAZEIRO P. P. The mouse pubic symphysis as a remodeling system: morphometrical analysis of proliferation and cell death during pregnancy, partus and postpartum. **Cell Tiss. Res.**, 330: 161-7, 2007.
- VIELL B., STRUCK H. Effects of the hormone relaxin on the metabolism of glycosaminoglycans in the mouse symphysis pubis. **Horm. Metabol. Res.**, 19: 415-18, 1987.
- VILLA-VERDE D.M., MELLO-COELHO V., LAGROTA-CÂNDIDO J.M., CHAMMAS R., SAVINO W.. The thymic nurse cell complex: an in vitro model for extracellular matrix-mediated intrathymic T cell migration. **Braz J Med Biol Res**,;28(8):907-12. 1995.
- VILLA-VERDE D.M., SILVA-MONTEIRO E., JASIULIONIS M.G., FARIAS-DE-OLIVEIRA D.A., BRENTANI R.R., SAVINO W., CHAMMAS R.. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. **Eur J Immunol.** ;32(5):1434-44, 2002
- WAHL L.M.; BLANDAU R. J., PAGE R. C. Effects of hormones on collagen metabolism and collagenase activity in the pubic symphysis ligament of the guinea pig. **Endocrinology**, 100: 571-579, 1977.
- WANG J. L., GRAY R. M., HAUDEK K. C., PATTERSON R. J. Nucleocytoplasmic lectins. **Biochem. Biophys. Acta**, 1673: 75-93, 2004.
- WANG L., INOHARA H., PIENTA K. J., RAZ A. Galectin-3 is a nuclear matrix protein which binds RNA. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, 217: 292-303, 1995.
- WANG W., HAYAMI T., KAPILA S. Female hormone receptors are differentially expressed in mouse fibrocartilages. **Osteoarthr. Cart.** Doi: 10.1016/j.joca.2008.05.015, 2008.
- WEN Y., POLAN M. L., CHEN B. Do extracellular matrix protein expressions change with cyclic reproductive hormones in pelvic connective tissue from women with stress urinary incontinence? **Human Repr.**, 21 (5): 1266-73, 2006.
- YANG E., SHIM J S., WOO H. J., KIM K. W., KWON H. J. Aminopeptidase N/CD13 induces angiogenesis through interaction with a pro-angiogenic protein, galectin-3. **Bioch. Biophys. Res. Com.**, 363: 336-41, 2007.

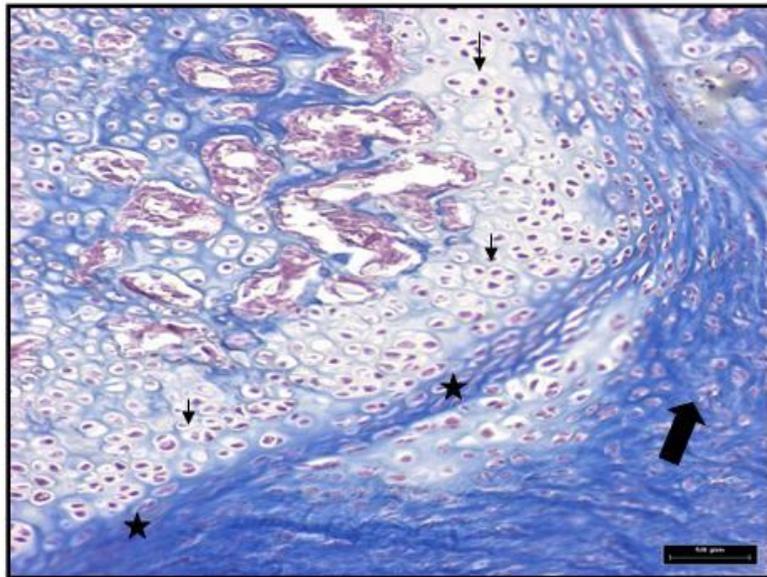
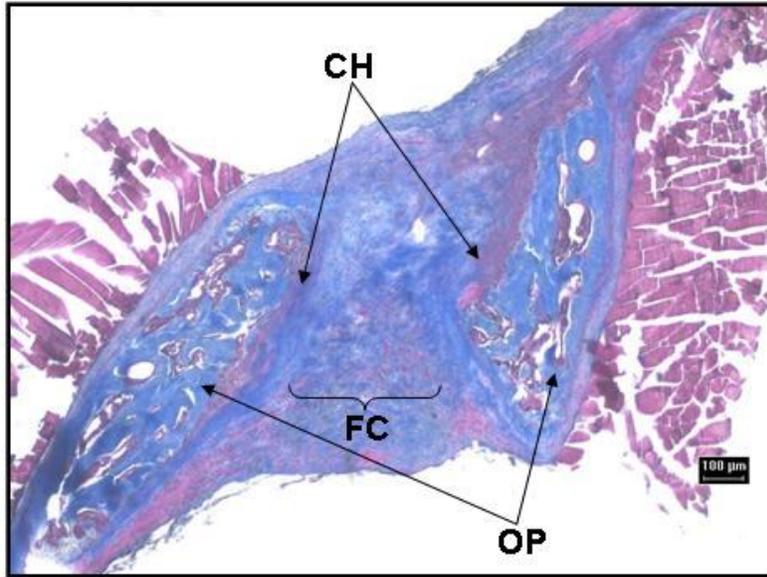
- YANG R. Y., LIU F. T. Galectins in cell growth and apoptosis. **Cell. Mol. Life Sci.**, 60: 636-43, 2003.
- YANG R. Y., RABINOVICH G. A., LIU F. T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert. Ver. Mol. Med.**, 10 (17), 2008.
- YANG R. Y., HSU D. K., LIU F. T. Expression of galectin-3 modulates T cell growth and apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 93: 6737-6742, 1996.
- YANG S., REMBIESA B., BÜLLESBACH E. E., SCHWABE C. Relaxin receptors in mice: Demonstration of ligand binding in symphyseal tissue and uterine membrane fragments. **Endocrinology**, 130: 179-85, 1992.
- YOSHII T., FUKUMORI T., HOMJO Y., INOHARA H., KIM H. C., RAZ A. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. **J. Biol. Chem.**, 277: 6852-7, 2002.
- ZHUO Y., CHAMMAS R., BELLIS S. L. Sialylation of β -integrins blocks cell adhesion to galectin-3 and protects cells against galectin-3 induced apoptosis. **J. Biol. Chem.**, disponível no endereço eletrônico <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M800015200>.

8. FIGURAS

As figuras 1 e 2 referem-se à fotomicrografias de sínfise púbica de animais virgens:

Figura 1: A sínfise púbica é formada por uma região central fibrocartilaginosa (FC), cercada em suas extremidades por dois coxins de cartilagem hialina (CH) que, por sua vez, são rodeados por uma porção óssea (OP). Coloração Tricrômico de Masson. Aumento 2x.

Figura 2: A região de cartilagem hialina (CH) é composta por condrócitos hipertróficos, condroblastos e uma matriz extracelular densa e basófila. Os condrócitos hipertróficos (setas) são células grandes, com núcleos arredondados, que por esta técnica aparecem corados fortemente em roxo. Os condroblastos (estrelas), por estarem localizados na porção mais periférica da cartilagem, apresentam forma mais elíptica, com núcleo ovóide. O pericôndrio é constituído por fibroblastos alongados, com núcleos densos. Segue-se a esta região, uma zona de transição (setas largas), formada por condrócitos não totalmente diferenciados, de aspecto arredondado e com núcleos grandes. Coloração Tricrômico de Masson. Aumento 10x.



As figuras 3, 4 e 5 referem-se à fotomicrografias de sínfise púbica de animais no D12.

Figura 3: (FC) região central fibrocartilaginosa; (setas) região de cartilagem hialina. Coloração Tricrômico de Masson. Aumento 2x.

Figura 4: (FC) região central fibrocartilaginosa; (setas) região de cartilagem hialina. Coloração Tricrômico de Masson. Aumento 10x.

Figura 5: Detalhe da região central da sínfise. Esta região ainda é formada por uma porção central fibrocartilaginosa situada entre dois coxins de cartilagem hialina. Na porção de cartilagem hialina, nota-se a presença de condrócitos hipertróficos (setas). Coloração Tricrômico de Masson. Aumento 20x.

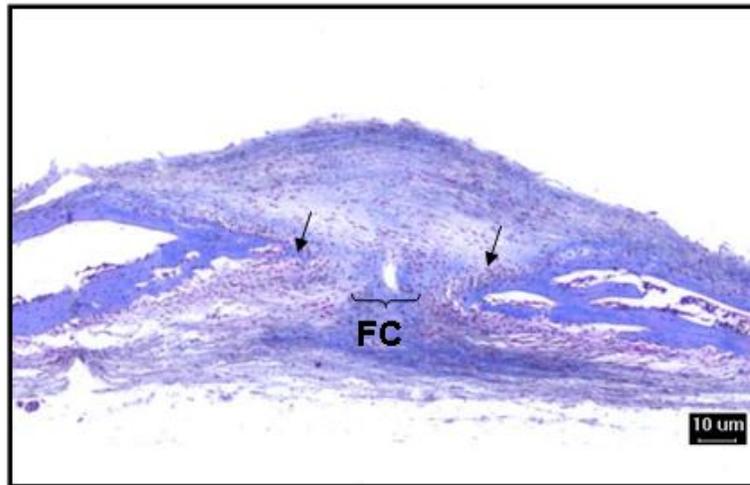


Figura 3

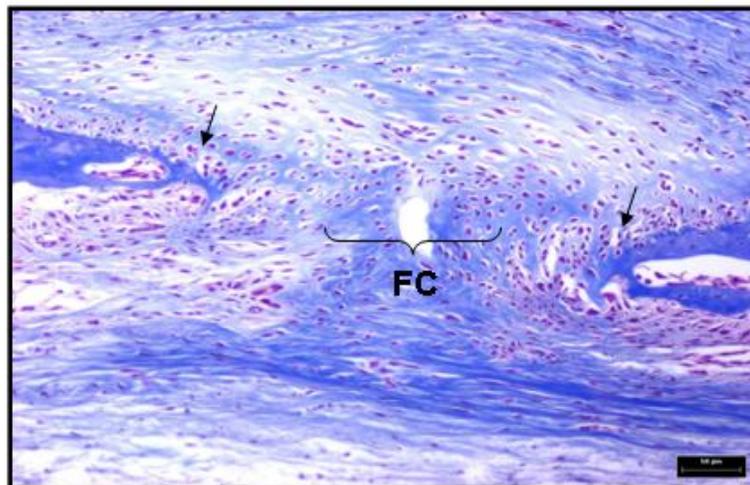


Figura 4

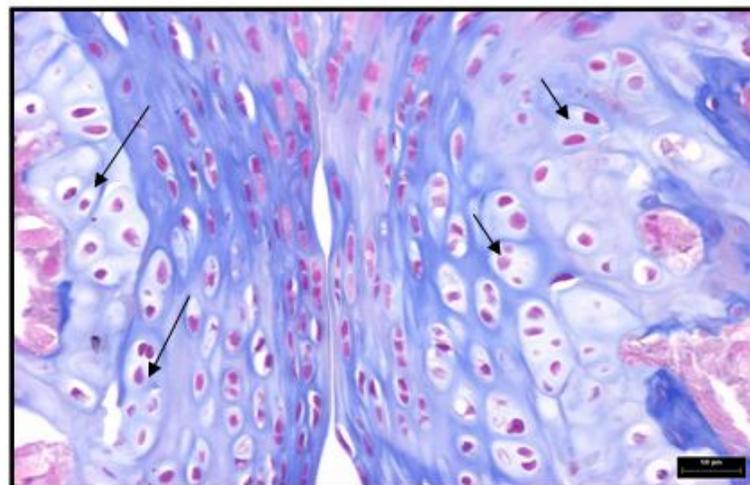


Figura 5

As figuras 6, 7 e 8 referem se a fotomicrografias de sínfise púbica de animais no D15:

Figura 6: No D15 já é possível a observação do início da formação do ligamento interpúbico (LI). A região de cartilagem hialina, bem como a porção óssea são parcialmente reabsorvidas, contribuindo para o aumento da zona de transição (ZT). Coloração Tricrômico de Masson. Aumento 2x.

