

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica

**ENVOLVIMENTO DOS GANGLIOSÍDIOS NA  
SUSTENTAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO MIELOPOIÉTICA  
POR DOIS ESTROMAS EXTRAMEDULARES**

**Dissertação de Mestrado**

**CLÁUDIA MARLISE BALBINOTTI ANDRADE**

Porto Alegre, 2004

**CLÁUDIA MARLISE BALBINOTTI ANDRADE**

**ENVOLVIMENTO DOS GANGLIOSÍDIOS NA  
SUSTENTAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO MIELOPOIÉTICA  
POR DOIS ESTROMAS EXTRAMEDULARES**

Dissertação de Mestrado em Bioquímica  
Para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Departamento de Bioquímica  
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica

Orientadora: Dra. Fátima C. R. Guma

Porto Alegre

2004

## AGRADECIMENTOS

À **Profª Fátima Guma** pela oportunidade e orientação deste trabalho e, principalmente, pelo incentivo e pela compreensão. Obrigada pelo exemplo de profissionalismo, pela amizade e pelo carinho.

À **Profª Vera Treis Trindade** pela co-orientação, concessão de reagentes, estímulo e exemplo de organização.

À **Profª Elena Bernard** pelo esclarecimento de dúvidas e pelo auxílio sempre que foi necessário.

À **Profª Regina Guaragna**, ao **Prof. José Cláudio** e demais colegas dos laboratórios 23 e 25 pelo auxílio e pela agradável convivência.

Ao **Prof. Radovan Borojevic** e ao pessoal do laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular, do Departamento de Histologia e Embriologia da UFRJ, pelo auxílio e concessão das células GR.

Aos meus queridos amigos do laboratório 21: **Alice, Aline G, Aline (Lica), Ana, Eduardo, Elisa, Gislaine, Izabel e Yole**, pela ajuda nos experimentos, pelo incentivo e pela amizade. Obrigada pelas brincadeiras e discussões não científicas que alegam o nosso local de trabalho.

À **Dona Lia** pela imprescindível ajuda com o material da cultura.

Aos meus pais, **Cláudio** e **Silvia**, pelo apoio incondicional.

Ao **Nando** pelo amor, companheirismo e incentivo.

**“Toda a nossa ciência , comparada com a realidade,  
é primitiva e infantil e, no entanto, é a coisa  
mais preciosa que temos.”**

**Albert Einstein**

## RESUMO

A hematopoiese representa uma cascata de eventos de proliferação e diferenciação celular precisamente regulada, onde uma população de células tronco pluripotentes indiferenciadas origina todas as células sangüíneas.

Durante o período embrionário o principal órgão hematopoiético é o fígado. A partir do desenvolvimento dos ossos longos, a hematopoiese é deslocada para a medula óssea, sendo este, na vida adulta, o sítio de produção das células sangüíneas. O microambiente da medula óssea, composto pelas células estromais, componentes de matriz extracelular e fatores de crescimento ou citocinas, desempenha importância fundamental na proliferação e diferenciação das células progenitoras hematopoiéticas.

Em algumas condições patológicas, na vida adulta, a hematopoiese pode ser observada em sítios extramedulares, especialmente no fígado, que demonstra assim preservar um potencial hematopoiético. Este fenômeno é descrito como hematopoiese extramedular e pode estar associado a reações fibrogranulomatosas, como a esquistossomose mansônica.

No presente estudo avaliou-se a hipótese de que os gangliosídeos possam participar do microambiente carregado negativamente necessário para o suporte da hematopoiese. Para isso, analisou-se o conteúdo, síntese e liberação

(*shedding*) de gangliosídios de dois estromas extramedulares, GRWT e GR(IFN- $\gamma$ R<sup>0/0</sup>), que expressam GM-CSF de maneira semelhante, mas têm capacidades diferentes de suporte da mielopoiese *in vitro*. A capacidade de suporte da hematopoiese pelos dois estromas foi monitorada através da proliferação das células FDC-P1, uma linhagem precursora mielóide. Observamos que os dois estromas sintetizam e liberam os mesmos gangliosídios, embora em proporções diferentes. Também verificamos que a inibição da síntese de gangliosídios diminui a proliferação mielopoiética em ambos os estromas extramedulares.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1 HEMATOPOIESE	11
1.1 Microambiente Hematopoiético	13
1.2 Ontogenia do Sistema Hematopoiético	15
1.3 Hematopoiese Extramedular	17
1.4 Modelo de Hematopoiese Extramedular – Células GR	18
2 GLICOESFINGOLIPÍDIOS	21
3 GANGLIOSÍDIOS	23
3.1 Nomenclatura	24
3.2 Localização e Distribuição	24
3.3 Biossíntese	26
3.4 Degradação	28
3.5 Rotas de Salvação	30
3.6 Funções	30
4 GANGLIOSÍDIOS E HEMATOPOIESE	31
OBJETIVOS	34
ARTIGO: Gangliosides regulate the capacity of stromal cells to support myepoiesis	36
DISCUSSÃO	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

## LISTA DE FIGURAS

### Figura 1

Cascata de diferenciação das células hematopoiéticas\_\_\_\_\_12

### Figura 2

Esquema da biossíntese dos esfingolipídios\_\_\_\_\_22

### Figura 3

Estrutura do gangliosídeo GD1a\_\_\_\_\_23

### Figura 4

Desenho esquemático dos microdomínios de membrana (*rafts* e caveolas)\_\_\_\_\_25

### Figura 5

Biossíntese das séries o, a, b e c dos gangliosídios\_\_\_\_\_27

### Figura 6

Rotas de degradação dos glicoesfingolipídios\_\_\_\_\_29



## LISTA DE ABREVEATURAS

GAG	Glicosaminoglicano
GalCer	Galactosilceramida
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GEM	Microdomínio de membrana enriquecido em glicoesfingolipídios
GlcCer	Glicosilceramida
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos-granulócitos
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GR	Células conjuntivas hepáticas derivadas de granuloma esquistossomótico
HSC	Célula tronco hematopoiética pluripotente
HSPG	Proteoglicano de heparam sulfato
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-12	Interleucina 12
IL-3	Interleucina 3
IL-5	Interleucina 5

IL-6	Interleucina 6
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MHSC	Célula tronco hematopoiética multipotente
NK	<i>Natural Killer</i>
PG	Proteoglicano
TGF- $\beta$	Fator de crescimento tumoral beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

## INTRODUÇÃO

### 1 HEMATOPOIESE

A hematopoiese corresponde a uma série de eventos de proliferação e diferenciação celular, responsáveis pela formação de todas as linhagens celulares que constituem o sistema hematopoiético (figura 1). Neste processo todas as células sanguíneas se originam a partir de um precursor comum, indiferenciado, com capacidade de auto-renovação, chamado *hematopoietic stem cell* (HSC) ou célula tronco hematopoiética pluripotente (PHSC) (WOLBER et al., 2002).

As células tronco hematopoiéticas pluripotentes respondem a diversos estímulos que induzem a sua auto-renovação, originando mais células indiferenciadas, bem como a outros estímulos que induzem a sua diferenciação originando dois tipos de célula tronco hematopoiéticas multipotentes (MHSCs). As duas populações de MHSCs são responsáveis pela formação de células progenitoras comprometidas com a linhagem linfóide ou com a linhagem mielóide. Os progenitores linfóides irão se diferenciar em linfócitos B, linfócitos T e células *Natural killer* (NK), já os precursores mielóides vão originar os granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos (HOFFMAN et al., 1995).

Ao longo da cascata de diferenciação celular a partir da célula tronco hematopoiética ocorre uma perda progressiva do potencial multipotente e todo processo é regulado por vários fatores de crescimento que atuam em diferentes etapas para controlar o tipo de célula formada e sua proporção (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999)

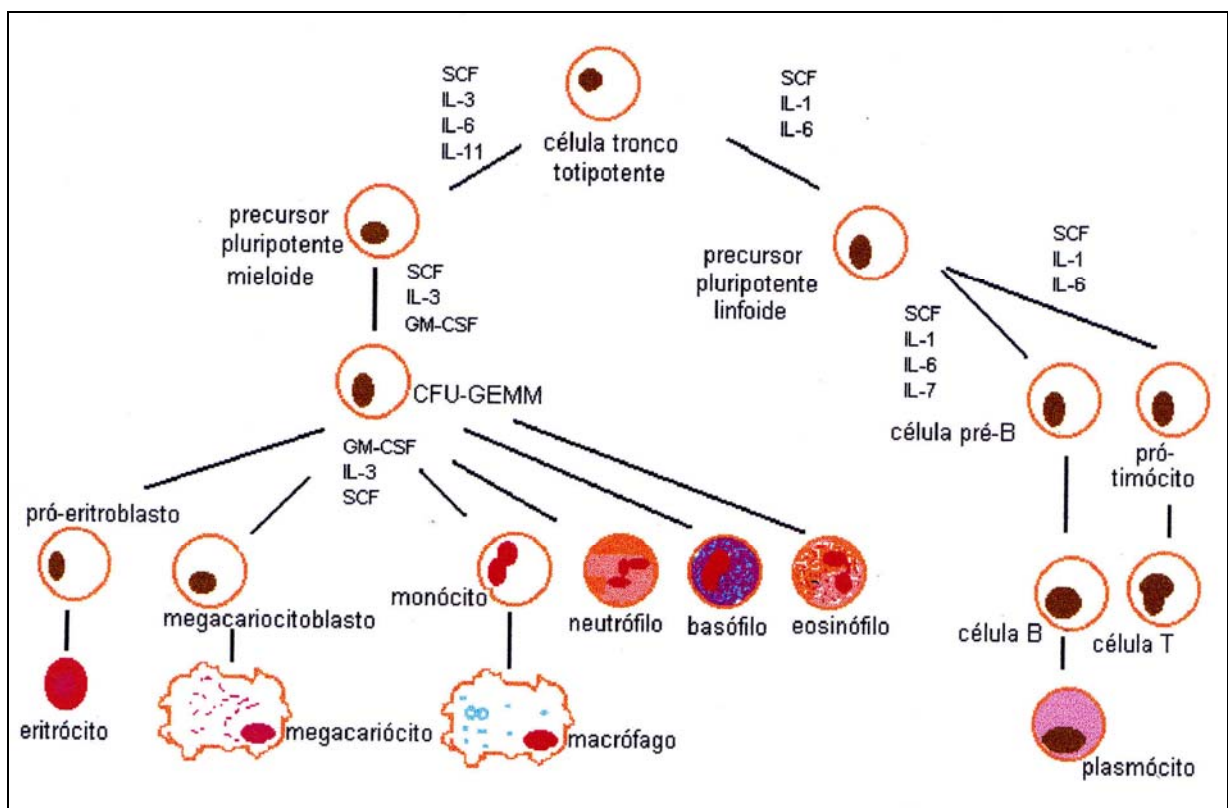


Figura 1: Cascata de diferenciação das células hematopoiéticas

(Disponível em: <<http://www.google.com.br>>)

## 1.1 Microambiente Hematopoiético

A hematopoiese depende do microambiente adequado, da presença de fatores de crescimento e de componentes de matriz extracelular (NARDI & ALFONSO, 1999). O microambiente favorável é fornecido pelas células do estroma dos órgãos hematopoiéticos. O estroma hematopoiético compreende vários tipos celulares, e de uma forma geral é representado pelas células presentes na medula óssea vermelha que permite o desenvolvimento das células hematopoiéticas. Assim, o termo célula estromal é um termo genérico que se refere a uma população heterogênea de células que formam o chamado microambiente hematopoiético, e que inclui células endoteliais, células reticulares adventícias, fibroblastos, adipócitos, osteoblastos, linfócitos T e macrófagos, (DORSHKIND, 1990; WILKINS, 1992).

As células endoteliais exercem efeito sobre as células hematopoiéticas através da interação célula-célula e da secreção de fatores de crescimento, como o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e o fator estimulador de colônias de macrófagos-granulócitos (GM-CSF) (HASTHORPE et al., 1992).

As células reticulares adventícias residem na superfície adluminal das células endoteliais venosas e emitem seus prolongamentos ao longo da cavidade medular, formando uma cadeia reticular que suporta as células hematopoiéticas (NARDI & ALFONSO, 1999).

Os fibroblatos secretam componentes de matriz extracelular que contribuem para a manutenção do microambiente hematopoiético (DORSHKIND, 1990).

Os osteoblastos secretam diversos fatores de crescimento importantes para as células hematopoiéticas, como G-CSF, GM-SCF, fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), e interagem com as células hematopoiéticas através de moléculas de adesão celular (TAICHMAN & EMERSON, 1998).

Os macrófagos estão associados com os progenitores eritróides fornecendo-lhes ferro (WILKINS, 1992). Os linfócitos T ativados e os mastócitos secretam GM-CSF, interleucina-3 (IL-3) e interleucina-5 (IL-5), os quais são responsáveis pela estimulação de várias células hematopoiéticas (DORSHKIND, 1990).

Os fatores de crescimento ou fatores estimuladores de colônias são glicoproteínas que podem ou não estar associadas a células e/ou matriz extracelular e exercem seus efeitos biológicos através de receptores específicos expressos na superfície de células alvo (KISHIMOTO et al., 1994). Essas moléculas atuam sobre as células tronco hematopoiéticas e células em diferenciação, estimulando a proliferação e a diferenciação, e em células maduras, estimulando a atividade funcional das mesmas (VERFAILLIE, 1998). Três vias são utilizadas para que eles cheguem às suas células alvo: transporte através da circulação sanguínea (como hormônios endócrinos), secreção por células do estroma (como hormônios parácrinos) e contato direto célula-célula (como moléculas sinalizadoras de superfície) (HOFFMAN et al., 1995).

Alguns fatores de crescimento, principalmente três interleucinas, IL-1, IL-3, IL-6, estimulam a proliferação das células tronco pluripotentes e multipotentes, mantendo, assim, suas populações. Os fatores estimuladores de colônia são

responsáveis pela estimulação da divisão celular e pela diferenciação das linhagens granulocítica e monocítica. A eritropoietina ativa a diferenciação dos eritrócitos e a trombopoietina estimula a produção de plaquetas. Também existem reguladores negativos, que atuam na supressão da proliferação celular, como o fator de crescimento tumoral beta (TGF- $\beta$ ) (DORSHKIND, 1990).

Componentes da matriz extracelular também são indispensáveis para a manutenção local das células hematopoiéticas primitivas e para o controle da diferenciação das linhagens específicas (WHETTON & SPOONCER, 1998). As células do estroma hematopoiético depositam no meio extracelular diversas proteínas estruturais e polissacarídeos, incluindo colágeno tipo I e III, elastina, fibronectina, laminina, proteoglicanos (PGs) e glicosaminoglicanos (GAGs) (GUPTA et al., 1998). Apesar da diversidade desses componentes, eles são fundamentais para o estabelecimento de nichos dentro do microambiente da medula óssea permitindo a regulação do fenômeno hematopoiético.

Dessa forma, o microambiente hematopoiético, composto por todos os seus tipos celulares, seus produtos e elementos de matriz extracelular, é capaz de sustentar a manutenção e a diferenciação dos precursores hematopoiéticos e influenciar no controle de todo o processo.

## **1.2 Ontogenia Do Sistema Hematopoiético**

As primeiras células sangüíneas do embrião humano surgem muito precocemente, duas semanas após a concepção, no mesoderma do saco

vitelínico, sendo este o primeiro sítio hematopoiético durante o período embrionário. Mais tarde, por volta da sexta semana de gestação, a hematopoiese passa a predominar no fígado, e durante o segundo trimestre inicia-se a fase esplênica. Tanto a fase hepática quanto a esplênica continuam até o final da gestação (WOLBER et al., 2002; TAVIAN et al., 1999).

