

Nycole Morelli Belote

Departamento de Morfologia e Genética
Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina
Biomedicina

Universidade Federal de São Paulo
São Paulo
2023

Escola Paulista de Medicina

Biomedicina

Nycole Morelli Belote

Profa. Dra. Cristiane Damas Gil

**EFEITO DE INIBIÇÃO DA PROTEÍNA GALECTINA-3 NA TOXICIDADE
CARDIORRENAL INDUZIDA PELA CISPLATINA EM RATOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
para obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Damas Gil

Financiamento: FAPESP (2020/03565-2;
2021/04139-0).

Morelli Belote, Nycole

EFEITO DE INIBIÇÃO DA PROTEÍNA GALECTINA-3 NA
TOXICIDADE CARDIORRENAL INDUZIDA PELA
CISPLATINA EM RATOS

/ Nycole Morelli Belote. - São Paulo, 2022.

44f.

Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de
São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Estrutural e Funcional.

Título em inglês: EFFECT OF TREATMENT WITH
MODIFIED CITRUS PECTIN IN THE HEART AND
KIDNEY DURING CISPLATIN-INDUCED TOXICITY
MODEL.

1. Cardiotoxicidade. 2. Nefrotoxicidade. 3. Inflamação. 4.
Cisplatina. 5. Pectina cítrica modificada. 6. Galectina-3.

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Sueli e Nino, minha espada e escudo que, além da vida, me deram um amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço imensamente à minha orientadora de olhos sempre atentos e mente brilhante, professora Cris. Você inspira, alegra e motiva todos ao redor, deixando as dificuldades pequenas. Sua paciência, foco e determinação com certeza levam todos que te seguem mais longe. Carregarei o seu exemplo em qualquer caminho que eu for seguir. Aos meus colegas do LACIMI, saibam que tenho guardado em meu coração toda as risadas, desabafos, conversas à toa, broncas e aprendizados que tive com vocês: Iza, Beca, Philipe e Rafa. Paulinho e Kátia, também agradeço por sempre estarem disponíveis para me ajudar, tive muita sorte de poder contar com vocês! Em especial, agradecerei ao Diego: amigo, muito do que sou hoje no quesito profissional, foi por você ter me ensinado e me mostrado o caminho. Ainda, também agradeço especialmente à Gisela, histologista que me ensinou tudo que sabe de imuno-histoquímica (e outras coisinhas mais). Gisa, nunca te vi economizando esforços para ensinar as pessoas- talvez você tenha herdado isso do seu pai. Você é admirável e eu nunca vou ousar esquecer de nenhum ensinamento da “escolinha Gisa de histologia”.

Às professoras Mônica e Lila do laboratório de Fisiologia da Nutrição, agradeço por disponibilizarem o tempo de vocês e compartilharem tanto conhecimento comigo durante o mês de experimentos da catalase. Esta etapa foi fundamental para os meus resultados, e foi muito importante para o meu desenvolvimento pessoal. Não poderia deixar de mencionar e exaltar o mestrando Artur e o técnico Valter por também terem me acompanhado durante dias inteiros de experimentação e estarem sempre disponíveis. Agradeço também aos demais colegas do laboratório de Fisiologia da Nutrição por me fazerem sentir em casa. Todos vocês foram essenciais!

À Marina Rodrigues, agradeço por ter sido sempre o meu porto seguro. Ganhei na loteria por ter uma pessoa tão inteligente e engenhosa tanto na vida acadêmica quanto na pessoal. Sou uma pessoa melhor estando com você, e mal posso esperar para ver nosso crescimento juntas.

Por último, mas com certeza não menos importante, aos meus amigos da biofamília (Danilo, Larissa, Marinelli, Marinhinha, Júlia), espero que nossa amizade dure da *biblac* até a nossa aposentadoria. Amo vocês imensamente.

RESUMO

A inflamação e estresse oxidativo são mecanismos muito comuns na citotoxicidade provocada pela cisplatina. Neste contexto, destacamos a galectina-3 (Gal-3), uma proteína ligante de β -galactosídeos que regula os processos inflamatórios e oxidativos, mas seu papel em modelos de toxicidade não está bem determinado. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inibição farmacológica da Gal-3 na toxicidade cardíaca e renal induzida pela cisplatina. Para tanto, Ratos Wistar machos foram divididos em 4 grupos (n = 6/grupo): SHAM e CIS, que receberam respectivamente salina estéril ou cisplatina (10 mg/kg/dia) via intraperitoneal (i.p.) por 3 dias e PEC e PEC+CIS, que receberam pectina cítrica modificada (inibidor da Gal-3) via oral (100 mg/kg/dia) por 7 dias, seguida por salina estéril ou cisplatina i.p. por 3 dias (CEUA nº 5338060422). Observamos que a administração de cisplatina produziu perda de peso significativa dos animais no 3º dia, enquanto nos outros grupos não ocorreram alterações significantes. A resposta sistêmica foi associada com um aumento significativo no perfil de neutrófilos circulantes e das citocinas IL-6 e IL-10. Além disso, no grupo PEC+CIS as citocinas IL-1 β e TNF- α aumentaram significativamente em relação aos grupos SHAM e PEC. O tratamento com a PEC não alterou os níveis da proteína Gal-3 no sangue e coração, mas foi eficaz na redução nos rins do grupo PEC em relação ao grupo SHAM. As análises histológicas não mostraram alterações nos cardiomiócitos entre as diferentes condições experimentais, porém um dano tubular renal caracterizado pela degeneração das células epiteliais foi evidenciado nos rins dos grupos tratados com cisplatina. As alterações na homeostase redox mostram ter um papel inicial no dano em ambos os tecidos neste modelo experimental, evidenciadas principalmente no grupo PEC+CIS pelo aumento da peroxidação lipídica em ambos os órgãos, perda da integridade dos complexos da cadeia fosforilativa mitocondrial e resposta da atividade da catalase no coração. Em conclusão, o tecido cardíaco se mostrou mais resistente à toxicidade e ao tratamento com a pectina cítrica modificada, enquanto os rins sofreram intensos danos morfológicos e depleção dos níveis de Gal-3. Nesse sentido, mais investigações são necessárias para determinar as funções da Gal-3 a curto e a longo prazo, uma vez que ela pode exercer tanto papéis benéficos quanto maléficos nos tecidos.

Palavras-chave: cardiotoxicidade; nefrotoxicidade; inflamação; cisplatina; pectina cítrica modificada.

ABSTRACT

Cisplatin is an antineoplastic agent related to cardiac toxicity. Inflammation and oxidative stress are very common mechanisms in the cytotoxicity caused by cisplatin. In this context, we highlight galectin-3 (Gal-3), a β -galactoside-binding protein that regulates inflammatory and oxidative processes, and an important biomarker of cardiac fibrosis. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of pharmacological inhibition of Gal-3 with modified citrus pectin (MCP) on the heart in a model of cisplatin-induced acute toxicity. For that, Male Wistar rats were divided into 4 groups (n=6/group): SHAM – received sterile saline intraperitoneally (i.p) for 3 days; CIS – received cisplatin i.p (10mg/kg/day) for 3 days; MCP – received MCP orally (100 mg/kg/day) for 7 days, followed by sterile saline i.p for 3 days; MCP+CIS – received MCP orally for 7 days followed by cisplatin for another 3 days. After 6 hours of the last dose of cisplatin or vehicle, blood, heart and kidneys were collected (CEUA nº 5338060422). We observe that cisplatin administration produced a marked weight loss in the animals on the 3rd day, while in the other groups there were no significant changes. The systemic response was associated with a significant increase in the profile of circulating neutrophils and the cytokines IL-6 and IL-10. Furthermore, in the MCP+CIS group, the cytokines IL-1 β and TNF- α increased significantly in relation to the SHAM and MCP groups. MCP treatment did not alter Gal-3 protein levels in the blood and heart, but it was effective in reducing kidneys in the MCP group compared to the SHAM group. Histological analyzes did not show changes in cardiomyocytes between the different experimental conditions, but renal tubular damage characterized by degeneration of epithelial cells was evidenced in the kidneys. Changes in redox homeostasis are shown to have an initial role in the damage in both tissues of this experimental model, evidenced mainly in the MCP+CIS group by increased lipid peroxidation, loss of integrity of mitochondrial phosphorylative chain complexes and catalase activity. Still, treatment with MCP did not change the levels of Gal-3 protein in the blood and heart, but it was effective in reducing the levels in the kidneys of the MCP group in relation to the SHAM group. In conclusion, cardiac tissue was more resistant to toxicity and treatment with modified citrus pectin, while kidneys suffered intense morphological damage and depletion of Gal-3 levels. In this context, further investigations are needed to determine the acute and chronic functions of Gal-3, since it can exert both beneficial and harmful roles in tissues. **Keywords:** cardiotoxicity; nephrotoxicity; inflammation; cisplatin; modified citrus pectin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delineamento experimental e protocolo de tratamentos farmacológicos. .	17
Figura 2. Esquema do processamento das amostras e respectivas análises.	17
Figura 3. Peso corporal dos animais ao longo do experimento	23
Figura 4. Análise quantitativa de leucócitos e citocinas do sangue periférico.....	24
Figura 5. Expressão de Gal-3 no modelo agudo de toxicidade induzida pela cisplatina	25
Figura 6. Análise histológica do miocárdio.....	26
Figura 7. Análise histológica do coração e detecção das células CD68-positiva....	27
Figura 8. A cisplatina e pectina provocam alterações oxidativas no tecido cardíaco.....	29
Figura 9. Efeito do tratamento com cisplatina e pectina cítrica modificada na morfologia renal	30
Figura 10. Dosagem de malondialdeído e da enzima antioxidante catalase nos homogenatos de rim	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CRD	Domínio reconhecedor de carboidrato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Gal-3	Galectina-3
PEC	Pectina cítrica modificada
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
SUMÁRIO	10
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. DESENVOLVIMENTO	16
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.2. Animais	16
3.3. Modelo experimental de toxicidade induzida pela cisplatina	16
3.4. Coleta e quantificação de leucócitos do sangue periférico	18
3.5. Coleta e processamento do coração e rins para microscopia de luz	18
3.6. Imuno-histoquímica	19
3.7. Ensaios Multiplex: Dosagem de Citocinas e Detecção dos complexos enzimáticos da fosforilação oxidativa (OXPHOS) mitocondrial	20
3.8. Dosagem da Galectina-3 por ELISA	20
3.9. Dosagem de malondialdeído (MDA)	21
3.10. Atividade da catalase	21
3.11. Análises estatísticas	22
3.12. RESULTADOS	22
3.13. A administração da PEC não previne a resposta inflamatória sistêmica induzida pela cisplatina 22	
3.14. O tratamento com a PEC não altera a expressão endógena de Gal-3 no sangue e coração, mas sim nos rins	24
3.15. O modelo agudo de toxicidade induzida pela cisplatina não provoca alterações histológicas no coração	26
3.16. O tratamento associado de pectina e cisplatina aumenta os níveis de MDA e catalase no coração após administração da cisplatina, bem como altera a fosforilação mitocondrial oxidativa neste órgão	28

3.17.	O modelo agudo de toxicidade induzida pela cisplatina causa danos morfológicos no labirinto cortical dos rins.....	29
3.18.	O tratamento associado de pectina e cisplatina aumenta os níveis de MDA nos rins, sem resposta compensatória da enzima antioxidante catalase.....	31
3.19.	DISCUSSÃO.....	31
3.20.	CONCLUSÃO.....	35
	REFERÊNCIAS.....	36
	ANEXO 1: Comprovante de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	45

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A cisplatina é um agente quimioterápico derivado da platina, sendo utilizado como medicamento para o tratamento de tumores e leucemia (Coradini *et al.*, 2007; Florea and Büsselberg, 2011; Callejo *et al.*, 2015; Ghosh, 2019; Abuzinadah and Ahmad, 2020). Intracelularmente, atua fazendo ligações cruzadas inter/intra-cadeias, causando danos diretos ao DNA, RNA e nas proteínas e, consequentemente, morte de células tumorais através de vias apoptóticas e não apoptóticas (Coradini *et al.*, 2007; Florea and Büsselberg, 2011).