Figura 7: Neste dia os condrócitos hipertróficos da região de cartilagem hialina (CH) passam por um processo de desdiferenciação, contribuindo para o aumento da zona de transição (ZT). Além disso, as células da zona de transição assumem um aspecto alongado, semelhante ao de fibroblastos (setas). Coloração Tricrômico de Masson. Aumento 10x.

Figura 8: Região Central. Nesta região, situa-se o ligamento em formação. O ligamento é composto por células alongadas semelhantes à fibroblastos. Estas células se dispõem com o seu maior eixo acompanhando o eixo do ligamento. Neste momento, algumas células passam a expressar altas taxas de α -actina de músculo liso, passando a ser chamadas de células semelhantes à miofibroblastos. No entanto, não é possível diferenciar os tipos celulares apenas por esta técnica de coloração. As fibras da matriz aparecem coradas em azul. Coloração Tricrômico de Masson. Aumento 20x.

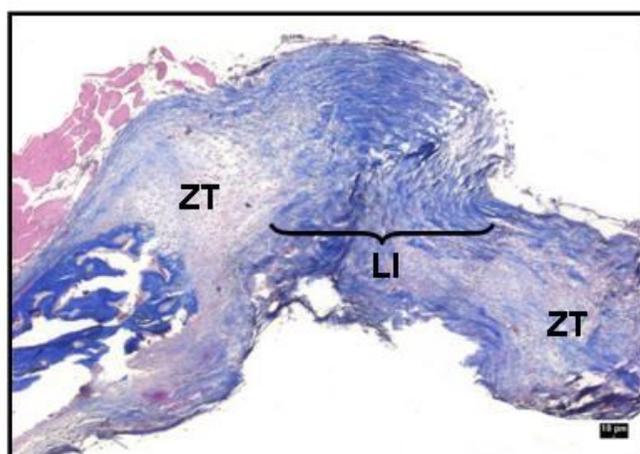


Figura 6

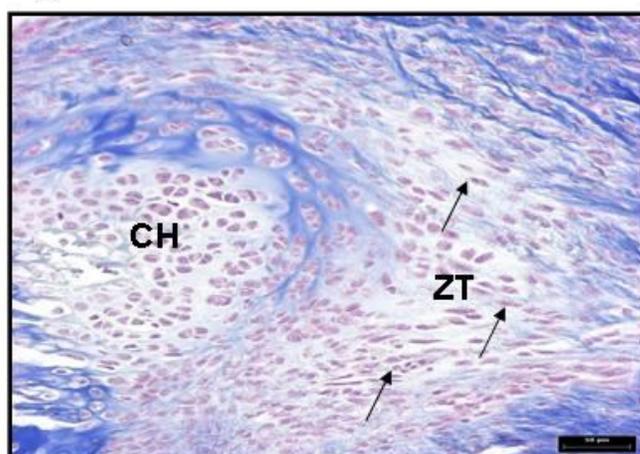


Figura 7

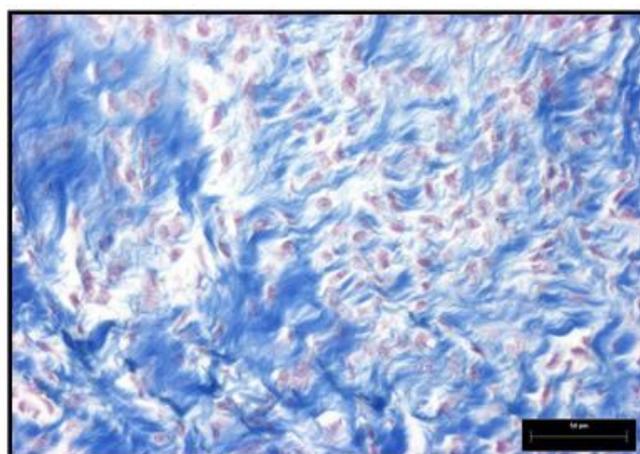


Figura 8

As figuras 9, 10 e 11 referem-se à fotomicrografias de sínfise púbica de animais no D18.

Figura 9: Neste dia da prenhez, o ligamento interpúbico (LI) já está completamente formado. A região de cartilagem hialina (estrelas) é muito menor em relação aos dias anteriores, e as células da zona de transição (setas largas) apresentam um aspecto alongado, semelhante às aquelas presentes no ligamento. Coloração Tricrômico de Masson. Aumento 2x.

Figura 10: A região de cartilagem hialina (estrelas) apresenta-se descaracterizada, devido ao processo de reabsorção da mesma que acontece durante a transformação da sínfise durante a prenhez. A região de transição (seta larga) apresenta uma porção formada por condrócitos mais arredondados, porém, estas células vão se achatando conforme se aproximam do ligamento (setas). Coloração Tricrômico de Masson. Aumento 10x.

Figura 11: A região central é pouco celular. As células presentes nesta região denominadas células semelhantes à miofibroblastos (setas) aparecem com o núcleo corado em rosa. A matriz, corada em azul, apresenta grande número de fibras colágenas e elásticas. Em algumas regiões é possível à observação do “crimp” das fibras colágenas, que dão ao tecido um aspecto ondulado. Coloração Tricrômico de Masson. Aumento 20x.

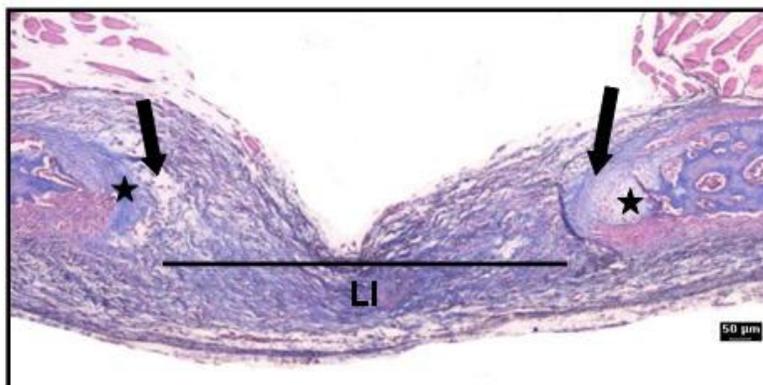


Figura 9

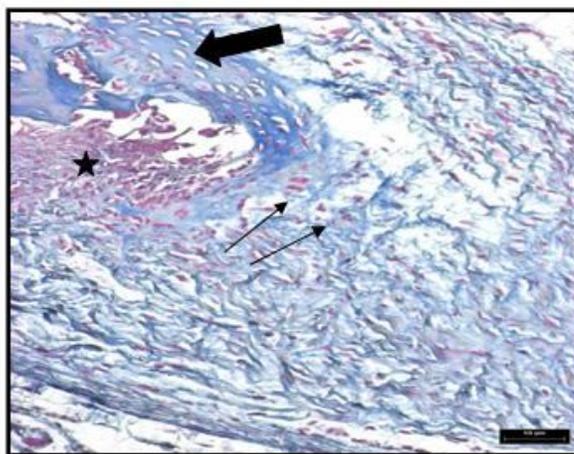


Figura 10

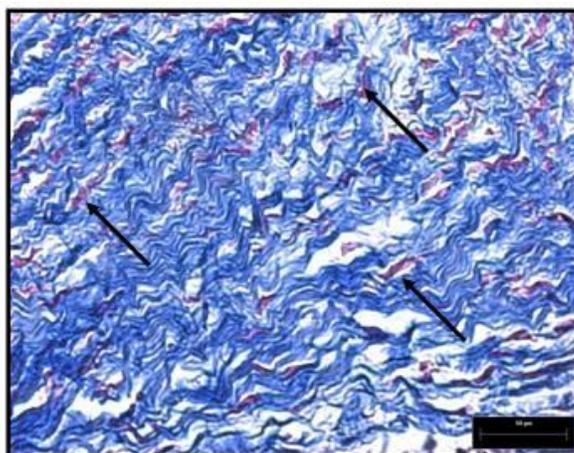


Figura 11

As figuras 12, 13 e 14 referem-se à fotomicrografias de sínfise púbica de animais no D19.

Figura 12: É possível notar que, neste dia de prenhez, o ligamento interpúbico (LI) predomina sobre todos os outros componentes da articulação. Coloração Tricrômico de Masson. Aumento 2x.

Figura 13: A região óssea aparece fortemente corada em azul (estrelas brancas). Nota-se uma maior reabsorção da porção cartilaginosa (PC) e amolecimento da porção do ligamento (LI). Coloração Tricrômico de Masson. Aumento 10x.

Figura 14: Detalhe. As células semelhantes a fibroblastos e miofibroblastos presentes nesta região apresentam aspecto alongado (setas) e aparecem com os núcleos corados em rosa. As fibras da matriz são bastante dispersas e aparecem coradas em azul. Coloração Tricrômio de Masson. Aumento 10x.

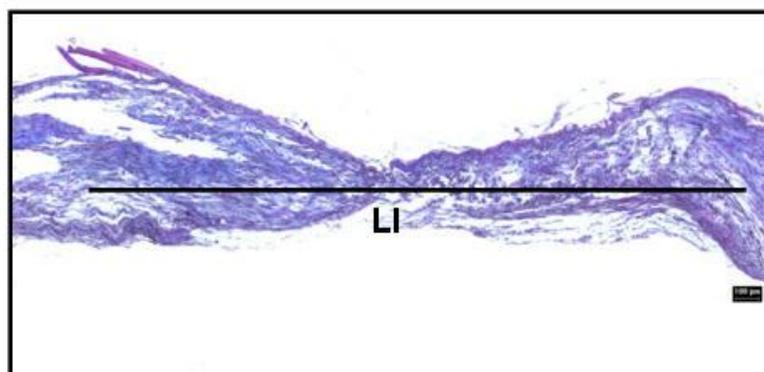


Figura 12

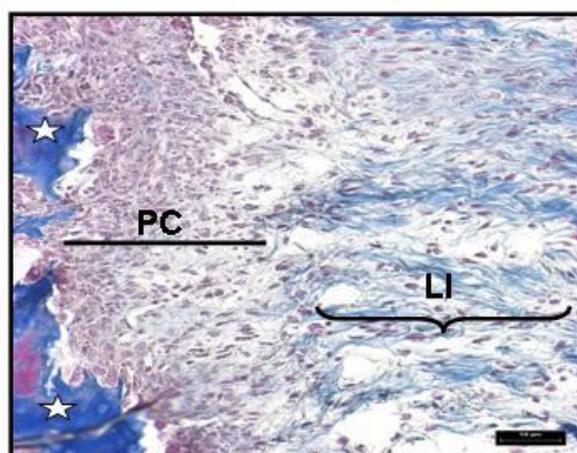


Figura 13

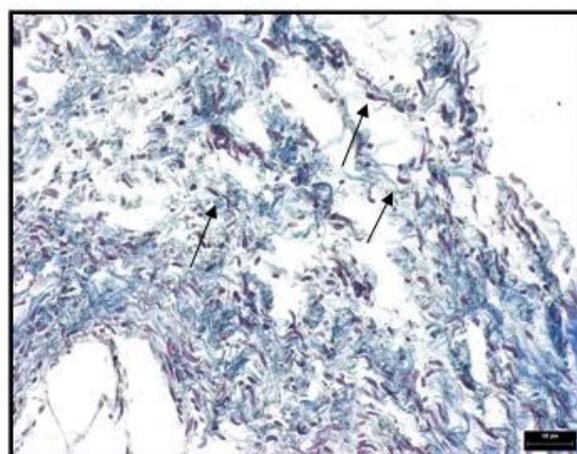


Figura 14

As figuras 15 e 16 referem-se à fotomicrografias de sínfise púbica de animais no 3DP.