A hematopoiese começa na medula óssea no final do segundo trimestre, a partir do desenvolvimento dos ossos longos. À medida que o sistema esquelético continua a se desenvolver, a medula óssea assume um papel cada vez maior na formação das células sangüíneas. Na vida adulta, em condições fisiológicas normais, a medula óssea passa a ser o sítio de produção das células sangüíneas e responde a demanda fisiológica continuamente com a produção dos diversos tipos celulares de forma precisa (Zon,1995).

A medula óssea é um órgão difuso, muito ativo e volumoso, constituindo aproximadamente 5% do peso total do corpo. É encontrada no canal medular dos ossos longos e nas cavidades dos ossos esponjosos. Existem dois tipos de medula óssea, a vermelha, hematógena, que deve sua cor à presença de numerosos eritrócitos em diversos estágios de maturação, e a medula óssea amarela, rica em células adiposas e que não produz células sangüíneas. No recém-nascido, toda a medula óssea é vermelha e, portanto, a produção de células do sangue é muito ativa. Com o avanço da idade, porém, a maior parte da medula óssea transforma-se na variedade amarela pelo acúmulo de grande quantidade de células adiposas. No adulto, a medula óssea vermelha existe no esterno, nas vértebras, nas costelas, nos ossos do crânio, nas epífisis proximais do fêmur e do úmero (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).



### 1.3 Hematopoiese Extramedular

Em adultos normais a mielopoiese e a linfopoiese ocorrem na medula óssea, onde elas são precisamente reguladas e dependentes do microambiente hematopoiético. No entanto, em algumas situações, na vida adulta, a hematopoiese pode ser observada em sítios extramedulares como fígado e baço. Isto ocorre em patologias que modificam o ambiente da medula óssea, como em mielofibroses severas, ou naquelas em que outras células ocupam o espaço hematopoiético, como em leucemias. A hematopoiese extramedular pode ser entendida como um fenômeno passivo, no qual as células se deslocam de seu local normal para sítios que tinham tido função hematopoiética no início de desenvolvimento embrionário (ALVAREZ-SILVA et al.,1993; DUTRA et al.,1997; ROSSI et al., 1999;).

A hematopoiese extramedular também pode estar associada a situações inflamatórias específicas, sendo possível estabelecer sítios hematopoiéticos em outros órgãos sem o comprometimento do espaço físico medular. Neste caso, um ambiente extramedular que mimetiza o estroma hematopoiético é formado e torna-se capaz de sustentar a proliferação e diferenciação de uma ou mais linhagens hematopoiéticas. A produção periférica de células mielóides que participam de infiltrados inflamatórios tem sido descrita em vários modelos experimentais, incluindo a infecção esquistossomal em camundongos (ROSSI et al., 1999).

A infecção esquistossomal é a principal causa da fibrose em fígado humano. O modelo murino de infecção esquistossomal tem sido utilizado para entender um dos maiores fatores desta patologia – a reação inflamatória

granulomatosa periovular. Os granulomas são inicialmente reações macrofágicas que mobilizam monócitos circulantes. Assim, os ovos do parasita são uma potente fonte de antígenos e os linfócitos e os eosinófilos, tornam-se subseqüentemente os maiores componentes dos granulomas. A reação fibrótica forma-se progressivamente pela mobilização de células estreladas ativadas do parênquima adjacente, as quais secretam matriz extracelular. Na fase crônica da doença ocorre a produção periférica de células inflamatórias, principalmente macrófagos e eosinófilos, que pode suplementar a produção dessas linhagens pela medula óssea (ROSSI et al, 1999).

Assim, na esquistossomose mansoni, tanto em humanos como em modelos experimentais, observa-se a produção de diversas linhagens celulares mielóides, como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e megacariócitos, em associação com reações inflamatórias granulomatosas. (Borojevic et al., 1983; Lenzi et al., 1995). No entanto, nesta patologia a função da medula óssea não está comprometida e o deslocamento da mielopoiese de seu sítio normal pode ser entendido como fenômeno ativo, controlado por células e moléculas específicas (ALVAREZ-SILVA et al., 1993).

#### **1.4 Modelo De Hematopoiese Extramedular – Células GR**

As células GR constituem um modelo de estudo para a hematopoiese extramedular. São caracterizadas como miofibroblastos e representam as células do tecido conjuntivo hepático envolvido com a reação fibrogranulomatosa induzida

em camundongos através de infecção esquistossomal (ALVAREZ-SILVA et al., 1993). Neste modelo de mielopoiese extramedular é possível avaliar os fatores que induzem à formação de um sítio mielopoiético mediante estímulo inflamatório, já que este processo leva a formação de um estroma mielopoiético (CARVALHO et al., 2000).

O estroma composto por células conjuntivas hepáticas, obtido de camundongos adultos, acometidos por *Schistosoma mansoni*, é capaz de sustentar a mielopoiese (BOROJEVIC et al., 1993). A capacidade de sustentação mielopoiética está associada a produção de GM-CSF, que permanece associado a membrana plasmática das células GR através de proteoglicanos que contem heparam sulfato (HSPGs). A adesão e o contato célula-célula também são necessários para as células GR estimularem a proliferação das células mielóides (ALVAREZ-SILVA et al., 1993).

O interferon gama (IFN- $\gamma$ ) é uma citocina imunomodulatória fundamental em processos imunopatológicos (YU et al., 1999). É produzido por linfócitos T e células *Natural Killer* em resposta a diversos estímulos imunológicos. A interleucina-12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), produzidos por macrófagos ativados, também induzem a produção desta citocina (FARRAR & SCHREIBER, 1993). O interferon gama exerce seus efeitos biológicos a partir da ligação aos seus receptores em células alvo de maneira autócrina ou parácrina. Este receptor é composto por duas subunidades transmembranares glicoprotéicas, as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , que permanecem isoladas na membrana plasmática, somente se oligomerizando no momento da ligação com o interferon gama (HAQUE & WILLIAMS, 1998).

Estudos utilizando o modelo de esquistossomose murina experimental em camundongos *knock out* para o receptor de interferon gama mostraram que o granuloma periovular intrahepático é menor nos animais *knock out* em comparação com os animais selvagens. Os animais mutantes apresentam uma reação fibrótica aumentada e uma significativa redução das células inflamatórias, indicando que o interferon gama modula o tamanho do granuloma, o depósito de tecido fibroso e a composição celular presente no sítio inflamatório (REZENDE et al., 1997). Oliveira e colaboradores (2000) utilizando o mesmo modelo de esquistossomose murina experimental, demonstraram que a ausência da sinalização celular mediada pelo receptor de interferon gama modifica as populações celulares de macrófagos, linfócitos e células conjuntivas hepáticas, que constituem o granuloma hepático periovular, sem alterar a resposta sistêmica a infecção. Observou-se que a população de macrófagos diferenciados é predominante nos animais selvagens, enquanto nos animais mutantes é maior o número de monócitos imaturos e proliferativos. Sabe-se também, que isto não está associado a alterações na expressão de fatores de crescimento, pois os dois estromas expressam os mesmos fatores, M-CSF, GM-CSF e IL-6 (AGUIAR, 2001).

Dessa forma, as células GR, células conjuntivas hepáticas obtidas de animais selvagens ou *knock out* para o receptor de interferon gama, constituem um modelo de estudo para a hematopoiese extramedular, uma vez que ambos os tipos celulares têm a capacidade de suportar a proliferação de precursores hematopoiéticos.

## 2 GLICOESFINGOLIPÍDIOS

Os glicosfingolipídios constituem uma grande e heterogênea família de lipídios anfipáticos presentes em todas as células eucarióticas. Estes compostos estão ancorados na membrana plasmática através da porção ceramida (parte hidrofóbica) e expõem a porção glicídica (parte hidrofílica) para o espaço extracelular (MACCIONI et al., 2002).

A ceramida é constituída por uma base esfingóide, composta por um amino-álcool de cadeia longa, ligada carboamidicamente a um ácido graxo contendo 16, 18 ou mais átomos de carbono. O grupamento alcoólico primário da ceramida serve como sítio de ligação para diversas moléculas, como fosfato, fosfocolina e sacarídios, resultando na formação de ceramida-1-fosfato, esfingomielina e glicosfingolipídios, respectivamente (figura 2). A porção glicídica pode ser representada por uma unidade simples, como no caso dos cerebrosídeos (Glicosilceramida, GlcCer, ou Galactosilceramida, GalCer), ou por um mono ou dissacarídeo sulfatado, como no caso dos sulfatídios, ou, ainda, por uma cadeia oligossacarídica contendo várias oses e derivados de oses. As unidades glicídicas presentes nos glicosfingolipídios são glicose, galactose, *N*-acetilglicosamina, *N*-acetilgalactosamina, fucose, ácido siálico e ácido glicurônico. Os glicosfingolipídios com um ou mais ácidos siálicos são chamados gangliosídeos e junto com os sulfatídios formam o grupo de glicosfingolipídios ácidos. Os demais

glicoesfingolípídios são classificados como glicoesfingolípídios neutros (TETTAMANTI et al., 2003).

O metabolismo dos glicoesfingolípídios envolve enzimas que residem em organelas subcelulares que participam dos sistemas de transporte endocítico e exocítico. Dessa forma, o fluxo metabólico destes compostos depende: 1) das enzimas envolvidas e de seus mecanismos regulatórios; 2) das rotas de endocitose e exocitose, às quais os processos de degradação e biossíntese dos glicoesfingolípídios estão intimamente relacionados; 3) da taxa de *turnover* da membrana plasmática, que reflete o estado funcional da célula e 4) da ocorrência de estímulos externos que favorecem a degradação dos glicoesfingolípídios e a formação de segundos mensageiros ou biorreguladores esfingóides (TETTAMANTI et al., 2003).

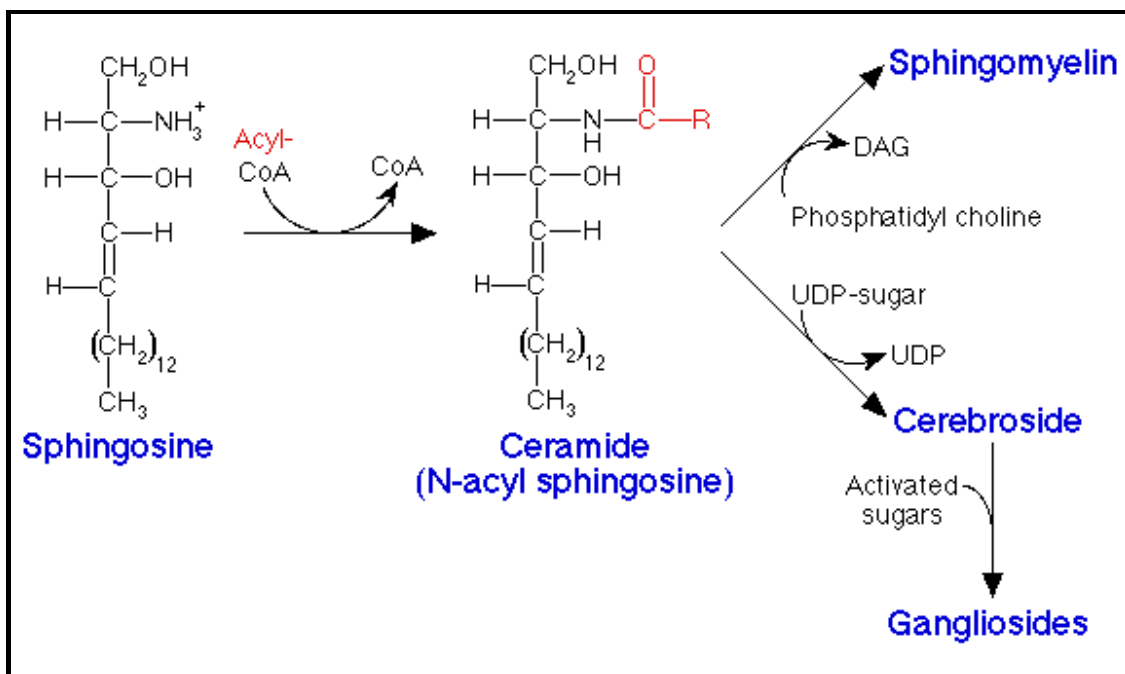


Figura 2: Esquema da biossíntese dos esfingolípídios

(Disponível em: <<http://www.google.com.br>>)

### 3 GANGLIOSÍDIOS

Os gangliosídeos são glicoesfingolípídios complexos que possuem em sua estrutura no mínimo um resíduo de ácido siálico, que pode ser o ácido *N*-acetilneuramínico ou o ácido *N*-glicolilneuramínico (figura 3). São substâncias anfipáticas, cuja parte hidrofóbica é representada pela ceramida e a parte hidrofílica consiste em um oligossacarídeo. Os resíduos de ácido siálico estão unidos aos resíduos de galactose internos e/ou da extremidade não redutora do oligossacarídeo (TETTAMANTI et al., 2003).

Estas características químicas proporcionam aos gangliosídeos sua solubilidade em água e em solventes orgânicos e são importantes para separá-los de outros componentes lipídicos de membrana.

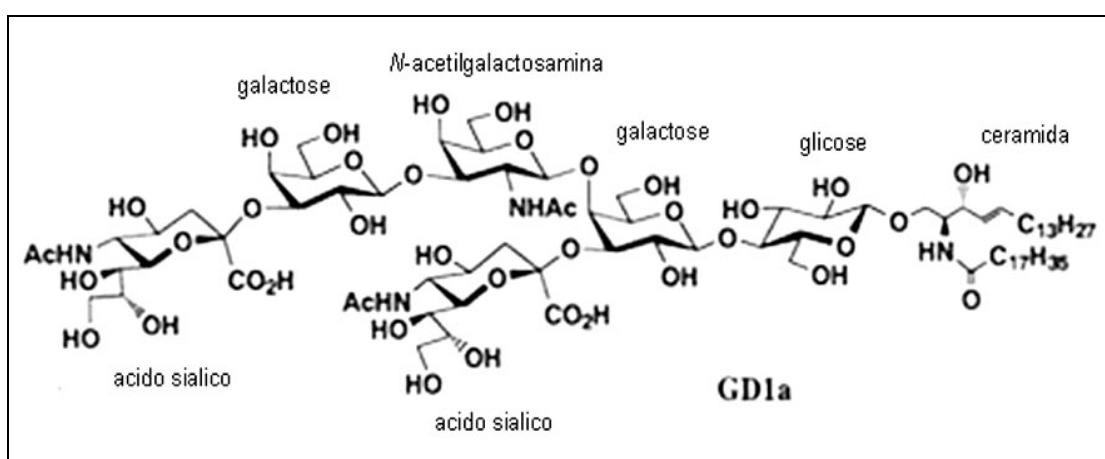


Figura 3: Estrutura do gangliosídeo GD1a

(Disponível em: <<http://www.google.com.br>>)

### **3.1 Nomenclatura**

A nomenclatura mais empregada para os gangliosídios é a de Svernerholm (1964), através da qual estes compostos são abreviados pela letra G, seguido pelas letras maiúsculas M (monosialo), D (disialo), T (trisialo), Q (tetrasialo), P (pentasialo), H (hexasialo) e S (septasialo) para designar a presença de um a sete resíduos de ácido siálico, respectivamente, e mais um número e/ou letra minúscula para distinguir os diferentes membros de cada grupo (ZELLER & MARCHASE, 1992).