Em contrapartida, o efeito antineoplásico da cisplatina pode alvejar as células não tumorais, podendo promover efeitos tóxicos cardíacos (Tsang *et al.*, 2009; Ryberg, 2012; Ghosh, 2019; Samadi *et al.*, 2021) e renais (Tsang *et al.*, 2009; Ghosh, 2019). Estes efeitos possuem uma variedade de consequências, que, no coração, podem ir desde arritmias assintomáticas à insuficiência cardíaca (Raja *et al.*, 2013; Schlumbrecht and Hehr, 2015; Oun and Rowan, 2017; Bin Naeem *et al.*, 2021). Foram relatados casos desencadeados pela utilização de cisplatina durante ou subsequente ao tratamento, como arritmias, fração de ejeção reduzida, angina instável, palpitações, dores no peito devido a isquemias e, menos frequentemente, infarto do miocárdio (Ryberg, 2012; Raja *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2018). No rim, por sua vez, quando a cisplatina é administrada via intravenosa em pacientes com função renal normal, aproximadamente 25% da dose é eliminada durante as primeiras 24 horas, e até 50% em 5 dias, podendo durar no organismo por até 28 dias em situação de superdosagem (Powis, 1982; Tsang *et al.*, 2009). Nesse contexto, podem ocorrer insuficiência renal aguda e crônica. Embora os mecanismos subjacentes não tenham sido totalmente elucidados, já se sabe que a nefrotoxicidade induzida por cisplatina está intimamente relacionada ao aumento da peroxidação lipídica decorrente do aumento da produção de ROS (Işeri *et al.*, 2007; Tsang *et al.*, 2009; Ghosh, 2019). Ainda, os mesmos processos agem no coração, estando intimamente atrelados à patogênese da cardiotoxicidade, pois desencadeiam respostas celulares e moleculares que induzem um remodelamento inapropriado do tecido cardíaco (Tsutsui *et al.*, 2011; Carrasco *et al.*, 2021; Sabbatino *et al.*, 2021). Esse estresse oxidativo está diretamente envolvido na evolução da insuficiência cardíaca e expressão de enzimas antioxidantes como um mecanismo compensatório (Sabbatino *et al.*, 2021).

Sendo assim, vale ressaltar que o estresse oxidativo é um mecanismo muito comum na citotoxicidade da cisplatina, que o induz pela formação de ROS - como radicais hidroxila e superóxido -, processo que depende da concentração da cisplatina e do tempo de exposição (Brozovic *et al.*, 2010). A produção de ROS está associada aos processos de peroxidação de lipídios, depleção de grupos sulfidríla, alteração de diferentes vias de transdução de sinal, entre outras ações, que podem causar danos ao DNA e, conseqüentemente, apoptose de células (Florea and Büsselberg, 2011). Assim, estratégias terapêuticas que visam reduzir e/ou proteger as funções desses órgãos vitais são fundamentais. Nesse contexto, destacamos a Galectina-3, uma lectina que possui afinidade a β -galactosídeos e classificada como quimérica, contendo um domínio reconhecedor de carboidrato ligado a outro domínio N-terminal, podendo formar oligômeros (Yu *et al.*, 2020). A expressão endógena dessa proteína foi observada em vários tipos celulares, especialmente nas relacionadas com a resposta inflamatória, tais como neutrófilos, mastócitos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos (Gil, Cooper, *et al.*, 2006; Marback *et al.*, 2007; Ge *et al.*, 2010; Andrade, Corrêa, *et al.*, 2018).

A proteína Gal-3 atua como um mediador pleiotrópico com inúmeras funções exercidas intra e extracelularmente (Radosavljevic *et al.*, 2012). A expressão endógena dessa proteína foi observada em vários tipos celulares, especialmente nas relacionadas com a resposta inflamatória, tais como neutrófilos, mastócitos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos (Gil *et al.*, 2006; Marback *et al.*, 2007; Ge *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2018). Dentre os vários papéis descritos para a Gal-3, destacam-se os relacionados com a resposta inflamatória, tumorigênese, imunidade inata e adquirida (Gruson and Ko, 2012; Radosavljevic *et al.*, 2012). Nos processos inflamatórios, a Gal-3 atua na maioria das vezes como uma citocina pró-inflamatória, ativando os mastócitos e os basófilos (Zuberi *et al.*, 1994), participando no processo de migração dos eosinófilos (Rao *et al.*, 2007; Ge *et al.*, 2013), induzindo a liberação de citocinas pelos monócitos (Jeng *et al.*, 1994), a quimiotaxia (Sano *et al.*, 2000) e o processo de fagocitose dos macrófagos *in vitro* (Sano *et al.*, 2003). Estudos *in vivo*, utilizando modelo experimental de peritonite em camundongos nocautes para Gal-3, mostraram que após injeção intraperitoneal de tioglicolato a migração de leucócitos reduziu significativamente para a cavidade peritoneal em relação aos animais selvagens, demonstrando o importante papel dessa proteína no recrutamento dos leucócitos (Colnot *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 2000). Portanto, a proteína Gal-3 pode

interferir positivamente no recrutamento dos leucócitos da circulação sanguínea para os locais de inflamação.

Outro aspecto relevante da Gal-3 na resposta inflamatória é sua participação na apoptose, processo fundamental na fase de reparo tecidual. Investigações apontam papéis pró ou anti-apoptótico dependendo da localização da Gal-3, estado de ativação e do tipo celular estudado (Hsu *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2005). A atividade anti-apoptótica dessa proteína ocorre no compartimento intracelular (Wang *et al.*, 2004), ao contrário do efeito pró-apoptótico realizado pela proteína exógena (Fernández *et al.*, 2005). Essa atividade intracelular está relacionada com a significativa similaridade na sequência de aminoácidos da Gal-3 com a proteína Bcl-2, molécula envolvida na inibição da apoptose (Akahani *et al.*, 1997) e na capacidade de regular a integridade da mitocôndria (Matarrese *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002). Já a atividade extracelular, demonstrada em neutrófilos humanos, está relacionada com a ativação da cascata de sinalização MAPK pela proteína p38 (Fernández *et al.*, 2005).

Nos rins, a elevação da expressão de Gal-3 é observada em modelos de lesão renal aguda (Nishiyama *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2018; Prud'homme *et al.*, 2019), estando associada com fibrose renal, aumento de células inflamatórias no tecido, expressão de citocinas pró-inflamatórias e apoptose. Essa lesão, por sua vez, está associada ao aumento do risco de insuficiência cardíaca através de vias dependentes de Gal-3 e aumento de citocinas inflamatórias no plasma, fatores que culminam na infiltração de células inflamatórias e ativação de fibroblastos, podendo ocasionar fibrose e disfunção cardíaca em até 28 dias após a lesão renal (Prud'homme *et al.*, 2019).

No tocante ao coração, a Gal-3 está relacionada com a ativação de macrófagos, aumento da atividade dos fibroblastos e consequente aumento de colágeno no miocárdio (Blanda *et al.*, 2020). Assim, está atrelada ao reparo tecidual do coração por meio da fibrose cardíaca, um mecanismo causado por acúmulo de matriz extracelular em resposta ao dano tecidual, o qual desencadeia perda da contratilidade cardíaca e, consequentemente, diversas implicações na função do coração (Chen *et al.*, 2021). Logo, o papel da Gal-3 no remodelamento dos tecidos do coração, associado ao seu papel na regulação da resposta inflamatória em diversas situações de estresse, vinculou esta lectina à fibrose tecidual e, consequentemente, insuficiência cardíaca (Calvier *et al.*, 2015; Gehlken *et al.*, 2018), tornando-a um potente biomarcador destes fenômenos (Gehlken *et al.*, 2018; Lubrano and Balzan, 2020).

Em modelos animais de insuficiência cardíaca, a Gal-3 é regulada positivamente na insuficiência cardíaca descompensada em comparação à compensada, estando isso associado à ativação de fibroblastos e macrófagos (De Boer *et al.*, 2010). Ademais, animais nocautes para a Gal-3 são mais resistentes aos efeitos da hipertensão induzida por angiotensina II quando comparados aos animais selvagens, não desenvolvendo fibrose e insuficiência cardíaca (Calvier *et al.*, 2015).

Posto isso, compostos capazes de inibir a expressão de Gal-3 como a pectina cítrica modificada, um polissacarídeo complexo indigerível e rico em beta-galactose solúvel em água (Eliaz and Raz, 2019), têm sido utilizados como possível ferramenta no tratamento de doenças inflamatórias, fibrose cardíaca e injúria renal (Martínez-Martínez, Calvier, *et al.*, 2015; Ibarrola *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020). Assim, a delineação de biomarcadores inflamatórios e seus agentes regulatórios na toxicidade renal e cardíaca podem levar a um melhor desenvolvimento no diagnóstico e tratamento de doenças relacionadas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da inibição farmacológica da Gal-3 na toxicidade cardíaca e renal induzida pela droga quimioterápica cisplatina em ratos Wistar.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a resposta sistêmica por meio da quantificação dos leucócitos periféricos e dosagem de citocinas;
- Avaliar histologicamente o coração e rim, buscando possíveis alterações celulares/estruturais frente às diferentes condições experimentais;
- Quantificar células inflamatórias no coração e rim;
- Avaliar a expressão da proteína Gal-3 por imuno-histoquímica e ELISA;
- Avaliar a expressão e atividade da catalase por imuno-histoquímica;
- Dosar malondialdeído pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA).

3. DESENVOLVIMENTO

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2. Animais

Rattus norvegicus (Wistar) machos, pesando entre 200 a 250g, com idade de 60 a 70 dias, provenientes do CEDEME (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais Para Medicina e Biologia) da UNIFESP. Os animais foram mantidos no biotério local de experimentação, com ciclo 12/12h claro/escuro com um sistema de iluminação das 7:00 às 19:00, temperatura ambiente controlada de 23-25°C e sem restrição de água e alimento. Os animais foram manipulados cuidadosamente durante 7 dias antes do início dos experimentos, para a ambientação e redução do estresse. Os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão Ética no Uso de Animais da UNIFESP (CEUA nº 5338060422).

3.3. Modelo experimental de toxicidade induzida pela cisplatina

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (n = 6 animais/grupo), de acordo com a descrição abaixo e Figura 1:

1. **CONTROLE (SHAM):** recebeu apenas veículo (salina estéril) via intraperitoneal (i.p.), durante 3 dias;
2. **CIS (cisplatina):** recebeu a aplicação do fármaco cisplatina (10 mg/kg/dia) i.p por 3 dias (Sena *et al.*, 2022);
3. **PEC (pectina):** recebeu tratamento farmacológico com pectina cítrica modificada (100 mg/kg/dia) via oral, por 7 dias (Li *et al.*, 2018). Em seguida, recebeu veículo i.p. durante 3 dias;
4. **PEC+CIS (pectina e cisplatina):** recebeu tratamento farmacológico com pectina cítrica modificada (100 mg/kg/dia) via oral durante 7 dias. Em seguida, recebeu a aplicação de cisplatina (10 mg/kg/dia) i.p. por 3 dias.

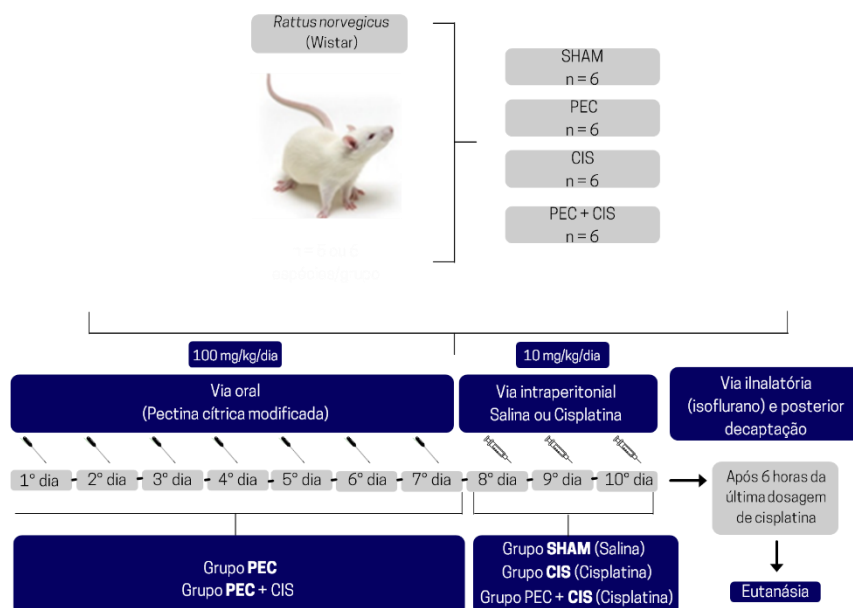


Figura 1. Delineamento experimental e protocolo de tratamentos farmacológicos.