Figura 15: Após o parto, inicia-se a involução do ligamento interpúbico (LI). A região de cartilagem hialina (setas) volta a se regenerar e aumenta o número de condrócitos hipertróficos desta região. Ainda não é possível a caracterização de uma zona de transição típica, porém, algumas células próximas à região cartilaginosa assumem um aspecto mais arredondado, típico dos condrócitos não totalmente diferenciados desta região (setas largas). A região central passa a ser composta por um tecido mais celular e menos elástico do que aquele presente antes do parto. As células semelhantes à miofibroblastos começam a diminuir em número. Em algumas regiões ainda é possível observar o “crimp” do colágeno dando um aspecto ondulado ao ligamento remanescente. (estrelas) região óssea. Coloração Tricrômico de Masson. Aumento 2x.

Figura 16: Detalhe. A porção óssea aparece corada em azul (estrela). Neste aumento é possível observar a reestruturação tanto da zona de cartilagem hialina (seta) quanto da zona de transição (seta larga). Coloração Tricrômico de Masson. Aumento 10x.

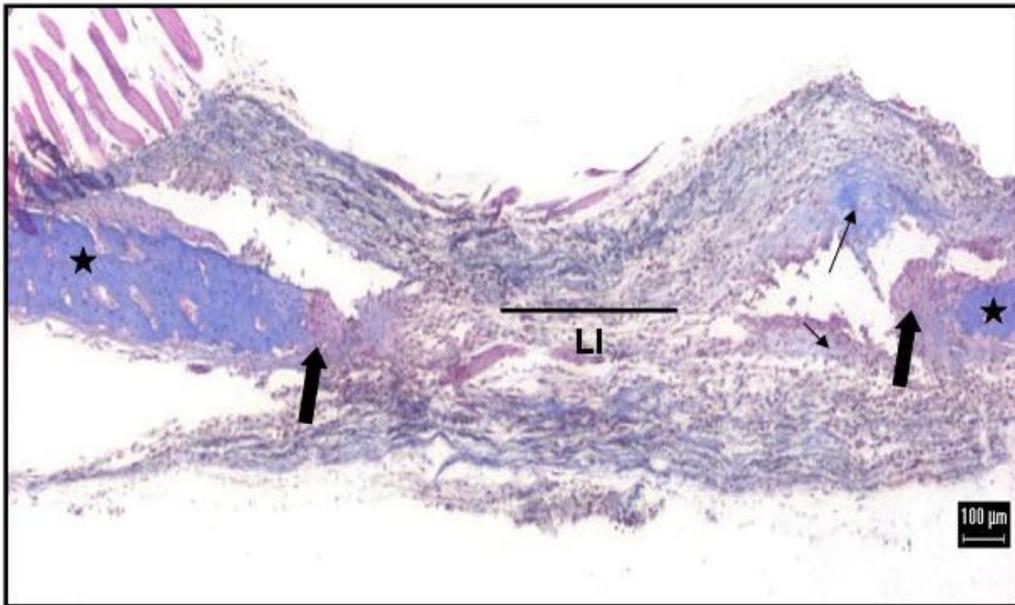


Figura 15

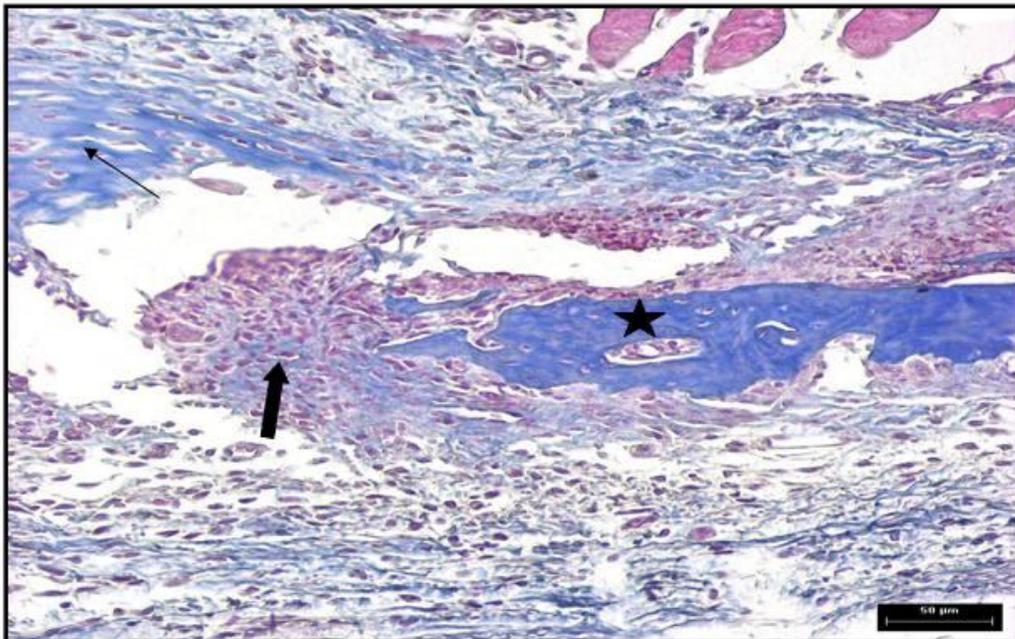


Figura 16

As figuras 17 e 18 referem-se à fotomicrografias de sínfise púbica de animais no 5DP:

Figura 17: Neste dia, a sínfise apresenta características morfológicas semelhantes à de um animal virgem. Tanto a porção óssea (OP) quanto a porção de cartilagem hialina (setas) são completamente restabelecidas. Nota-se uma típica zona de transição cartilaginosa (setas largas) onde os condrócitos aparecem mais fracamente corados, em relação à cartilagem hialina. A região central volta a ser composta por um tecido fibrocartilaginoso (FC), onde as fibras são mais compactadas.

Figura 18: Nota-se uma região de cartilagem hialina (setas) adjacente ao osso púbico (OP). Esta cartilagem apresenta matriz fortemente corada em azul. A partir desta região nota-se a formação da zona de transição (estrela), que apresenta um aspecto cônico, e apresenta células mais alongadas e matriz relativamente mais frouxa em relação à cartilagem hialina. Seguindo em direção ao centro, nota-se um tecido fibrocartilaginoso, onde as células semelhantes à fibroblastos apresentam um aspecto alongado (cabeças de seta) e a matriz apresenta fibras compactas e orientadas (setas largas). Coloração Tricrômico de Masson. Aumento 10x.

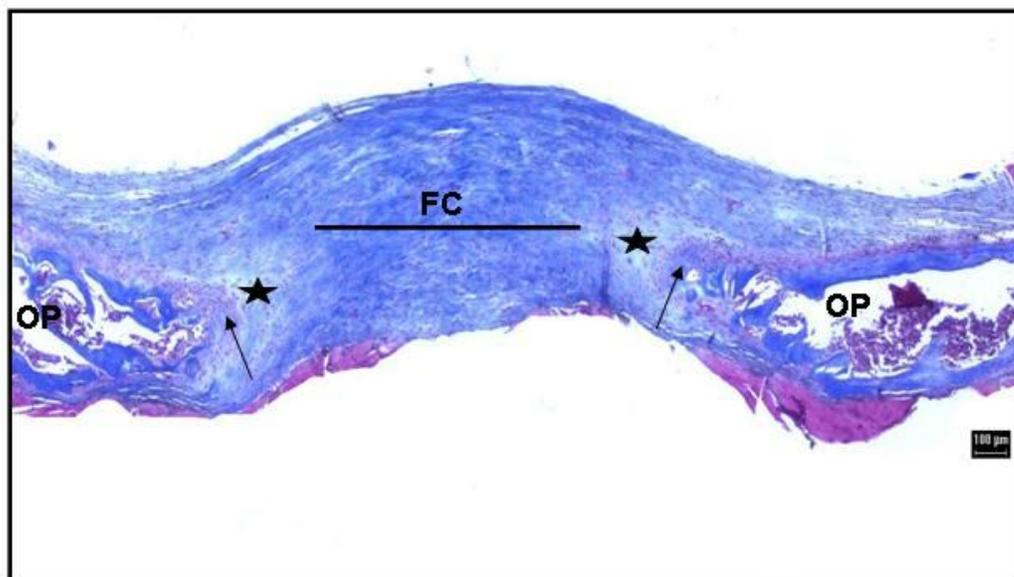


Figura 17

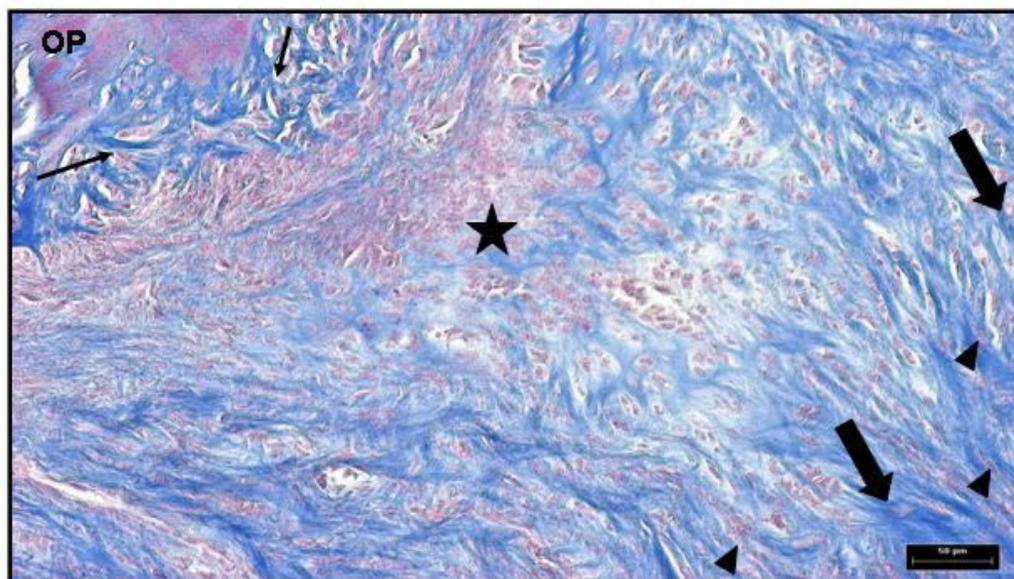


Figura 18

As figuras 19-24 referem-se à reação imunocitoquímica para galectina-3 em animais virgens.

Figura 19: Detalhe da porção lateral da sínfise, onde os condrócitos hipertróficos da região de cartilagem hialina apresentaram tanto marcação positiva citoplasmática (setas) quanto nuclear (setas largas) Aumento 40x.

Figura 20: Detalhe da porção lateral da sínfise, onde é possível observar que, ao contrário dos condrócitos hipertróficos, os condrócitos periféricos da região de cartilagem hialina (cabeças de seta) não apresentaram marcação positiva para galectina-3. Aumento 40x.

Figura 21: Detalhe da zona de transição. Nesta região, observou-se marcação positiva no citoplasma de alguns condrócitos (setas) e na região perinuclear de algumas células semelhantes à fibroblastos (cabeças de setas). Aumento 40x.

Figura 22: Detalhe da zona de transição, onde é possível observar que em alguns condrócitos desta região a galectina-3 parece estar localizada em grânulos citoplasmáticos (setas largas). Aumento 40x.

Figura 23: Nesta imagem nota-se que a região central fibrocartilaginosa apresentou marcação positiva para galectina-3 distribuída apenas pelo citoplasma de algumas células semelhantes a fibroblastos (setas). Aumento 20x.

Figura 24: Detalhe da região central fibrocartilaginosa, onde algumas células semelhantes a fibroblastos apresentaram marcação positiva para galectina-3. Aumento 40x.

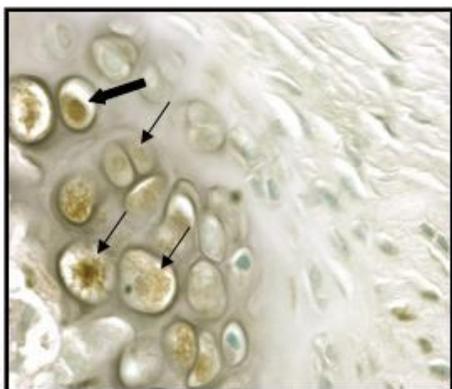


Figura 19

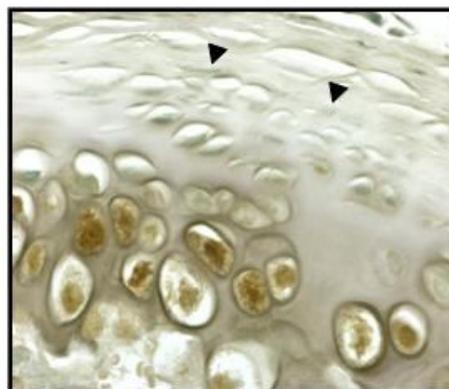


Figura 20

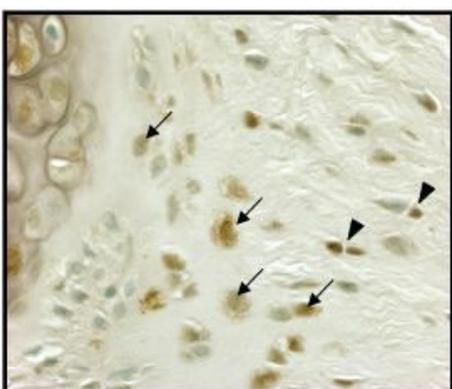


Figura 21



Figura 22

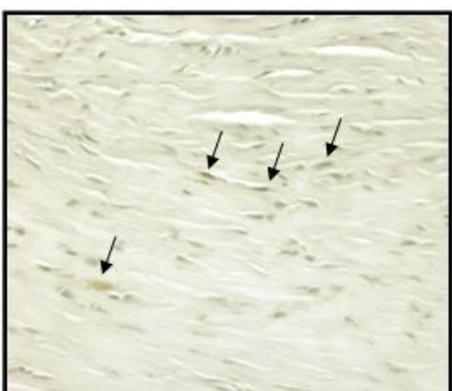


Figura 23

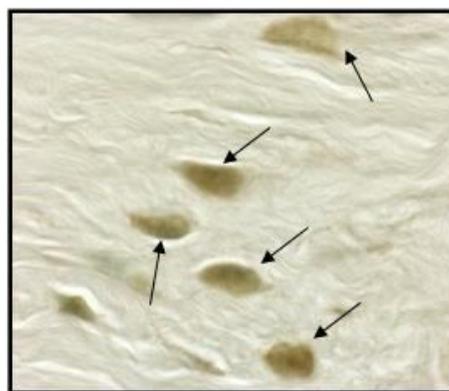


Figura 24

As figuras 25, 26 e 27 referem-se à reação imunocitoquímica para galectina-3 em animais no D12.

Figura 25: Detalhe da região de cartilagem hialina. Os condrócitos hipertróficos desta região apresentaram marcação positiva para galectina-3 distribuída em algumas regiões do citoplasma (setas). Não foi observada marcação nuclear. Aumento 100x.

Figura 26: Alguns condrócitos da porção mais periférica da cartilagem hialina (seta larga) apresentaram marcação citoplasmática positiva, porém outros não apresentaram nenhum tipo de marcação (cabeças de seta). Aumento 100x.

Figura 27: Detalhe da zona de transição, onde se observa marcação positiva citoplasmática em algumas células semelhantes à fibroblastos (setas). Aumento 40x.



Figura 25



Figura 26

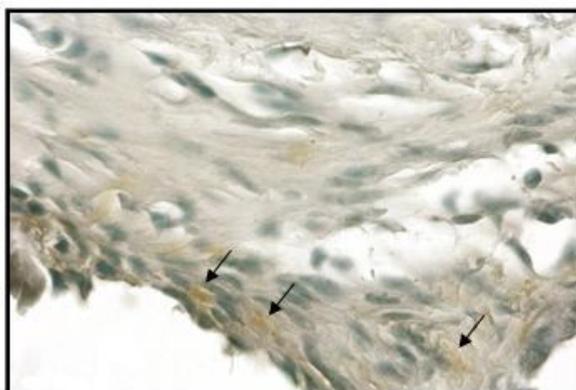


Figura 27

As figuras 28-31 referem-se à reação imunocitoquímica para galectina-3 em animais no D15.

Figura 28: Visão panorâmica da porção lateral mostrando marcação positiva para galectina-3 tanto na região de cartilagem hialina (CH) quanto na zona de transição (ZT). Aumento 20x.

Figura 29: Detalhe dos condrócitos hipertróficos da região de cartilagem hialina. Alguns desses condrócitos apresentaram marcação citoplasmática (setas), outros, apenas marcação nuclear (cabeças de seta) e outros não apresentaram nenhuma marcação (estrelas). Aumento 100x.

Figura 30: Detalhe da região de transição, onde alguns condrócitos apresentam-se fortemente marcados (setas). Aumento 40x.

Figura 31: Detalhe da região central, onde se situa o ligamento em formação. É possível observar que algumas células semelhantes a fibroblastos apresentam o citoplasma positivamente marcado. Aumento 40x.

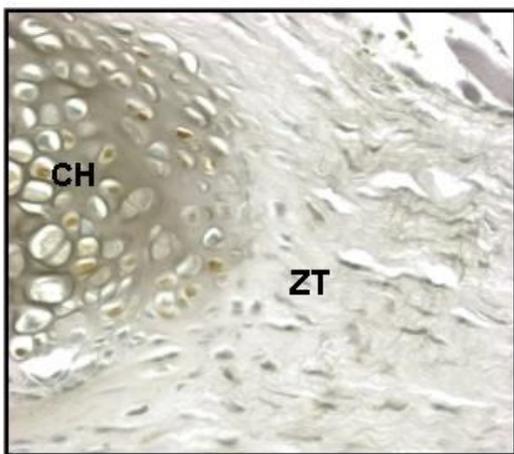


Figura 28

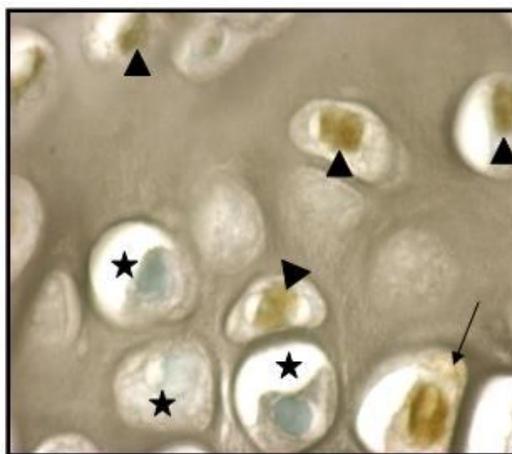


Figura 29

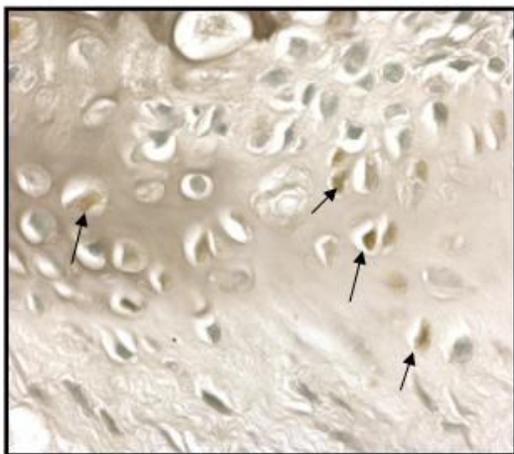


Figura 30

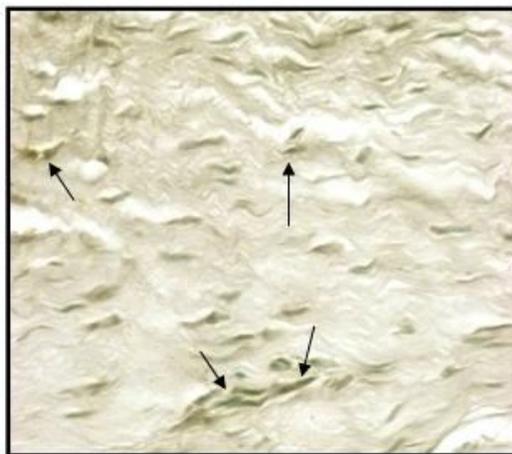


Figura 31

As figuras 32-35 referem-se à reação imunocitoquímica para galectina-3 em animais no D18:

Figura 32: Detalhe da região de cartilagem hialina. Tanto os condrócitos hipertróficos (setas largas) quanto os periféricos (setas) apresentam marcação positiva para galectina-3 (setas). Aumento 20x.

Figura 33: Detalhe dos condrócitos hipertróficos da região de cartilagem hialina. Alguns condrócitos apresentam marcação positiva distribuída por toda a célula (estrela), outros, apresentam apenas marcação nuclear (cabeças de seta), e há outros que não apresentam nenhum tipo de marcação (setas). Aumento 100x.

Figura 34: Detalhe da zona de transição, onde alguns condrócitos, especialmente àqueles mais próximos ao ligamento, apresentam marcação positiva citoplasmática. Aumento 20x.

Figura 35: Detalhe da porção central, onde se situa o ligamento interpúbico. As células semelhantes à miofibroblastos desta região apresentam marcação citoplasmática positiva para galectina-3 (cabeças de seta). Aumento 40x.

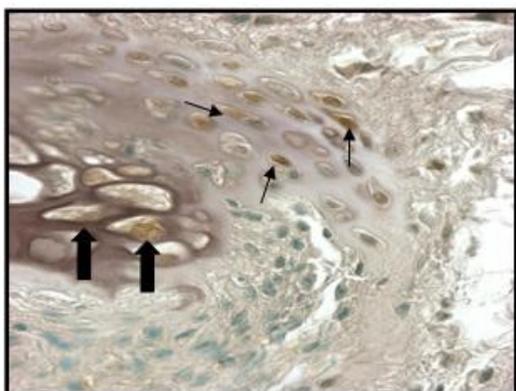


Figura 32

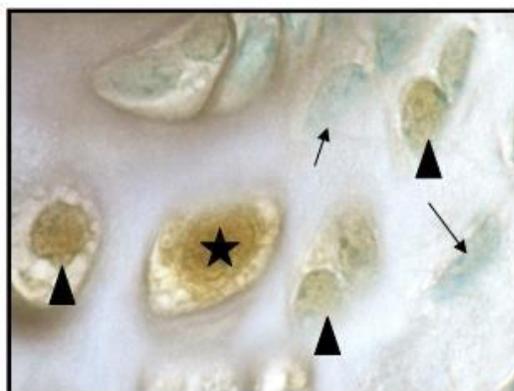


Figura 33



Figura 34

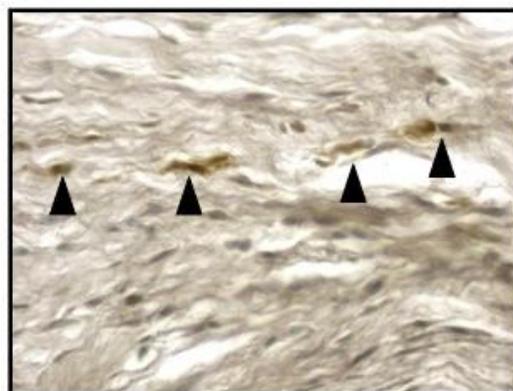


Figura 35

As figuras 36-41 referem-se à reação imunocitoquímica para galectina-3 em animais no D19:

Figura 36: Observa-se marcação positiva para galectina-3 em todos os tipos celulares da região remanescente de cartilagem hialina (CH), da zona de transição (ZT) e do ligamento interpúbico (LI). Aumento 20x.

Figura 37: Detalhe da região remanescente de cartilagem hialina. Neste local, alguns condrócitos apresentam uma marcação distribuída tanto pelo núcleo quanto pelo citoplasma (setas), enquanto que outros apresentam uma marcação predominantemente citoplasmática (cabeças de seta). É possível notar nesta imagem uma porção da zona de transição, constituída por células alongadas (setas largas) também marcadas positivamente para galectina-3. Aumento 40x.

Figura 38: Detalhe da região de transição, onde é possível notar algumas células completamente positivas para a reação (setas), enquanto que outras apresentam apenas marcação citoplasmática (cabeças de setas). Aumento 40x.

Figura 39: Detalhe da figura 38, mostrando que o padrão de marcação para galectina-3 não é o mesmo para as células da zona de transição. Algumas células apresentam marcação predominantemente citoplasmática (cabeça de seta) enquanto outras aparecem completamente marcadas (setas). Aumento 40x.

Figura 40: É possível observar a matriz frouxa que compõe o ligamento (setas largas) e células semelhantes à miofibroblastos (setas) positivas para a reação. Aumento 40x.

Figura 41: Detalhe da imagem anterior, onde é possível observar uma célula que aparenta estar se dividindo (cabeça de seta) e que apresenta o citoplasma positivo para a reação. As outras células pertencentes a esta região, apresentam todo o seu conteúdo positivamente marcado para a reação (setas). Aumento 100x.

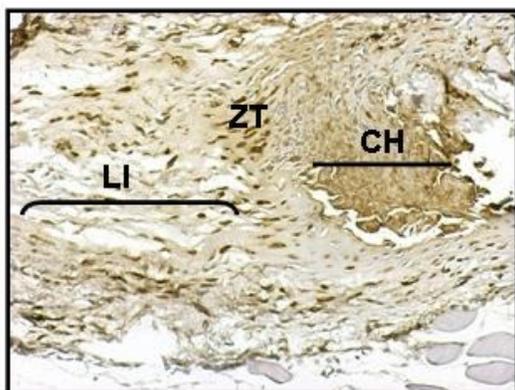


Figura 36

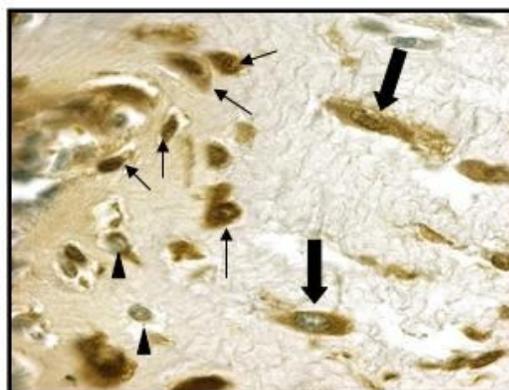


Figura 37



Figura 38

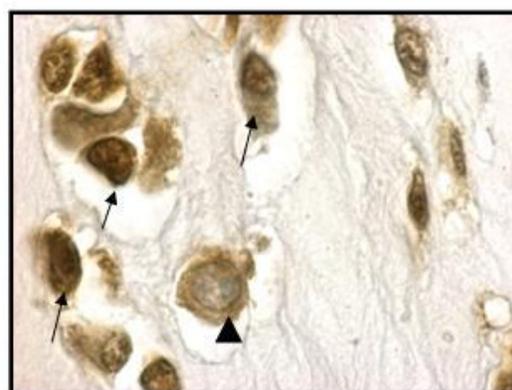


Figura 39



Figura 40

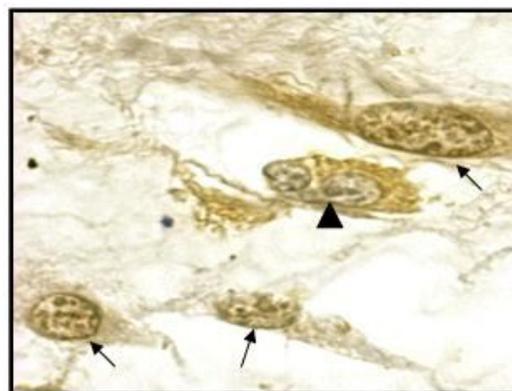


Figura 41

As figuras 42-45 referem-se à reação imunocitoquímica para galectina-3 em animais no 3DP.

Figura 42: Vista da porção lateral da sínfise, onde pode se observar a reestruturação da região cartilaginosa (RC) que apresenta algumas células positivamente marcadas. Nesta imagem também é possível observar uma porção da zona de transição (ZT), cujas células também aparecem positivamente marcadas para galectina-3. Aumento 20x.

Figura 43: Em algumas células a galectina-3 parece estar organizada em grânulos citoplasmáticos (setas) enquanto que em outras, ela parece estar limitada ao núcleo (cabeça de seta). Aumento 40x.

Figura 44: Detalhe da zona de transição, onde a maioria das células apresenta marcação positiva nuclear (setas largas). No entanto, há algumas células que apresentam um padrão granular de marcação citoplasmática (setas). Aumento 100x.

Figura 45: Detalhe da porção central do ligamento. Nesta região, algumas células semelhantes à miofibroblastos apresentam marcação dispersa pelo citoplasma (setas largas) e outras apresentam um padrão granular de marcação (setas). Aumento 100x.

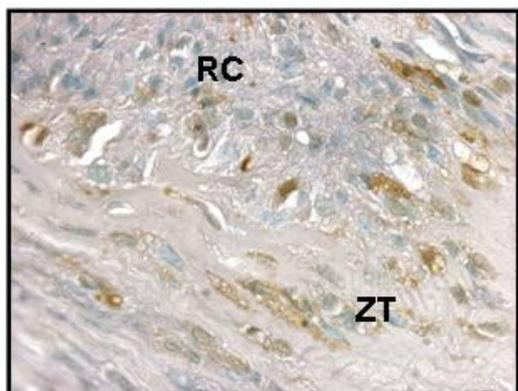


Figura 42

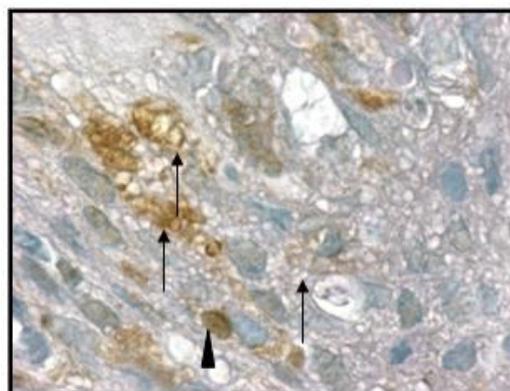


Figura 43

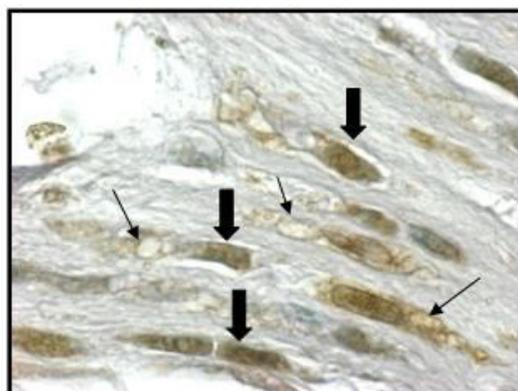


Figura 44

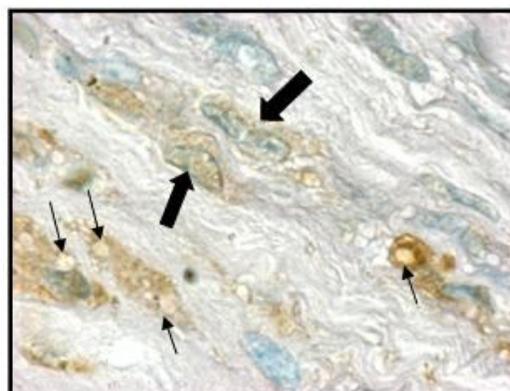


Figura 45

As figuras 46, 47 e 48 referem-se à reação imunocitoquímica para galectina-3 em animais no 5DP.

Figura 46: Neste dia da prenhez, a sínfise apresenta características morfológicas semelhantes à de um animal virgem. Nota-se nesta imagem a região de cartilagem hialina (CH) que apresenta algumas células positivamente marcadas, e a zona de transição (ZT), com muito poucas células marcadas. Aumento 20x.

Figura 47: Detalhe da região cartilaginosa adjacente ao osso púbico. Os condrócitos desta região aparecem completamente marcados para galectina-3 (setas). Aumento 100x.

Figura 48: Detalhe da porção central fibrocartilaginosa central, que não apresenta marcação positiva para galectina-3. Aumento 40x.



Figura 46

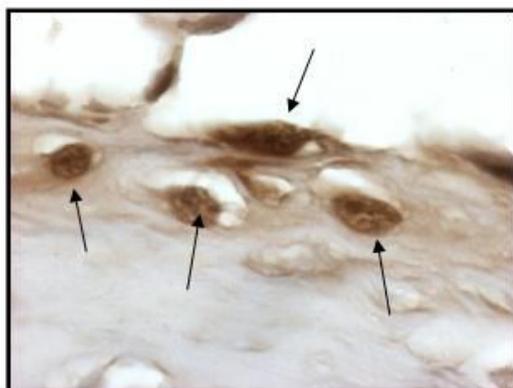


Figura 47

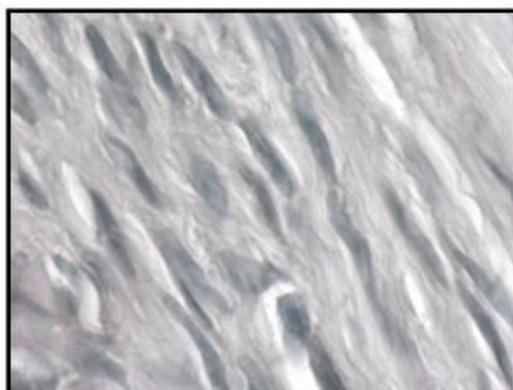


Figura 48

As figuras 49 e 50 referem-se à reação de imunofluorescência para galectina-3 em animais virgens

Figura 49: Detalhe da região de cartilagem hialina onde apenas alguns condrócitos aparecem com marcação positiva citoplasmática (setas). Os núcleos das células aparecem corados em azul. Aumento 60x.

Figura 50: Detalhe da zona de transição. A maioria dos condrócitos apresenta marcação positiva em algumas regiões do citoplasma. Porém, alguns condrócitos apresentam marcação nuclear (cabeças de setas). Aumento 60x.

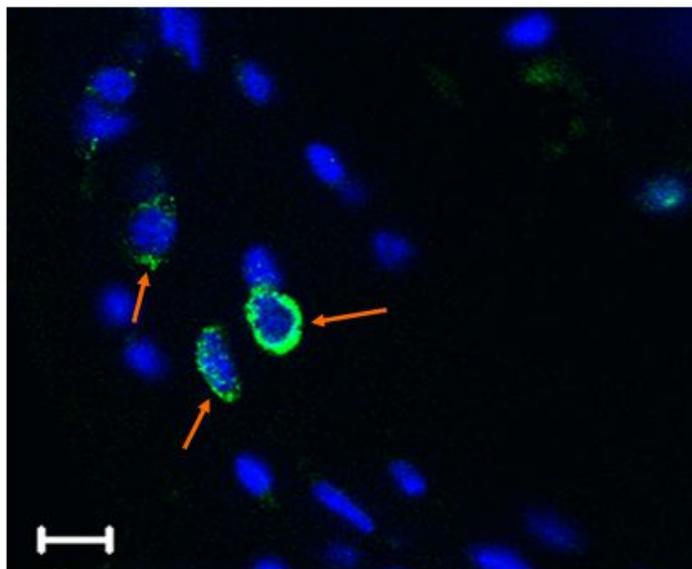


Figura 49

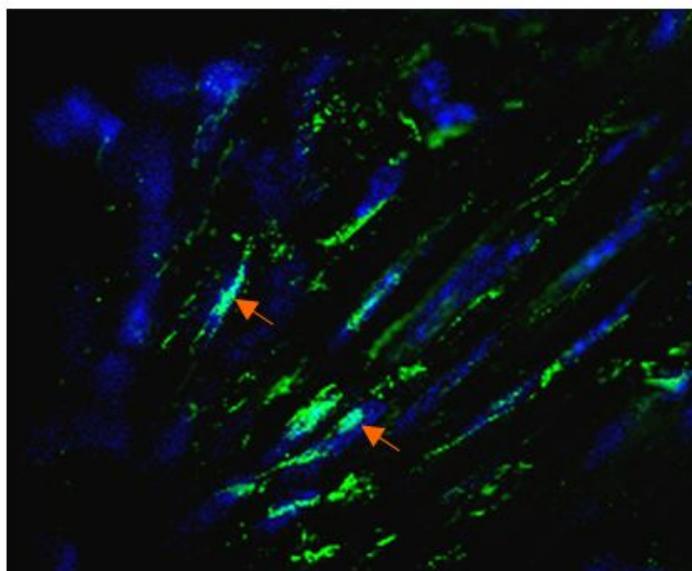


Figura 50

As figuras 51 e 52 referem-se à reação de imunofluorescência para galectina-3 em animais no D12:

Figura 51: Fotomicrografia de reação de imunofluorescência para galectina-3 em animal no D12. Detalhe da região de cartilagem hialina, onde alguns condrócitos apresentam marcação nuclear (setas) e outros, apenas marcação citoplasmática. Os núcleos das células aparecem corados em azul. Aumento 60x.

Figura 52: Fotomicrografia de reação de imunofluorescência para galectina-3 em animal no D12. Observa-se nesta imagem uma porção da zona de transição, constituída por células mais arredondadas, e uma porção da região central fibrocartilaginosa da sínfise, constituída por células alongadas. Na zona de transição, observou-se marcação positiva dispersa pelo citoplasma de alguns condrócitos (setas largas). Na região fibrocartilaginosa, a marcação parecia limitada a algumas regiões do citoplasma (setas). Em nenhuma das regiões foi observada marcação nuclear. Aumento 60x.

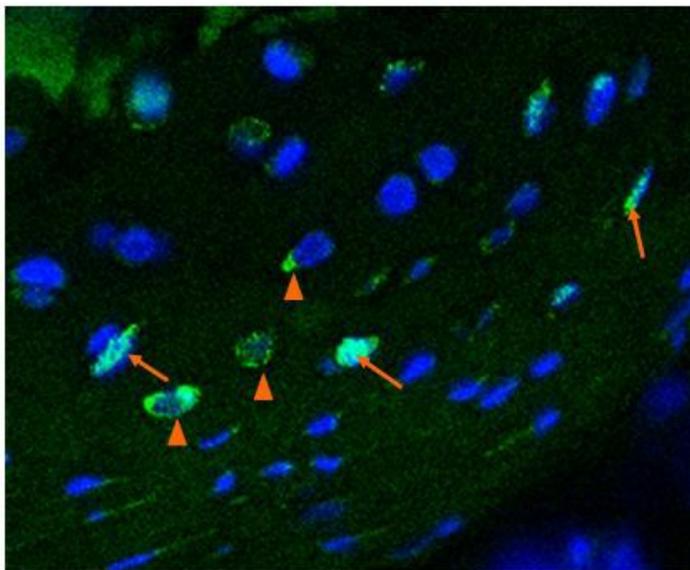


Figura 51

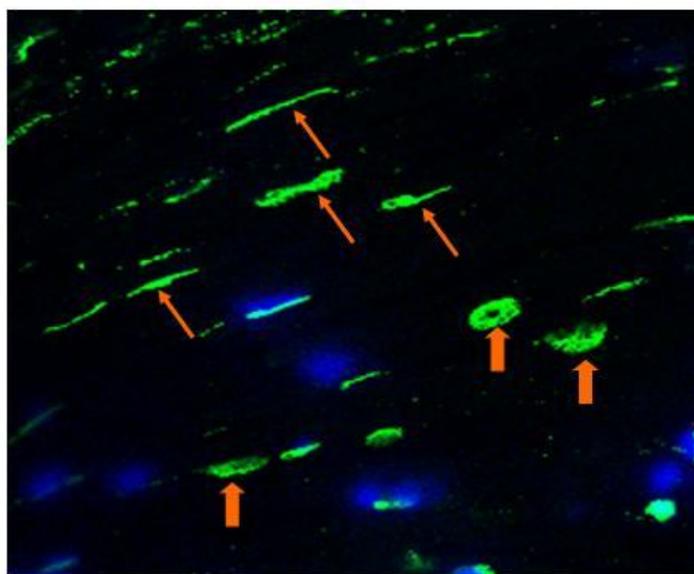


Figura 52

As figuras 53 e 54 referem-se à reação de imunofluorescência para galectina-3 em animais no D15:

Figura 53: Nesta imagem observa-se a região de cartilagem hialina e uma porção do osso púbico. Na região óssea, algumas células aparecem fortemente marcadas (estrelas), porém não é possível distinguir o tipo celular. Na região de cartilagem hialina são observados diversos padrões de marcação positiva dos condrócitos. Alguns aparecem com o núcleo fortemente marcado e com o citoplasma apresentando uma marcação fraca e dispersa (setas). Outros apresentam marcação nuclear e citoplasmática de intensidade semelhante (cabeça de seta). E há ainda alguns que apresentam uma marcação predominantemente citoplasmática (setas largas). Aumento 60x.

Figura 54: Nesta imagem é possível observar a zona de transição e algumas células do ligamento em formação. As células da zona de transição apresentam uma marcação predominantemente citoplasmática (setas). Apenas algumas células também apresentaram marcação nuclear (setas largas). Na região do ligamento, foram observadas poucas células marcadas, sendo que a marcação parecia quantitativamente fraca e predominantemente citoplasmática (seta larga). Tanto na zona de transição quanto na região de formação do ligamento observou-se marcação de elementos da matriz extracelular (estrelas). Aumento 60x.

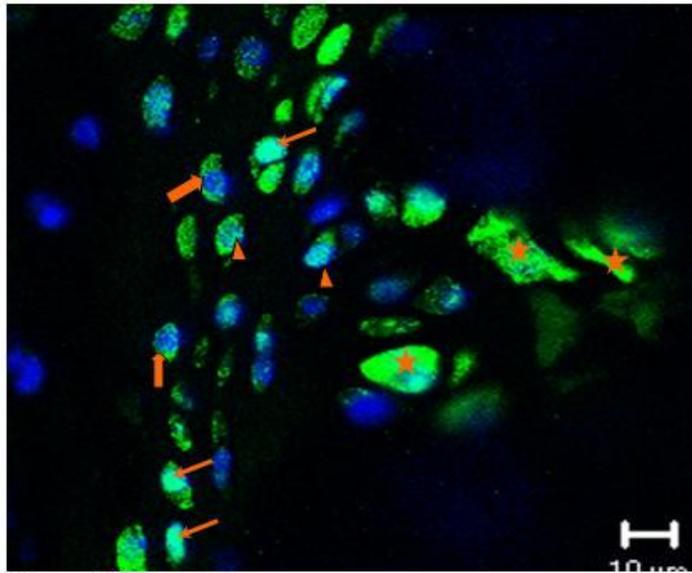


Figura 53

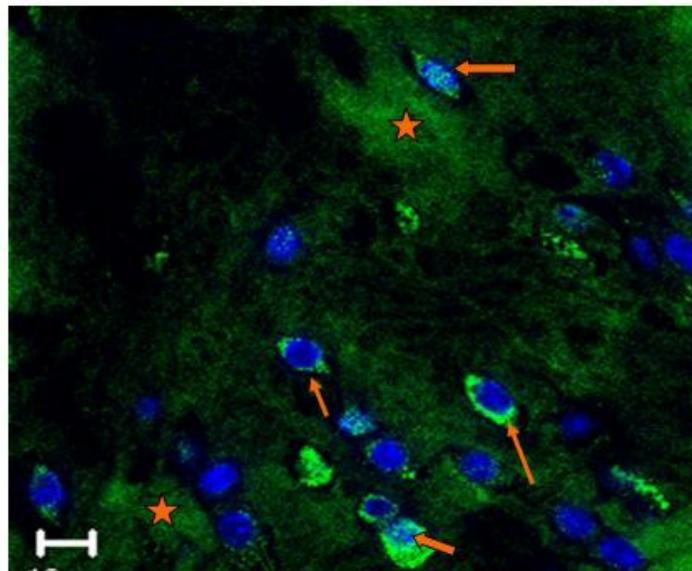


Figura 54

As figuras 55 e 56 referem-se à reação de imunofluorescência para galectina-3 em animais no D18:

Figura 55: Detalhe da região de cartilagem hialina, que neste momento está quase que completamente reabsorvida, e de uma porção da zona de transição. A principal marcação observada se situa no citoplasma das células da zona de transição (setas). Aumento 60x.

Figura 56: Detalhe da região central, onde as células alongadas aparecem com o citoplasma fortemente marcado para galectina-3 (setas). Aumento 60x.

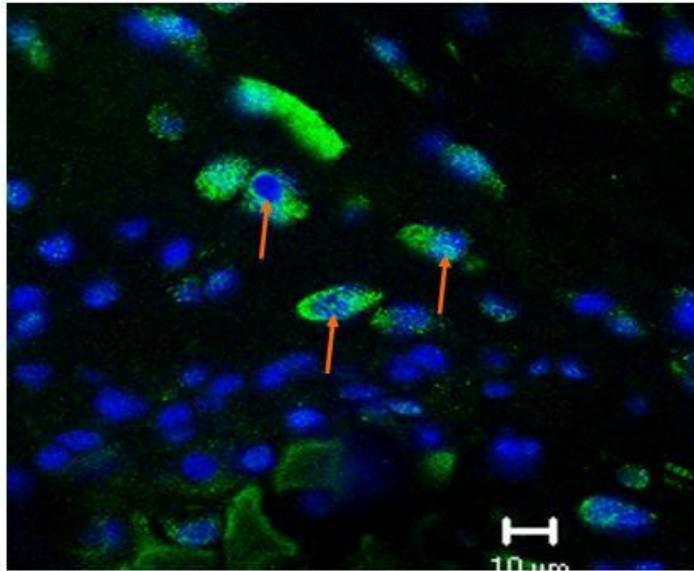


Figura 55

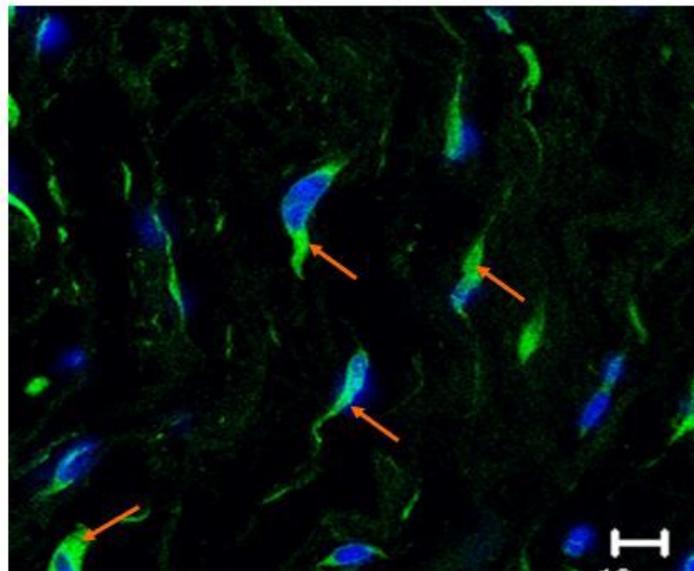


Figura 56

As figuras 57, 58 e 59 referem-se à reação de imunofluorescência para galectina-3 em animais no D19:

Figura 57: Detalhe da região de cartilagem hialina. Os condrócitos desta região apresentam forte marcação citoplasmática para galectina-3 (setas), porém apenas algumas células também apresentam marcação nuclear (estrela). Aumento 60x.

Figura 58: Detalhe da zona de transição. Nesta região, a marcação positiva para galectina-3 assume um aspecto perinuclear em algumas células (setas) e em outras parece distribuída em algumas regiões específicas do citoplasma (setas largas). Aumento 60x.

Figura 59: Detalhe da região do ligamento interpúbico. Nesta região, a marcação positiva para galectina-3 apresenta um padrão disperso por todo o citoplasma das células semelhantes a miofibroblastos (setas). Nesta imagem aparece uma célula que parece estar se dividindo (seta larga) Aumento 60x.

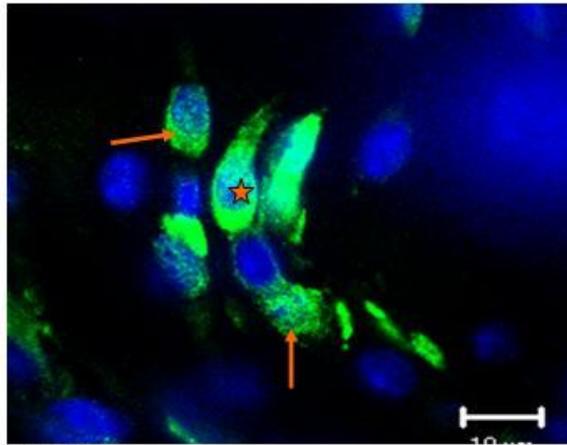


Figura 57

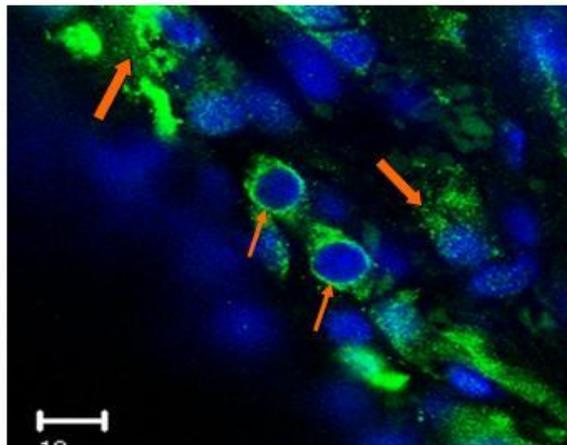


Figura 58

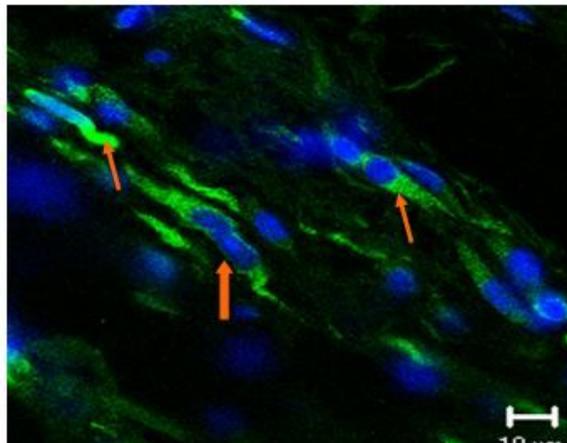


Figura 59

As figuras 60, 61 e 62 referem-se à reação de imunofluorescência para galectina-3 em animais no 3DP:

Figura 60: Detalhe da região de cartilagem hialina. Nesta região a galectina-3 parecia preferencialmente localizada no núcleo das células (setas). Em algumas delas é possível observar um padrão de marcação puntual no núcleo (cabeça de seta). Aumento 60x.

Figura 61: Detalhe da zona de transição. Nesta região, algumas células apresentam uma forte marcação nuclear (setas) enquanto que outras aparentam não apresentar a proteína no núcleo, mas sim apenas no citoplasma (setas largas). Aumento 60x.

Figura 62: Detalhe da região central. A maioria das células desta região aparece com o citoplasma fortemente marcado, sendo que apenas algumas células também apresentam marcação nuclear (setas). Aumento 60x.

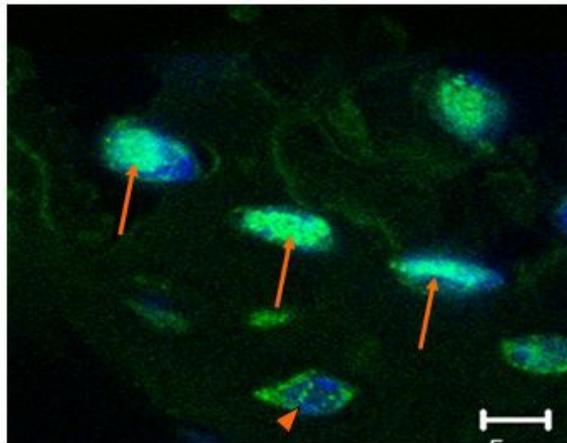


Figura 60

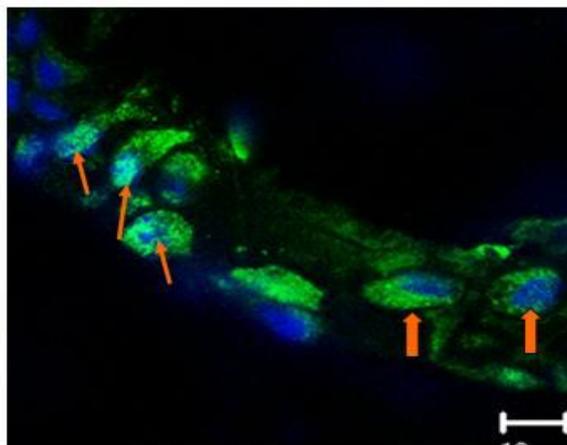


Figura 61

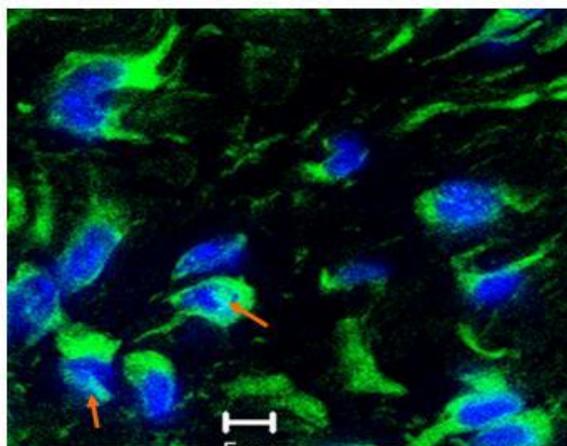


Figura 62

As figuras 63 e 64 referem-se a reação de imunofluorescência para galectina-3 em animais no 5DP:

Figura 63: Neste dia, o padrão de marcação é muito semelhante ao de um animal virgem. As principais células marcadas são os condrócitos da região de cartilagem hialina (setas) e da zona de transição (setas largas). Nas duas regiões foi observada forte marcação nuclear e citoplasmática.

Figura 64: Detalhe de uma das células da região de transição. Essa célula apresenta tanto marcação citoplasmática quanto nuclear. A galectina-3 parece distribuída igualmente por todas as regiões do citoplasma desta célula, porém, no núcleo, ela parece estar limitada a uma determinada região. Aumento 100x.

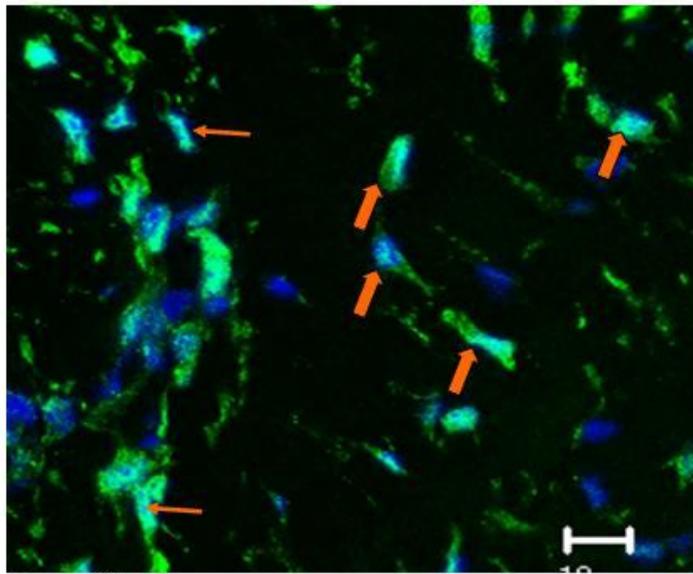


Figura 63

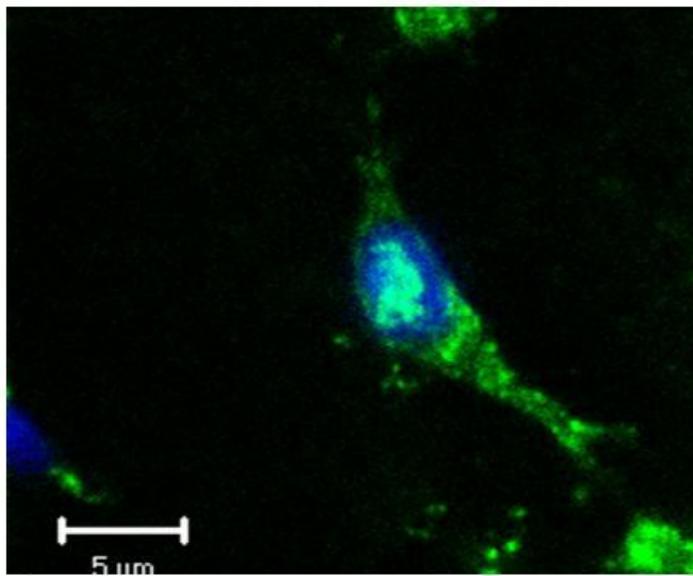


Figura 64

Figura 65: Fotomicrografia de reação de imunofluorescência para galectina-3 e α -SMA em animal virgem. Nestes animais foi observado que a α -SMA aparece especialmente distribuída no citoplasma dos condrócitos presentes na região de transição da sínfise, e, na maioria destas células, ela parece estar co-localizada com a galectina-3. (A) marcação para galectina-3; (B) marcação para α -SMA; (C) sobreposição de A e B, os núcleos aparecem corados em azul. Aumento 60x.

Figura 66: Fotomicrografia de reação de imunofluorescência para galectina-3 e α -SMA em animal no D12. Observou-se que as células da região de transição apresentavam o citoplasma fortemente marcado. Outra região que apresentou forte marcação para esta proteína foi a região central, onde esta aparecia distribuída por todo o citoplasma das células semelhantes à miofibroblastos e, em algumas regiões co-localizada com a galectina-3. (A) marcação para galectina-3; (B) marcação para α -SMA; (C) sobreposição de A e B, os núcleos aparecem corados em azul. Aumento 60x.

Figura 67: Fotomicrografia de reação de imunofluorescência para galectina-3 e α -SMA em animal no D15. Neste dia da prenhez observou-se forte marcação de actina distribuída por todo o citoplasma de alguns condrócitos hipertóxicos. Esta marcação era co-localizada com a de galectina-3, porém, com a sobreposição das imagens, esta última parecia quantitativamente mais forte em relação à primeira. Além disso, ao contrário do observado para galectina-3, em nenhuma das células houve marcação positiva nuclear para actina. Na região de transição bem como no ligamento em formação, também se observou co-localização das duas proteínas, sendo que a actina também parecia assumir um aspecto granular no citoplasma destas células.