### **3.2 Localização e Distribuição Celular**

A principal localização dos gangliosídios é no lado externo da membrana plasmática, onde sua porção oligossacarídica encontra-se voltada para a superfície celular e a porção ceramida encontra-se inserida na camada externa da membrana. Os gangliosídios são os maiores componentes das membranas neuronais, constituindo entre 10 e 12% do conteúdo lipídico total e 20 a 25% da camada externa da membrana. Estes compostos também estão presentes em organelas subcelulares, envolvidas com o metabolismo dos glicoesfingolipídios, ou em vesículas, ou outras estruturas de transporte, responsáveis pelo transporte intracelular dessas moléculas (MACCIONI et al., 1999; TETTAMANTI et al., 2003).

Devido às suas propriedades anfipáticas e à composição de sua porção hidrofóbica, os gangliosídios formam, juntamente com o colesterol e proteínas



específicas, microdomínios na membrana plasmática, também chamados de domínios resistentes a detergentes, domínios enriquecidos em glicoesfingolípídios (GEM) ou *rafts* lipídicos (figura 4). Esses microdomínios de membrana ricos em glicoesfingolípídios são considerados fundamentais para os eventos de sinalização celular mediados por receptor (CREMESTI et al., 2002).

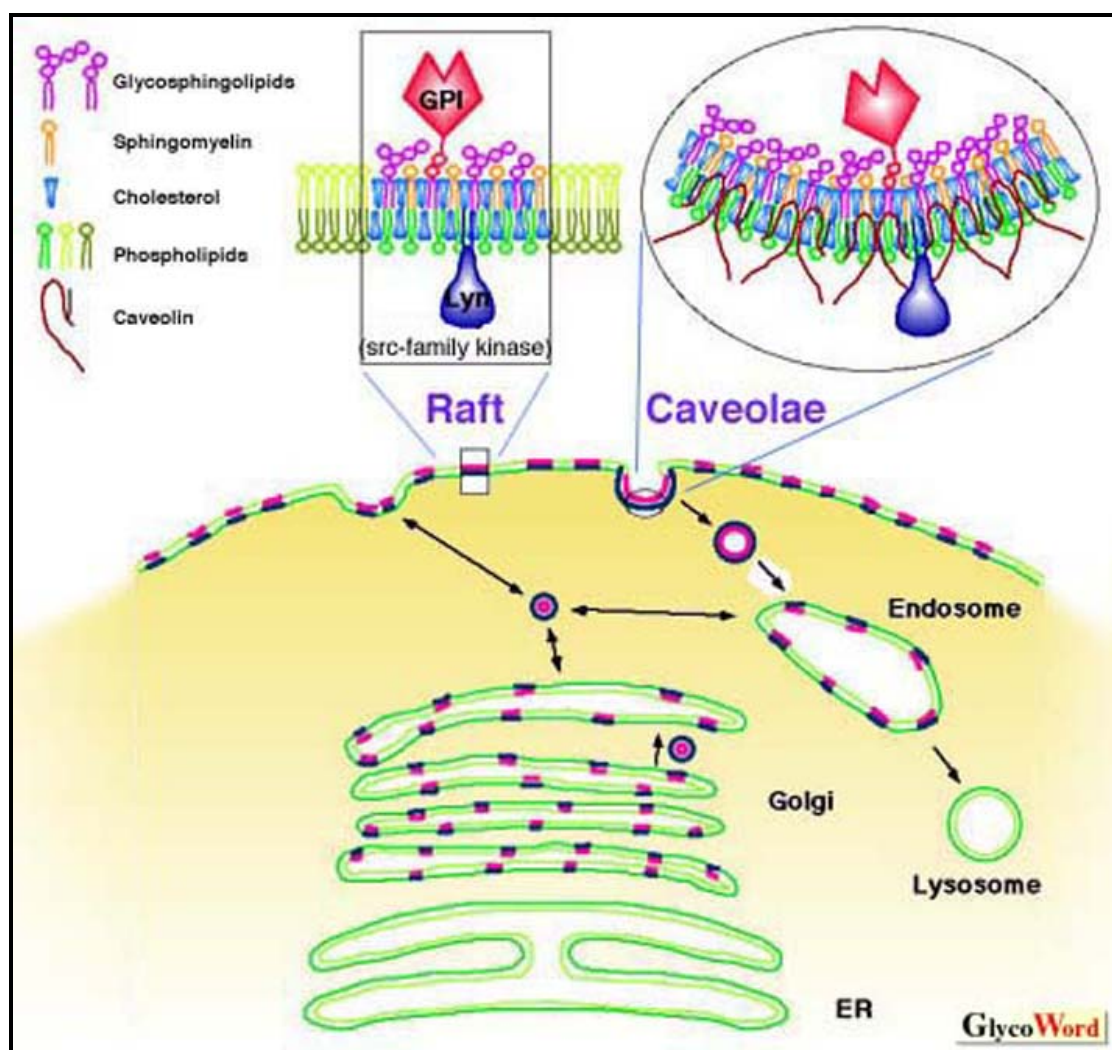


Figura4: Desenho esquemático dos microdomínios de membrana (*rafts* e caveolas)

(Disponível em: <<http://www.google.com.br>>)

### 3.3 Biossíntese

A biossíntese dos gangliosídeos é um processo localizado no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, no qual ocorre um fluxo intracelular de moléculas, a partir do retículo, passando pelas cisternas do Golgi e chegando a membrana da célula (ZELLER & MARCHASE, 1992).

No retículo endoplasmático é sintetizada a porção ceramida, através de uma série de reações específicas. Esta molécula intermediária é glicosilada na face citosólica do cis-Golgi e as demais adições seqüenciais de resíduos de oses ocorrem nos outros compartimentos do complexo de Golgi através da ação de glicosiltransferases, que atuam transferindo monossacarídeos, a partir de seus nucleotídeos doadores, para a cadeia oligossacarídica em formação (MACCIONI et al., 2002).

A biossíntese dos gangliosídeos ocorre através de três rotas denominadas de série a, b e c (figura 5). O gangliosídeo GM3 é o precursor comum para a biossíntese de GM2 e GD3, sendo, portanto, o ponto de ramificação entre as rotas a e b. E, por isso, as enzimas GM2 sintase e GD3 sintase são consideradas enzimas reguladoras dessas rotas (YU & BIEBERICHI, 2001).

As reações de síntese dos gangliosídeos simples GM3, GD3 e GT3 ocorrerem no cis, medial e trans-Golgi, podendo se estender até o trans-Golgi-network (TGN), enquanto a síntese dos gangliosídeos complexos, como GM1, GD1a, GD1b e GT1b, ocorre quase que exclusivamente, no TGN. O transporte de GlcCer desde o cis-Golgi até o Golgi distal ocorre por transporte vesicular,



### 3.4 Degradação

A degradação dos gangliosídeos ocorre através da remoção seqüencial de resíduos de açúcar pelas seguintes hidrolases: neuraminidase, beta-galactosidase, beta-hexosaminidase, glicosilceramida-beta-glicosidase e ceramidase. Estas enzimas atuam sequencialmente sobre a extremidade não redutora dos gangliosídeos e levam finalmente à formação de esfingosina e ácido graxo. O fluxo da degradação ocorre através da rota endocitose-endossomo-lisossomo e todos os passos enzimáticos requerem pH ácido dentro da organela (RIBONI et al., 1997).

O processo degradativo inicia com a transformação dos multissialogangliosídeos nos monossialogangliosídeos correspondentes por ação das sialidases. Assim, por exemplo, através da remoção de uma molécula de ácido siálico do GT1a forma-se o GD1a e retirando-se também um ácido siálico deste último forma-se o GM1. E, a partir da remoção de galactose do GM1, por uma beta-galactosidase, forma-se o GM2 e retirando-se *N*-acetilgalactosamina, por ação de uma beta-*N*-acetilhexosaminidase, deste último, forma-se o GM3 (figura 6). Em alguns casos, o ácido siálico é removido do GM1 e do GM2 por sialidases específicas formando os globosídeos GA1 e GA2, que por ação de uma beta-galactosidase e uma beta-*N*-acetilhexosaminidase, são convertidos em lactosilceramida. A lactosilceramida, formada a partir de GA2 ou de GM3, é então

degradada a ceramida pela ação seqüencial de uma beta-galactosidade e uma beta-glicosidase (TETTAMANTI et al., 2003).

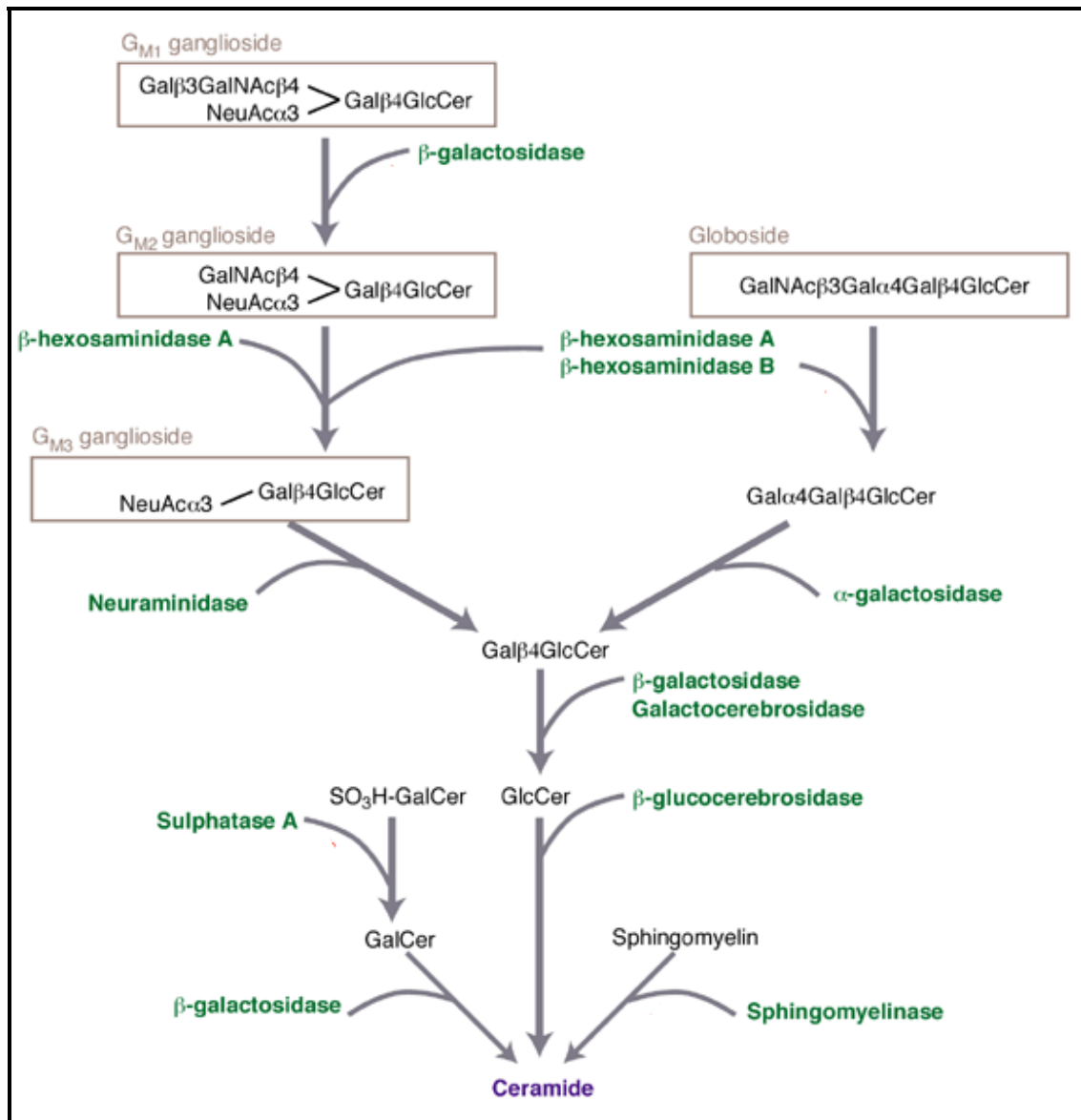


Figura 6: Rotas de degradação dos glicoesfingolipídios

(Disponível em: <<http://www.google.com.br>>)

### **3.5 Rotas De Salvação**

Os produtos finais da degradação dos gangliosídeos, como monossacarídeos, esfingosina e ácidos graxos, ou seus intermediários, lactosilceramida, glicosilceramida e ceramida, formados dentro do lisossoma podem sair desta organela, por difusão espontânea ou através de transportadores, podendo ser novamente utilizados nas rotas biossintéticas. A utilização destes fragmentos metabólicos nos processos biossintéticos constitui a chamada rota metabólica de salvação (TETTAMANTI et al., 2003).

### **3.6 Funções**

A distribuição diferente dos gangliosídeos em vários tecidos é um forte indício de que eles têm funções distintas nesses tecidos. Mais especificamente, mudanças no padrão de gangliosídeos são observadas durante o desenvolvimento cerebral e determinadas regiões do cérebro adulto são caracterizadas por um padrão específico de gangliosídeos. Em vista disso, nenhuma função particular pode ser atribuída a um só gangliosídeo, mas já é conhecido que esses compostos estão envolvidos em muitos processos celulares fundamentais, incluindo diferenciação, crescimento, migração e morfogênese, interação célula-célula e

matriz-célula, além de participarem no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central (LLOYD & FURUKAMA, 1998).

Os gangliosídeos também são importantes para os processos de transdução de sinal, pois eles são componentes dos microdomínios de membrana, os quais reúnem receptores, proteínas (ancoradas a glicosilfosfatidilinositol, GPI) e moléculas que participam da sinalização celular. Além disso, os metabólitos da degradação dos gangliosídeos, esfingosina e ceramida, funcionam como segundos mensageiros celulares (SIMONS & TOOMRE, 2000; HAKOMORI, 2003).

#### **4 GANGLIOSÍDIOS E A HEMATOPOIESE**

Vários trabalhos têm demonstrado a relação dos gangliosídeos com a modulação da hematopoiese. Estudos utilizando as células HL-60, uma linhagem leucêmica humana, mostraram que o gangliosídeo GM3 e gangliosídeos da série neolacto induzem a diferenciação monocítica e granulocítica, respectivamente, nessa linhagem celular, indicando que os gangliosídeos são importantes tanto na indução da diferenciação, como na determinação da direção da mesma (NAKAMURA et al., 1991). Os mesmos autores também demonstraram que em células K562, uma linhagem leucêmica multipotente capaz de se diferenciar formando as linhagens eritrocítica, monocítica, granulocítica e megacariocítica, o gangliosídeo GM3 induz a diferenciação megacariocítica (NAKAMURA et al., 1991).

Os gangliosídios expressos nas membranas celulares também podem ser liberados para o meio extracelular e exercerem seus efeitos biológicos. Sietsma e colaboradores (1998) relataram que os gangliosídios derivados de neuroblastomas humanos inibem a eritropoiese e a mielopoiese, sugerindo que os gangliosídios liberados pelas células tumorais contribuem para a supressão da medula óssea observada em pacientes com neuroblastoma.

Os gangliosídios derivados de linfoma de células T ou linfoma de Dalton, que são predominantemente GD3 e GM2, inibem a hematopoiese por induzirem a morte de células da medula óssea por apoptose (BHARTI & SINGH, 2000). Esses mesmo autores, em um trabalho posterior, sugerem que a modulação da hematopoiese pelos gangliosídios derivados do linfoma de Dalton ocorra devido a inibição da proliferação das células da medula óssea, indução de morte celular e alteração da resposta dessas células ao M-CSF (BHARTI & SINGH, 2001).