Após 6 horas da última dose de cisplatina, os animais foram submetidos a eutanásia para coleta do sangue, coração e rins. A figura 2 resume o processamento das amostras e respectivas análises propostas.

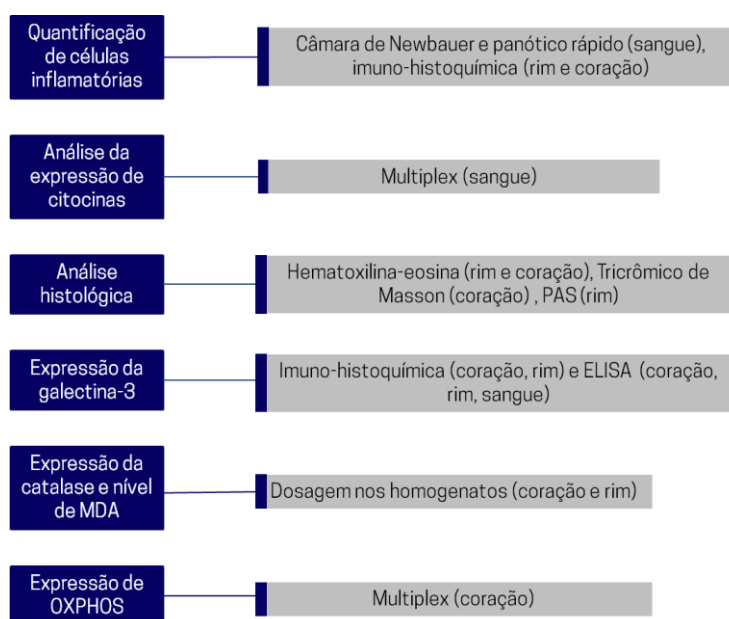


Figura 2. Esquema do processamento das amostras e respectivas análises.

3.4. Coleta e quantificação de leucócitos do sangue periférico

Após coleta do sangue com anticoagulante citrato de sódio, 10 µL de cada amostra foram diluídos na solução de Turk (0,1 g de violeta cristal diluído em 3% de ácido acético) na proporção de 1:20 para quantificação dos leucócitos em câmara de Neubauer. Outra alíquota de 10 µL foi gotejada em lâmina de vidro para a técnica de distensão sanguínea e coloração com Panótico Rápido (Laborclin, Vargem Grande, PR, Brasil) para contagem diferencial dos leucócitos (neutrófilos, linfócitos e monócitos).

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M.) do número de células $\times 10^3/\text{mL}$.

3.5. Coleta e processamento do coração e rins para microscopia de luz

Os animais foram submetidos à eutanásia com isoflurano por via inalatória. Os órgãos foram divididos em 2 partes, submetidas aos seguintes passos: I) ao congelamento imediato em nitrogênio líquido para análises moleculares; II) à fixação em paraformaldeído a 4% tamponado por 48 horas.

Após a fixação, os órgãos foram desidratados em graduações crescentes de álcool etílico (70% - 1 troca, 100% - 3 trocas) e diafanizados em xilol (2 trocas), permanecendo em cada solução por 1 hora. Posteriormente, as peças foram impregnadas pela parafina líquida em estufa (temperatura de 60°C) por, aproximadamente, 8 horas, e em seguida incluídas. Após isso, cortes histológicos foram obtidos com auxílio de micrótomo rotativo (Microm, HM 325). Os cortes com 4 µm de espessura foram aderidos em lâminas comuns para realização dos métodos de coloração.

Para avaliação de possível fibrose no coração, cortes corados pelo método de Masson (evidencia as fibras colágenas em azul) foram fotografados utilizando-se uma objetiva de 40X no microscópio ZEISS, AXIOSKOP 2, do Laboratório de Histologia da UNIFESP. A densitometria para a cor azul foi realizada utilizando-se o software de livre acesso ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Foram avaliadas 10 fotomicrografias/corte/animal de regiões contendo somente feixes de cardiomiócitos e 10 fotomicrografias de regiões contendo vasos da microcirculação (arteríola e

vênulas) de mesmo calibre, totalizando uma área de 0,4 mm². Os dados foram mostrados como média $\pm$ S.E.M. de unidades arbitrárias (u.a.).

Para avaliação do dano tubular renal, 9 fotomicrografias foram tiradas na região cortical e medular coradas com PAS, utilizando-se a objetiva de 20X (totalizando uma área de 3 mm²). Cada fotomicrografia recebeu uma pontuação para o escore do dano tubular renal agudo: 0 = sem lesão observada; 1 = < 25% do campo afetado; 2 = 26-50% do campo afetado; 3 $\geq$ 50% do campo afetado (CARLOS; SILVA; GIL; OLIANI, 2018; RACUSEN; SOLEZ; COLVIN; et al., 1999).

3.6. Imuno-histoquímica

Cortes de 4 μ m do coração e rim foram preparados em lâminas silanizadas a 4%. Após o processo de desparafinização em xilol e reidratação em álcoois graduados, foi efetuada a recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0 em panela à vapor a 96°C, durante 20 minutos. As secções foram lavadas com água destilada e, posteriormente, realizada a inativação de peroxidases endógenas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol durante 30 minutos. Após lavagem em tampão fosfato salina (PBS), foi realizada a incubação do material com os anticorpos policlonais de coelho anti-CD68 (marcador de macrófagos) (ABclonal, Woburn, MA, USA), anti-catalase, anti-elastase (Abcam, Waltham, MA, USA) e anti-galectina-3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) na diluição 1:200 em soroalbumina bovina a 1% (BSA), por 16-18 horas, a 4°C, em câmara úmida. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário conjugados a peroxidase (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) por 1 hora a temperatura ambiente e revelados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Após esta reação, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Carazzi. O controle negativo da reação foi obtido omitindo-se o anticorpo primário.

Para quantificação das células CD68-positivas, os cortes foram escaneados utilizando-se o equipamento Aperio CS2 (Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha) do Laboratório Multiuso de Patologia Molecular da UNIFESP. Para a quantificação das células foi utilizado o programa de livre acesso QuPath (<https://qupath.github.io/>). Os dados foram expressos como média $\pm$ S.E.M. do número de células por mm².

3.7. Ensaios Multiplex: Dosagem de Citocinas e Detecção dos complexos enzimáticos da fosforilação oxidativa (OXPHOS) mitocondrial

Amostras de 25µL de plasma nas diferentes condições experimentais foram submetidas ao ensaio multiplex utilizando o kit RECYTMAG-65K para o painel MILLIPLEX MAP de rato (Millipore Corporation, EUA). Foram avaliados 4 alvos: IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α. A detecção das proteínas foi realizada através da tecnologia Luminex, seguindo as instruções do fabricante, pelo equipamento multiusuário Milliplex Analyzer Xponent 3 (Millipore Corporation, USA), UNIFESP, SP. Os resultados foram expressos como média ± S.E.M. das concentrações de citocinas (pg/mL).

Para analisar se os complexos da cadeia transportadora de elétrons I, III e V foram afetados pelas diferentes condições experimentais, realizamos ensaio multiplex com os homogenatos do coração utilizando o kit *Rat/Mouse Oxidative Phosphorylation (OXPHOS) Magnetic Bead Panel #RM0XSMAG-17K*. Os homogenatos de coração foram preparados a partir de 0,1 g de amostra macerada em 1 mL de tampão de lise mitocondrial/celular disponível no kit, utilizando-se o homogeneizador portátil (Uniscience, São Paulo, Brasil). Posteriormente, as amostras foram incubadas no gelo e centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante armazenado a - 70°C.

Para a detecção dos complexos enzimáticos I, III e V, foram utilizados 25 µL de homogenatos do coração, e a detecção das proteínas realizada seguindo instruções do fabricante e utilizando-se a tecnologia Luminex, por meio do equipamento multiusuário Milliplex Analyzer Xponent 3 (Merck Millipore), UNIFESP, SP. Os dados foram demonstrados como média ± S.E.M. de intensidade de fluorescência (MFI).

3.8. Dosagem da Galectina-3 por ELISA

A dosagem de Gal-3 foi realizada no sangue e homogenatos de coração e rim das diferentes condições experimentais, por meio do kit ERLGALS3 comercialmente disponível (Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os homogenatos foram preparados a partir de 0,1 g de amostra macerada em 1 mL de tampão tris-salina, pH 7.4, utilizando-se o homogeneizador portátil (Uniscience). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm e o

sobrenadante armazenado a - 70°C. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata e os dados expressos como a média $\pm$ S.E.M. da concentração de Gal-3 (pg/mL ou pg/mg total de proteína).

3.9. Dosagem de malondialdeído (MDA)

A dosagem de MDA foi realizada nos homogenatos de coração e rim nas diferentes condições experimentais. Os homogenatos foram preparados a partir de 0,1 g de amostra macerada em 1 mL de solução de homogeneização (KCl a 1%) utilizando-se o homogeneizador portátil Uniscience. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante armazenado a - 70°C.

Para a dosagem de MDA nas amostras, foram adicionados por microtubo: 50 μ L de homogenato, 750 μ L de ácido acético a 20%, 100 μ L de dodecil sulfato de sódio a 8%, 750 μ L de ácido tiobarbitúrico a 0,8% e 350 μ L de água destilada. Para a curva padrão, 3 soluções com concentrações conhecidas de MDA foram preparadas: Tubo 1 (300 nM/mL), Tubo 2 (30 nM/mL) e Tubo 3 (3 nM/mL), das quais 50 μ L foram adicionados às soluções descritas acima. O tubo Branco foi obtido somente pelas soluções de incubação, omitindo-se soluções de homogenato e/ou da curva padrão. Os microtubos foram incubados por 60 minutos em banho seco a 95°C e a reação foi parada pela adição dos microtubos em gelo. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm e 200 μ L foram adicionados à uma placa de 96 poços. A leitura da placa foi realizada no leitor de absorbância Biotek 800 TS no comprimento de onda de 532 nm. Os dados foram demonstrados como média $\pm$ S.E.M da concentração de MDA em nM/mL.

3.10. Atividade da catalase

A atividade da enzima catalase foi dosada nos homogenatos de coração e rim por meio de ensaio colorimétrico do consumo de catalase tecidual pela reação com peróxido de hidrogênio. Os homogenatos foram preparados com 0,1 g de amostra em 1 mL de tampão fosfato, pH 7.4, homogeneizados no equipamento *Beadblaster*²⁴ (Benchmark Scientific, Inc.) durante 30 segundos. Posteriormente, as amostras foram

centrifugadas por 10 minutos a 5.000 rpm e o sobrenadante armazenado a - 70°C. Para a análise, foram pipetados em placa de quartzo 5 µL de amostra e 100 µL de solução 20mM de H₂O₂ por poço. Foram cronometrados 3 minutos de reação e, por fim, feita a leitura de ponto único no comprimento de onda de 374 nm no espectrofotômetro SpectraMax® (Molecular Devices, LLC), disponibilizado no laboratório de Fisiologia da Nutrição, UNIFESP. A curva padrão de peróxido de hidrogênio seguiu as absorbâncias de 20 U, 10 U, 5 U, 2.5 U, 1.25 U, 0.65 U e 0.3125 U e, então, a concentração de peróxido restante no poço foi calculada através da regressão linear gerada (Concentração x Absorbância), isolando-se o x da equação. Finalmente, a catalase consumida foi calculada através da divisão do peróxido catalisado (20U-x) pelo tempo de reação (3 minutos), sendo que o valor final foi corrigido pela quantidade de proteína da amostra. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata e os dados expressos como a média ± S.E.M. da quantidade de catalase consumida por tempo de reação (U/min/mg de proteína).

3.11. Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad versão 9.00. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para determinar a normalidade dos dados. Para amostras com uma distribuição normal, foi aplicado a análise de variância (ANOVA), seguido pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas ou teste *t* para comparação entre dois grupos. O teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn ou teste Mann-Whitney foi utilizado para amostras com distribuição não normal. Em todos os casos, valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3.12. RESULTADOS

3.13. A administração da PEC não previne a resposta inflamatória sistêmica induzida pela cisplatina

Inicialmente verificamos se as diferentes condições experimentais poderiam alterar o peso dos animais. Desta forma, os ratos foram pesados nos dias 1, 7 e 10. Como esperado, os animais dos grupos SHAM e PEC mantiveram seu peso corporal ao longo do experimento (Figura 3). Os animais dos grupos CIS e PEC+CIS tenderam

ao ganho da massa corporal no 7º dia em relação ao início do experimento (1º dia), apresentando uma perda marcante após 3 dias de administração da cisplatina em relação ao 7º dia (Figura 3).