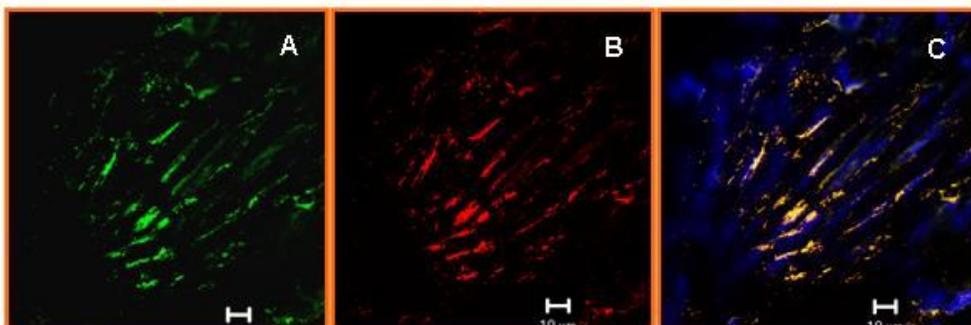


Figura 65

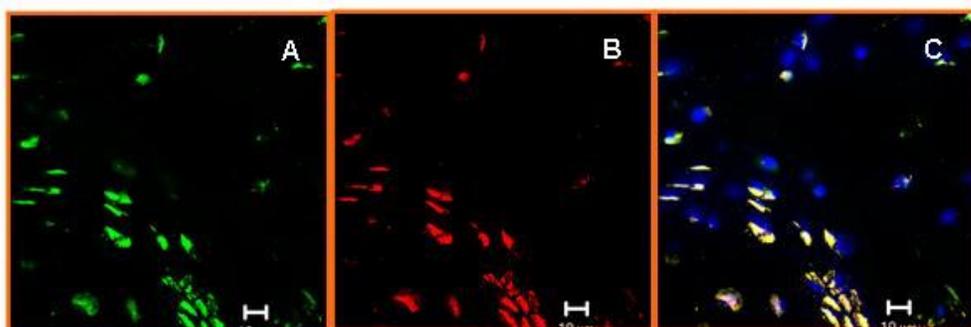


Figura 66

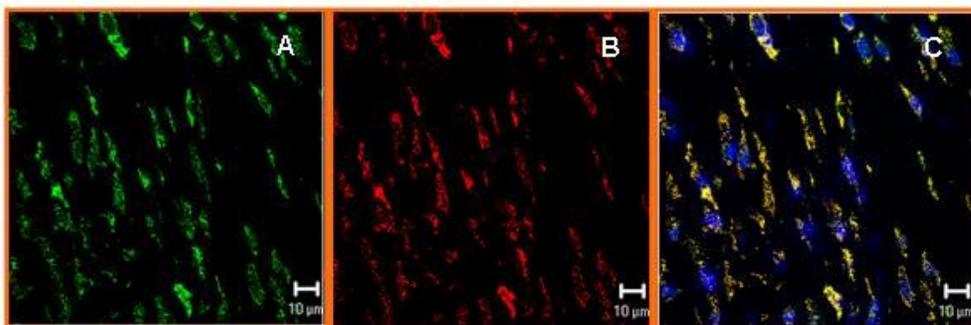


Figura 67

Figura 68: Fotomicrografia de reação de imunofluorescência para galectina-3 e α -SMA em animal no D18. Detalhe do ligamento interpúbico onde as células que apresentam galectina-3 também expressam α -SMA. Porém, na sobreposição das imagens, a expressão de galectina-3 parece qualitativamente maior. (A) marcação para galectina-3; (B) marcação para α -SMA; (C) sobreposição de A e B, os núcleos aparecem corados em azul. Aumento 60x.

Figura 69: Fotomicrografia de reação de imunofluorescência para galectina-3 e α -SMA em animal no D19. Detalhe da região do ligamento. As células semelhantes a miofibroblastos desta região expressam tanto galectina-3 quanto α -SMA. Porém, a galectina-3 aparece localizada no núcleo de algumas células (A-setas), enquanto que a α -SMA nunca está presente no núcleo (B-setas). Quando as imagens são sobrepostas, a expressão de galectina-3 parece ser qualitativamente mais forte. (A) marcação para galectina-3; (B) marcação para α -SMA; (C) sobreposição de A e B, os núcleos aparecem corados em azul. Aumento 60x.

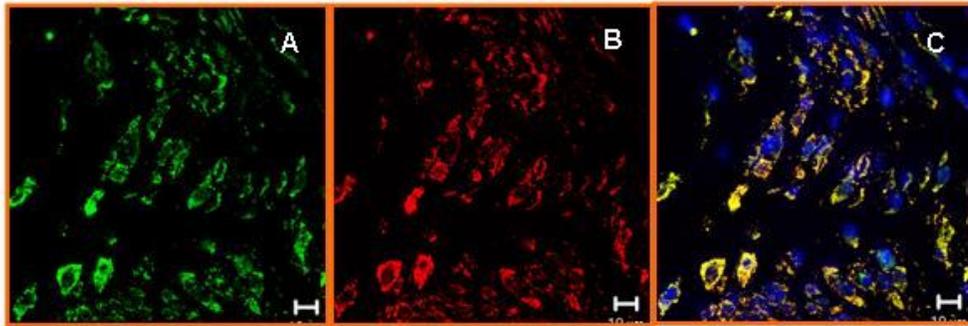


Figura 68

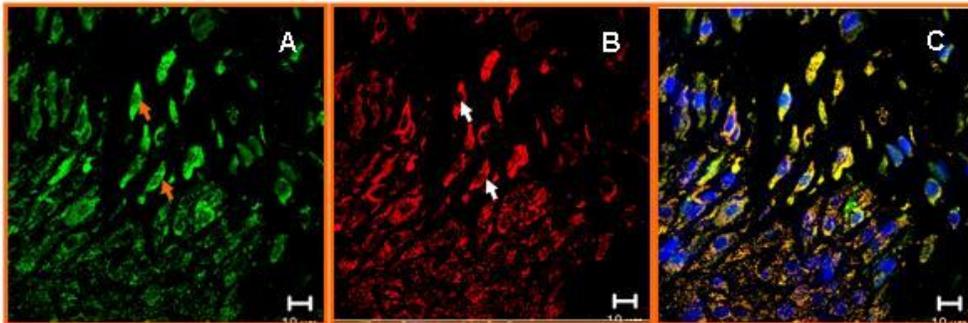


Figura 69

Figura 70: Fotomicrografia de reação de imunofluorescência para galectina-3 e α -SMA em animal no 3DP. Detalhe da região de cartilagem hialina e da zona de transição. Neste dia a α -actina foi observada distribuída uniformemente pelo citoplasma dos condrócitos da cartilagem hialina. Este foi o mesmo padrão observado para galectina-3, porém a segunda parecia mais fortemente expressa. Além disso, encontrou-se marcação positiva para actina também no citoplasma dos condrócitos da região de transição, sendo que neste local também houve co-expressão das duas proteínas. (A) marcação para galectina-3; (B) marcação para α -SMA; (C) sobreposição de A e B, os núcleos aparecem corados em azul. Aumento 60x.

Figura 71: Fotomicrografia de reação de imunofluorescência para galectina-3 e α -SMA em animal no 5DP. Detalhe da região central da sínfise. Neste dia de prenhez a marcação para α -actina foi quantitativamente muito mais fraca em relação aos outros grupos estudados. Ela pode ser observada distribuída por apenas alguns pontos das células semelhantes à fibroblastos. Quando as imagens são sobrepostas, a expressão da galectina-3 mascara a da SMA. (A) marcação para galectina-3; (B) marcação para α -SMA; (C) sobreposição de A e B, os núcleos aparecem corados em azul. Aumento 60x.

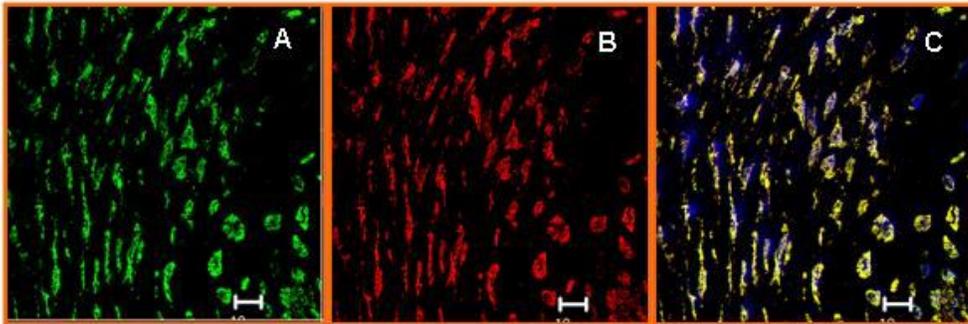


Figura 70

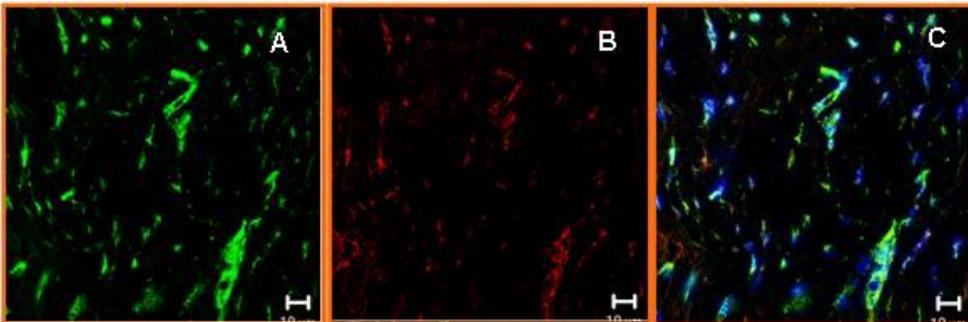


Figura 71

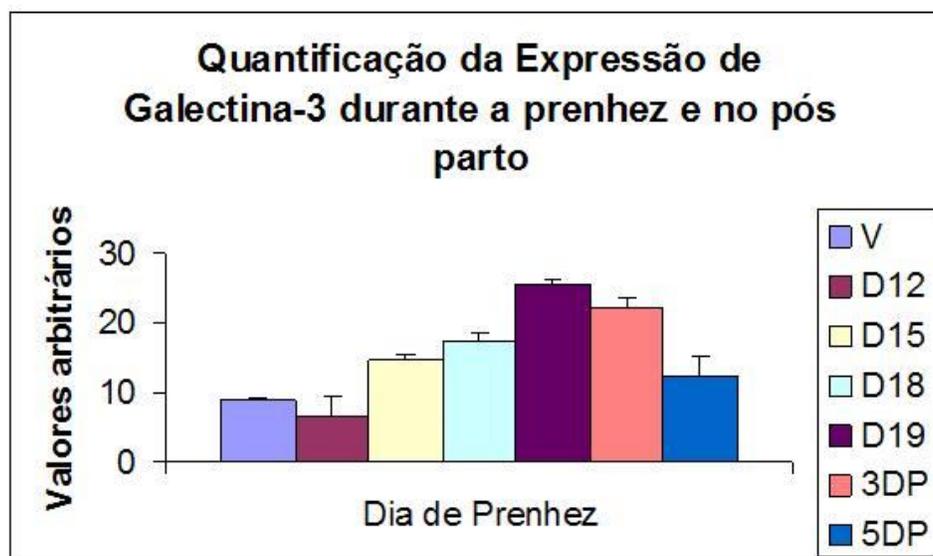
Figura 72: Reação de western blotting para galectina-3. Através desta reação foi possível observar que a galectina-3 está presente em todos os dias da prenhez estudados, porém, aparentemente em concentrações diferentes.

Gráfico 1: Média da quantificação da densidade relativa das bandas obtidas pela reação de western blotting para galectina-3. Os valores foram submetidos ao teste T de Tukey para verificação da diferença entre eles. Foi observado que em animais virgens (média arbitrária= 8.7) a expressão de galectina-3 é significativamente menor do que a de animais nos D15, D18, D19 e 3DP. Para animais no D12 (média arbitrária= 6.68), a expressão é significativamente menor do que a de todos os outros grupos. A média obtida para animais no D15 (14.45) foi significativamente menor do que a dos dias D18 e D19, 3DP e maior que a dos animais 5DP. No D18, a expressão de galectina-3 (média arbitrária= 17.39) é significativamente maior do que a dos animais virgens, D12, D15, e 5DP. A análise estatística revelou que a maior expressão de galectina-3 é alcançada no D19 (média arbitrária= 25.68), e que esta média é significativamente maior do que a de todos os outros grupos estudados. Após o parto, inicia-se uma queda na expressão de galectina-3, sendo que a média no 3DP (21.9) é menor do que a obtida no D19, mas ainda é maior do que a dos outros grupos. Finalmente, no 5DP (média arbitrária= 12.25), ocorre uma brusca queda na expressão de galectina-3, havendo diferença significativa entre este grupo e os grupos D12, D15, D18, D19 e 3DP.

Figura 72



Gráfico 1



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Mestrado intitulada "IMUNOLocalização de GALECTINA-3 NA SÍNFISE PÚBICA DE CAMUNDONGOS DURANTE A PREENHEZ E PÓS-PARTO":

se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 01/2008, referente a bioética e biossegurança.

está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1845-1).

tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (Protocolo nº _____).

Maria Amália Cavinato Nascimento

 Aluna Maria Amália Cavinato Nascimento

Paulo Pinto Joazeiro

 Orientador: Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido Indeferido

Ana Maria Aparecida Guaraldo
 Nome:
 Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
 Presidente
 Comissão de Ética na Experimentação Animal
 CEEA/IB - UNICAMP