Wettreich e colaboradores (1999), demonstraram que a interação física entre GM-CSF, e proteoglicanos de heparam sulfato é fundamental para a modulação da atividade deste fator de crescimento sobre as células hematopoiéticas. Esta associação entre GM-CSF e HSPG é dependente das propriedades físico-químicas do microambiente e somente ocorre em pH ácido, entre 4 e 5. Provavelmente o ambiente intercelular, incluindo os microdomínios compostos por lipídios com carga negativa, como os gangliosídios, pode promover condições que induzam uma alteração conformacional na molécula de GM-CSF, possibilitando sua interação com os glicosaminoglicanos. Estes microdomínios encontram-se na membrana das células estromais e/ou das células precursoras hematopoiéticas. Estas informações associadas à presença de



glicosfingolípídios em regiões específicas da membrana plasmática fundamentam a hipótese de que os gangliosídios podem participar do microambiente negativo necessário para o suporte da hematopoiese.

## OBJETIVOS

Considerando o exposto acima e levando em conta a possibilidade da participação dos gangliosídeos no microambiente carregado negativamente necessário para o suporte do processo hematopoiético, esta dissertação tem como objetivos:

- ▶ Determinar a síntese e a expressão de glicoesfingolipídios, especialmente dos gangliosídeos, pelos dois estromas extramedulares derivados de fígado de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*, GRWT e GR(IFN- $\gamma$ R<sup>0/0</sup>)
- ▶ Caracterizar o perfil de glicoesfingolipídios liberados para o meio de cultura (shedding) pelos dois estromas extramedulares
- ▶ Verificar a distribuição destes compostos nas frações de membrana solúveis e insolúveis a detergente
- ▶ Avaliar a proliferação das células FDCP-1, uma linhagem precursora mielóide, através do co-cultivo com dois estromas extramedulares na presença e ausência de um inibidor específico da síntese dos gangliosídeos e, também, através do cultivo na presença dos meios condicionados por esses estromas

**ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO NA REVISTA  
CELL AND TISSUE RESEARCH**

Claudia M. B. Andrade, Ana Luiza Ziulkoski, Aline X. S. dos Santos, Leonardo S. Boldrini,  
Vera M. T. Trindade, Radovan Borojevic, Fátima C. R. Guma

**Gangliosides regulate the capacity of stromal cells  
to support myelopoiesis**

C. M. B. Andrade, A. L. Ziulkoski, A. X. S. dos Santos, V. M. T. Trindade, F. C. R. Guma  
(corresponding author)

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul,

Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo,

90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

e-mail: [fguma.voy@terra.com.br](mailto:fguma.voy@terra.com.br)

Tel.: +55-51-3316 5546

FAX: +55-51-3316 5535

L.S. Boldrini, R. Borojevic

Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, and

Programa Avançado de Biologia Aplicada à Medicina,

Hospital Clementino Fraga Filho, Cidade Universitária,

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária,

21941-970, Rio de Janeiro, Brasil.

This research was supported by CNPq and CAPES grants of the Brazilian Federal Government, FAPERGS grant of the Rio Grande do Sul State Government, and FAPERJ grant of the Rio de Janeiro State Government.

**Summary:**

Stroma-mediated myelopoiesis depends upon growth-factors and the appropriate intercellular microenvironment, whose polarity is relevant for granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) mediated myeloid cell proliferation. Here we have addressed the question of whether gangliosides participate in formation of the microenvironment required to sustain myelopoiesis. We analysed the ganglioside synthesis, expression and shedding by two primary liver stromal cell cultures isolated from the wild type and the interferon gamma receptor knockout mice. The latter one has a higher capacity to sustain myelopoiesis, although the two cells produce the same growth factors. We used the FDC-P1 myeloid growth factor-dependent cell line as the reporter system, monitoring the cell survival and proliferation that reflect the bio-availability and the activity of GM-CSF. Our results demonstrated that although the two stromal cells synthesise the same gangliosides, their relative content and distribution were quite different. The FDCP-1 cell proliferation correlated with, and was dependent upon, the presence of GM3. It was abrogated in cultures in which ganglioside synthesis was inhibited in the stroma, as well as in presence of stroma cell supernatants in which GM3 was neutralised by the anti-GM3 monoclonal antibody. FDC-P1 cells do not accumulate GM3, but they are able to take up the stroma-produced GM3. This ganglioside accumulates in the cold Triton-X insoluble membrane fraction, particularly at the interface between stroma and myeloid cells. The role of the stroma in sustaining myelopoiesis is thus double: it provides simultaneously the growth factor and the ganglioside required for the optimal stimulation of the myeloid cell proliferation.

**Keywords:**

gangliosides; glycosphingolipids; haemopoiesis; myelopoiesis; interferon gamma

## INTRODUCTION

The haemopoietic system produces continuously a very high number of blood cells in a hierarchically ordered sequence of cell commitment and differentiation. Committed myeloid cell progenitors, the colony-forming units (CFU), are clonogenic, generating mature cells belonging to one or several myeloid lineages. They are controlled by and depend upon the haemopoietic environment, composed of stromal cells, associated extracellular matrix, and growth factors or cytokines, which can be locally produced or brought into the bone marrow by blood circulation. Interaction of stroma with haemopoietic cells involves direct cell-cell contacts, interaction of cytokines with cell membrane-associated molecules or with the adjacent extracellular matrix, which control the progressive commitment and differentiation of haemopoietic precursors into mature blood cells. In adults, haemopoiesis is essentially located in the bone marrow, but peripheral expansion of lymphoid and myeloid cells can also occur in specialised tissues, as well as within inflammatory and regenerative tissue reactions (Hamilton 2002).

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is one of the major growth factors that participate in controls of proliferation, differentiation and activation of myeloid cells. Besides its function in the bone marrow haemopoiesis, GM-CSF also participates in repair and regeneration subsequent to lesions of epithelial tissues, which are one of its major sources, as well as after injuries of the nervous system (Holgate 2000; Mann et al. 2001; Franzen et al. 2004]. Chronic activation of GM-CSF production in many cells that can participate in inflammation, such as macrophages, lymphocytes, endothelial and dendritic cells, leads to exacerbated tissue reactions, activation of myofibroblasts and formation of granulation tissue and/or fibrosis (Desmoulière et al. 1995, Mann et al. 2001]. Moreover, GM-CSF expression is known to occur in many carcinoma cells, and it correlates with the tumour aggressiveness and the extension of pericancerous stroma reaction (Bretscher et al. 2000). Understanding paracrine and juxtacrine controls of its activity is thus relevant for pathobiology of many tissue reactions to injury.

Several studies have indicated that the mitogenic activity of GM-CSF can be modulated by the glycosaminoglycan moiety of heparan-sulphate proteoglycans produced by stromal cells (Alvarez-Silva et al. 1993, 1994; Alvarez-Silva and Borojevic 1996; Modrowski et al. 2000). In previous studies, we have shown that interaction between GM-

CSF and glycosaminoglycans was dependent upon the polarity of the intercellular microenvironment, which could enhance or abrogate the biological availability or activity of the cytokine. This control was sensitive to digestion with sialyase. We proposed that clusters of negatively charged molecules, such as sialylated glycoproteins and glycosphingolipids (gangliosides), associated with membranes of either stromal cells, haemopoietic progenitors, or of both cell types, could be determinant for the local physical and chemical properties leading to the decreased pH, which induces the conformational change in GM-CSF required for its optimal interaction with glycosaminoglycans (Wettrich et al. 1999; Carvalho et al. 2000; Borojevic et al. 2003). It has been also shown that gangliosides can participate in regulation of cellular proliferation, differentiation and in cell to cell interactions, as well as in oncogenesis and in haemopoiesis. Gangliosides derived from a T-cell lymphoma or neuroblastoma can modulate haemopoiesis by inhibiting proliferation of bone marrow cells (Bharti and Singh 2000, 2001; Sietsma et al. 1998), and the crucial role of the GM3 ganglioside in regulation of leukaemia cell differentiation has been proposed (Nakamura et al. 1991). In a preliminary comparative study of gangliosides produced by different connective tissue stromata, we have found that those that have a high capacity to sustain myelopoiesis invariably produce and accumulate the GM3 as the major component of their ganglioside pool (F.C.R. Guma, unpublished data).

Here we have searched to establish an experimental model to monitor and characterise the role of gangliosides in the GM-CSF interaction with stroma and with haemopoietic cells. In view of the complexity of the bone marrow haemopoietic stroma that is composed of several cell types, we have chosen to study the simple liver connective tissue stroma composed of cells involved in fibro-granulomatous inflammatory reactions. These cells are derived from activated hepatic stellate cells, and have characteristics of myofibroblasts (Boloukhère et al. 1993). They can be isolated *in vitro* from mice livers as primary cell lines termed GR cells, which have been shown to have a full capacity to sustain GM-CSF-mediated proliferation of bone marrow-derived myeloid progenitors, cells of inflammatory infiltrates, as well as of GM-CSF-dependent cell lines (Alvarez-Silva et al. 1993; Dutra et al. 1997; Rossi et al. 1999). Moreover, hepatic granulomatous inflammatory reactions are modulated by the interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) signalling, which plays a pivotal role in this immuno-pathological process. Abrogation of this pathway increased the activation of connective tissue cells and the intensity of the cell infiltrate (Oliveira et al.



2000). We isolated the GR cells from wild-type mice (GR-WT) and from mice knockout for the IFN $\gamma$  receptor (GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup>). They represent an interesting model to study stroma interaction with myeloid growth factor-dependent progenitors, since GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> cells have a higher capacity to sustain myelopoiesis than the GR-WT counterparts. We showed that both cells express GM-CSF as well as other growth factors at the same level, and we speculated that the difference in GR-cell-supported myelopoiesis might depend upon the growth factor bio-availability and its interaction with other co-stimulatory molecules of the stroma or of the myeloid progenitor cell membranes.

In the present study, we have addressed the question of which gangliosides could participate in the formation of the microenvironment required to sustain myelopoiesis. We used different strategies analysing the ganglioside synthesis, expression and shedding by the two primary liver stromal cell cultures, GR-WT and GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup>. We used the FDC-P1 myeloid growth factor-dependent cell line as the reporter system, monitoring the cell survival and proliferation that reflect the bio-availability and the local activity of GM-CSF. Our results demonstrated that although the two stromal cells synthesise the same gangliosides, their relative content and distribution were quite different. The intensity of FDC-P1 cell proliferation correlated with and was dependent upon the presence of the GM3.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Materials**

We purchased Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), RPMI 1640 medium and lipid standards from Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA, foetal bovine serum (FBS) from Cultilab, Campinas, SP, Brazil, D-[U-<sup>14</sup>C] galactose (300 mCi / mmol) from Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK, glycosyl ceramide synthase inhibitor DL-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (PDMP) from Calbiochem, San Diego, CA, USA, silica-gel high performance thin layer chromatography (HPTLC) plates from Merck, Darmstadt, Germany, plastic tissue culture dishes from Nunc, Roskilde, Denmark, TRIzol and Taq-DNA Polymerase from Invitrogen Life-Technologies, São

Paulo, SP, Brazil, C<sub>6</sub>-NBD-ceramide from Sigma. The supernatant of DH<sub>2</sub> hybridoma was generously supplied by Prof. Sen-itiroh Hakamori, Pacific Northwest Research Institute, Seattle, WA.

### **Cells and cell cultures**

All the cells were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The GR cells (GR-WT and GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup>) were isolated as previously described (Alvarez-Silva et al. 1993), and maintained in DMEM supplemented with 10% FBS. The FDC-P1 cells were maintained in RPMI 1640 medium with 10% FBS, supplemented with 10% supernatant of WeHi-3B cells that secrete IL-3 and GM-CSF constitutively. The cultures were maintained under a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C.

Cell culture supernatants were harvested from confluent cultures of GR-WT or GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> cells, maintained for 48 h in the above described medium, cleared by centrifugation, filtered and used fresh. For GM3 inhibition we used anti-GM3 antibody produced by the hybridoma DH<sub>2</sub>. The GR cell supernatants were supplemented with 10% or 20% hybridoma supernatant, and incubated for 1 h at 37°C before use. For inhibition of glycosphingolipid synthesis, we incubated cell cultures with 20  $\mu$ M PDMP during 72 h, changing the culture medium every 24 h. Subsequently, cell cultures were incubated for 48 h with the same medium, and the supernatant was harvested and processed as described. In order to monitor the capacity of these GR cell-conditioned media to sustain proliferation of the GM-CSF-dependent FDC-P1 cells, 4 x 10<sup>4</sup> cells were washed and plated into 24-well culture plates in DMEM supplemented with 10% FBS and mixed (1:1) with the cell conditioned media, without exogenous growth factors. The negative control was 10% FBS-containing DMEM, and the positive one was the same medium with 10% supernatant of WeHi-3B cells. Cells were quantified by haemocytometer. At least two independent experiments were done in quadruplicate.

### **Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)**

RNA was extracted from stromal cells using the TRIzol, and 1  $\mu$ g was used to prepare the cDNA. PCR (25  $\mu$ L) was done with Taq-DNA Polymerase using 30 s denaturation at 95°C, 45 s annealing at 58 – 62°C, and 1 min extension at 72°C. We used 35

cycles for all the assays. Actin was used as internal control. Primer pairs are listed in the Table 1. PCR products were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gels and stained by ethidium bromide.

### **Metabolic labelling and lipid extraction**

Cultures of stromal cells that reached confluence, and cultures of FDC-P1 cells were incubated with [<sup>14</sup>C]galactose, 0.5  $\mu$ Ci/mL, for 12 h. Subsequently, cells were washed three times with cold phosphate buffered saline (PBS), harvested and pelleted by brief centrifugation (Zurita et al. 2001). Lipids were extracted from non-radioactive or radio-labelled cell pellets with chloroform / methanol (2:1, v/v), and gangliosides were purified by Sep-Pack C18 column (Williams and McCluer 1980).

### **Triton X-100 treatment**

GR cells were labelled with [<sup>14</sup>C]galactose for 12 h, washed with cold PBS and harvested by scraping. Samples were treated with 0.5 mL of the lysis buffer containing 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) (TNE buffer), for 1 h at 4°C, and then centrifuged for 1 h at 100,000 *g* at 4°C. The supernatant (soluble fraction) was removed and the pellet (insoluble fraction) was re-suspended in 0.2 mL lysis buffer. The obtained fractions were subjected to Folch partition in order to monitor the gangliosides content (Folch et al. 1957). The resulting aqueous phases were purified further to eliminate Triton X-100 by passing through DEAE-Sephadex and Sep-Pack C18 columns (Crespo et al. 2002). Both the insoluble and the soluble fractions yielded approximately 700 cpm in GR-WT cells, while GR-IFN $\gamma$ -R<sup>o/o</sup> cells yielded 800 cpm in the soluble fraction and 2100 cpm in the insoluble one. We applied the total fractions for analyses on HPTLC plates.

### **Chromatography and analysis of the gangliosides**

The purified lipid extract was evaporated under N<sub>2</sub> and run on HPTLC silica gel 60 plates with two successive solvent systems: chloroform / methanol (4:1, v/v) followed by chloroform / methanol / 0.25% aqueous CaCl<sub>2</sub> (60:36:8, v/v). The last migration was developed in a tank described by Nores et al. (1994). Radioactive sphingolipids were visualised by exposition of a radiographic film (Kodak X-Omat AR) at -70°C and their

relative contribution was determined by densitometric scanning of the X-ray film in a CS 930 Shimadzu UV/vis densitometer. The unlabelled gangliosides and standards were visualised by exposure to resorcinol-HCl (Svennerholm, 1957). For each run of unlabelled lipids we applied the quantity extracted from the cell mass containing approximately 500 µg proteins. For radio-labelled lipids we applied 5000 cpm, that corresponded to 300 µg protein of GR-WT cells and to 50 µg protein of GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> cells, which incorporated a much higher quantity of galactose.