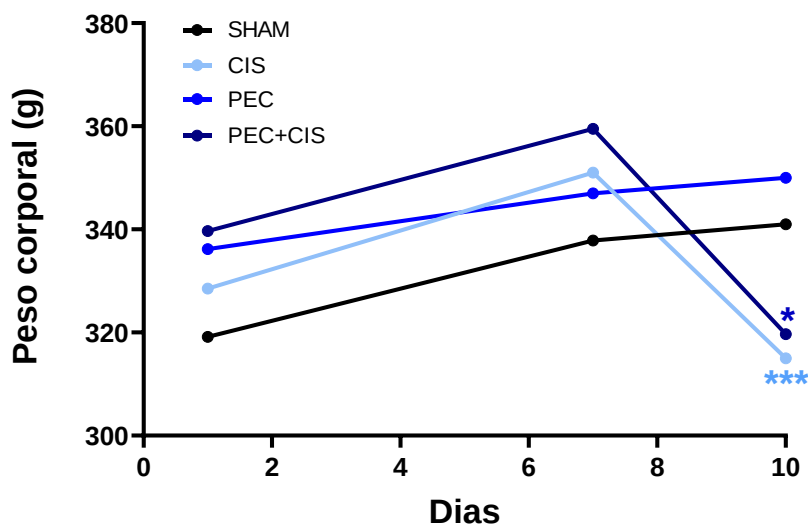


Figura 3. Peso corporal dos animais ao longo do experimento. Os animais foram pesados nos dias 1, 7 e 10 e os dados representam as médias $\pm$ S.E.M do peso corporal em gramas ($n = 6$ animais/grupo). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ (10º dia vs. 7º dia) (ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

A análise de leucócitos mostrou um aumento significativo no percentual de neutrófilos circulantes nos grupos que receberam cisplatina (CIS e PEC+CIS) em relação aos grupos SHAM e PEC (Figura 4A). Além disso, os grupos que receberam cisplatina apresentaram menor percentual de linfócitos e monócitos em relação aos outros grupos (Figuras 4B, C), com redução significativa detectada apenas no grupo CIS em relação ao PEC (Figura 4B). Não foi detectada alteração no número total de leucócitos entre os diferentes grupos experimentais (dados não mostrados).

A análise das citocinas mostrou aumento significativo dos níveis plasmáticos de IL-6 e IL-10 nos grupos CIS e PEC+CIS em relação ao grupo PEC, enquanto as citocinas IL-1 β e TNF- α aumentaram significativamente no grupo PEC+CIS em relação aos grupos SHAM e PEC (Figuras 4D-G).

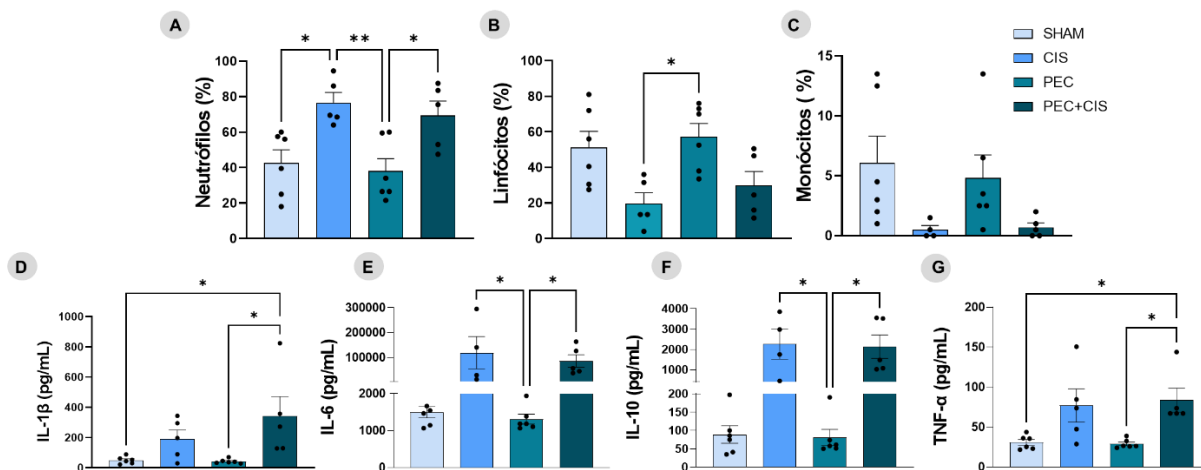


Figura 4. Análise quantitativa de leucócitos e citocinas do sangue periférico. A: Neutrófilos. **B:** Linfócitos. **C:** Monócitos. Os dados representam as médias $\pm$ S.E.M do número de células $\times 10^3$ /mL ($n = 5-6$ animais/grupo). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ (ANOVA, pós-teste de Bonferroni). **D:** IL-1 β . **E:** IL-6. **F:** IL-10. **G:** TNF- α . Os dados representam as médias $\pm$ S.E.M da concentração das citocinas em pg/mL. * $P < 0,05$ (ANOVA, pós-teste de Bonferroni em D; Kruskal–Wallis, pós-teste de Dunn em E-G).

3.14. O tratamento com a PEC não altera a expressão endógena de Gal-3 no sangue e coração, mas sim nos rins

Considerando alguns estudos que utilizaram a mesma concentração de PEC do nosso e evidenciaram a redução da expressão da proteína e RNAm da Gal-3 em diferentes tecidos/órgãos (tecido adiposo, aorta, coração e rins) em modelos experimentais de obesidade (Martínez-Martínez, López-Ándres, *et al.*, 2015; Martínez-Martínez *et al.*, 2016) e de hipertensão arterial (Martínez-Martínez, Calvier, *et al.*, 2015; Ibarrola *et al.*, 2017; Martínez-Martínez *et al.*, 2018), nosso próximo passo foi dosar esta proteína pelo método de ELISA no sangue, coração e rins.

Nossas análises mostraram que o tratamento com a PEC não alterou os níveis de Gal-3 no sangue e coração entre os grupos experimentais (Figuras 5A, B). No entanto, os rins de animais dos grupos que receberam PEC mostraram redução significativa de Gal-3 em relação ao grupo SHAM (Figura 5C).

As análises imuno-histoquímicas evidenciaram a expressão de Gal-3 nos cardiomiócitos em todas as condições experimentais (Figuras 5D-G). Nos grupos CIS e PEC+CIS, a expressão de Gal-3 nos cardiomiócitos apresentou pontos de maior imunorreatividade em relação a outras áreas do citoplasma, enquanto nos grupos SHAM e PEC, essa expressão apresentou distribuição homogênea ao longo das

células (Figuras 5D-G). No rim, a localização de Gal-3 foi especialmente observada nas células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais e distais (Figuras 5I-L). Ainda, nos grupos PEC e PEC+CIS, a expressão de Gal-3 apresentou imunorreatividade menos intensa em comparação ao grupo SHAM, corroborando os resultados da técnica de ELISA. Os cortes utilizados como controle da reação, com omissão do anticorpo primário, não apresentaram imunorreatividade no coração e rim (Figuras 5H, M).

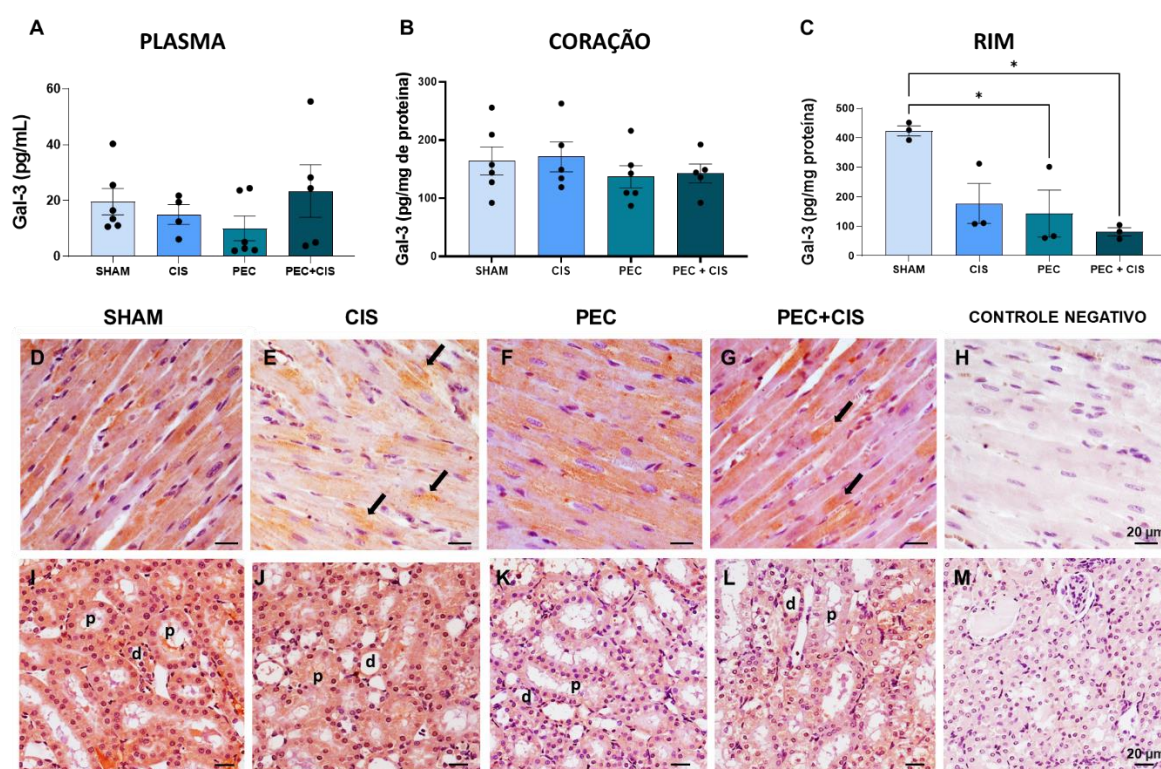


Figura 5. Expressão de Gal-3 no modelo agudo de toxicidade induzida pela cisplatina. A-C: Níveis proteicos da Gal-3 detectados por ELISA no sangue, coração e rins. * $P < 0,05$ (ANOVA, pós-teste de Bonferroni). D-G: Expressão de Gal-3 nos cardiomiócitos. Células dos grupos CIS e PEC+CIS apresentam pontos de maior imunorreatividade de Gal-3 (setas) em relação a outras regiões citoplasmáticas. I-L: Intensa imunorreatividade de Gal-3 detectada nas células epiteliais tubulares renais dos grupos SHAM e CIS em relação aos grupos PEC e PEC+CIS. Túbulo contorcido proximal (p). Túbulo contorcido distal (d). H, M: Controles negativos da reação. Contracoloração: Hematoxilina de Carazzi.

3.15. O modelo agudo de toxicidade induzida pela cisplatina não provoca alterações histológicas no coração

Para a análise histológica do coração, foram realizadas as colorações hematoxilina e eosina e tricrômio de Masson, a fim de obter informações a respeito da morfologia do órgão.

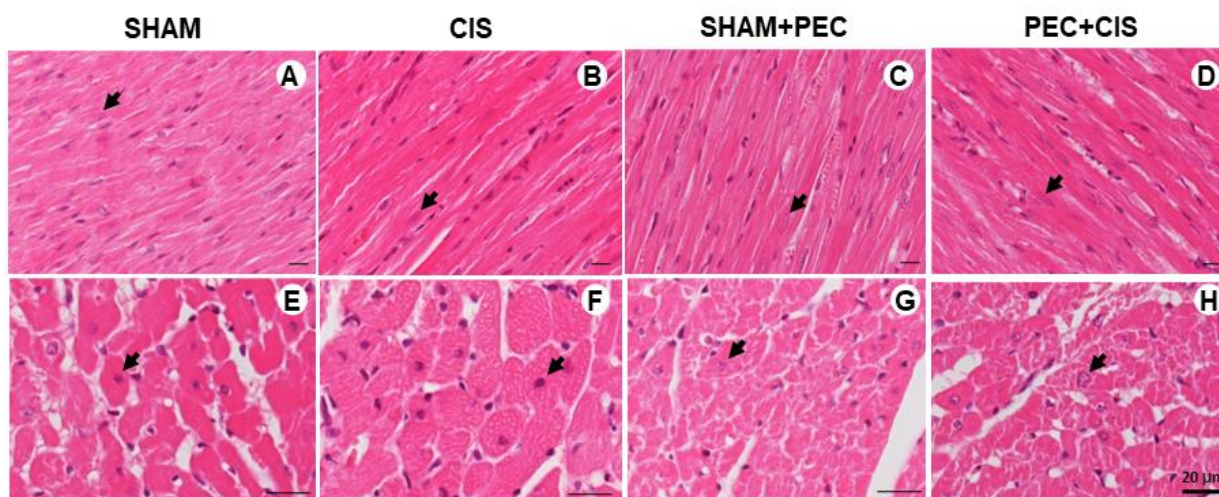


Figura 6. Análise histológica do miocárdio. Não detectamos alterações morfológicas evidentes entre os grupos SHAM [A, E], CIS [B, F], PEC [C, G] e PEC+CIS [D, H]. **A-D:** Cardiomiócitos alongados e cilíndricos, com estriações transversais e núcleos centrais (setas). **E-H:** Secções transversais de cardiomiócitos evidenciando seus núcleos de posição central (setas). Coloração: Hematoxilina Eosina. Barras: 20 µm.

A coloração por HE não evidenciou alterações morfológicas nos cardiomiócitos nas diferentes condições experimentais. Em todas as condições as células apresentaram citoplasma com intensa acidofilia, estriações evidenciadas no corte longitudinal e núcleos de posição central (Figura 6).

A coloração por tricrômio de Masson permitiu diferenciar o tecido conjuntivo, cujas fibras colágenas se destacam em azul, dos tecidos musculares cardíaco e liso - cujas células se coram em vermelho. Assim, avaliamos diferentes regiões contendo cardiomiócitos e vasos da microcirculação do coração (arteríolas e vênulas) para investigar um possível processo de fibrose cardíaca neste modelo experimental. As análises morfológicas não evidenciaram alterações nas regiões de tecido conjuntivo nas áreas da microcirculação e entre os cardiomiócitos (Figuras 7A-H), observações corroboradas pela densitometria (Figuras 7M,N).

Também avaliamos a presença de macrófagos no coração por meio da análise imuno-histoquímica de CD68. As células CD68-positivas foram observadas em todas as condições experimentais, especialmente localizadas no tecido conjuntivo propriamente dito do epicárdio e miocárdio (Figuras 7I-L). A quantificação destas células não demonstrou diferença significativa nas diferentes condições experimentais (Figura 7O), indicando que a administração de cisplatina não causou maior influxo de macrófagos no tecido. Além disso, como não foi detectada presença de infiltrado inflamatório no coração nos grupos que receberam cisplatina, optamos por cancelar a investigação da expressão da elastase (marcador de neutrófilos), prevista no plano inicial do projeto.

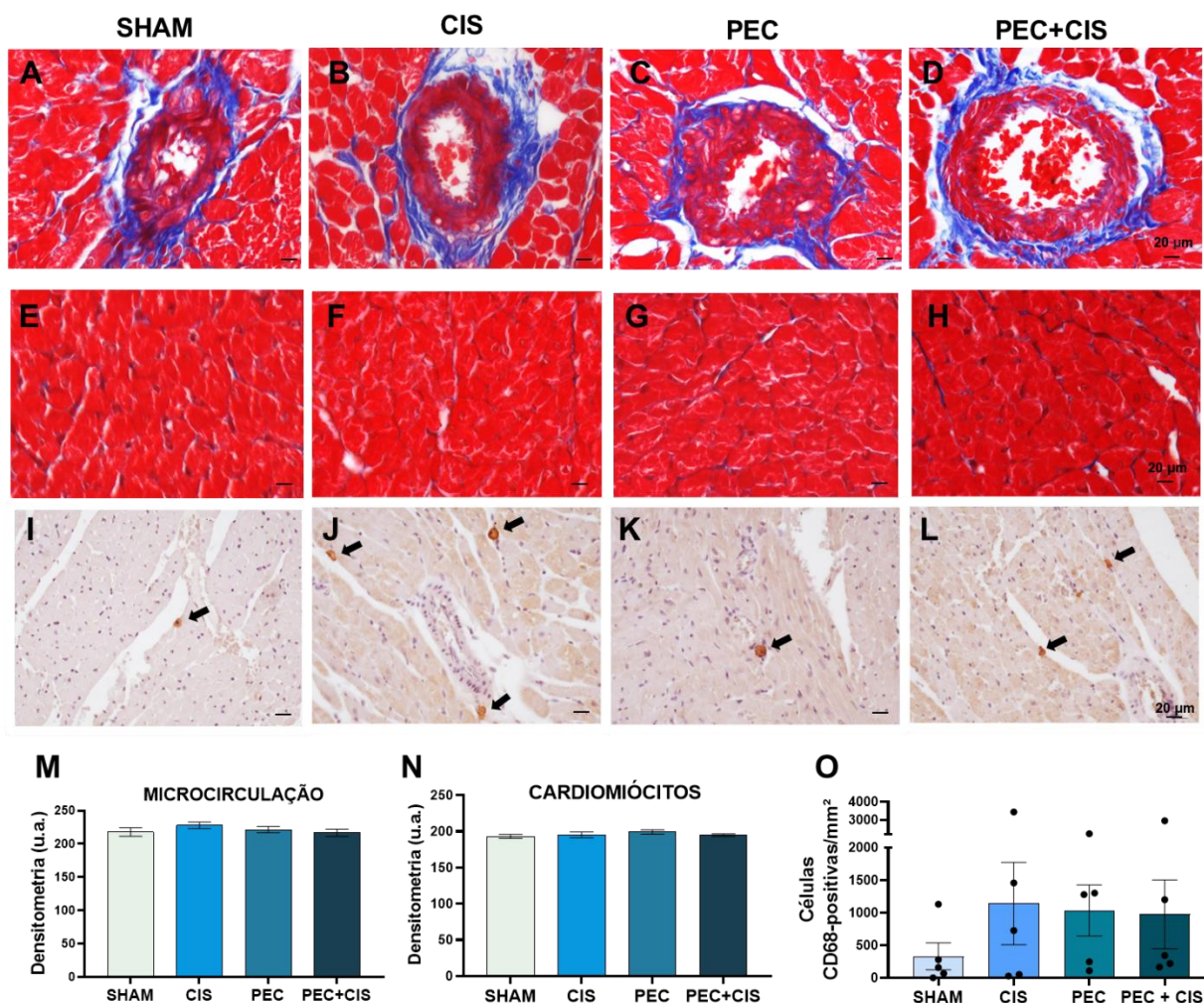


Figura 7. Análise histológica do coração e detecção das células CD68-positivas. **A-D:** Arteríolas no miocárdio não demonstram alterações na túnica adventícia (tecido conjuntivo evidenciado em azul) entre os grupos. **E-H:** Cardiomiócitos em corte transversal envoltos por tecido conjuntivo destacado em azul. Sem alterações na deposição de fibras colágenas entre os grupos. Coloração: Tricrômio de Masson. **I-L:** Células CD68-positivas (setas) foram detectadas no tecido conjuntivo associado ao tecido muscular estriado cardíaco em todos os grupos experimentais.

Contracoloração: Hematoxilina de Carazzi. **M, N:** Densitometria da cor azul nas regiões da microcirculação e dos cardiomiócitos. **O:** Quantificação das células CD68-positivas. Os dados representam as médias $\pm$ S.E.M da cor azul (fibras colágenas) em unidades arbitrárias (u.a.) (**M, N**) e da quantidade de células CD68-positivas por mm² de tecido (**O**) (n = 5-6 animais/grupo).

3.16. O tratamento associado de pectina e cisplatina aumenta os níveis de MDA e catalase no coração após administração da cisplatina, bem como altera a fosforilação mitocondrial oxidativa neste órgão

Uma vez que não foram detectadas alterações morfológicas no coração, investigamos se neste modelo agudo de toxicidade induzida pela cisplatina e tratamento com PEC ocorrem alterações moleculares nos cardiomiócitos. Nesse sentido, o estresse oxidativo é um mecanismo muito comum na citotoxicidade induzida pela cisplatina, que induz a formação de ROS e peroxidação de lipídios, culminando com o dano celular e morte (Floreas and Büsselberg, 2011). Assim, avaliamos em nosso estudo os níveis da enzima antioxidante catalase e sua atividade, os níveis de MDA e dos complexos enzimáticos mitocondriais envolvidos com o processo de fosforilação oxidativa nos homogenatos de coração.

A expressão da catalase foi detectada no citoplasma dos cardiomiócitos em todos os grupos experimentais. No grupo PEC+CIS, os níveis de catalase demonstraram intensa imunorreatividade (Figura 8D) em relação aos demais grupos (Figuras 8A-C). Além disto, a atividade desta enzima nos homogenatos do coração foi significativamente maior no grupo PEC+CIS em relação aos grupos CIS e PEC (Figura 8E), corroborando os achados imuno-histoquímicos (Figura 8E).

A dosagem do MDA, também realizada nos homogenatos de coração, mostrou um aumento significativo de seus níveis no grupo PEC+CIS em relação ao grupo SHAM, enquanto não houve diferença nos grupos tratados somente com pectina ou cisplatina (Figura 8F).

O estudo da expressão dos complexos I, III e V nos homogenatos do coração nas diferentes condições experimentais mostraram que, em nosso modelo, ocorre uma desregulação das enzimas dos complexos I e III. A primeira mostrou uma diminuição acentuada nos grupos CIS e PEC em comparação com o SHAM, enquanto a última aumentou no grupo PEC+CIS em comparação com o PEC (Figuras 8G-I).

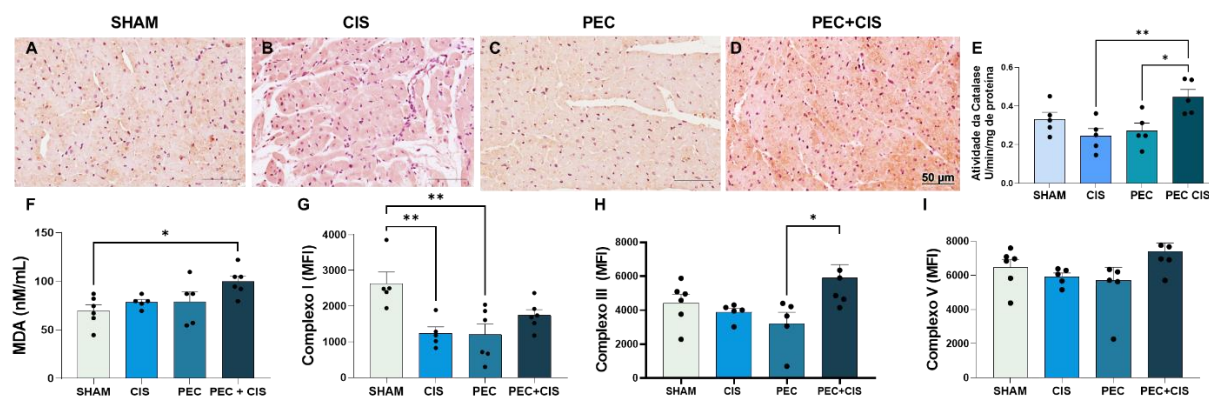


Figura 8. A cisplatina e pectina provocam alterações oxidativas no tecido cardíaco. A-D: Intensa imunomarcação de catalase nos cardiomiócitos detectada no grupo PEC+CIS em relação aos demais grupos. Contracoloração: Hematoxilina de Carazzi. E: Dosagem da atividade da catalase em U/min/mg de proteína nos homogenatos do coração (n = 5/grupo). F: Análise da concentração de malondialdeído (MDA) em nM/mL (n = 5-6/grupo). G-I: Expressão por intensidade de fluorescência (MFI) dos complexos I, III e V da cadeia de fosforilação mitocondrial nos homogenatos do coração (n = 5-6/grupo). Os dados representam as médias $\pm$ S.E.M. nas diferentes análises (E-I). *P < 0,05; **P < 0,01 (ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

3.17. O modelo agudo de toxicidade induzida pela cisplatina causa danos morfológicos no labirinto cortical dos rins

A análise morfológica dos rins mostrou preservação da região cortical nos diferentes grupos experimentais (Figuras 9A-D). No entanto, os grupos que receberam cisplatina mostraram alterações morfológicas na região cortical mais profunda, tais como perda da borda em escova na superfície apical das células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais, e degeneração celular nos túbulos contorcidos evidenciada pela presença de corpos apoptóticos (Figuras 9E-H). Estas alterações foram confirmadas pela avaliação do escore de dano tubular agudo renal. Os grupos CIS e PEC+CIS apresentaram aumento significativo do escore em relação aos grupos SHAM e PEC (Figura 9I).