### **Shedding of gangliosides**

The GR and FDC-P1 cells were metabolically labelled with [<sup>14</sup>C]-galactose 0.5 µCi/mL for 12 h. Cells were washed and cultured in fresh medium for 48 h. The culture supernatant was collected, dialysed against distilled water, lyophilised and the total lipids were extracted from lyophilised powder with chloroform / methanol (1:1, v/v). The cells were harvested and lipids extracted with chloroform / methanol (2:1, v/v). The gangliosides present in the cells and in the supernatant were then purified and analysed by HPTLC as described above. We applied the quantity of lipids equivalent to 500 µg protein of the stroma cells. This corresponded to 1600 cpm in the cell layer and 500 cpm in the supernatant for GR-WT cells, and to 5000 cpm in the cell layer and 1200 cpm in the supernatant for GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> cells.

### **Cocultures assays**

The FDC-P1 cells, extensively washed with calcium- and magnesium- free balanced salt solution (BSS) in order to remove IL-3, were inoculated onto the semi-confluent monolayers of GR cells in 24 cultures plates, 1 x 10<sup>5</sup> cells per well. After 2 h, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h of co-incubation, they were observed under microscope equipped with phase contrast and photographed (Carvalho et al. 2000). The protein content was quantified in sedimented cells after lipid extractions, solubilised with 10 N NaOH and quantified as described by Peterson (1979), using bovine serum albumin (BSA) as standard.

**DL-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (PDMP) treatment of cells**

Inhibition of glycolipid synthesis with PDMP was carried out on GR and FDC-P1 cells, treated with 20  $\mu\text{M}$  PDMP, added to the culture medium from a recently prepared 600  $\mu\text{M}$  stock solution. FDC-P1 cells were inoculated onto the semi-confluent monolayers of GR cells and the co-cultures remained under the same treatment. Inhibition of glycolipid synthesis was monitored in PDMP-treated and control cells by HPTLC analyses of cellular gangliosides, as described above.

**Immunocytochemistry**

Cell co-cultures grown on coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min, washed, and incubated in PBS buffer containing 3% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at 37°C to block the non-specific binding sites. Coverslips were then incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal anti-GM3 antibody (clone DH2), washed and reacted with the CY3-conjugated goat anti-mouse IgG for 1.5 h at 37°C (Crespo et al., 2002). Alternatively, glycosphingolipids were labelled by overnight incubation of stromal cultures with 5  $\mu\text{M}$  C<sub>6</sub>-NBD-ceramide. Stromata were subsequently washed and seeded with FDC-P1 cells. After 6 h, cocultures were washed and mounted with Fluorsave. Confocal images were acquired with Carl Zeiss LSM5 Pascal laser scanning confocal microscope equipped with an argon/helium/neon laser and a 63x (1.4) oil immersion objective.

## RESULTS

Stroma-induced myelopoiesis was monitored using the GM-CSF-dependent myeloid progenitor FDC-P1 cell line. Co-cultures of FDC-P1 cells with the two studied GR monolayers showed that the GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> stroma induced a more rapid and intense proliferation as compared to GR-WT cells (Figure 1). The RT-PCR analysis showed that the two cell types expressed M-CSF and GM-CSF at the same level. FDC-P1 cells did not express these genes (Figure 2).

In view of the described role of negatively-charged sialic-acid-containing molecules at the membrane interface between the supporting stroma and the haemopoietic cells (Borojevic et al. 2003), we monitored the presence and distribution of the sialic-acid-containing glycosphingolipids, the gangliosides (Figure 3). GR-WT and GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> cells presented ganglioside bands that migrated as GM3, GM2, GM1 and GD1a standards. The major ganglioside in GR-WT cells was GD1a, while GM3 was the major one in GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> cells (Figure 3A). The myeloid progenitor FDC-P1 cells produced GD1a, GD1b, GM1 and only traces of GM3 (Figure 3A). When the cells were incubated in the medium containing [<sup>14</sup>C]galactose, the same gangliosides were metabolically labelled. The radioactive incorporation in GR-WT cell glycosphingolipids was highest in GD1a, while GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> cells synthesized GM3 and GD1a in similar quantities. We could observe also the presence of ceramide tetrahexoside (CTetH) in GR-WT cells (Figure 3B). In FDC-P1 cells, the radioactivity was incorporated principally in GM1 and GD1a. These cells also synthesized significant quantities of a neutral glycolipid that migrated as ceramide trihexoside (CTH) (Figure 3B). Comparing the ganglioside quantity with the rate of their synthesis, we note the high relative quantity of the radiolabelled GM3 as compared to the total GM3 present in GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> cells, suggesting either its further metabolism to other gangliosides or its shedding.

In view of our previous observation that the supernatants of stroma layers that produced GM-CSF contained components that could enhance or inhibit its growth-promoting effect (Carvalho et al. 2000), we monitored proliferation of FDC-P1 cells in presence of supernatants of GR-WT and GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> cells (Figure 4A). A significantly higher proliferation was sustained by supernatants of the latter ones. Therefore, we analysed gangliosides shed by the GR-WT and GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> cells (Figure 5). They

released the major gangliosides that they synthesized, but GR-WT shed a much smaller total quantity of gangliosides as compared to GR-IFN $\gamma$ -R<sup>o/o</sup> cells. The difference between the ganglioside pattern in the Figures 3 and 5 reflects the fact that in the shedding experiment the glucose incorporation was done during 12 h, and shedding represents the gangliosides harvested during the following 48 h of chase. In this period, the labelled precursors followed further their metabolism. The densitometric quantification of the autoradiographies showed that the two bands of each ganglioside, corresponding to different fatty acids incorporated into the ceramide, had different shedding velocities. While in cell extracts, the upper band was in general slightly larger, in the shed fraction the lower band was considerably larger (Figure 6). This suggests that the two subtypes of sphingolipids have a distinct stability in cell membranes and different rates of metabolism, in accordance on our previous studies on sphingomyelin and ganglioside metabolism (Andrade et al. 2003; Ziulkoski et al. 2001). The biological significance of this phenomenon remains to be established.

In order to monitor the causal relationship of the sphingolipids produced by the stroma cells and present in the cell supernatants with their ability to support the FDC-P1 cell proliferation, we monitored cell growth in cultures in which the glycolipid synthesis was inhibited with PDMP, a potent inhibitor of ceramide glycosyltransferase. Exposure of stroma cells to 2  $\mu$ M PDMP in the culture medium for 1-3 days led to a gradual decrease in [<sup>14</sup>C]galactose incorporation into glycolipids (data not shown). GR-WT and GR-IFN $\gamma$ -R<sup>o/o</sup> cell cultures treated with PDMP had the pattern of gangliosides altered, showing absence of GM3 and a residual presence of a fraction of GD1a, suggesting its slower turnover (Figure 7). FDC-P1 cell survival and proliferation in cultures whose stromata were previously treated with 2  $\mu$ M PDMP was clearly inhibited, as compared to the respective controls (Figure 8). This observation was reinforced by the determination of the co-culture total protein content at the end of the experiment, which decreased 50% in cultures treated with PDMP.

We questioned further whether the capacity of stroma supernatants to support myelopoiesis reflected the inhibition of the ganglioside synthesis in the stroma layer described above. We found indeed that the myelosupportive capacity of supernatants with decreased content of gangliosides was lower than that of the controls (Figure 4B). Since the PDMP-mediated inhibition of the synthesis of gangliosides could indirectly affect

production of other compounds, we used the neutralizing anti-GM3 antibody in FDC-P1 cells cultures sustained by the GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> stroma supernatants, in which GM3 is the major ganglioside. Similar to the previous result, the FDC-P1 proliferation was inhibited in the presence of this antibody, indicating the direct relationship between the presence of GM3 and both the survival and the proliferation of this GM-CSF-dependent cell line (Figure 4C). Taken together, these data indicated that the presence of GM3 is required for the biological activity of GM-CSF, both in cell-cell contact-dependent interactions and in the activity of the stroma-cell supernatants.

Our previous study indicated an uneven distribution of the sialylated compounds in the cell membranes of stromata and of FDC-P1 cells, as well as their extensive movements upon establishment of cell-cell contacts (Borojevic et al. 2003). In order to address the question of their distribution in cell membranes, we examined the ganglioside composition of fractions soluble or insoluble in cold Triton X-100. The autoradiographies showed that in GR-WT cells similar quantities of lipids were present in the two fractions, while in GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> cells a larger part of gangliosides was found in the insoluble fraction, indicating their segregation in lipid rafts or caveolae (Figure 9). This observation raised two questions. The first one concerns the potential capping of membrane regions containing cytokine receptors and the associated molecules such as heparin sulphate-bearing proteoglycans at the interface between the interacting stroma and myeloid cells, already suggested by electron microscopy observations (Borojevic et al. 2003). The second one raises the question of the participation of each cell type in generating the intercellular microenvironment shared by the two interacting cell types.

When GR stromata were cultured in presence of fluorescent C<sub>6</sub>-NBD-ceramide it was incorporated into the cells. As expected, it labelled essentially the Golgi region, where the major part of the metabolism of ceramide-derived compounds occurs (Figure 10 – cells of the stroma). When FDCP-P1 cells were plated over the C<sub>6</sub>-NBD-ceramide-labelled stroma, they became also fluorescent (Figure 10). This indicated either that the labelled ceramide-derived compounds were shed into the supernatant being subsequently captured by FDC-P1 cells, or that these compounds could be transferred at the cell-cell contacts from the stroma to the haemopoietic progenitors.

We further questioned whether this transfer involved the GM3, shown to be the major ganglioside in stromas that sustained haemopoietic progenitors. GM3 labelling by



the fluorescent antibody gives a very faint reaction on FDC-P1 cells cultured alone (not shown), in agreement with the data shown for the ganglioside synthesis (Figure 3A). However, an intense labelling was observed not only in the stroma, but also in FDC-P1 cells cultured in contact with the stroma cells. Its distribution was limited to the cell membrane, being more intense at the interface with the stroma, in accordance with the previously reported distribution of the sialic acid-containing compounds. Taken together, these results suggest that the *de novo* synthesis and accumulation of GM3 occurs in stromal cells. It may be transferred through the narrow intercellular space into the adjacent FDC-P1 membranes. Alternatively, the GM3 shed into the supernatant may be captured and incorporated into FDC-P1 cell membranes. This may be followed by extensive capping of membrane-associated molecules, the GM3 being accumulated in the FDC-P1 cell membranes facing the stromal layer, generating a highly charged intercellular space depicted by ferritin labelling of the sialic acid (Borojevic et al. 2003).

## DISCUSSION

The present study gave two sets of information: (1) GM-CSF activity in supporting the myeloid cell proliferation requires the presence of gangliosides, and in particular the GM3, at the interface between the stroma and the target cells, and (2) IFN $\gamma$  down-regulation of myeloid cell proliferation operates through modification of the cell membrane ganglioside pool.

The capacity of endogenous and exogenous gangliosides to modulate cell growth has been known for long time (Hakomori 1990). In most cases, they are associated with the negative effect on the cell proliferation mediated by growth factors such as epidermal, fibroblast and platelet-derived growth factor (EGF, FGF, PDGF). The decrease of the growth factors activity was ascribed to the decreased ligand-binding or to the hampered dimerization of the receptor protein chains, resulting in the decreased autophosphorylation of tyrosines required for the intracellular signalling cascade. Activation of the receptor-associated tyrosine phosphatase dependent upon GM3 gives the same result (Miljan and

Bremer, 2002). Moreover, the integrin-dependent phosphorylation of receptor tyrosines was also decreased in response to gangliosides, indicating that intracellular growth-factor independent signalling can also be downregulated (Toledo et al. 2005). On the other hand, the quality of gangliosides can be determinant for the inclusion of receptors into glycolipid-enriched membrane regions (GEMR), which control the activation, the turnover and the subcellular localisation of the signalling compounds (Miljan and Bremer, 2002).

In our model of haemopoietin-mediated proliferation of myeloid progenitors, the GM3 is required for maximal stimulation of the cell proliferation. This was shown by the hampered myeloid cell proliferation in contact with stroma or in presence of the supernatant of stromal cells in which ganglioside synthesis was inhibited. The same result was obtained using anti-GM3 antibodies, confirming the importance of this molecule for myeloid cell proliferation. We have no information on the potential binding of GM3 to the nGM-CSF receptor and its effect on the receptor autophosphorylation. However, we have previously presented evidence that the optimal binding of the ligand to the receptor required an acid environment dependent upon sialic acid, and the proper composition of the environment surrounding the receptor may be determinant for the mitogenic activity of GM-CSF (Alvarez-Silva and Borojevic 1996; Borojevic et al. 2003). It should be noted that the GM-CSF receptor is in the FDC-P1 cell membrane. Since FDC-P1 cells accumulate only small quantities of GM3, it has to be provided by the stroma through the intercellular transfer of shed gangliosides, as reported between lymphoma cells and fibroblasts (Olshefki and Ladisch, 1996). The role of the stroma is thus double: it provides simultaneously the growth factor and the ganglioside required for the optimal stimulation of the myeloid cell proliferation.

IFN $\gamma$  is known inhibit proliferation of myeloid cells in inflammatory infiltrates, and it decreases the capacity of stroma to sustain the survival and proliferation of haemopoietic stem cells (Yu et al. 1999; Kato et al. 2003). As expected, our study shows that stroma cells derived of mice with the knockout gene of IFN $\gamma$  receptor have an increased capacity to sustain myelopoiesis. It is striking that the ganglioside profile of the two stromas is quite different, with the switch from a low content of GM3 in the WT cells to a high relative content in IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> mice. Since we have shown that GM3 is required for efficient

stimulation of myelopoiesis in the target cells, these results suggest that the capacity of  $\text{IFN}\gamma$  to decrease the intensity of myeloid proliferation is mediated by the modulation of ganglioside synthesis. The link between the  $\text{IFN}\gamma$  signalling pathway and the accumulation of GM3 remains unknown.