A presença de infiltrado inflamatório nos rins foi avaliada por meio da reação de imuno-histoquímica para a elastase, marcador de neutrófilo (Ho *et al.*, 2014). A presença de neutrófilos foi observada especialmente nos corpúsculos renais (Figuras 9I-L), mas a análise quantitativa não demonstrou alterações significantes entre os diferentes grupos experimentais (Figura 9N).

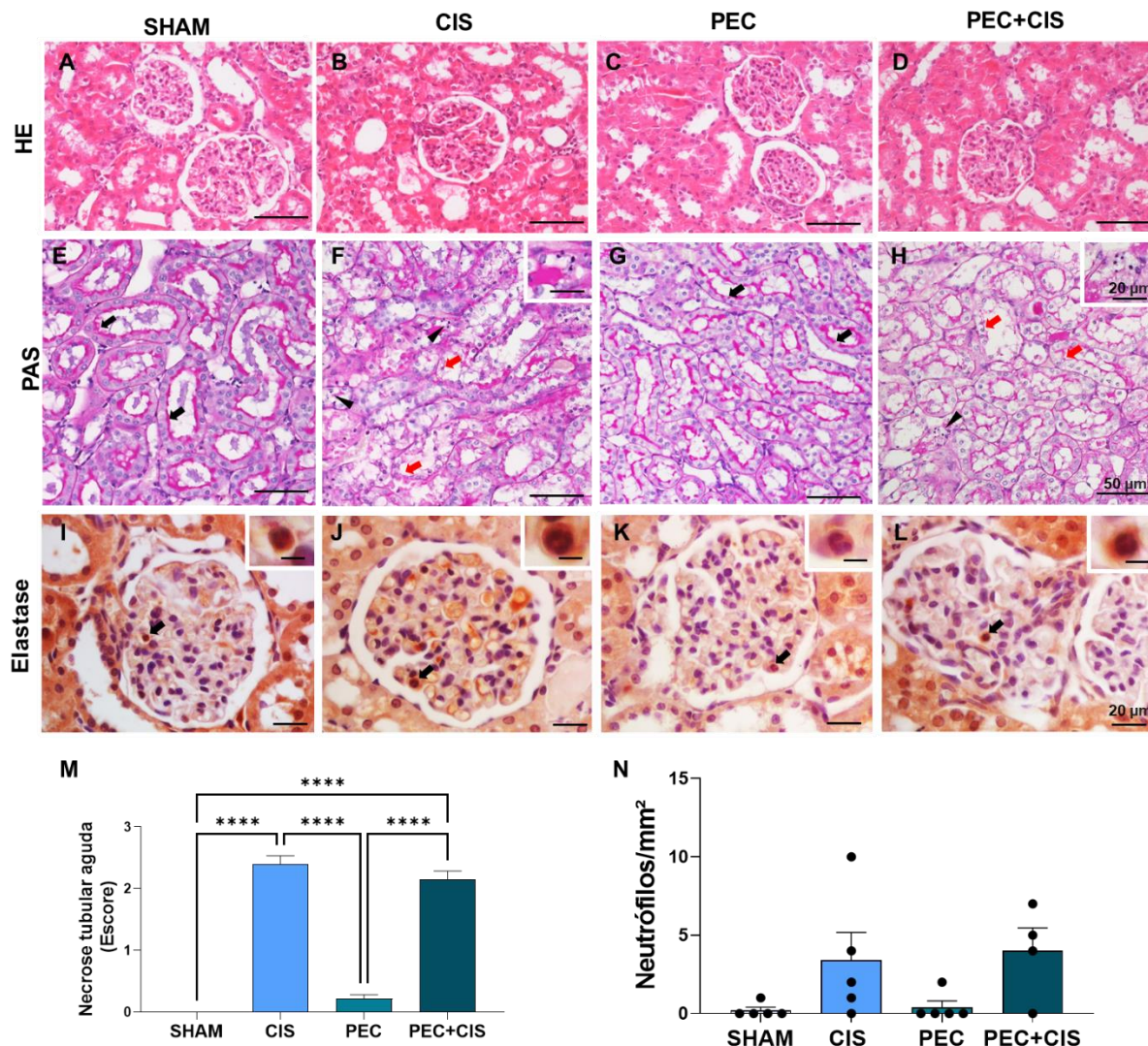


Figura 9. Efeito do tratamento com cisplatina e pectina cítrica modificada na morfologia renal. **A-D:** Região cortical evidenciando a presença de corpúsculos renais e túbulos contorcidos com morfologia típica, sem anormalidades nos diferentes grupos experimentais. Coloração: HE. **E-H:** Região cortical mais profunda dos grupos SHAM e PEC mostram integridade das células epiteliais tubulares renais com preservação da borda em escova (setas pretas). Perda da integridade celular e da borda em escova (setas vermelhas), bem como corpos apoptóticos (cabeças de seta; insets das figs F, H) são observadas nos grupos CIS e PEC+CIS. Coloração: PAS. **I-L:** Detecção de neutrófilos (setas; células positivas para elastase) nos corpúsculos renais. Detalhe das fotos no canto superior direito, evidencia a morfologia típica dos neutrófilos com núcleos multilobulados. Contracoloração: Hematoxilina de Carazzi. Barras: 50 μ m (**A-H**), 20 μ m (**I-L**; insets das figs. **F** e **H**), e 5 μ m (insets das figs. **I-L**). **M:** Escore de dano tubular renal agudo. **N:** Quantificação de células elastase-positivas (neutrófilos). Os dados representam as médias $\pm$ S.E.M. nas diferentes ($n = 4-6$ animais/grupos). **** $P < 0,0001$ (Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn).

3.18. O tratamento associado de pectina e cisplatina aumenta os níveis de MDA nos rins, sem resposta compensatória da enzima antioxidante catalase

O tratamento com a cisplatina associado à pectina cítrica modificada se mostrou suficiente para aumentar a dosagem de malondialdeído nos homogenatos de rim, evidenciando um aumento significativo da peroxidação lipídica no grupo PEC+CIS em relação ao grupo SHAM (Figura 10A), assim como no coração. Por outro lado, a atividade da enzima antioxidante catalase não mostrou diferenças entre os grupos experimentais (Figura 10B).

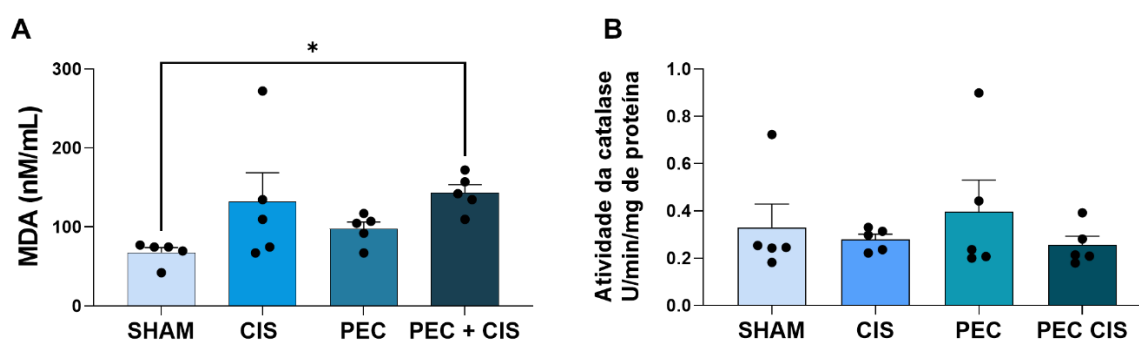


Figura 10. Dosagem de malondialdeído e da enzima antioxidante catalase nos homogenatos de rim. A: Análise da concentração de malondialdeído (MDA) em nM/mL. **B:** Dosagem da atividade da catalase em U/min/mg de proteína. Os dados representam as médias $\pm$ S.E.M das diferentes análises (n = 5/grupo). *P < 0,05 (Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn).

3.19. DISCUSSÃO

Considerando que o papel da inibição da Gal-3 não está completamente estabelecido, este estudo é importante para enriquecer os já existentes a respeito da inibição dessa proteína na toxicidade cardíaca e renal. Apesar de necessária em condições saudáveis, a Gal-3 é considerada um padrão molecular associado ao dano (DAMP) expresso em diversos tecidos e, ainda, em diversos compartimentos celulares ou meio extracelular, fatores que a atribuem diversas funções patológicas envolvidas com a resposta inflamatória, incluindo síndromes cardiorenais (Boutín *et al.*, 2022). Nesse sentido, estratégias terapêuticas que visem a inibição das ações deletérias da Gal-3, tais como o uso da PEC, são promissoras e têm sido mostradas na literatura

em diferentes modelos experimentais de obesidade (Martínez-Martínez, López-Ándres, *et al.*, 2015; Martínez-Martínez *et al.*, 2016), hipertensão (Martínez-Martínez, Calvier, *et al.*, 2015; Ibarrola *et al.*, 2017; Martínez-Martínez *et al.*, 2018), fibrose cardiorrenal e hepática (Kolatsi-Joannou *et al.*, 2011; Calvier *et al.*, 2015; Abu-Elsaad and Elkashef, 2016), em especial na toxicidade induzida pela cisplatina (Li *et al.*, 2018)

Inicialmente, avaliamos em nosso estudo a resposta inflamatória sistêmica induzida pela cisplatina e o efeito do tratamento com a PEC. O modelo de toxicidade aguda induzida pela cisplatina causou aumento do recrutamento de neutrófilos circulantes nos grupos CIS e PEC+CIS em detrimento da população de linfócitos e monócitos, fator que condiz com o papel dessa droga no aumento da resposta inflamatória (Abuzinadah and Ahmad, 2020; Ramkumar *et al.*, 2021). Uma vez que o processo de recrutamento e inflamação se dá através da ativação de componentes da resposta inflamatória, como as citocinas (Liu *et al.*, 2020; Ikeda *et al.*, 2021), dosamos no plasma dos animais um painel de citocinas para complementar os achados na resposta sistêmica. A análise demonstrou um aumento em ambos os grupos tratados com cisplatina das citocinas IL-6 e IL-10, e quando associada com a PEC houve aumento também da IL-1 β e TNF- α , indicando uma exacerbação da resposta inflamatória sistêmica no grupo PEC+CIS.

O tratamento com a PEC, por sua vez, não foi suficiente para reduzir os níveis de Gal-3 no coração e sangue, embora outros estudos utilizando modelos experimentais de remodelação cardiovascular pela obesidade (Martínez-Martínez, López-Ándres, *et al.*, 2015) e de hipertensão arterial (Martínez-Martínez, Calvier, *et al.*, 2015) tenham mostrado redução de Gal-3 após tratamento com PEC. Nos dois estudos, os modelos foram desenvolvidos por 6 semanas com igual tempo de tratamento com PEC. Já em nosso modelo, utilizamos um protocolo de tratamento prévio de 7 dias, seguindo o modelo de nefrotoxicidade induzida por cisplatina em camundongos (Li *et al.*, 2018). No estudo de Li e colaboradores, foi mostrado que o tratamento com PEC reduziu os níveis endógenos de Gal-3 nos rins após 7 e 14 dias da injeção de cisplatina (20 mg/kg). Esses dados corroboram nossos achados para os níveis endógenos de Gal-3 nos rins, que evidenciam redução significativa nos grupos tratados com a PEC em relação aos animais SHAM após os 7 dias de tratamento prévio. A alteração dos níveis de Gal-3 detectada nos rins e não no coração pela PEC pode ser explicada pelo fato dos rins possuírem naturalmente maior expressão de Gal-3 em relação ao coração (Suthahar *et al.*, 2018), sendo mais sensíveis à ação

inibitória da PEC. Por outro lado, para reduzir a expressão de Gal-3 no coração, um maior tempo de tratamento com PEC seria necessário, como demonstrado por outros estudos (Martínez-Martínez, Calvier, *et al.*, 2015; Martínez-Martínez, López-Ándres, *et al.*, 2015).

A análise da expressão de células CD68-positivas mostrou que não houve migração exacerbada de macrófagos para o tecido muscular cardíaco nos grupos tratados com cisplatina, uma vez que não houve alteração do perfil de expressão dessas células em relação ao grupo SHAM. Além disso, não foram observadas alterações morfológicas no coração nas colorações de HE e Masson. Desse modo, os resultados não contemplam o observado por outros estudos na literatura (Khadrawy *et al.*, 2021), o que pode ser atribuído ao modelo de tratamento agudo com a cisplatina - 3 dias, que não foi o suficiente para a infiltração de células inflamatórias e aumento dos níveis de Gal-3 no coração.

Por outro lado, houve resposta de estresse oxidativo ao tratamento com cisplatina, representada pelo aumento dos níveis de MDA (PEC+CIS vs. SHAM). Além disso, a atividade da enzima antioxidante catalase aumentou no grupo PEC+CIS, indicando uma ativação da resposta antioxidante celular frente ao estresse oxidativo gerado pela cisplatina, mecanismo mostrado em estudos prévios (Meilhac *et al.*, 2000). Sendo assim, vale destacar as mitocôndrias: o coração utiliza preferencialmente a energia provida por essa organela (Zhou and Tian, 2018) que está envolvida com o estresse oxidativo nesse órgão, uma vez que a produção de ROS de origem mitocondrial é feita principalmente na cadeia de transporte de elétrons (Wong *et al.*, 2017; Zhou and Toan, 2020). Nesse sentido, foi avaliado por ensaio multiplex a expressão das enzimas críticas da fosforilação oxidativa mitocondrial, que apresentou desregulação observada pela diminuição do complexo I (CIS e PEC vs. SHAM) e aumento do III (PEC+ CIS vs. PEC). Especialmente no coração, um órgão com intensa atividade mitocondrial, os complexos I e III estão envolvidos na produção do ânion superóxido (Bereiter-Hahn *et al.*, 2008; Szewczyk *et al.*, 2015; Ait-Aissa *et al.*, 2019), um oxidante potente que deve ser neutralizado (Zhou and Toan, 2020). A partir desses achados moleculares, pode-se supor que o início do dano cardíaco provocado pela inflamação induzida pela cisplatina advém do desequilíbrio dos complexos da cadeia oxidativa e estresse oxidativo, mecanismo que é associado à insuficiência cardíaca quando as ROS ultrapassam a capacidade de neutralização dos

antioxidantes (D'oria *et al.*, 2020), afetando a homeostase redox e causando dano tecidual (Le Gal *et al.*, 2021)

Diferentemente do coração, mesmo não havendo influxo de células inflamatórias para o tecido, os rins se mostraram mais sensíveis ao tratamento com cisplatina, havendo perda da integridade celular e descaracterização da morfologia renal, fatores também observados em estudos prévios de nosso grupo (Lucchi *et al.*, 2022). Por outro lado, houve aumento da peroxidação lipídica em ambos os órgãos (coração e rins), mostrando que, nesse modelo experimental, o desequilíbrio da homeostase redox está vinculado ao dano agudo causado pela cisplatina associado ao tratamento com PEC.

Como se sabe, a Gal-3 é uma proteína pleiotrópica, podendo exercer funções antagônicas a depender de sua localização (Haudek *et al.*, 2010), e sua inibição pode ser prejudicial ao aumentar a produção de ROS pela mitocôndria no início da morte celular (Matarrese *et al.*, 2000), estando isso associado com seu efeito anti-apoptótico ao se translocar à mitocôndria e evitar alterações no potencial de membrana dessa organela (Al-Salam *et al.*, 2021). Uma vez que o antagonismo da PEC não é específico, esta função também pode ser impedida (Eliaz and Raz, 2019), causando dano celular (Al-Salam *et al.*, 2021). Ainda, a enzima antioxidante catalase não foi responsiva nos rins, órgão com sérios danos morfológicos. Apesar do tratamento exógeno com catalase evitar a injúria renal em modelos agudos de nefrotoxicidade, a expressão dessa enzima para compensar o dano oxidativo tecidual parece não ser tão responsiva nos rins quanto no coração (Ferro *et al.*, 2010; Al-Salam and Hashmi, 2018; Tan *et al.*, 2020; Sabbatino *et al.*, 2021).

Vale ressaltar que uma lesão renal crônica, que se inicia na maior parte das vezes em uma lesão aguda, pode acarretar uma síndrome renocardiaca, na qual o aumento da expressão de Gal-3 se mostra um protagonista dos efeitos deletérios nos rins e coração (Ronco *et al.*, 2010; Prud'homme *et al.*, 2019). Assim, é importante continuar a investigação da inibição dessa proteína em ambos os órgãos no modelo agudo, bem como sua importância para a homeostase, visando entender seus complexos papéis e bloquear ou diminuir a resposta inflamatória exacerbada da Gal-3 como uma prevenção da progressão dos efeitos deletérios crônicos celulares e moleculares (Prud'homme *et al.*, 2019).

3.20. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os rins e o coração se comportam de forma diferente quando submetidos à toxicidade aguda induzida pela cisplatina. O tratamento com a cisplatina causou resposta inflamatória sistêmica e afetou a homeostase redox no coração, porém não afetou a morfologia, perfil inflamatório ou expressão de Gal-3 nesse órgão. Os rins, por outro lado, se mostraram morfológicamente mais sensíveis ao tratamento agudo, fator que não parece ser exclusivamente dependente de Gal-3, uma vez que o nível dessa proteína não aumentou no grupo tratado com a cisplatina. Ainda, a PEC foi suficiente para a depleção dos níveis de Gal-3 nos rins, mas não no coração, demonstrando ser importante para a recuperação tecidual após os danos agudos. Nesse sentido, mais investigações são necessárias para determinar as funções dessa proteína a curto e a longo prazo, uma vez que ela pode exercer tanto papéis benéficos quanto maléficos nos tecidos.

REFERÊNCIAS

ABU-ELSAAD, N. M.; ELKASHEF, W. F. Modified citrus pectin stops progression of liver fibrosis by inhibiting galectin-3 and inducing apoptosis of stellate cells. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 94, n. 5, p. 554-62, May 2016. ISSN 1205-7541. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27010252> >.

ABUZINADAH, M. F.; AHMAD, A. Pharmacological studies on the efficacy of a thymoquinone-containing novel polyherbal formulation against cisplatin-induced hepatorenal toxicity in rats. **J Food Biochem**, v. 44, n. 2, p. e13131, 02 2020. ISSN 1745-4514. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31876968> >.

AIT-AISSA, K. et al. Mitochondrial Oxidative Phosphorylation defect in the Heart of Subjects with Coronary Artery Disease. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 7623, May 20 2019. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31110224> >.

AKAHANI, S. et al. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. **Cancer Res**, v. 57, n. 23, p. 5272-6, Dec 1997. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393748> >.

AL-SALAM, S.; HASHMI, S. Myocardial Ischemia Reperfusion Injury: Apoptotic, Inflammatory and Oxidative Stress Role of Galectin-3. **Cell Physiol Biochem**, v. 50, n. 3, p. 1123-1139, 2018. ISSN 1421-9778. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30355930> >.

AL-SALAM, S. et al. Galectin-3 Possesses Anti-Necroptotic and Anti-Apoptotic Effects in Cisplatin-Induced Acute Tubular Necrosis. **Cell Physiol Biochem**, v. 55, n. 3, p. 344-363, Jun 26 2021. ISSN 1421-9778. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34171186> >.

ANDRADE, F. E. C. et al. Evaluation of galectin-1 and galectin-3 as prospective biomarkers in keratoconus. **Br J Ophthalmol**, v. 102, n. 5, p. 700-707, 05 2018. ISSN 1468-2079. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29439091> >.

BEREITER-HAHN, J. et al. Structural implications of mitochondrial dynamics. **Biotechnol J**, v. 3, n. 6, p. 765-80, Jun 2008. ISSN 1860-7314. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18512869> >.

BIN NAEEM, S. et al. Cisplatin-Induced Bradycardia: A Silent Risk Observed in Two Different Clinical Cases. **Cureus**, v. 13, n. 11, p. e19769, Nov 2021. ISSN 2168-8184. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34950548> >.

BLANDA, V. et al. Galectin-3 in Cardiovascular Diseases. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 23, Dec 2020. ISSN 1422-0067. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33287402> >.

BROZOVIC, A.; AMBRIOVIĆ-RISTOV, A.; OSMAK, M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. **Crit Rev Toxicol**, v. 40, n. 4, p. 347-59, Apr 2010. ISSN 1547-6898. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20163198> >.

CALLEJO, A. et al. Cisplatin-Induced Ototoxicity: Effects, Mechanisms and Protection Strategies. **Toxics**, v. 3, n. 3, p. 268-293, Jul 2015. ISSN 2305-6304. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29051464> >.

CALVIER, L. et al. The impact of galectin-3 inhibition on aldosterone-induced cardiac and renal injuries. **JACC Heart Fail**, v. 3, n. 1, p. 59-67, Jan 2015. ISSN 2213-1787. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25458174> >.

CARRASCO, R. et al. Role of Oxidative Stress in the Mechanisms of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Effects of Preventive Strategies. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2021, p. 8863789, 2021. ISSN 1942-0994. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33574985> >.

CHEN, W. et al. Cardiac Fibroblasts and Myocardial Regeneration. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 9, p. 599928, 2021. ISSN 2296-4185. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33842440> >.

COLNOT, C. et al. Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. **Immunology**, v. 94, n. 3, p. 290-6, Jul 1998. ISSN 0019-2805. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9767409> >.

CORADINI, P. P. et al. Ototoxicity from cisplatin therapy in childhood cancer. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 29, n. 6, p. 355-60, Jun 2007. ISSN 1077-4114. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17551394> >.

D'ORIA, R. et al. The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2020, p. 5732956, 2020. ISSN 1942-0994. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32509147> >.

DE BOER, R. A.; YU, L.; VAN VELDHUISEN, D. J. Galectin-3 in cardiac remodeling and heart failure. **Curr Heart Fail Rep**, v. 7, n. 1, p. 1-8, Mar 2010. ISSN 1546-9549. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20425490> >.

ELIAZ, I.; RAZ, A. Pleiotropic Effects of Modified Citrus Pectin. **Nutrients**, v. 11, n. 11, Nov 2019. ISSN 2072-6643. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31683865> >.

FERNÁNDEZ, G. C. et al. Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways. **Glycobiology**, v. 15, n. 5, p. 519-27, May 2005. ISSN 0959-6658. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15604089> >.

FERRO, C. E. O. et al. [Catalase activity in lung, kidney and small bowel non-ischemic in rats after intestinal reperfusion]. **Rev Col Bras Cir**, v. 37, n. 1, p. 31-8, Feb 2010. ISSN 1809-4546. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20414575> >.

FLOREA, A. M.; BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. **Cancers (Basel)**, v. 3, n. 1, p. 1351-71, Mar 2011. ISSN 2072-6694. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24212665> >.

GE, X. N. et al. Allergen-induced airway remodeling is impaired in galectin-3-deficient mice. **J Immunol**, v. 185, n. 2, p. 1205-14, Jul 2010. ISSN 1550-6606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20543100> >.

_____. Eosinophil-expressed galectin-3 regulates cell trafficking and migration. **Front Pharmacol**, v. 4, p. 37, 2013. ISSN 1663-9812. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23576987> >.

GEHLKEN, C. et al. Galectin-3 in Heart Failure: An Update of the Last 3 Years. **Heart Fail Clin**, v. 14, n. 1, p. 75-92, Jan 2018. ISSN 1551-7136. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29153203> >.

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorg Chem**, v. 88, p. 102925, 07 2019. ISSN 1090-2120. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31003078> >.

GIL, C. D. et al. Inflammation-induced modulation of cellular galectin-1 and -3 expression in a model of rat peritonitis. **Inflamm Res**, v. 55, n. 3, p. 99-107, Mar 2006. ISSN 1023-3830. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16673152> >.

GRUSON, D.; KO, G. Galectins testing: new promises for the diagnosis and risk stratification of chronic diseases? **Clin Biochem**, v. 45, n. 10-11, p. 719-26, Jul 2012. ISSN 1873-2933. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546645> >.

HAUDEK, K. C. et al. Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. **Biochim Biophys Acta**, v. 1800, n. 2, p. 181-9, Feb 2010. ISSN 0006-3002. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19616076> >.

HO, A. S. et al. Neutrophil elastase as a diagnostic marker and therapeutic target in colorectal cancers. **Oncotarget**, v. 5, n. 2, p. 473-80, Jan 30 2014. ISSN 1949-2553. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24457622> >.

HSU, D. K. et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. **Am J Pathol**, v. 156, n. 3, p. 1073-83, Mar 2000. ISSN 0002-9440. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10702423> >.