## REFERENCES

Alvarez-Silva M, Borojevic R (1996) GM-CSF and IL-3 activities in schistosomal liver granulomas are controlled by stroma-associated heparan-sulfate proteoglycans. *J Leuk Biol* 59: 435-441

Alvarez-Silva M, Pinazo AC, El-Cheikh MC, Borojevic R (1994) Myelopoietic competence of stroma composed of hepatic granuloma-derived connective tissue cells or skin fibroblasts. *Braz. J Med Biol Res* 27: 2143-2152

Alvarez-Silva M, Silva LC, Borojevic R (1993) Cell membrane-associated proteoglycans mediate extramedullar myeloid proliferation in granulomatous inflammatory reactions to schistosome eggs. *J Cell Sci* 104: 477-484

Andrade CMB, Trindade VMT, Cardoso CCA, Ziulkoski AL, Trugo L, Guaragna RM, Borojevic R, Guma FCR (2003) Changes in sphingolipid species in the phenotype conversion from myofibroblasts to lipocytes in hepatic stellate cells. *J Cell Biochem* 88:533-544

Bharti AC, Singh SM (2000) Induction of apoptosis in bone marrow cells by gangliosides produced by a T cell lymphoma. *Immunol Lett* 72:39-48

Bharti AC, Singh SM (2001) Gangliosides derived from a T cell lymphoma inhibit bone marrow cell proliferation and differentiation. *Int Immunopharmacol* 1:155-165

Boloukhère M, Baldo-Correa E, Borojevic R (1993) Experimental schistosomiasis mansoni: characterization of connective tissue cells in hepatic periovular granulomas. *J Submicroscop Cytol Pathol* 25:505-517

Borojevic R, Carvalho MA, Corrêa-Junior JD, Arcanjo K, Gomes L, Joazeiro PP, Balduino A, Wettreich A, Coelho-Sampaio T (2003) Stroma-mediated granulocyte-macrophage

colony-stimulating factor (GM-CSF) control of myelopoiesis: spatial organisation of intercellular interactions. *Cell Tiss Res* 313:55-62

Bretscher V, Andreutti D, Neuville P, Martin M, Martin F, Lefebvre O, Gilles C, Benzonana G, Gabbiani G. (2000) GM-CSF expression by tumor cells correlates with aggressivity and with stroma reaction formation. *J Submicroscop Cytol Pathol* 32:525-533

Carvalho MA, Arcanjo K, Silva LCF, Borojevic R (2000) The capacity of connective tissue stromas to sustain myelopoiesis depends both upon the growth factors and the local intercellular environment *Biol Cell* 92:605-614

Crespo PM, Zurita AR, Daniotti JL (2002) Effect of gangliosides on the distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in plasma membrane from Chinese Hamster Ovary-K1 cells. *J Biol Chem* 277:44731-44739

Desmoulière A, Tuchweber B, Gabbiani G. (1995) Role of myofibroblast differentiation during liver fibrosis. *J Hepatol* 22 (S2): 61-64

Dutra HS, Rossi MID, Azevedo SP, El-Cheikh MC, Borojevic R (1997) Haematopoietic capacity of colony-forming cells mobilised in hepatic inflammatory reactions as compared to that of normal bone marrow cells. *Res Immunol* 148:437-444

Folch J., Lees M., Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for isolation of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 226:497-509

Franzen R, Bouhy D, Schoenen J (2004) Nervous system injury: focus on the inflammatory cytokine “granulocyte-macrophage colony stimulating factor”. *Nuerosci Lett* 361:76-78

Hakomori S (1990) Bifunctional role of glycosphingolipids. *J Biol Chem* 265:18713-18718

Hamilton JA (2002) GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol* 23:403-408

Holgate S. T. (2000) Epithelial damage and response. *Clin Exp Allergy* 30(S1): 37-41

Kato K, Kamezaki K, Shimoda K, Numata A, Haro T, Aoki K, Ishikawa F, Takase K, Ariyama H, Matsuda T, Miyamoto T, Nagafuji K, Gondo H, Nakayama K, Harada M (2003) Intercellular signal transduction of interferon on the suppression of haematopoietic cell growth. *Br J Haematol* 123:528-535

Mann A, Breuhahn K, Schirmacher P, Blessing M (2001) Keratinocyte-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: Stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation, and vascularization. *J Invest Dermatol* 117:1382-1390

Miljan EA, Bremer EG (2002) Regulation of growth factor receptors by gangliosides. *Sci STKE* 160:RE15

Modrowski D, Basle M, Lomri A, Marie PJ (2000) Syndecan-2 is involved in the mitogenic activity and signaling of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in osteoblasts. *J Biol Chem* 275:9178-9185

Nakamura M, Kirito K, Yamanoi J, Wainai T, Nojiri H, Saito M (1991) Ganglioside GM3 can induce megakaryocytoid differentiation of human leukemia cell line K562 cells. *Cancer Res* 51:1940-1945

Nores GA, Mitzumari RK, Kremer DM (1994) Chromatographic tank designed to obtain highly reproducible high-performance thin-layer chromatograms of gangliosides and neutral glycosphingolipids. *J Chromatogr A* 686:155-157

Oliveira VR, El-Cheikh MC, Aguiar AM, Balduino A, Pinho MFB, Reis LFL, Borojevic R (2000) *Schistosoma mansoni* egg-induced hepatic granulomas in mice deficient for the interferon-gamma receptor have altered populations of macrophages, lymphocytes and connective tissue cells. *Microbes Infect* 2:1817-1826

Olshefski R, Ladish S (1996) Intracellular transfer of shed tumor cell gangliosides. FEBS Letters 386:11-14

Peterson GL (1979) Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry. Anal Biochem 100:201-220

Rossi MID, Dutra HS, El-Cheikh MC, Bonomo A, Borojevic R (1999) Extramedullar B-lymphopoiesis in liver schistosomal granulomas: presence of the early stages and inhibition of the full B cell differentiation. Internatl Immunol 11:509-518

Sietsma H, Nijhol W, Dontje B, Vellenga E, Kamps WA, Kok JW (1998) Inhibition of hemopoiesis *in vitro* by neuroblastoma-derived gangliosides. Cancer Res 58:4840-4844.

Svennerholm L. (1957) Quantitative estimation of sialic acids a colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. Biochim Biophys Acta 24:604-611

Toledo MS, Suzuki E, Handa K, Hakomori S. (2005) Effect of gangliosides and tetraspanins on interaction of integrin with fibroblast growth factor receptor. J Biol Chem (in press)

Wettrich A, Sebollela A, Carvalho MA, Azevedo SP, Borojevic R, Ferreira ST, Coelho-Sampaio T (1999) Acidic pH modulates the interaction between human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and glycosaminoglycans. J Biol Chem 274:31468-31475

Williams MA, McCluer RH (1980) The use Sep-Pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides. J Neurochem 35:266-269

Yu JM, Emmons RVB, Hanazono Y, Sellers S, Young NS, Dunbar CE (1999) Expression of interferon- $\gamma$  by stromal cells inhibits murine long-term repopulating hematopoietic stem cell activity. Exp Hematol 27:895-903

Ziulkoski AL, Zimmer AR, Zanettini JS, Trugo LC, Guma FC (2001) Synthesis and transport of different sphingomyelin species in rat Sertoli cells. *Mol Cell Biochem* 219: 57-64

Zurita AR, Maccioni HJF, Daniotti JL (2001) Modulation of epidermal growth factor receptor phosphorylation by endogenously expressed gangliosides. *Biochem J* 355:465-472



## FIGURE LEGENDS

**Figure 1:** FDC-P1 cells plated over confluent stromata of GR-WT and GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> cells without addition of exogenous growth factors. Phase-contrast images represent cultures at different times after plating.

**Figure 2:** RT-PCR analysis of the expression of M-CSF (**A**), GM-CSF (**B**) and  $\beta$ -actin (**C**) in the GR-WT (1) and GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> (2) cells.

**Figure 3:** Synthesis of gangliosides in GR-WT, GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> and FDC-P1 cells. (**A**) HPTLC of gangliosides stained with resorcinol-HCl. (**B**) HPTLC fluorography of gangliosides metabolically labelled with <sup>14</sup>[C]galactose. The positions of glycolipid standards are indicated.

**Figure 4.** Proliferation and/or survival of FDC-P1 cells, expressed as % of the inoculated cells observed after 24 h. Results represent mean values of 3 experiments done in triplicate, and standard errors when larger than the symbol. (**A**) FDC-P1 cells in presence of supernatants of GR-WT (WT) and GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> (KO) cells, in presence of WeHi-3b cells (C pos – positive control) and in the absence of any supernatant (C neg – negative control). (**B**) FDC-P1 cell proliferation in presence of stroma supernatants harvested from cell cultures with PDMP inhibitor of ganglioside synthesis. (**C**) FDC-P1 cell proliferation in presence of stroma supernatants harvested from GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> stroma treated with 10% or 20% DH2 supernatant containing monoclonal anti-GM3 antibody.

**Figure 5:** Ganglioside and phospholipid synthesis and shedding by GR-WT cells (**A** and **B**), and GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> (**C** and **D**). The positions of chromatographed glycolipid standards are indicated. PE – phosphatidyl ethanolamine, CDH – ceramide dihexoside, PC – phosphatidyl choline, CTetH – ceramide tetrahexoside, GD1a and GM1 to 3 – gangliosides, Or – origin. **A** and **C** – HPTLC fluorography of extracts of the cell layers, corresponding to 500  $\mu$ g cell protein containing 1600 cpm in **A** and 5000 cpm in **C**. **B** and **D** – HPTLC fluorography of total lipids extracted from the culture medium containing 500 cpm in **B** and 1200 cpm in **D**.

**Figure 6:** Densitometric quantification of gangliosides synthesised (open bars) and shed (black bars), distinguishing upper (U) and lower (L) band observed in HPTLC. Upper panel: GR-WT, lower panel: GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> stroma cells.

**Figure 7:** HPTLC fluorographic analysis of <sup>14</sup>[C]galactose-labelled gangliosides synthesised by GR-WT and GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> cells in standard culture (a) and in presence of ganglioside synthesis inhibitor PDMP (b).

**Figure 8:** Inhibition of FDC-P cell survival and proliferation in co-culture with stromas in which ganglioside synthesis was inhibited by PDMP. Upper panel: GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup>, lower panel GR-WT.

**Figure 9:** Metabolic labelling and Triton X-100 extraction of total gangliosides synthesized in (A) GR-WT, (B) GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup>. Lipids were labelled with [<sup>14</sup>C]galactose during 12 h. Cell homogenates were extracted with ice-cold Triton X-100, separated in detergent soluble fraction (SF) and insoluble fraction (IF). The positions of chromatographed glycolipid standards are indicated.

**Figure 10.** Left panel: Co-cultures of FDC-P1 cells with GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> cell stroma, previously incubated with C<sub>6</sub>-NBD-ceramide for 12 h. FDC-P1 cells, cultured over the labelled stroma for 6 h show intense fluorescence of ceramide-derived lipids transferred from the stroma. Right panel: Co-cultures of FDC-P1 cells with GR-IFN $\gamma$ -R<sup>0/0</sup> cell stroma, labelled with anti GM3 monoclonal antibody.

**Table 1.**

Primers used for RT-PCR detection of GM-CSF, M-CSF and  $\beta$ -actin expression.

	Sequence	bp
$\beta$ -actin	5' gtgggccgctctaggcacca 3' 5' gctctttaggcttccaggaagtc 3'	540
GM-CSF	5' agaagctaacaatgtgtgcagaccg 3' 5' attccaagttcctggctcatcattacgc 3'	313
M-CSF	5' tgccttcttcgacatggctgggc 3' 5' gaacagctggatgatcctgtttgc 3'	212

FIGURA 1

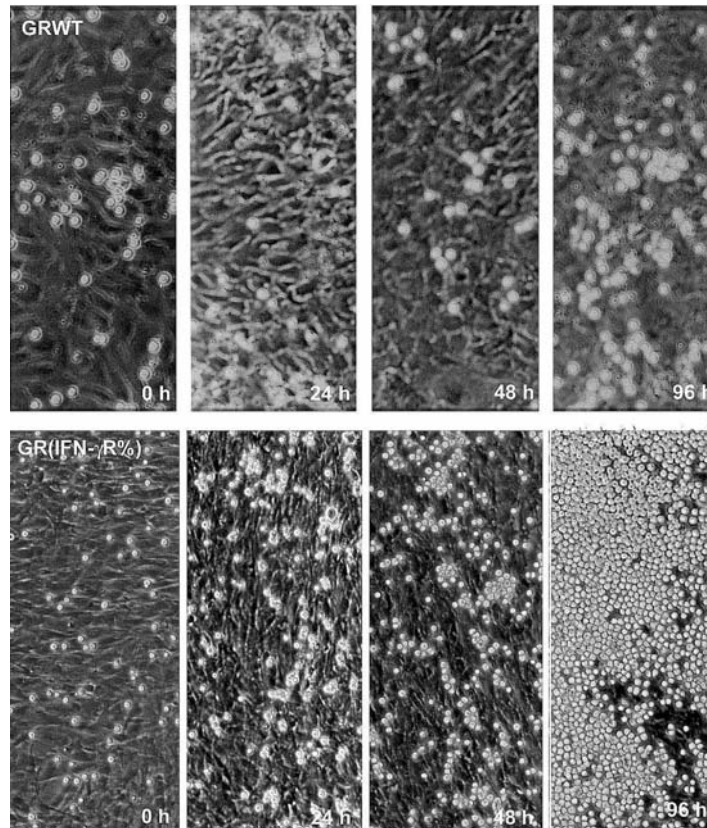


FIGURA 2

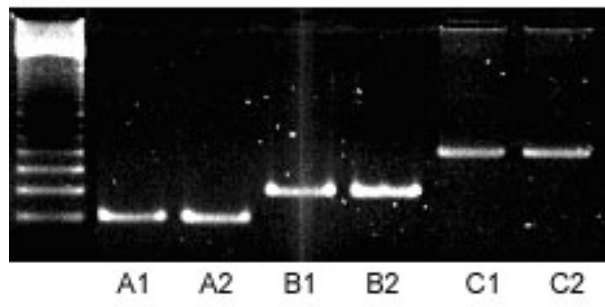


FIGURA 3A

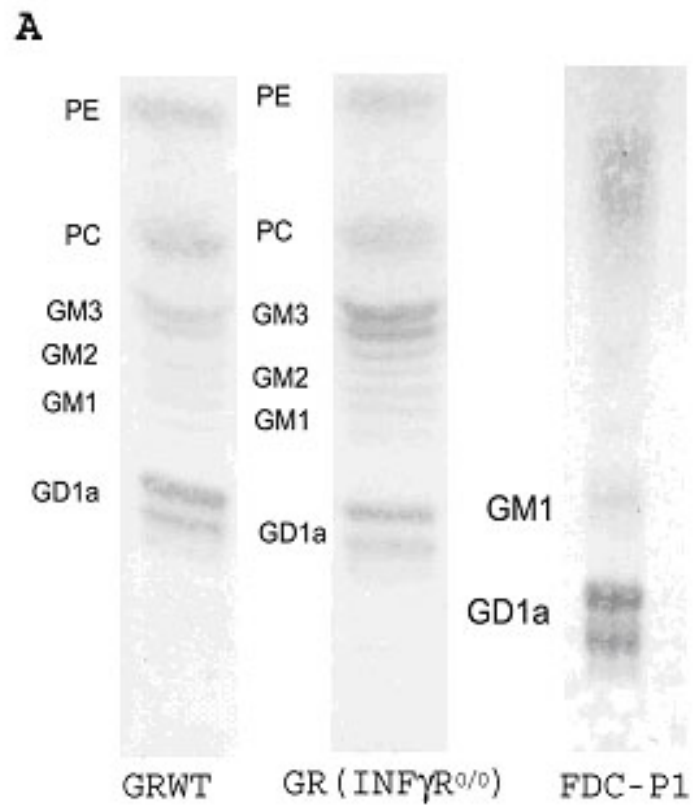


FIGURA 3B

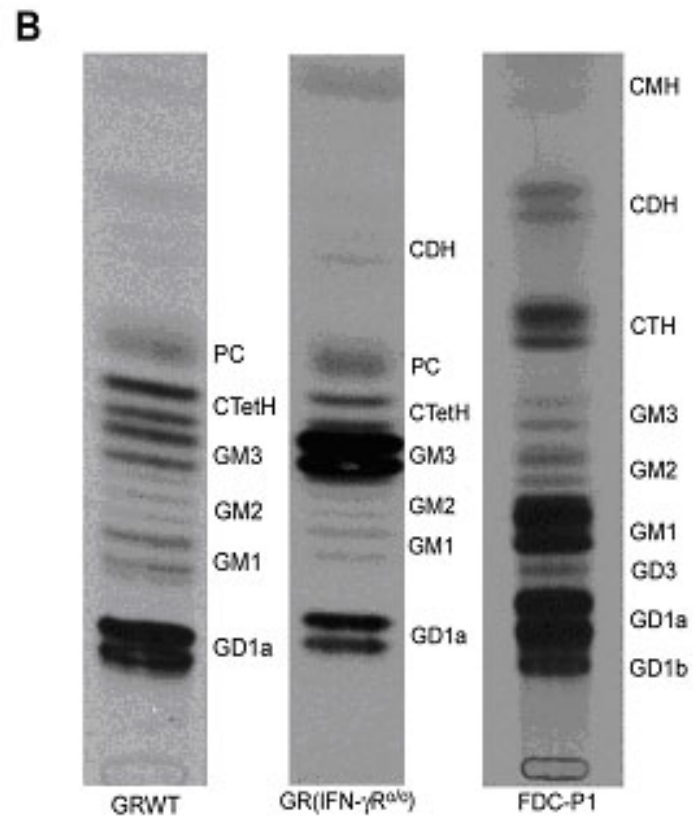


FIGURA 4

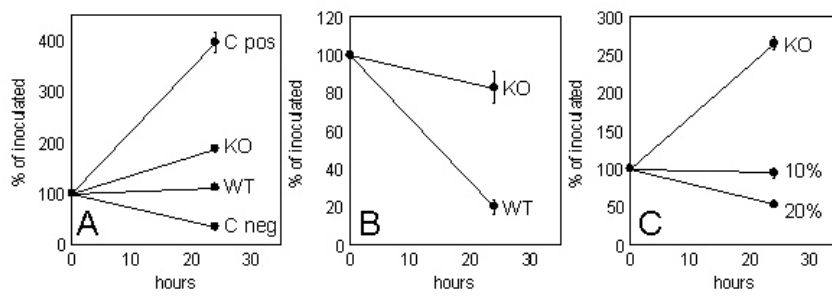




FIGURA 5

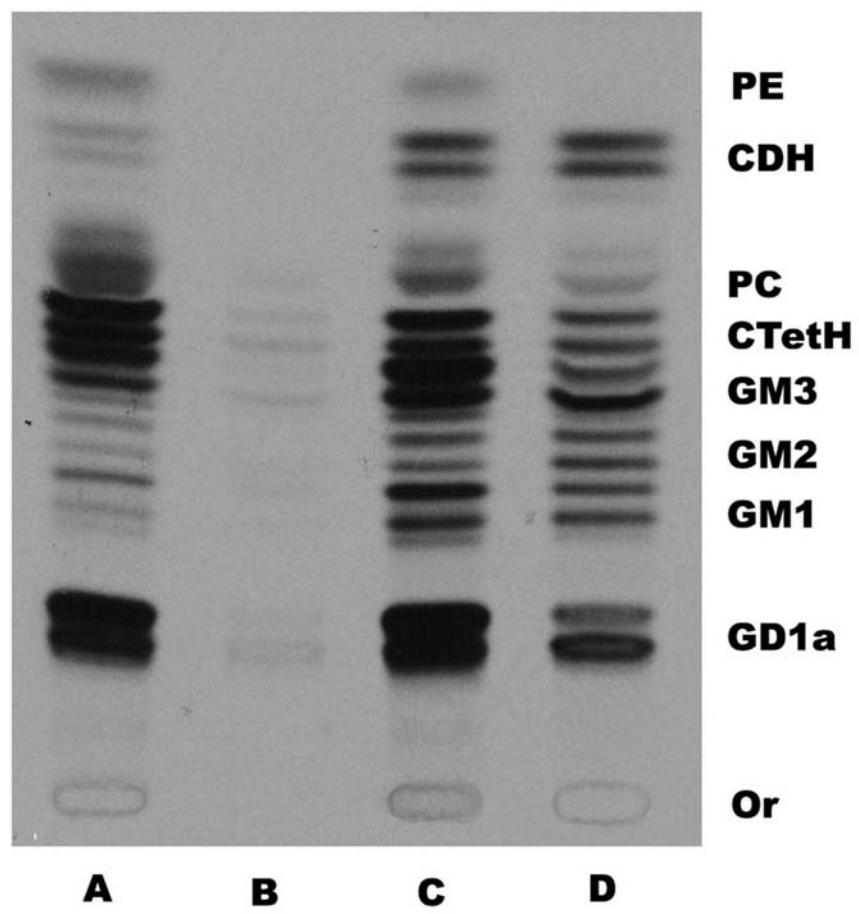


FIGURA 6

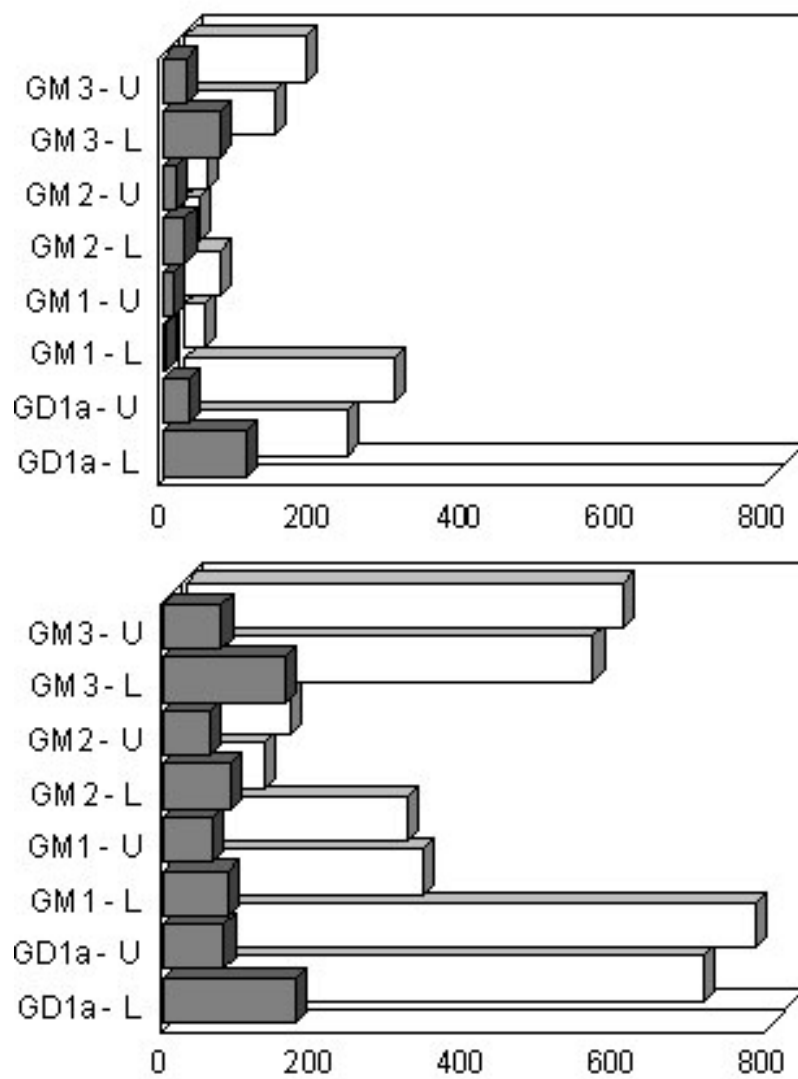


FIGURA 7

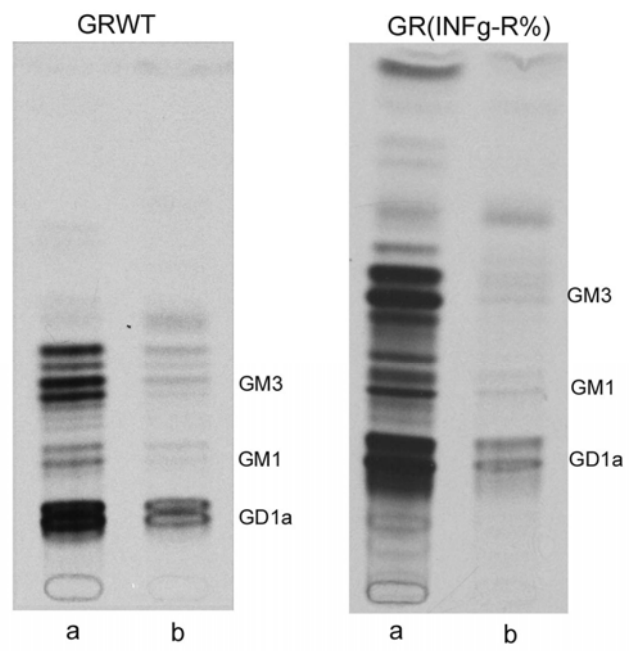


FIGURA 8

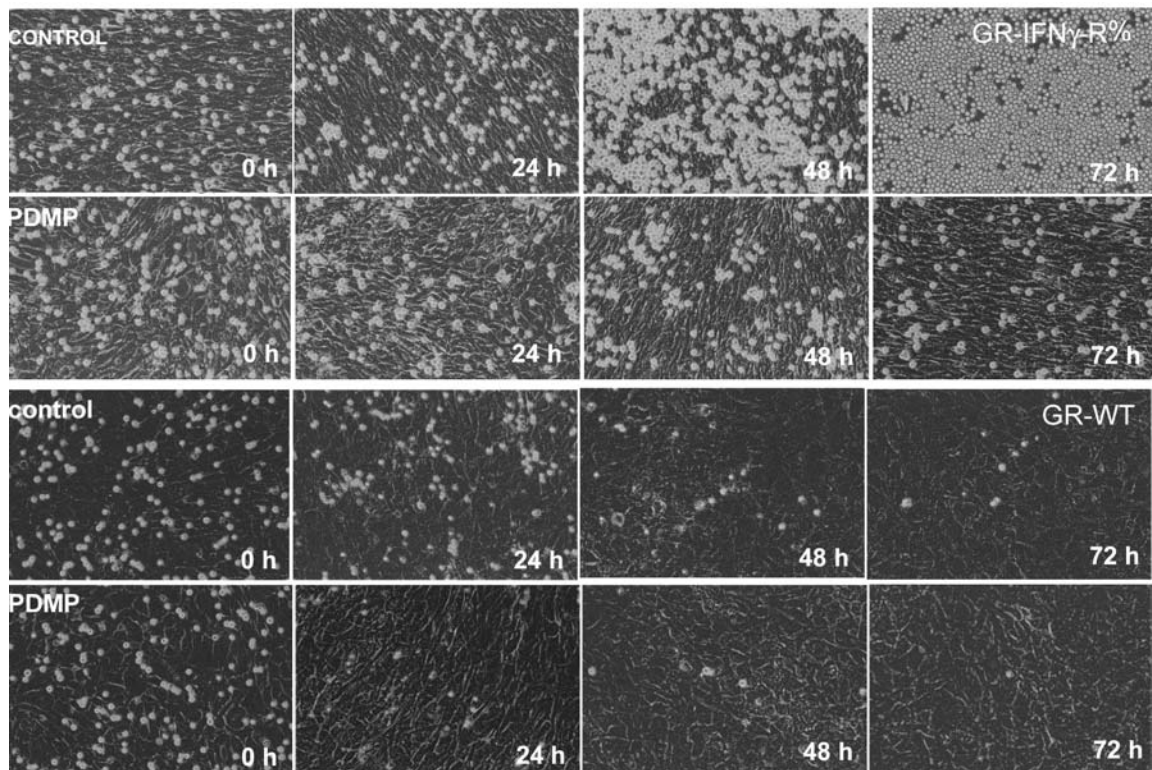


FIGURA 9

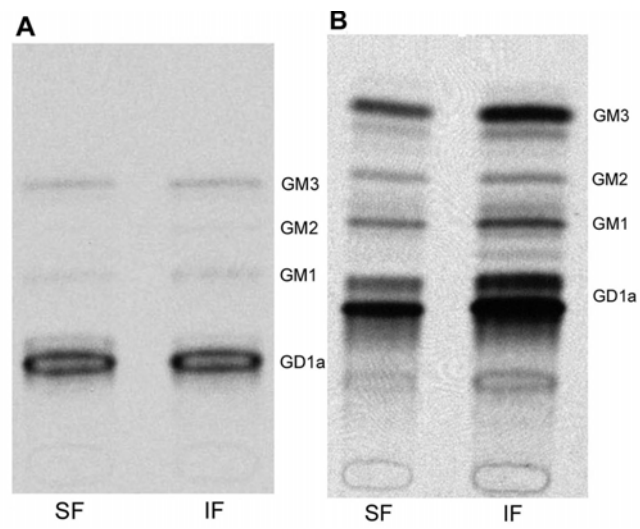
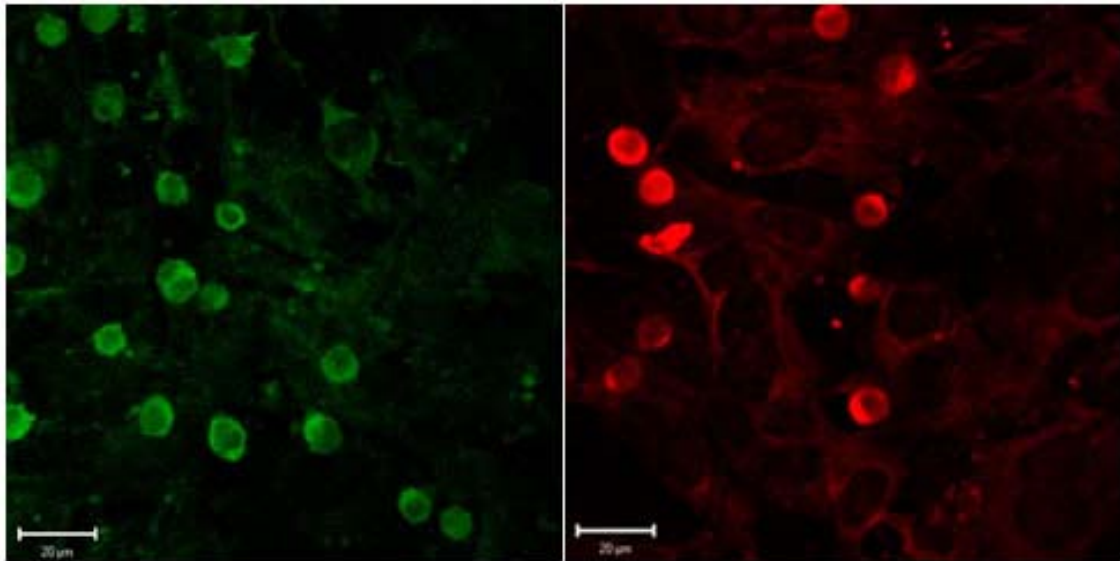


FIGURA 10



## DISCUSSÃO

As células perisinusoidais hepáticas, envolvidas com as reações granulomatosas, são caracterizadas como miofibroblastos e apresentam características semelhantes às células do tecido conjuntivo que compõem o estroma hematopoiético medular. Estas células derivadas de granulomas, chamadas GR, são capazes de sustentar a proliferação de células mielopoiéticas derivadas da medula óssea, como também a proliferação de uma linhagem celular precursora mielóide (BOLUKHÈRE et al. 1993). A capacidade de sustentação mielopoiética das células GR se deve à habilidade que as mesmas têm de expressar fatores de crescimento necessários para este processo (BRITO & BOROJEVIC, 1997).

Neste trabalho, nós monitoramos a proliferação de uma linhagem precursora mielóide, células FDC-P1, sobre dois estromas extramedulares, células GRWT e GR(IFN- $\gamma$ R<sup>0/0</sup>). Ambos os estromas sustentam a proliferação das células FDC-P1, no entanto, ao final do mesmo tempo de co-cultivo, observa-se uma maior quantidade das precursoras mielóides sobre o estroma GR(IFN- $\gamma$ R<sup>0/0</sup>). Como, os dois estromas expressam GM-CSF de maneira semelhante, essa diferença na capacidade de suporte da mielopoiese pode estar relacionada com outras moléculas co-estimulatórias.

A capacidade de sustentação mielopoiética das células estromais depende dos fatores de crescimento e do tipo de glicoconjugados presente na membrana

dessas células. Borojevic et al. (2003) observaram a existência de um capping de moléculas carregadas negativamente, na interface entre as células estromais e as precursoras mielóides e mostraram que as mesmas possuem ácido siálico em sua estrutura. Os gangliosídeos são moléculas que contêm ácido siálico e possuem carga negativa devido à presença de grupos carboxílicos. Com base nestas observações, nós sugerimos que esses glicosíngolipídios participem do contato físico que ocorre entre as células estromais e as precursoras hematopoiéticas.

Com o objetivo de analisar a relação dos gangliosídeos com a capacidade de suporte da mielopoiese, nós analisamos a expressão, síntese, liberação (*shedding*) e distribuição celular dos gangliosídeos dos estroma GRWT e GR(IFN- $\gamma$ R<sup>0/0</sup>) e das células FDC-P1. Nossos resultados mostraram que as células GRWT e GR(IFN- $\gamma$ R<sup>0/0</sup>) expressam e liberam os gangliosídeos GM3, GM2, GM1 e GD1a. No entanto, o principal gangliosídeo das células GRWT é o GD1a e das células GR(IFN- $\gamma$ R<sup>0/0</sup>) é o GM3. Nas células FDC-P1 os principais gangliosídeos são GM1 e GD1a. Essas células também apresentam diferenças nas quantidades de gangliosídeos que liberam. As GRWT liberam somente pequena quantidade dos gangliosídeos que sintetiza quando comparadas com as GR(IFN- $\gamma$ R<sup>0/0</sup>).

Em nosso modelo de proliferação de progenitores mielóides mediado por hemopoietinas, o gangliosídeo GM3 é requerido para a máxima estimulação da proliferação celular. Isto foi demonstrado pela diminuição da proliferação das células FDC-P1 tanto em co-cultivo com os estromas que estavam com a síntese de gangliosídeos inibida, como também na presença de sobrenadantes de cultura de células estromais nas quais a síntese dessas moléculas também estava bloqueada. O mesmo resultado foi obtido com a utilização de um anticorpo anti-



GM3. No entanto, quando utilizamos um anticorpo anti-GD3, sobrenadante do hibridoma R24, não se observou alteração na proliferação das células FDC-P1, o que nos permite descartar uma possível reação inespecífica do anti-GM3 e confirmar a importância deste gangliosídeo para a proliferação das células mielóides.

Nossos resultados também evidenciam a ocorrência de uma transferência intercelular de esfingolípídios, provavelmente do gangliosídeo GM3 liberado pelas células estromais para as células FDC-P1, como já foi descrito entre linfomas e fibroblastos (OLSHESKI and LADISCH, 1996). Dessa forma, as células estromais são fundamentais para o fornecimento simultâneo dos fatores de crescimento e dos gangliosídios requeridos para a ótima estimulação da proliferação das células mielóides.

Os microdomínios enriquecidos em glicoesfingolípídios (GEM) são unidades estruturais e funcionais presentes na membrana plasmática e estão envolvidos com a adesão celular e transdução de sinal através de interações carboidrato-carboidrato (HAKOMORI, 2003). Nossos resultados mostraram que parte dos gangliosídios presentes nos estromas GRWT e GR(IFN- $\gamma$ R<sup>0/0</sup>) encontram-se na fração insolúvel em detergente, evidenciando que esses glicolípídios estão presentes nos GEMs e podem estar envolvidos com a ativação e localização subcelular de moléculas sinalizadoras.

Sabe-se que o IFN $\gamma$  inibe a proliferação de células mielóides em infiltrados inflamatórios e diminui a capacidade dos estromas em sustentar a sobrevivência e a proliferação das células hematopoiéticas (YU et al. 1999; KATO et al. 2003). Como esperado, nosso estudo mostra que as células estromais derivadas do

camundongos *knockout* para o receptor de IFN $\gamma$  apresentam uma melhor capacidade de sustentar a mielopoiese. Somado a isso, o perfil de gangliosídeos apresentado pelos dois estromas é diferente, as células GRWT têm um baixo conteúdo de GM3, enquanto e as células GR(IFN- $\gamma$ R<sup>0/0</sup>), apresentam uma grande quantidade deste gangliosídeo.

Estes resultados nos permitem sugerir a participação do gangliosídeo GM3 na estimulação da proliferação mielopoética e uma possível relação entre a capacidade do IFN $\gamma$  em diminuir a proliferação mielóide com a modulação da síntese de gangliosídeos. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar a ligação entre a sinalização mediada pelo IFN $\gamma$  e o acúmulo de GM3.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, Alessandra Melo. **A Regulação de Células Conjuntivas Hepáticas pelo Interferon Gama**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

ALVAREZ-SILVA, M.; SILVA, L.C.F.; BOROJEVIC, R. Cell membrane-associated proteoglycans mediate extramedullar myeloid proliferation in granulomatous inflammatory reactions to schistosome eggs. **Journal of Cell Science**, v. 104, p. 477-484, 1993.

BHARTI, A.C.; SINGH, S.M. Induction of apoptosis in bone marrow cells by gangliosides produced by a T cell lymphoma, **Immunology Letters**, v. 72, p. 39-48, 2000.

BHARTI, A.C.; SINGH, S.M. Gangliosides derived from a T cell lymphoma inhibit bone marrow cell proliferation and differentiation, **International Immunopharmacology**, n. 1 p. 155-165, 2001.

BOLOUKHÈRE, M.; BALDO-CORREA, E.; BOROJEVIC, R. Experimental schistosomiasis mansoni: characterization of connective tissue cells in hepatic periovular granulomas, **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.25, p. 505-517,1993.

BOROJEVIC, R.; CARVALHO, M.A.; CORRÊA-JUNIOR, J.D.; ARCANJO, K.; GOMES, L.; JUAZEIRO, P.P., WETTREICH, A.; COELHO-SAMPAIO, T. Stroma-mediated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) stimulation of myelopoiesis: spatial organization of intercellular interactions, **Cell Tissue Research**. V. 313, n.1, p. 55-62, 2003.

BOROJEVIC, R.; EL-CHEIKH, M.C.; ALVAREZ-SILVA, M.; ALMEIDA, K.G.; DUTRA, H.S. Hepatic myelopoiesis associated with inflammation: liver connective

tissue cells from a myelopoietic stroma. In: **Cells hepatic sinusoid**. Kupfer Cell Foundation, Leiden, The Netherlands, v. 4, p. 130-133, 1993.

BOROJEVIC, R.; SANTOS-DA-SILVA, C.; CARVALHO, E.A. Chronic schistosomiasis mansoni: splenic myelopoiesis and inhibition of neutrophil granulocytogenesis mediated by sera of patients. **J. Infect. Dis.**, v. 148, p. 422-426, 1983.

BRITO, J.M.; BOROJEVIC, R. Liver granulomas in schistosomiasis: mast cell-dependent induction of SCF expression in hepatic stellate cells is mediated by TNF-alpha, **J. Leukoc. Biol.**, v. 62, p. 389-396, 1997.

CARVALHO, M.A.; ARCANJO, K.; SILVA, L.C.F.; BOROJEVIC, R. The capacity of connective tissue stromas to sustain myelopoiesis depends both upon the growth factors and the local intercellular environment. **Biology of the Cell**, v. 92, p. 605-614, 2000.

CREMESTI, A.E.; GONI, F.M.; KOLESNICK, R. Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome?. **FEBS Letters**, v. 531, p. 47-53, 2002.

DORSHKIND, K. Regulation of hematopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 111-137, 1990.

DUTRA, H.S.; ROSSI, M.I.D.; AZEVEDO, S.P.; EL-CHEIKH, M.C.; BOROJEVIC, R. Haematopoietic capacity of colony-forming cells mobilized in hepatic inflammatory reactions as compared to that of normal bone marrow cells. **Res. Immunol.**, v. 148, p. 437-444, 1997.

FARRAR, M.A.; SCHREIBER, R.D. The molecular cell biology of interferon- $\gamma$  and its receptor. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 571-611, 1993.

GUPTA, P.; OEGEMA JR, T.R.; BRAZIL, J.J.; DUDEK, A.Z.; SLUNGAARD. A.; VERFAILLIE, C.M. Structurally specific heparan sulfates support primitive human hematopoiesis by formation of a multimolecular stem cell niche. **Blood**, v.92, n. 12, p. 4641-4651, 1998.

HAKOMORI, S. Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane. **Current Opinion in Hematology**, v. 10, p. 16-24, 2003.

HAQUE, S.J.; WILLIAMS, B.R.G. Signal transduction in the interferon system. **Sem. Oncol.**, v. 25, suppl. 1, p. 14-22, 1998.

HASTHORPE, S.; BOGDANOVSKI, M.; ROGERSON, J.; RADLEY, J.M. Characterization of endothelial cells in murine long-term marrow culture. Implication for hematopoietic regulation. **Experimntal Hematology**, v. 20, p. 476-481, 1992.

HOFFMAN, R.; BENZ JR, E.J.; SHATTIL, S.J.; FURIE, B.; COHEN, H.J.; SILBERSTEIN, L.E. **Hematology: basic principles and pratice**. 2.ed. New York: Churchill Livingstone, 1995. p.180-241. cap. 14, 15, 16.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 206-220. cap. 13.

KATO, K.; KAMEZAKI, K.; SHIMODA, K.; NUMATA, A.; HARO, T.; AOKI, K.; ISHIKAWA, F.; TAKASE, K.; ARIYAMA, H.; MATSUDA, T.; MIYAMOTO, T.; NAGAFUJI, K.; GONDO, H.; NAKAYAMA, K.; HARADA, M. Intercellular signal transduction of interferon on the suppression of haematopoietic cell growth. **Br J Haematol**, 123, p. 528-535, 2003

KISHIMOTO, T.; AKIRA, S.; TAGA, T. Cytokine signal transduction. **Cell**, v. 76, p. 253-262, 1994.

LENZI, H.L.; LENZI, J.A.; ROSMAN, F.C.; PELAJO-MACHADO, M.; MOTA, E.M.; PANASCO, M.S.; OLIVEIRA, D.N. *Extramedullar hematopoiesis in murine Schistosomiasis mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 169-177, 1995.

LLOYD, K.O.; FURUKAMA, K. Biosynthesis and functions of gangliosides: recent advances. **Glycoconjugate Journal**, v. 15, p. 627-636, 1998.

MACCIONI, H.J.F.; DANIOTTI, J.L.; MARTINA, J.A. Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1437, p. 101-118, 1999.

MACCIONI, H.J.F.; GIRAUDO, C.G.; DANIOTTI, J.L. Understanding the stepwise synthesis of glycolipids. **Neurochemical Research**, v. 27, n. 718, p. 629-636, 2002.

NAKAMURA, M.; KIRITO, K.; YAMANOI, J.; WAINAI, T.; NOJIRI, H.; SAITO, M. Ganglioside GM3 can Induce Megakaryocytoid Differentiation of Human Leukemia Cell Line K562 Cells, **Cancer Research**, v. 51, p. 1940-1945, 1991.

NARDI, N.B.; ALFONSO, Z.Z.C. The hematopoietic stroma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 601-609, 1999.

OLIVEIRA, V.R.; EL-CHEIKH, M.C.; AGUIAR, A.M.; BALDUINO, A.; PINHO, M.F.B.; REIS, L.F.L.; BOROJEVIC, R. *Schistosoma mansoni* egg-induced hepatic granulomas in mice deficient for the interferon-gamma receptor have altered populations of macrophages, lymphocytes and connective tissue cells. **Microbes and Infections**, v. 2, p. 1817-1826, 2000.

OLSHEFSKI, R.; LADISH, S. Intracellular transfer of shed tumor cell gangliosides. **FEBS Letters**, v. 386, p. 11-14, 1996.

REZENDE, S.A.; OLIVEIRA, V.R.; SILVA, A.M.; ALVES, J.B.; REIS, L.F.L. Mice lacking the gamma interferon receptor have an impaired granulomatous reaction to schistosoma mansoni. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 8, p. 3457-3461, 1997.

RIBONI, L.; VIANI, P.; BASSI, R.; PRINETTI, A.; TETTAMANTI, G. The role of sphingolipids in the process of signal transduction. **Prog. Lipid Res.**, v. 36, p. 153-195, 1997.

ROSSI, M.I.D.; DUTRA, H.S.; EL-CHEIKH, M.C.; BONOMO, A.; BOROJEVIC, R. Extramedullar B lymphopoiesis in liver schistosomal granulomas: presence of the early stages and inhibition of the full B cell differentiation. **International Immunology**, v. 11, n. 4, p. 509-518, 1999.

SAITO, M. Bioactive gangliosides: differentiation inducers for hematopoietic cells and their mechanism(s) of actions, **Adv. Lipid Res.** v. 25, p. 303-327, 1993.

SIETSMA, H.; KAMPS, W.A.; DONTJE, B.; HENDRIKS, D.; KOK, J.W.; VELLENGA, E.; NIJHOF, W. Leukemia-induced bone marrow depression: effects of gangliosides on erythroid cell production, **Int. J. Cancer**. V. 82, n. 1, p. 92-97, 1999.

SIETSMA, H.; NIJHOL, W.; DONTJE, B.; VELLENGA, E.; KAMPS, W.A.; KOK, J.W. Inhibition of hematopoiesis in vitro by neuroblastoma-derived gangliosides, **Cancer Research**, v. 58 p. 4840-4848, 1998.

SIMONS, K.; TOOMRE, D. Lipids rafts and signal transduction. **Molecular Cell Biology**, v. 1, p. 31-39, 2000.

SVENNERHOLM, L. The gangliosides. **J Lipid Res.**, n. 5, p. 145-155, 1964.

TAICHMAN, R.S.; EMERSON, S.G. The role of osteoblast in the hematopoietic microenvironment. **Stem Cells**, v. 16, p. 7-15, 1998.

TAVIAN, M.; CORTES, F.; CHARBORD, P.; LABASTIE, M.C.; PEAUL, B. Emergence of the haematopoietic system in the human embryo and foetus. **Haematologica**, v. 84, p. 1-3, 1999.

TETTAMANTI, G.; BASSI, R.; VIANI, P.; RIBONI, L. Salvage pathways in glycosphingolipid metabolism. **Biochimie**, v. 85, p. 423-437, 2003.

VERFAILLIE, C.M. Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process. **Blood**, v. 92, n. 8, p. 2609-2612, 1998.

WETTREICH, A.; SEBOLLELA, A.; CARVALHO, M.A.; AZEVEDO, S. P.; BOROJEVIC, R.; FERREIRA, S.T.; COELHO-SAMPAIO, T. Acidic pH Modulates the Interaction between Human Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor and Glycosaminoglycans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 44, p. 31468-31475, 1999.

WHETTON, A.D.; SPOONCER, E. Role of cytokines and extracellular matrix in the regulation of haemopoietic stem cells. **Curr. Op. in Cell Biol.**, v. 10, n. 6, p. 721-726, 1998.

WILKINS, B.S. Histology of normal haematopoiesis: bone marrow histology I. **J. Clin. Pathol.** v. 45, p. 645-649, 1992.

WOLBER, F.M.; LEONARD, E.; MICHAEL, S.; ORSCHELL-TRAYCOFF, C.M.; YODER, M.C.; SROUR, E.F. Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system. **Experimntal Hematology**, v. 30, p. 1010-1019, 2002.

YU, J.; EMMONS, R.V.B.; HANAZONO, Y.; SELLERS, S.; YOUNG, N.S.; DUNBAR, C.E. Expression of the interferon- $\gamma$  by stromal cells inhibits murine long-



term repopulating hematopoietic stem cell activity. **Experimental Hematology**, v. 27, p. 895-903, 1999.

YU, R.K.; BIEBERICHI, E. Regulation of glycosyltransferases in ganglioside biosynthesis by phosphorylation and dephosphorylation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 177, p. 19-24, 2001.

ZELLER, C.B.; MARCHASE, R.B. Gangliosides as modulators of cell function. **The American Physiological Society**, v. 262, p. c1341-c1355, 1992.

ZON, L.I. Developmental biology of hematopoiesis. **Blood**, v. 86, p. 2876-2891, 1995.