HU, Y. et al. Cisplatin-induced cardiotoxicity with midrange ejection fraction: A case report and review of the literature. **Medicine (Baltimore)**, v. 97, n. 52, p. e13807, Dec 2018. ISSN 1536-5964. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30593170> >.

IBARROLA, J. et al. Beneficial Effects of Galectin-3 Blockade in Vascular and Aortic Valve Alterations in an Experimental Pressure Overload Model. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 8, Jul 2017. ISSN 1422-0067. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28758988> >.

_____. Myocardial Injury After Ischemia/Reperfusion Is Attenuated By Pharmacological Galectin-3 Inhibition. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 9607, 07 2019. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31270370> >.

IKEDA, Y. et al. Role of ferroptosis in cisplatin-induced acute nephrotoxicity in mice. **J Trace Elem Med Biol**, v. 67, p. 126798, Sep 2021. ISSN 1878-3252. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34087581> >.

IŞERI, S. et al. Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. **Toxicology**, v. 230, n. 2-3, p. 256-64, Feb 12 2007. ISSN 0300-483X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17196726> >.

JENG, K. C.; FRIGERI, L. G.; LIU, F. T. An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes. **Immunol Lett**, v. 42, n. 3, p. 113-6, Oct 1994. ISSN 0165-2478. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7890309> >.

KHADRAWY, Y. A. et al. The Effect of Curcumin Nanoparticles on Cisplatin-Induced Cardiotoxicity in Male Wistar Albino Rats. **Cardiovasc Toxicol**, v. 21, n. 6, p. 433-443, 06 2021. ISSN 1559-0259. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33548025> >.

KOLATSI-JOANNOU, M. et al. Modified citrus pectin reduces galectin-3 expression and disease severity in experimental acute kidney injury. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18683, Apr 08 2011. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21494626> >.

LE GAL, K.; SCHMIDT, E. E.; SAYIN, V. I. Cellular Redox Homeostasis. **Antioxidants (Basel)**, v. 10, n. 9, Aug 28 2021. ISSN 2076-3921. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34573009> >.

LI, H. Y. et al. Galectin 3 inhibition attenuates renal injury progression in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Biosci Rep**, v. 38, n. 6, 12 2018. ISSN 1573-4935. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30455396> >.

LIU, W. et al. Cisplatin-stimulated macrophages promote ovarian cancer migration via the CCL20-CCR6 axis. **Cancer Lett**, v. 472, p. 59-69, 03 01 2020. ISSN 1872-7980. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31866467> >.

LUBRANO, V.; BALZAN, S. Role of oxidative stress-related biomarkers in heart failure: galectin 3, α 1-antitrypsin and LOX-1: new therapeutic perspective? **Mol Cell Biochem**, v. 464, n. 1-2, p. 143-152, Jan 2020. ISSN 1573-4919. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31782085> >.

LUCCHI, D. B. M. et al. The role of annexin A1-derived peptide Ac. **Life Sci**, v. 304, p. 120677, Sep 01 2022. ISSN 1879-0631. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35654117> >.

MARBACK, P. M. et al. [Epidemiological and clinical features of allergic conjunctivitis in a reference center]. **Arq Bras Oftalmol**, v. 70, n. 2, p. 312-6, 2007 Mar-Apr 2007. ISSN 0004-2749. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17589705> >.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, E. et al. Galectin-3 blockade inhibits cardiac inflammation and fibrosis in experimental hyperaldosteronism and hypertension. **Hypertension**, v. 66, n. 4, p. 767-75, Oct 2015. ISSN 1524-4563. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26238446> >.

_____. Galectin-3 inhibition prevents adipose tissue remodelling in obesity. **Int J Obes (Lond)**, v. 40, n. 6, p. 1034-8, 06 2016. ISSN 1476-5497. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26853916> >.

_____. Galectin-3 pharmacological inhibition attenuates early renal damage in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**, v. 36, n. 2, p. 368-376, 02 2018. ISSN 1473-5598. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28858976> >.

_____. Galectin-3 Participates in Cardiovascular Remodeling Associated With Obesity. **Hypertension**, v. 66, n. 5, p. 961-9, Nov 2015. ISSN 1524-4563. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26351031> >.

MATARRESE, P. et al. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. **Int J Cancer**, v. 85, n. 4, p. 545-54, Feb 2000. ISSN 0020-7136. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699929> >.

MEILHAC, O. et al. Lipid peroxides induce expression of catalase in cultured vascular cells. **J Lipid Res**, v. 41, n. 8, p. 1205-13, Aug 2000. ISSN 0022-2275. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10946007> >.

NISHIYAMA, J. et al. Up-regulation of galectin-3 in acute renal failure of the rat. **Am J Pathol**, v. 157, n. 3, p. 815-23, Sep 2000. ISSN 0002-9440. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10980121> >.

OUN, R.; ROWAN, E. Cisplatin induced arrhythmia; electrolyte imbalance or disturbance of the SA node? **Eur J Pharmacol**, v. 811, p. 125-128, Sep 15 2017. ISSN 1879-0712. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28599874> >.

POWIS, G. Effect of human renal and hepatic disease on the pharmacokinetics of anticancer drugs. **Cancer Treat Rev**, v. 9, n. 2, p. 85-124, Jun 1982. ISSN 0305-7372. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6181872> >.

PRUD'HOMME, M. et al. Acute Kidney Injury Induces Remote Cardiac Damage and Dysfunction Through the Galectin-3 Pathway. **JACC Basic Transl Sci**, v. 4, n. 6, p. 717-732, Oct 2019. ISSN 2452-302X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31709320> >.

RADOSAVLJEVIC, G. et al. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. **Immunol Res**, v. 52, n. 1-2, p. 100-10, Apr 2012. ISSN 1559-0755. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22418727> >.

RAJA, W. et al. Cisplatin induced paroxysmal supraventricular tachycardia. **Indian J Med Paediatr Oncol**, v. 34, n. 4, p. 330-2, Oct 2013. ISSN 0971-5851. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24604969> >.

RAMKUMAR, V. et al. Oxidative Stress and Inflammation Caused by Cisplatin Ototoxicity. **Antioxidants (Basel)**, v. 10, n. 12, Nov 29 2021. ISSN 2076-3921. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34943021> >.

RAO, S. P. et al. Galectin-3 functions as an adhesion molecule to support eosinophil rolling and adhesion under conditions of flow. **J Immunol**, v. 179, n. 11, p. 7800-7, Dec

2007. ISSN 0022-1767. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18025226> >.

RONCO, C. et al. Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the acute dialysis quality initiative. **Eur Heart J**, v. 31, n. 6, p. 703-11, Mar 2010. ISSN 1522-9645. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20037146> >.

RYBERG, M. Recent advances in cardiotoxicity of anticancer therapies. **Am Soc Clin Oncol Educ Book**, p. 555-9, 2012. ISSN 1548-8748. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24451795> >.

SABBATINO, F. et al. Molecules and Mechanisms to Overcome Oxidative Stress Inducing Cardiovascular Disease in Cancer Patients. **Life (Basel)**, v. 11, n. 2, Jan 2021. ISSN 2075-1729. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33573162> >.

SAMADI, M. et al. The role of taurine on chemotherapy-induced cardiotoxicity: A systematic review of non-clinical study. **Life Sci**, v. 265, p. 118813, Jan 2021. ISSN 1879-0631. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33275984> >.

SANO, H. et al. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. **J Clin Invest**, v. 112, n. 3, p. 389-97, Aug 2003. ISSN 0021-9738. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12897206> >.

_____. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. **J Immunol**, v. 165, n. 4, p. 2156-64, Aug 2000. ISSN 0022-1767. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10925302> >.

SCHLUMBRECHT, M. P.; HEHR, K. Cisplatin-induced bradycardia and the importance of the QT interval. **J Oncol Pharm Pract**, v. 21, n. 2, p. 157-60, Apr 2015. ISSN 1477-092X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24557923> >.

SENA, L. S. et al. Pharmacological treatment with annexin A1-derived peptide protects against cisplatin-induced hearing loss. **Toxicol Lett**, v. 363, p. 27-35, May 10 2022. ISSN 1879-3169. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35561849> >.

SUTHAHAR, N. et al. Galectin-3 Activation and Inhibition in Heart Failure and Cardiovascular Disease: An Update. **Theranostics**, v. 8, n. 3, p. 593-609, 2018. ISSN 1838-7640. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29344292> >.

SZEWCZYK, A. et al. Mitochondrial mechanisms of endothelial dysfunction. **Pharmacol Rep**, v. 67, n. 4, p. 704-10, Aug 2015. ISSN 1734-1140. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26321271> >.

TAN, Y. C. et al. Apocynin and catalase prevent hypertension and kidney injury in Cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats. **PLoS One**, v. 15, n. 4, p. e0231472, 2020. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32298299> >.

TSANG, R. Y.; AL-FAYEA, T.; AU, H. J. Cisplatin overdose: toxicities and management. **Drug Saf**, v. 32, n. 12, p. 1109-22, 2009. ISSN 1179-1942. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19916578> >.

TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S. Oxidative stress and heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 301, n. 6, p. H2181-90, Dec 2011. ISSN 1522-1539. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21949114> >.

WANG, J. L. et al. Nucleocytoplasmic lectins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1673, n. 1-2, p. 75-93, Jul 2004. ISSN 0006-3002. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15238251> >.

WONG, H. S. et al. Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions. **J Biol Chem**, v. 292, n. 41, p. 16804-16809, 10 13 2017. ISSN 1083-351X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28842493> >.

YU, F. et al. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. **J Biol Chem**, v. 277, n. 18, p. 15819-27, May 2002. ISSN 0021-9258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839755> >.

YU, T. B. et al. Serum galectins as potential biomarkers of inflammatory bowel diseases. **PLoS One**, v. 15, n. 1, p. e0227306, 2020. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31929564> >.

ZHANG, M. et al. Galectin-3 knock down inhibits cardiac ischemia-reperfusion injury through interacting with bcl-2 and modulating cell apoptosis. **Arch Biochem Biophys**, v. 694, p. 108602, 11 2020. ISSN 1096-0384. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32980351> >.

ZHOU, B.; TIAN, R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. **J Clin Invest**, v. 128, n. 9, p. 3716-3726, 08 31 2018. ISSN 1558-8238. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30124471> >.

ZHOU, H.; TOAN, S. Pathological Roles of Mitochondrial Oxidative Stress and Mitochondrial Dynamics in Cardiac Microvascular Ischemia/Reperfusion Injury. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, 01 05 2020. ISSN 2218-273X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31948043> >.

ZUBERI, R. I.; FRIGERI, L. G.; LIU, F. T. Activation of rat basophilic leukemia cells by epsilon BP, an IgE-binding endogenous lectin. **Cell Immunol**, v. 156, n. 1, p. 1-12, Jun 1994. ISSN 0008-8749. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8200029> >.

ANEXO 1: Comprovante de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DE INIBIÇÃO DA PROTEÍNA GALECTINA-3 NA TOXICIDADE CARDÍACA E RENAL INDUZIDA PELA CISPLATINA EM RATOS", protocolada sob o CEUA nº 5338060422 (ID 011539), sob a responsabilidade de **Cristiane Damas Gil e equipe; Cristiane Damas Gil; Gisela Rodrigues da Silva Sasso; Nycole Morelli Belote; Diego Dias dos Santos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 14/04/2022.

We certify that the proposal "Effect of galectin-3 protein inhibition on cisplatin-induced cardiac and renal toxicity in rats", utilizing 0 Heterogenics rats (), protocol number CEUA 5338060422 (ID 011539), under the responsibility of **Cristiane Damas Gil and team; Cristiane Damas Gil; Gisela Rodrigues da Silva Sasso; Nycole Morelli Belote; Diego Dias dos Santos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 04/14/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [05/2022](#) a [01/2023](#)

Área: [Histologia E Biologia Estrutural/morfologia E Genética](#)

Origem: [Amostras biológicas estocadas](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [60 a 70 dias](#)

N: [0](#)

Linhagem: [WISTAR](#)

Peso: [200 a 250 g](#)

Local do experimento: Não será necessário o uso de animais para execução deste projeto. As amostras já foram coletadas no projeto intitulado "Efeito de inibição da proteína galectina-3 na toxicidade hepática induzida pela cisplatina em ratos", aprovado pela CEUA da UNIFESP (nº 5533211220) em 20/01/2021.

São Paulo, 20 de dezembro de 2022

Prof. Dra. Daniela Santoro Rosa
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dra. Kátia De Angelis Lobo d'Avila
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo