

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

RENATA LINS CARNEIRO LEÃO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE INIBIDORES DA GALECTINA-3  
EM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO HEPÁTICA CRÔNICA

RECIFE

2015

Renata Lins Carneiro Leão

**Avaliação do potencial terapêutico de inibidores da Galectina-3 em modelo experimental de lesão hepática crônica**

Dissertação apresentada ao curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

**Orientadora:** Dra. Sheilla Andrade de Oliveira

**Co-orientador:** Msc. Bruno Solano de Freitas Souza

RECIFE

2015

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

---

L437a Leão, Renata Lins Carneiro.  
Avaliação do potencial terapêutico de inibidores da Galectina-3 em modelo experimental de lesão hepática crônica / Renata Lins Carneiro Leão. - Recife: [s.n.], 2015.  
68 p. : ilus., graf.

Mestrado (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

Orientadora: Sheilla Andrade de Oliveira;  
co-orientador: Bruno Solano de Freitas Souza.

1. Fibrose hepática. 2. Pectinas. 3. Galectina-3. 4. Quimioterapia. 1. Oliveira, Sheilla Andrade de. 2. Souza, Bruno Solano de Freitas. III. Título.

---

CDU 616-003.6

Renata Lins Carneiro Leão

**Avaliação do potencial terapêutico de inibidores da Galectina-3 em modelo experimental de lesão hepática crônica**

Dissertação apresentada ao curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 27/03/2015

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Sheilla Andrade de Oliveira  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

---

Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

---

Dr. Fábio Lopes de Melo  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre olhou por mim e me guiou em todas as decisões até hoje tomadas. Por escutar meus apelos e me dar forças para seguir em frente, sempre que preciso. Por abençoar minha vida e nunca permitir que me faltasse nada.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para me fazer feliz. Agradeço por todo amor, carinho e preocupação. Pela educação que sempre me ofereceram e que me possibilitou chegar até aqui e concluir mais uma etapa importante na minha vida.

Ao meu irmão André, pela convivência diária e companheirismo.

Aos meus avós, por todas as orações, cuidados, carinho e afeto. Em especial a minha avó Vitória, pelo seu amor incondicional, por ser com certeza uma segunda mãe para mim. Obrigada por toda preocupação, ligação diária, as quais muitas vezes, pela correria do dia-a-dia, eu não dava o devido valor, mas que hoje me fazem muita falta.

À minha orientadora Dra. Sheilla Andrade de Oliveira, por todos os ensinamentos, dedicação, e por todo o esforço realizado para que este trabalho fosse terminado com sucesso. Obrigada por toda ajuda e suporte oferecido, mesmo com tantas responsabilidades da chefia do departamento. Também não poderia deixar de agradecer por toda convivência, amizade e palavras de conforto durante estes dois anos de mestrado.

Ao meu co-orientador Bruno Solano, por todo o suporte necessário para a conclusão deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular, Carolline Guimarães, Carlos Miranda e Míria Barbosa, que contribuíram de forma direta para a realização deste trabalho. Em especial a Roni Evêncio, por toda dedicação no meu projeto, incluindo as várias horas de morfometria; e a Veruska Alexandrino, por todo o auxílio e ensinamentos passados quando eu era a recém chegada no laboratório. por estar presente em todos os meus experimentos, por me ajudar sempre que precisei e por ir ao Aggeu comigo em pleno carnaval. Isto sim é amizade!

Aos colaboradores do Hospital São Rafael (BA) que contribuíram imensamente na reta final deste trabalho. Em especial a Dra. Milena Soares, por me receber tão bem no seu laboratório e na sua casa e a Dra. Carine Azevedo e Msc.

Daniela Nascimento, que mesmo com outras atividades, dedicaram dias para auxiliar na conclusão desta etapa.

Aos Obreiros, Camila Cavalcanti, Sávio Vieira, Elisa Almeida, Lígia Figueiredo, Renan Garcia, Heitor Neco, Rossana Nascimento e João Ramos, por todos os momentos compartilhados, histórias e risadas. Com certeza, o mestrado não seria o mesmo sem vocês.

A todos os amigos, em especial a Mariana Almeida, Rayza Miranda, Ana Luiza Villena, Gabriela Perez, Camila Almeida, Mellissa Santos, Tauane Mathias, Diego Carvalho, Paula Leite e Amanda Monteiro, por toda paciência e compreensão pela minha ausência nestes últimos dois anos. Obrigada por todas as vezes que me ouviram desabafar e me animaram, e por todos os momentos de alegria que me proporcionaram.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e a Fundação Oswaldo Cruz, por toda a infraestrutura e material necessário para realização da pesquisa, além do auxílio financeiro concedido.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde, por todo o conhecimento proporcionado, o qual foi fundamental para o meu crescimento profissional.

A todos, meu eterno obrigada!

LEÃO, Renata Lins Carneiro. Avaliação do potencial terapêutico de inibidores da Galectina-3 em modelo experimental de lesão hepática crônica. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

## RESUMO

As lesões crônicas do fígado são resultantes de agressões persistentes, onde a desorganização e destruição do tecido podem desencadear processos de regeneração e fibrose. Para que a integridade e homeostase do órgão sejam restauradas, várias vias intracelulares e intercelulares são ativadas. Uma delas é a através da liberação de moléculas pró-fibrogênicas, a exemplo da lectina solúvel b-galactosídeo, a galectina-3 (Gal-3). A alta expressão dessa lectina tem sido associada a fibrogênese no fígado. A descoberta de moléculas capazes de se ligar à Gal-3 e inibir a sua ação são importantes no desenvolvimento de terapias anti-fibrosantes. A pectina cítrica modificada (PCM) e a N-acetilactosamina (LacNAc) demonstraram ação benéfica no tratamento de doenças fibróticas, incluindo renais e cardíacas, contudo, pouco se sabe sobre suas eficácias na fibrose hepática. Diante disso, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos das administrações da PCM e LacNAc quanto aos níveis de Gal-3 e fibrose em modelo experimental de lesão hepática crônica. Inicialmente, a fibrose hepática foi induzida em camundongos C57BL/6 pela administração de tetracloreto de carbono a 20% diluído em azeite de oliva. Grupos de camundongos com dois ou quatro meses de lesão foram tratados com PCM (1% e 5%, fornecida *ad libitum*) e com LacNAc, por via intraperitoneal. Adicionalmente, camundongos knockouts para o gene da Gal-3 (Gal-3<sup>-/-</sup>) foram utilizados como um controle. Subsequentemente às intervenções, análises morfométricas, bioquímicas, imunológicas e de biologia molecular foram realizadas. Na análise morfométrica, não se verificou alteração no percentual de tecido fibroso entre os grupos tratados com PCM (1% e 5%) ou LacNAc quando comparados com seus respectivos controles, o que foi confirmado pela dosagem dos níveis de hidroxiprolina. Adicionalmente, não foi observada alteração dos níveis de Gal-3, MMP-9 e TIMP-1 após tratamento com os inibidores. Os resultados obtidos indicaram que a PCM e a LacNAc não foram capazes de inibir a Gal-3 no fígado, e portanto, não interferiram na deposição de tecido fibroso nesse modelo experimental.

Palavras-chaves: Fibrose Hepática; Pectinas; Galectina-3; Quimioterapia.

LEÃO, Renata Lins Carneiro. Avaliação do potencial terapêutico de inibidores da Galectina-3 em modelo experimental de lesão hepática crônica. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

## ABSTRACT

Chronic liver injuries are the result of persistent damages, in which the disorganization and destruction of tissue can trigger the regeneration processes and fibrosis. In order to restore the integrity and organ homeostasis, various intracellular and intercellular pathways are activated. One is through the release of pro-fibrogenic molecules, such as the beta-galactoside-binding lectin, the galectin-3 (Gal-3). The high expression of this lectin has been associated with liver fibrogenesis. The discovery of molecules capable of binding Gal-3 and inhibit their activity are important in the development of anti-fibrotic therapies. Modified citrus pectin (MCP) and N-acetyllactosamine (LacNAc) showed beneficial effects in treating fibrotic diseases, including kidney and heart diseases, however, little is known about their efficacy in liver fibrosis. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of administration of MCP and LacNAc in the levels of Gal-3 and fibrosis in an experimental model of chronic liver injury. Initially, hepatic fibrosis was induced in C57BL/6 mice by administration of carbon tetrachloride diluted to 20% in olive oil. The mice groups with two or four months of injury were treated with MCP (1% and 5%, provided *ad libitum*) and LacNAc, intraperitoneally. In addition, Gal-3 knockouts mice (Gal-3<sup>-/-</sup>) were used as a control. After the interventions, morphometric, biochemical, immunological and molecular biology analysis were performed. In the morphometric analysis, there was no change in the percentage of fibrous tissue between the groups treated with MCP (1% and 5%) or LacNAc when compared to their respective controls, which was confirmed by measurement of hydroxyproline levels. Additionally, there was no change in the levels of Gal-3, MMP-9 and TIMP-1, after treatment with the inhibitors. The results indicated that the MCP and LacNAc were not able to inhibit Gal-3 in the liver and, therefore, did not affect the deposition of fibrous tissue in this experimental model.

Keywords: Hepatic fibrosis; Pectins; Galectin -3; Chemotherapy.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Esquema do mecanismo geral da fibrogênese hepática.	<b>16</b>
<b>Figura 2-</b>	Participação da CEH na patogênese da fibrose hepática.	<b>18</b>
<b>Figura 3-</b>	Representação esquemática da estrutura da Galectina-3.	<b>21</b>
<b>Figura 4-</b>	Funções da Gal-3 a depender da sua localização tecidual.	<b>23</b>
<b>Figura 5-</b>	Papel da Gal-3 na fibrogênese tissular.	<b>24</b>
<b>Figura 6-</b>	Estrutura química de LacNAc.	<b>29</b>
<b>Figura 7-</b>	Quantificação do percentual de tecido fibroso do experimento utilizando a terapia com PCM 5%.	<b>39</b>
<b>Figura 8-</b>	Imagens de cortes histológicos de fígados de camundongos corados com picosírius para avaliação das fibras colágenas dos grupos do experimento utilizando a terapia com PCM a 5%.	<b>40</b>
<b>Figura 9-</b>	Dosagem de hidroxiprolina do experimento utilizando a terapia com PCM a 5%.	<b>41</b>
<b>Figura 10-</b>	Quantificação do percentual de tecido fibroso e dosagem de hidroxiprolina do experimento utilizando a terapia com PCM 1%.	<b>42</b>
<b>Figura 11-</b>	Quantificação do percentual de tecido fibroso e dosagem de hidroxiprolina do experimento utilizando a terapia com LacNAc.	<b>43</b>

- Figura 12** Imagens de cortes histológicos de fígados de camundongos corados com picosírius para avaliação das fibras colágenas dos grupos do experimento utilizando a terapia com LacNAc. **43**
- Figura 13** Imagens de cortes histológicos de fígados de camundongos corados com picosírius para avaliação das fibras colágenas dos grupos do experimento utilizando a terapia com LacNAc. **44**
- Figura 14-** Imagens de cortes histológicos de fígados de camundongos WT e Gal-3<sup>-/-</sup> corados com picosírius para avaliação das fibras colágenas. **45**
- Figura 15-** Análise da expressão gênica da Gal-3 no fígado de camundongos com lesão hepática crônica, após tratamento com os inibidores de Gal-3. **46**
- Figura 16-** Análise da expressão gênica de TIMP-1 no fígado de camundongos com lesão hepática crônica, após tratamento com os inibidores de Gal-3. **47**
- Figura 17-** Análise da expressão gênica de MMP-9 no fígado de camundongos com lesão hepática crônica, após tratamento com os inibidores de Gal-3. **48**
- Figura 18-** Quantificação da Gal-3, pela técnica de imunofluorescência, no fígado de camundongos com lesão hepática, após tratamento com PCM 5% e LacNAc. **49**
- Figura 19-** Imunofluorescência para a Gal-3 no fígado de camundongos com lesão hepática crônica, após tratamento com os inibidores de Gal-3. **50**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$ -SMA	Alfa-Actina de Músculo Liso
BSA	Albumina de soro bovino
CCl <sub>4</sub>	Tetracloroeto de Carbono
cDNA	DNA complementar
CEH	Célula Estrelada Hepática
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Desoxiribonucleotídeos fosfatados
DRC	Domínio Reconhecedor de Carboidratos
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
FGF	Fator de Crescimento de Fribroblastos
Gal-3	Galectina-3
Gal-3 <sup>-/-</sup>	Camundongos knockouts para o gene da Gal-3
HCV	Vírus da Hepatite C
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon-gama
LacNAc	N-acetilactosamina
LPS	Lipopolissacarídeo
MEC	Componentes da Matrix Extracelular
MMP	Metaloproteinases
NO	Óxido Nítrico
PBS	Tampão fosfato salina
PCM	Pectina Cítrica Modificada
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

RNA	Ácido ribonucléico
SBH	Sociedade Brasileira de Hematologia
siRNA	Pequenos RNAs de interferência
snRNA	Small hairpin RNA
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Tumoral-beta
TIMP	Inibidor Tissular de Metaloproteinases
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral-alfa
WT	Wild type (selvagem)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Fibrogênese hepática</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Terapias antifibróticas e novas abordagens</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>Galectina-3: estrutura, distribuição e função</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>Gal-3 e fibrogênese</b> .....	<b>24</b>
<b>2.5</b>	<b>Gal-3 e a ativação alternativa de macrófagos</b> .....	<b>26</b>
<b>2.6</b>	<b>Inibidores de Gal-3: Pectina Cítrica Modificada e N-acetilactosamina</b> .....	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
<b>5.1</b>	<b>Animais</b> .....	<b>33</b>
<b>5.2</b>	<b>Grupos experimentais</b> .....	<b>33</b>
<b>5.3</b>	<b>Indução da lesão hepática pela administração crônica de CCl<sub>4</sub></b> .....	<b>34</b>
<b>5.4</b>	<b>Administração dos inibidores de Gal-3</b> .....	<b>35</b>
<b>5.5</b>	<b>Morfometria</b> .....	<b>35</b>
<b>5.6</b>	<b>Dosagem de hidroxiprolina</b> .....	<b>35</b>
<b>5.7</b>	<b>RTqPCR para os alvos Gal-3, TIMP-1 e MMP-9</b> .....	<b>36</b>
<b>5.8</b>	<b>Imunofluorescência para Gal-3</b> .....	<b>37</b>
<b>5.9</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>37</b>
<b>5.10</b>	<b>Aspectos éticos</b> .....	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<b>6.1</b>	<b>Avaliação do tecido fibroso</b> .....	<b>39</b>
<b>6.2</b>	<b>Avaliação da expressão gênica da Gal-3, TIMP-1 e MMP-9</b> .....	<b>45</b>
<b>6.2.1</b>	<b>Gal-3</b> .....	<b>45</b>
<b>6.2.2</b>	<b>TIMP-1</b> .....	<b>46</b>
<b>6.2.3</b>	<b>MMP-9</b> .....	<b>47</b>
<b>6.3</b>	<b>Análise dos níveis da proteína Gal-3 por imunofluorescência</b> .....	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>

<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As hepatopatias são decorrentes de diferentes etiologias, e têm gerado uma curva ascendente de morbimortalidade em todo o mundo (LEE; FRIEDMAN, 2011). As causas mais comuns das doenças hepáticas são as hepatites virais, o consumo excessivo do álcool e a doença hepática gordurosa associada à obesidade (HERNANDES-GEA; FRIEDMAN, 2011; LEE; FRIEDMAN, 2011).

De uma forma geral, lesões hepáticas persistentes resultam em desorganização e destruição tecidual. Para restaurar a homeostase dos tecidos, vias intracelulares e intercelulares são ativadas no intuito de promover o reparo hepático. No sistema de reparo, mecanismos pró fibrogênicos estão envolvidos no processo de cicatrização (WICK et al., 2013). Uma das moléculas envolvidas é uma lectina solúvel b-galactosídea, a galectina-3 (Gal-3). Essa lectina participa em uma variedade de processos, tanto fisiológicos quanto patológicos, incluindo uma interação entre inflamação e fibrogênese (SASAKI, 1999).

Através de ensaios *in vitro*, verificou-se que a Gal-3 está presente em diversos processos biológicos, tais como proliferação celular (MOUTSATSOS et al., 1987; INOHARA et al., 1998), apoptose, resposta inflamatória (COLNOT et al., 1998; HSU et al., 2000) e fibrogênese (HSU et al., 1999). Os trabalhos *in vivo*, por sua vez, comprovaram o papel da Gal-3 na proliferação das células mesangiais e progressão da doença renal inflamatória (SASAKI et al., 1999); na patogênese da disfunção cardíaca, atuando de forma direta na regulação da fibrose cardíaca e remodelamento (LOK et al., 2010); como mediador inflamatório em lesões agudas do fígado (DRAGOMIR et al., 2012); na patogênese hepática crônica onde animais com deleção do gene da Gal-3 apresentaram uma menor ativação de células estreladas e uma diminuição na deposição de colágeno (HENDERSON et al., 2006); Em estudos do nosso grupo com animais cirróticos submetidos a terapia com célula-tronco, foi observada a redução da expressão da Gal-3 nos camundongos que obtiveram melhora hepática após terapia (OLIVEIRA et al., 2012)

Uma vez que a Gal-3 está sendo relacionada com a patogênese de diversas doenças, incluindo as hepatopatias, seria relevante o desenvolvimento de metodologias capazes de bloquear a atividade dessa lectina. Experimentalmente, isto pode ser realizado através de algumas ferramentas, dentre elas a administração de moléculas capazes de se ligar à Gal-3 e inibir a sua ação, como é o caso da

pectina cítrica modificada (PCM) e da N-acetilactosamina (LacNAc). A PCM é um inibidor natural da Gal-3 que pode ser administrado por via oral e vem sendo utilizado principalmente em estudos em modelos experimentais oncológicos, bem como em alguns estudos clínicos em pacientes com câncer (MORRIS et al., 2013). A LacNAc, por sua vez, é um carboidrato sintético, que tem apresentado efeito benéfico em modelos experimentais de fibrose em diferentes órgãos, tais como rim e coração (FRENAY et al., 2014; YU et al., 2013).

O presente trabalho adotou um desenho de estudo, no qual, grupos de camundongos com lesão crônica do fígado foram submetidos ao tratamento com os inibidores de Gal-3, PCM e LacNAc. Adicionalmente, camundongos knockouts para o gene da Gal-3 ( $Gal-3^{-/-}$ ) foram utilizados como um controle dos experimentos. Subsequentemente às intervenções, diversos parâmetros foram avaliados, como expressão de Gal-3 e quantificação de fibrose e seus mediadores. Pretendemos com esse estudo confirmar o envolvimento da Gal-3 na patogênese da doença hepática e investigar o potencial terapêutico dos inibidores PCM e LacNAc, em lesões de fígado.



## 2 REFERENCIALTEÓRICO

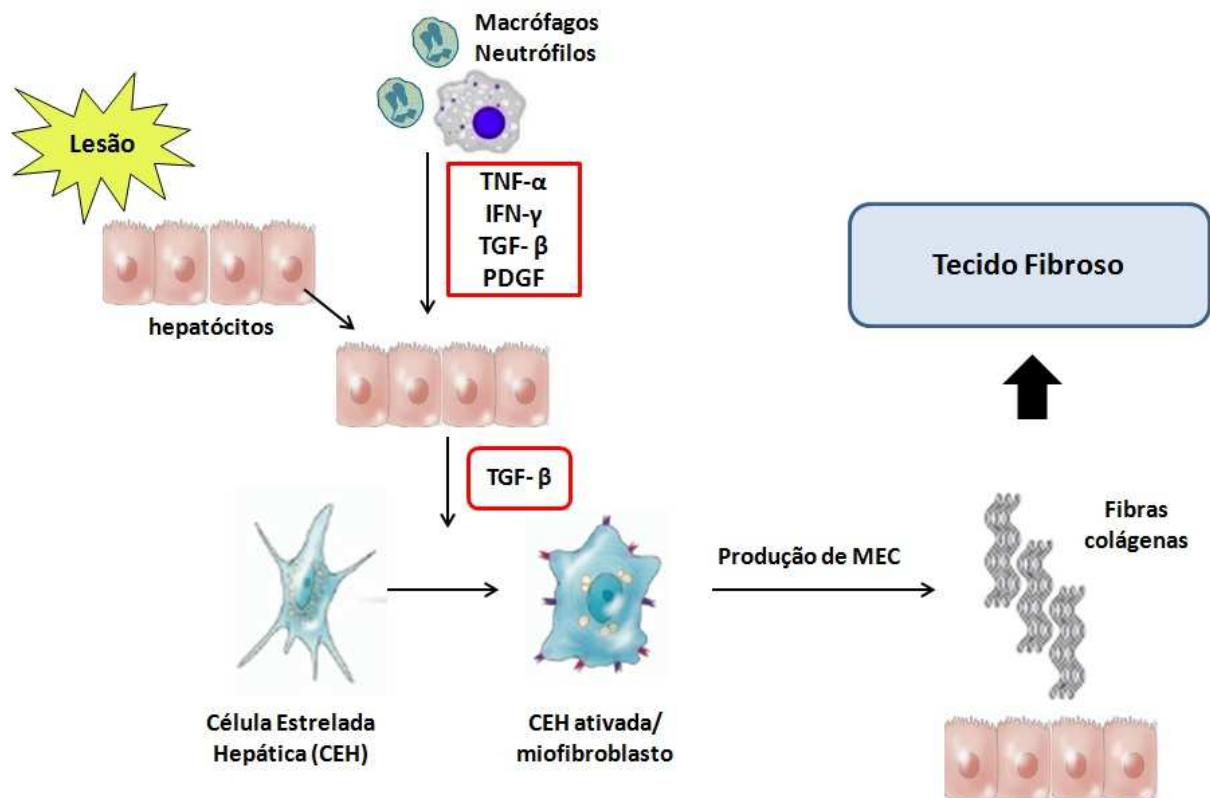
### 2.1 Fibrogênese hepática

A fibrose hepática é um processo dinâmico que se inicia como uma resposta a estímulos agressores, que quando persistentes, levam a deposição exacerbada de matriz extracelular (MEC) e consequente substituição do parênquima hepático por tecido de cicatrização (ROCKEY, 2013). As hepatites virais B e C são as causas mais frequentes de lesão no fígado, com uma estimativa de 350 e 170 milhões de indivíduos infectados, respectivamente (CUSTER et al., 2004). O consumo excessivo do álcool é outro fator comum de lesão crônica hepática, e seu uso contínuo, muitas vezes associado às infecções virais, levam o paciente a progredir para o estágio de cirrose, hepatocarcinoma e insuficiência hepática (MILLER et al., 2011). Dentre outros fatores que promovem a fibrogênese hepática pode-se citar: esteatose (DAS et al., 2010), hepatite autoimune (LIM et al., 2008), obstrução do ducto biliar, infecções parasitárias (a exemplo das causadas pelo *Schistosoma mansoni*) (ANDERSSON; CHUNG, 2007) e desordens metabólicas tais como hemocromatose e a doença de Wilson (LEFKOWITCH, 2006).

Lesões hepáticas persistentes ativam o processo de reparo que tenta restabelecer o órgão morfofuncionalmente. De uma forma geral, quando o fígado sofre alguma agressão, células inflamatórias e residentes, como as células de Kupffer, são recrutadas e passam a liberar citocinas, tais como Fator de Crescimento Tumoral- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e outros agentes quimiotáticos que regulam a resposta inflamatória e estimulam a fibrogênese hepática (HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011). A fibrogênese se deve, principalmente, à ativação e alteração fenotípica das células estreladas hepáticas (CEHs), que em estado normal encontram-se quiescentes no espaço perisinusoidal de Disse (CASSIMAN et al., 2002; JIANG; TÖRÖK, 2013). Quando são ativadas, as CEHs liberam seus depósitos de vitamina A e adquirem um fenótipo semelhante à miofibroblasto, passando a expressar alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e produzir componentes da matriz extracelular (MEC) em grandes quantidades (HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011; JIANG; TÖRÖK, 2013). Em lesões crônicas avançadas, o fígado apresenta um aumento considerável dos componentes da MEC incluindo colágenos, principalmente colágenos dos tipos I e III, glicoproteínas e

proteoglicanas, que passam a preencher espaços que, anteriormente à lesão, eram ocupados por tecidos íntegros (IREDALE, 2007; TSUKADA; PARSONS; RIPPE, 2006). Um esquema ilustrativo do mecanismo geral da formação de fibrose no fígado pode ser visto a seguir, na figura 1.

**Figura 1-** Esquema do mecanismo geral da fibrogênese hepática.



**Fonte:** Adaptado de Friedman (2008) e Mormone, George e Nieto (2011).

**Nota:** Após uma agressão tecidual, células inflamatórias, como os neutrófilos e macrófagos, são recrutadas para o local de lesão e passam a secretar citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IFN-γ) e pró-fibrogênicas (TGF-β e PDGF). Principalmente pela ação do TGF-β, as CEHs são ativadas, adquirem um fenótipo de miofibroblasto e passam a secretar componentes da matriz extracelular. Quando os estímulos agressores persistem, ocorre uma deposição excessiva deste tecido de cicatrização, dando origem à fibrose.

Além das CEHs (ROCKEY, 2006), outras células estão envolvidas no desenvolvimento de fibrose no fígado, dentre elas estão os fibroblastos periportais (DRANOFF et al., 2007), fibrócitos (KISSELEVA et al., 2006) e miofibroblastos (KALLURI; NEILSON, 2003; KAIMORI et al., 2007).

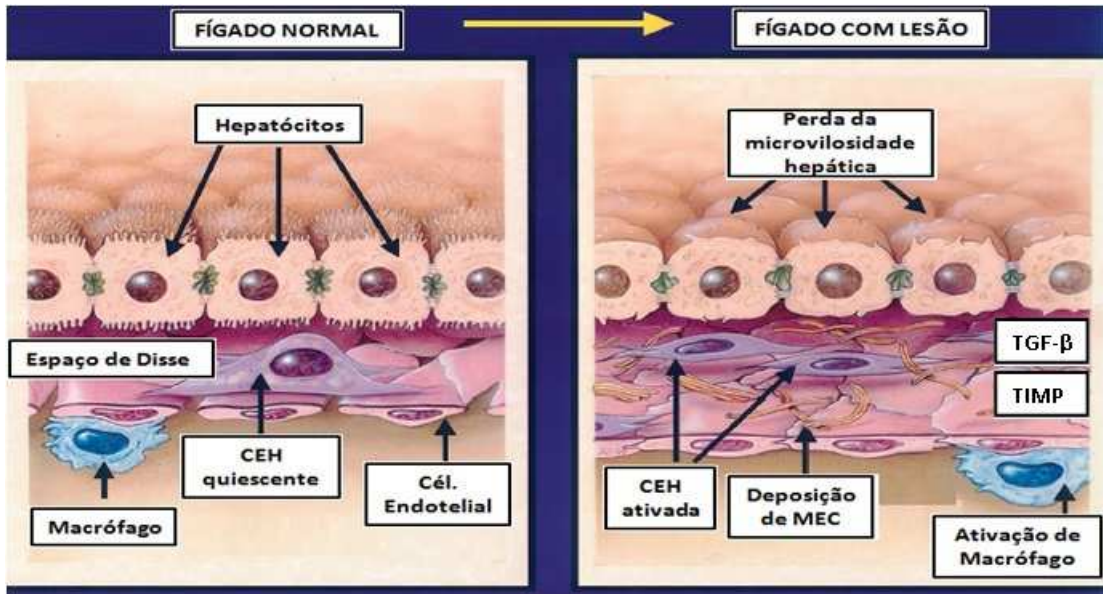
No fígado, a estabilidade dos componentes da matriz extracelular é regulada por enzimas responsáveis pela degradação da MEC, denominadas de

Metaloproteinases (MMP), e por seus inibidores específicos (TIMPs, do inglês *tissue inhibitors of metalloproteinases*) (DUARTE et al., 2015). Quando ocorre dano ao tecido, o equilíbrio funcional é prejudicado e há alterações nos processos de fibrogênese e de fibrólise, resultando em um acúmulo do tecido fibroso (IREDALE; THOMPSON; HENDERSON, 2013). A MMP-9 (gelatinase B), juntamente com a MMP-13, são as principais enzimas que promovem a degradação da MEC, e sua ativação pode ser bloqueada pelos inibidores TIMP-1 e TIMP-2, respectivamente (KURZEPA et al., 2014).

Em lesões hepáticas crônicas, é observado um aumento dos níveis de TIMP-1 e este fenômeno está associado à inibição da atividade de degradação da MMP-9, resultando na deposição de tecido fibroso (FRIEDMAN et al., 2013). A expressão deste inibidor de metaloproteinase vem sendo correlacionado com o aumento dos níveis de colágeno e de  $\alpha$ -SMA, sendo diretamente associado com a ativação das CEHs e com a intensidade da fibrose no fígado (IREDALE; THOMPSON; HENDERSON, 2013). Por isso, a dosagem dos níveis séricos de TIMP-1, vem sendo utilizada como um dos marcadores do estadiamento de doenças hepáticas crônicas (ALKHOURI et al., 2011; PARKES et al., 2010; ROSENBERG et al., 2004; XIE et al., 2014). A MMP-9, por sua vez, também se encontra elevada em fígados lesionados, porém de uma forma não relacionada ao grau de fibrose (HEMMANN et al., 2007).

Além de secretar grandes quantidades de MEC, as CEHs ativadas expressam uma combinação de MMPs e TIMPs, principalmente TIMP-1, a qual inibe a atividade de degradação das MMPs, contribuindo para o acúmulo de tecido fibroso no órgão (IREDALE; THOMPSON; HENDERSON, 2013). Adicionalmente, as CEHs secretam TGF- $\beta$ , descrita atualmente como a citocina pró-fibrogênica mais potente do fígado (LEE; FRIEDMAN, 2011). Esta citocina, além de induzir a diferenciação das CEHs em miofibroblastos secretores de MEC, também está envolvida no aumento da expressão de TIMP-1, reforçando o seu papel fibrogênico (IREDALE; THOMPSON; HENDERSON, 2013) (figura 2).

**Figura 2-** Participação da CEH na patogênese da fibrose hepática.



**Fonte:** Adaptada de Friedman (2000).

**Nota:** Na fisiologia normal do fígado, as CEHs possuem uma morfologia estrelada e encontram-se quiescentes no espaço perisinusoidal de Disse. Em decorrência de uma lesão no órgão, essas células são ativadas, adquirem um fenótipo de miofibroblasto e secretam grandes quantidades de MEC. Esta deposição excessiva de tecido de cicatrização contribui para a perda da microvilosidade hepática, além de causar outros danos teciduais, os quais evoluem progressivamente, levando a falha da função do órgão. A ativação dos macrófagos, também em decorrência de danos teciduais, contribuem para a ativação parácrina das CEHs.

Frente à notável participação das CEHs na patogênese das doenças hepáticas, diversos estudos vêm utilizando estas células ou moléculas que participam na sua ativação, como alvo para terapias antifibróticas (HENDERSON et al., 2006; ROCKEY, 2013).

## 2.2 Terapias antifibróticas e novas abordagens

Durante muito tempo acreditou-se que a fibrose hepática era um processo irreversível (BONIS et al., 2001). Porém estudos vêm demonstrando que a reversibilidade da fibrose é possível e está associada à reabsorção da cicatriz fibrótica e inativação das CEHs produtoras de colágeno (LIU et al., 2013).

Os tratamentos existentes para as hepatopatias são limitados e diferenciados a depender da causa e/ou persistência do estímulo. Em geral, as terapias tentam deter ou atrasar a agressão tecidual, conseguindo apenas minimizar os danos aos tecidos, reduzindo as complicações associadas à doença. Quando as medidas terapêuticas

não são eficientes, os pacientes podem evoluir para forma crônica da doença com a presença do quadro de cirrose e falência hepática. Nesses casos o transplante do fígado passa a ser a única opção terapêutica efetiva (JIANG; TÖRÖK, 2013). Contudo, esse procedimento é de alto risco e bastante invasivo, dificultado também pela baixa disponibilidade de órgãos pelo sistema de saúde. Além disso, a dependência do paciente transplantado por medicamentos imunossupressores e a probabilidade de uma possível rejeição ao novo órgão são fatores de risco limitantes para o transplante (PELLICORO; RAMACHANDRAN; IREDALE, 2012).

O desenvolvimento de uma terapia antifibrótica, direcionada a inibição da síntese de colágeno, modulação da ativação das CEHs, degradação da MEC e estimulação da morte de CEHs, seria ideal para o tratamento das diferentes doenças crônicas do fígado. Diversos compostos, incluindo drogas, citocinas e vitaminas, tais como a polienilfosfatidilcolina, colchicina, interleucina-10 (IL-10), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), vitamina E e medicamentos fitoterápicos, têm sido utilizados em ensaios clínicos, contudo, evidências que comprovem as suas eficácias no tratamento das hepatopatias são insuficientes (ROCKEY, 2013).

A colchicina é uma droga anti-inflamatória e antifibrótica (RAMBALDI; GLUUD, 2001), conhecida por inibir a síntese de colágeno (KERSHENOBICH et al., 1988). Ensaios clínicos têm sido realizados, porém a efetividade da droga não foi comprovada e por isso, não é recomendada para uso em pacientes (MORGAN et al., 2005; RAMBALDI; GLUUD, 2001). No estudo realizado por Morgan et al. (2005), não foram observadas diferenças significativas na mortalidade (geral e devido a complicações específicas do fígado) de pacientes com cirrose alcoólica avançada após tratamento com a colchicina, quando comparados com pacientes que receberam o placebo. Em estudo comparativo de 14 ensaios clínicos de paciente com fibrose ou cirrose, alcoólica ou não alcoólica, além de não ter sido observado diferença na mortalidade (geral e específica), também não foi constatada alterações na morfologia hepática, nem em níveis de marcadores de fibrose (RAMBALDI; GLUUD, 2001).

O interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) tem demonstrado ser um potente inibidor da ativação de CEHs e, portanto, um possível inibidor da fibrogênese. Porém, um largo estudo clínico randomizado demonstrou que o IFN- $\gamma$  não foi capaz de diminuir a fibrose em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV) que apresentavam fibrose avançada. Os autores concluíram que o tratamento foi ineficaz devido ao estágio

avançado da cirrose hepática dos pacientes ou pela necessidade de um maior tempo de tratamento (ROCKEY, 2008).

Trabalhos mais recentes vêm sugerindo a utilização de pequenos RNAs de interferência (siRNA) como forma de inibir a expressão de moléculas alvos envolvidas na fibrogênese (NOVOBRANTSEVA et al., 2008; VAISHNAW et al., 2010). A maioria dos genes alvos são aqueles relacionados à proliferação e ativação das CEHs ou na síntese e deposição de colágeno. O TGF- $\beta$ , por possuir papel essencial na ativação das CEHs e na fibrogênese, se tornou um importante alvo terapêutico. Cheng et al. (2009) construíram 10 siRNAs que possuíam como alvo o mRNA do TGF- $\beta$  e transformaram os dois siRNAs mais efetivos em small hairpin RNA (shRNA), os quais foram transfectados em CEHs imortalizadas de rato (HSC-T6). Os níveis de TGF- $\beta$  foram significativamente reduzidos nas células transfectadas, comprovando o silenciamento efetivo do mesmo. Outros efeitos subsequentes à diminuição dessa citocina também foram observados, como a diminuição da expressão de colágeno I, TIMP-1 e citocinas inflamatórias. Estes resultados sugerem que a utilização de siRNAs e shRNAs é uma abordagem promissora para o tratamento da fibrose hepática (CHENG; YANG; MAHATO, 2009).

Um dos desafios no desenvolvimento de uma medida terapêutica antifibrótica eficiente é a necessidade da especificidade da terapia, ou seja, as medidas tomadas devem agir apenas na célula efetora. A inibição do TGF- $\beta$  por shRNA, por exemplo, pode promover efeitos colaterais, visto que esta citocina tem papel importante na regulação do crescimento celular, dentre outras funções. Conseguir direcionar a terapia a um tipo celular específico (preferencialmente, nos casos de fibrose hepática, a CEH) seria o ideal (ROCKEY, 2013).

A falta de métodos de acompanhamento dos níveis de fibrose também é um problema para o estudo da efetividade dos compostos testados. A biópsia do fígado é o método padrão ouro para avaliar a fibrose, porém possui desvantagens como ser invasivo e, ocasionalmente, pouco preciso (resultados podem variar quando analisadas amostras de diferentes regiões do fígado). Dessa forma, seria apropriado o estabelecimento de biomarcadores que pudessem auxiliar no monitoramento da terapia (ROCKEY, 2013).

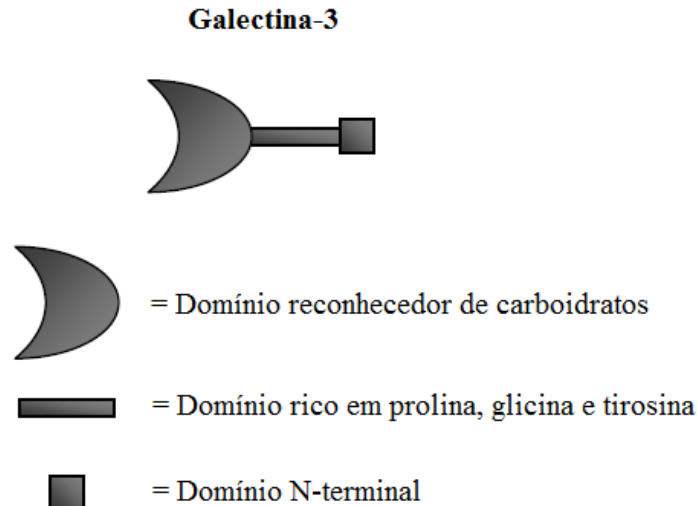
O desenvolvimento de uma terapia antifibrótica que seja eficiente, não hepatotóxica e segura quando utilizada por longos períodos é um desafio. Contudo,

terapias combinadas com diferentes alvos biológicos pode ser uma nova abordagem e a possível solução no tratamento da patogênese da fibrose hepática.

### 2.3 Galectina-3: estrutura, distribuição e função

A Galectina-3 (Gal-3) é uma lectina animal, monomérica, de aproximadamente 30 kD, que possui afinidade por  $\beta$ -galactosídeos (HENDERSON, et al., 2008; SANZ; FUENTES; BERENGUEL, et al., 2013). Essa lectina possui uma estrutura quimérica composta por três domínios distintos: 1) Porção C-terminal, que contém o domínio reconhecedor de carboidratos (DRC), formado por aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos; 2) Extenso domínio rico em prolina, glicina e tirosina e 3) Pequena porção N-terminal, contendo um sítio de fosforilação de serina (figura 3) (FARNWOETH, 2007; WANG et al., 2009).

**Figura 3-** Representação esquemática da estrutura da Galectina-3.



**Fonte:** Adaptada de Farnworth (2007).

**Nota:** A Gal-3 é uma lectina ligadora de  $\beta$ -galactosídeos, de aproximadamente 30 kD. Possui na sua estrutura um curto domínio n-terminal, uma porção intermediária, rica em prolina, glicina e tirosina e uma região c-terminal, conhecida como domínio reconhecedor de carboidratos (DCR).

O DRC da Gal-3 é responsável pela sua ligação a  $\beta$ -galactosídeos, tais como a lactose, N-acetilactosamina e galacto-oligossacarídeos, presentes na superfície celular e em moléculas da matriz extracelular. Esta ligação é o evento

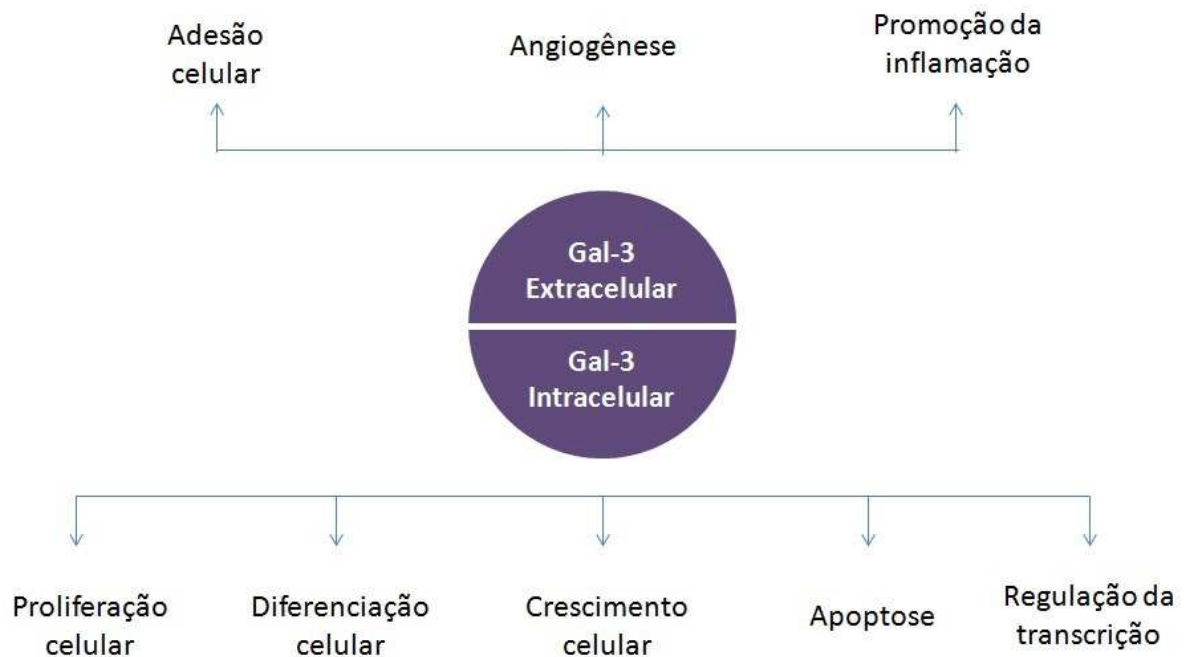
desencadeador das ações biológicas da Gal-3 (SÖRME et al., 2003). Por ter afinidade por uma variedade de moléculas, a Gal-3 desempenha papel modulador em diversos processos, tais como apoptose e proliferação celular e está relacionada à patogênese de diversas doenças, como câncer e fibrose (HENDERSON; SETHI, 2009).

A Gal-3 faz parte de uma família de lectinas, que possui um total de 15 membros, enumerados de acordo com a ordem cronológica das suas descobertas (SANZ; FUENTES; BERENGUEL et al., 2013). Foi primeiramente descrita como Mac-2, uma proteína de superfície do macrófago identificada por Ho e Springer em 1982. Ao longo do tempo, outras denominações surgiram como CBP-35, IgEBP, CBP-30, RL-29, L-29, L-31, L-34 e LBL.

A Gal-3 é expressa em diversos tipos celulares, tais como, CEHs, macrófagos ativados, neutrófilos, eosinófilos, fibroblastos e células epiteliais dos tratos respiratório, gastrointestinal e renal (LEE et al., 2009; SAKAKI et al., 2010; ZHANG et al., 2009). É encontrada tanto extracelular, como intracelularmente, no citoplasma ou no núcleo (ARGUËSO; PANJWANI, 2011). Dependendo da sua localização, ela pode possuir diferentes funções biológicas (figura 4). Intracelularmente, a Gal-3 possui papel na proliferação, diferenciação e crescimento celular, na apoptose e na regulação da transcrição (LI; LI; GAO, 2014). Já na forma extracelular, ela participa dos processos de adesão celular, angiogênese e promoção da inflamação (LIU et al., 1995; LI; LI; GAO, 2014). A Gal-3 é altamente expressa durante a diferenciação de monócitos em macrófagos, podendo ser considerada um marcador de diferenciação (LIU et al., 1995).



**Figura 4-** Funções da Gal-3 a depender da sua localização tecidual.



**Fonte:** Elaborada pela autora.

Além de estar envolvida em processos fisiológicos, a Gal-3 também é conhecida por participar de processos patológicos. Muitos estudos demonstram a relação dos níveis elevados de Gal-3 com o desenvolvimento de câncer e metástase (TAKENAKA; FUKUMORI; RAZ, 2004). Contudo, a sua participação na carcinogênese é contraditória. Dependendo do tecido e da fase do câncer, a Gal-3 pode tanto inibir como estimular a adesão celular, favorecendo ou não a invasão das células transformadas para outros tecidos (EBRAHIM et al., 2014; OCHIENG et al., 1998).

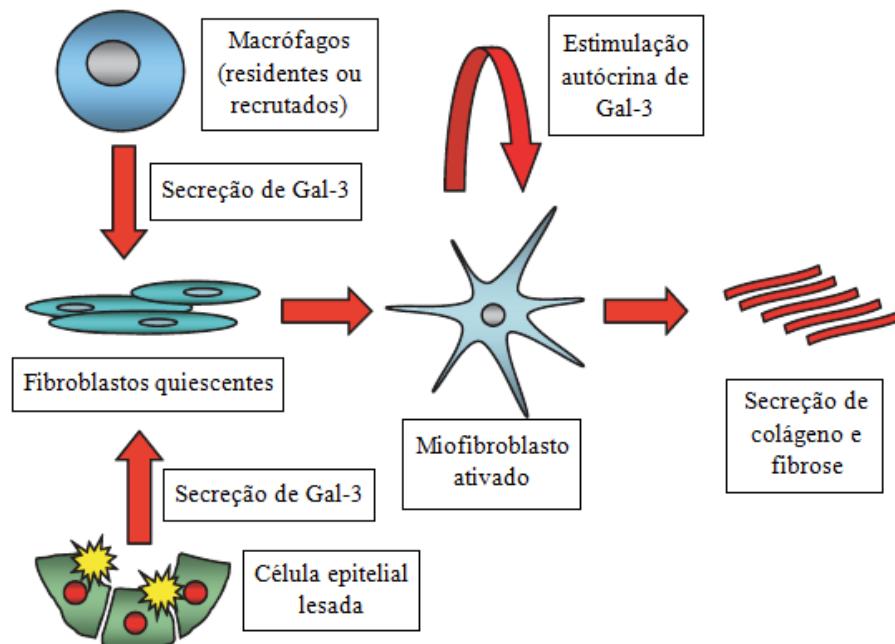
Há evidências de que Gal-3 é regulada positivamente em câncer de mama (MOISA et al., 2007), estômago (KIM et al., 2010), cólon (POVEGLIANO et al., 2011; WU et al., 2013), pâncreas (SONG et al., 2012), cérebro (BINH et al., 2013), pele (BRAEUER et al., 2012), rim (SAKAKI et al., 2010; STRAUBE et al., 2011) e tireoide (CHIU et al., 2010; HTWE et al., 2010), sendo a sua alta expressão relacionada com a chance de metástase. Contudo, resultados contrários foram obtidos por Tsuboi et al. (2007), os quais sugerem que a Gal-3 encontra-se diminuída nos estágios mais avançados de invasão e metástase de câncer de cólon. Além disso, estudos indicam

que, em câncer de próstata, a Gal-3 é regulada negativamente (COMPAGNO et al., 2014; MERSEBURGER et al., 2008).

## 2.4 Gal-3 e fibrogênese

Evidências demonstram que a Gal-3 exerce um papel importante no desenvolvimento de tecido fibroso em uma variedade de órgãos, tais como, rim (HENDERSON et al., 2008), coração (CALVIER et al., 2013; HO et al., 2012; MORROW; O'DONOGHUE, 2012; YU et al., 2013), pulmão (MACKINNON et al., 2012; NISHI et al., 2007) e fígado (HENDERSON et al., 2006; HSU et al., 1999; JIANG et al., 2012). Níveis elevados dessa lectina vêm sendo encontrados tanto em modelos experimentais como em pacientes acometidos por doenças fibróticas (BAYES-GENIS, et al., 2014; LOPEZ-ANDRES, et al., 2012; MACKINNON, et al., 2012; TANIGUCHI, et al., 2012; YU, et al., 2013). O mecanismo de ação exato da Gal-3 na fibrogênese ainda não foi elucidado. Acredita-se que a Gal-3 participa diretamente na ativação de miofibroblastos (figura 5) (HENDERSON et al., 2006).

**Figura 5-** Papel da Gal-3 na fibrogênese tissular.



**Fonte:** Adaptada de Henderson e Sethi (2009).

**Nota:** Após uma agressão tecidual, macrófagos (residentes ou recrutados) e células epiteliais lesadas secretam Gal-3, que por sua vez participa diretamente da ativação dos miofibroblastos secretores de MEC. O papel autócrino da Gal-3 sobre os miofibroblastos ativados mantém a resposta fibrogênica.

Em estudo de Henderson et al. (2006) foi observado aumento da expressão de Gal-3 em camundongos submetidos ao tratamento com tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>). Adicionalmente, camundongos knockouts para o gene da Gal-3 tratados com CCl<sub>4</sub> apresentaram diminuição significativa da expressão de  $\alpha$ -SMA (marcador de CEH ativada) e de colágeno quando comparados com camundongos selvagens (HENDERSON et al., 2006). Estes dados sugerem que a Gal-3 regula a ativação das CEHs e a deposição de colágeno durante a lesão hepática *in vivo*. Neste mesmo estudo, não foi constatada diferença nos níveis de TGF- $\beta$  entre os camundongos Gal-3<sup>-/-</sup> e selvagens após estímulo do CCl<sub>4</sub>. Este resultado indica que a ausência da Gal-3 é capaz de inibir a fibrose apesar dos níveis semelhantes da principal citocina pró-fibrogênica (HENDERSON et al., 2006). Em concordância com estes resultados, Jiang et al. (2012) também verificaram redução significativa nos níveis de fibrose, com diminuição da expressão de  $\alpha$ -SMA e TGF- $\beta$  em camundongos Gal-3<sup>-/-</sup> induzidos à desenvolver lesão hepática através do modelo de ligação do ducto biliar (JIANG et al., 2012). Confirmando ainda mais o envolvimento da Gal-3 com o desenvolvimento de tecido fibroso, foi observada redução desta lectina em animais cirróticos que obtiveram melhora hepática após terapia com células-tronco (OLIVEIRA et al., 2012).

Estudos relataram anteriormente que as CEHs são capazes de fagocitar corpos apoptóticos provenientes de hepatócitos mortos, e que em decorrência desta ação, se transdiferenciam em miofibroblastos secretores de colágeno e TGF- $\beta$  (JIANG et al., 2012). A Gal-3 tem sido descrita como uma lectina que regula este processo de ativação de CEHs mediada por fagocitose. Isso foi evidenciado *in vitro*, quando CEHs obtidas de camundongos Gal-3<sup>-/-</sup>, tratadas com corpos apoptóticos, exibiram uma diminuição da atividade fagocítica, além de redução na expressão de TGF- $\beta$  e  $\alpha$ 1-procolágeno. Quando adicionada uma Gal-3 recombinante à cultura, estes efeitos eram revertidos (JIANG et al. 2012).

Diante da participação importante na promoção da fibrose, a Gal-3 tem sido estudada como um potencial alvo para terapias antifibróticas. O desenvolvimento de metodologias capazes de inibir a ação desta lectina pode trazer resultados promissores no tratamento das diversas doenças crônicas do fígado.

## 2.5 Gal-3 e ativação alternativa de macrófagos

A depender do microambiente onde se encontram, os macrófagos podem seguir duas vias de ativação, a via clássica (perfil M1) e via alternativa (perfil M2). A via clássica foi a primeira via a ser descoberta (por isso o nome “clássica”) e é ativada por agentes microbianos ou por citocinas do tipo Th1, como IFN- $\gamma$  ou interleucina-12 (IL-12). Esta ativação desencadeia uma resposta inflamatória e citotóxica, com o objetivo de erradicar os agentes invasores ou células tumorais, liberando óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias, tais como, TNF- $\alpha$  e IL-6. Os macrófagos M1 têm papel fundamental na primeira linha de defesa do hospedeiro, tendo uma potente função microbicida, todavia, a liberação excessiva e contínua destas substâncias podem levar a lesão do próprio tecido do hospedeiro (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

Quando estimulados por citocinas do tipo Th2, como IL-4 e IL-13, os macrófagos adquirem um fenótipo alternativamente ativado. Estes macrófagos são responsáveis pela resolução da inflamação e remodelagem tecidual e vem sendo associado a diversas doenças, como asma, infecções parasitárias, reparação de lesões e na fibrogênese de doenças granulomatosas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

Quando alternativamente ativados, os macrófagos passam a secretar fatores de crescimento que estimulam a proliferação de fibroblastos (PDGF), síntese de colágeno (TGF- $\beta$ ) e formação de novos vasos sanguíneos (fator de crescimento de fibroblastos, FGF) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

Além das citocinas Th1 e Th2 mencionadas anteriormente, outras moléculas são capazes de direcionar a ativação dos macrófagos, determinando a sua funcionalidade. A Gal-3 tem sido demonstrada como um fator importante para a ativação alternativa dos macrófagos, sendo assim um possível mecanismo de promoção de fibrose.

MacKinnon et al. (2008) demonstraram que a deleção do gene da Gal-3 em camundongos reprimiu a ativação alternativa dos macrófagos induzida por IL-4 e IL-13, de medula óssea (*in vitro*), e de macrófagos residentes e de lavado peritoneal (*in vivo*), sem afetar a ativação clássica induzida por IFN- $\gamma$  e lipopolissacarídeo (LPS). Neste mesmo estudo foi demonstrado a inibição da ativação alternativa dos

macrófagos mediada por IL-4, através da utilização de um siRNA contra a Gal-3 e contra o seu receptor de membrana presente nos macrófagos, o CD98.

A indução de um perfil específico de ativação do macrófago pode ser útil no tratamento de doenças e pode ser estudada para sua utilização futura em terapias. O uso de inibidores de Gal-3, a fim de bloquear a ativação alternativa dos macrófagos, pode representar uma boa alternativa terapêutica para doenças inflamatórias crônicas, fibróticas e neoplásicas (LI; LI; GAO, 2014).

## **2.6 Inibidores de Gal-3: Pectina Cítrica Modificada e N-acetilactosamina**

A pectina é um polissacarídeo complexo encontrado em algumas frutas e vegetais, como na polpa de maçã e nas cascas de frutas cítricas (MORRIS et al., 2013). É conhecida pela sua utilização na indústria farmacêutica como agente gelificante ou na estabilização de bebidas lácteas a base de ácido (MAXWELL et al., 2012). Sua estrutura é complexa e possui um alto peso molecular, o que dificulta a sua absorção pelo trato gastrointestinal (MORRIS et al., 2013).

A pectina cítrica modificada (PCM) foi produzida a partir da fragmentação enzimática da pectina em porções menores (de 5 a 10 kD), para facilitar a sua assimilação pelo organismo (MORRIS et al., 2013). Evidências demonstram que a PCM é capaz de se ligar aos domínios reconhecedores de carboidratos da Gal-3 e inibir a sua ação (GUNNING; BONGAERTS; MORRIS, 2009; MORRIS et al., 2011). Visto que a Gal-3 tem sido associada ao desenvolvimento de tecido fibroso e progressão de câncer, a utilização de um ligante inibidor natural, como a PCM, pode contribuir para a melhora de diversas doenças fibróticas e tumorais.

A maioria dos estudos realizados utilizando a PCM baseiam-se na sua propriedade anti-tumoral (MORRIS et al., 2013). Dados de estudos *in vitro* ou *in vivo* demonstraram que a MCP é eficaz contra uma variedade de cânceres, incluindo câncer da próstata (GLINSKII et al., 2005; HSIEH; WU, 1995; PIENTA et al., 1995), câncer do cólon (HAYASHI et al., 2000; NANGIA-MAKKERETAL, 2002), câncer de mama (GLINSKII et al., 2005; NANGIA-MAKKER et al., 2002; SATHISHA et al., 2007), melanoma (INOHARA; RAZ, 1994;. PLATT; RAZ, 1992), mieloma múltiplo (CHAUHAN et al., 2005) e hemangiossarcoma (JOHNSON et al., 1992).

Ainda são poucos os estudos sobre o papel da PCM nas doenças fibróticas. Kolatsi-Joannou et al. (2011) avaliaram o efeito da PCM em modelo experimental de

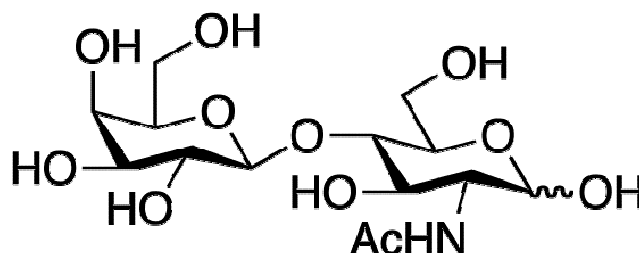
lesão renal aguda induzida por ácido fólico. Neste estudo, foi observado que os camundongos tratados com PCM a 1% apresentaram níveis mais baixos de Gal-3, associado com a diminuição da fibrose renal. Além disso, em modelo de fibrose vascular induzida por aldosterona, em ratos, a administração da PCM foi capaz de inibir a Gal-3 e diminuir a expressão de colágeno tipo I, revertendo o quadro de hipertrofia vascular, inflamação e fibrose (CALVIER et al., 2013).

O único estudo disponível na literatura que avalia o efeito da PCM no fígado foi realizado em modelo experimental de câncer de cólon e metástase hepática. Nesse trabalho, células de câncer de cólon foram injetadas no baço de camundongos que, dois dias após a cirurgia, foram tratados continuamente com diferentes concentrações de PCM, baixa (1%), média (2,5%) e alta (5%). Foi observada a redução da porcentagem da metástase hepática de maneira proporcional a concentração da PCM, sendo a dose de 5% a mais eficiente (LIU et al., 2008; LIU; HUANG; YANG, 2008).

A utilização da PCM em modelo experimental de fibrose hepática é uma abordagem inovadora no tratamento das doenças do fígado. Espera-se que a sua utilização seja capaz de promover uma melhora tecidual após estímulo agressor contínuo. Além disso, já é conhecido que o consumo da PCM é seguro e não tóxico, visto que a mesma já é comercializada como suplemento alimentar (PectaSol-C) (ELIAZ, 2011).

Assim como a PCM, a LacNAc também é um carboidrato, porém, de estrutura química pequena e bem definida, de fórmula molecular  $C_{14}H_{25}NO_{11}$  (figura 6). Esta é um dissacarídeo, que consiste em unidades de galactose e n-acetilglicose, que, muitas vezes, aparece como um elemento estrutural de oligoconjugados de importância biológica (CARBOSYNTH). Este composto é capaz de se ligar ao DRC das lectinas e dessa forma inibir seus efeitos, e por isso, vem sendo amplamente utilizado na investigação do papel e funções de lectinas, incluindo a Gal-3 (CARBOSYNTH; DEMOTTE et al., 2010; RABINOVICH, 1999; SÖRME et al., 2002; UMEMOTO et al., 2003).

**Figura 6-** Estrutura química de LacNAc.



**Fonte:** Toronto Research Chemicals Inc (2015).

**Nota:** A LacNAc é um dissacarídeo de estrutura química bem definida e que possui a fórmula molecular  $C_{14}H_{25}NO_{11}$ .

A utilização da LacNAc como inibidor de Gal-3 vem demonstrando resultados promissores, sendo capaz de reverter fibroses cardíacas e renais, em modelos experimentais (YU et al., 2013; FRENAY et al., 2014). Ratos transgênicos que superexpressam renina e, assim, desenvolvem hipertensão grave e hipertrofia cardíaca [TGR (mREN2) 27], após tratamento com LacNAc, apresentaram atenuação da disfunção ventricular esquerda associada à diminuição de fibrose (YU et al., 2013). De maneira semelhante, camundongos submetidos à constrição aórtica transversal (TAC) (modelo de insuficiência cardíaca), apresentaram inibição da progressão do remodelamento cardíaco e diminuição dos níveis de fibrose, após tratamento com LacNAc (YU et al., 2013). Este efeito inibidor também pôde ser observado em ensaio *in vitro*, onde cultura de fibroblastos dermais de humanos adultos, após tratamento com LacNAc, exibiram diminuição da produção e deposição de colágeno I e III, quando comparado com cultura na ausência do inibidor (YU et al., 2013).

Em modelo de nefropatia hipertensiva, ratos apresentaram diminuição de  $\alpha$ -SMA, colágeno I e III, além de atenuação da proteinúria e dos níveis de creatinina plasmática, após terapia com LacNAc. No geral, a administração deste inibidor foi capaz de reduzir a lesão renal e promover a melhora da função do órgão (FRENAY et al., 2014).

Poucos estudos avaliam a utilização da LacNAc em modelos de doenças fibróticas e ainda não se têm evidências do seu papel e do seu potencial terapêutico frente às lesões hepáticas crônicas. Diante disso, maiores estudos são necessários

avaliar a eficiência da inibição da Gal-3 por este inibidor farmacológico no fígado e investigar se esta abordagem poderia se tornar uma possível opção terapêutica.



### 3 JUSTIFICATIVA

As doenças hepáticas representam um grave problema de saúde pública, sendo responsáveis por um considerável número de atendimentos e internações hospitalares com um índice crescente de risco de morte. Segundo dados recentes da Sociedade Brasileira de Hematologia (SBH), cerca de 30 mil pessoas morrem por ano devido às doenças hepáticas no Brasil. Contudo, ainda não existe uma terapia eficaz frente às lesões do fígado. Atualmente, o tratamento se resume na tentativa de remoção do estímulo agressor e em casos mais graves, como na insuficiência hepática descompensada, o transplante de fígado tem sido a terapia mais indicada. Diante deste cenário, fica clara a necessidade de estudos mais aprofundados sobre o processo de fibrogênese e da busca de novas terapias antifibrosantes.

A alta expressão da Gal-3 tem sido associada ao desenvolvimento de fibrose em uma variedade de órgãos, inclusive no fígado, estando relacionada diretamente com a ativação das CEHs, descrita hoje como a principal célula envolvida no processo de fibrogênese. Dessa forma, estudos de métodos não invasivos, que visem inibir a ação da Gal-3 são de extrema importância no desenvolvimento de terapias antifibrosantes. Estudos vêm demonstrando que a PCM produzida a partir da parte branca da casca dos citrinos, pode limitar e bloquear o excesso da atividade da proteína Gal-3. Desta maneira, a PCM vem gerando resultados promissores em modelos experimentais tanto oncológicos, como fibróticos. A LacNAc, por sua vez, também vem demonstrando ser um eficiente inibidor da Gal-3, conseguindo atenuar a fibrose em modelo animal em diferentes órgãos, tais como rim e coração. A utilização destes inibidores em modelo experimental de fibrose hepática é uma abordagem inovadora e de suma relevância para o tratamento das doenças do fígado. Uma vez, obtendo-se bons resultados estaremos favorecendo a melhoria da qualidade de vida dos portadores de hepatopatias provenientes de diferentes etiologias.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Investigar o efeito da administração da PCM e da LacNAc na fibrose em modelo experimental de lesão hepática crônica.

### **4.2 Objetivos específicos**

- a) Avaliar a expressão de Gal-3 nos fígados de camundongos com lesão hepática crônica;
- b) Investigar o efeito da administração de LacNAc e de diferentes doses da PCM quanto aos níveis de Gal-3 e fibrose no fígado dos camundongos com lesão hepática.
- c) Comparar os níveis de fibrose e a expressão de Gal-3 entre camundongos tratados com PCM ou LacNAc e animais knockouts para o gene da Gal-3.
- d) Avaliar a expressão dos reguladores da degradação do tecido fibroso, MMP-9 e TIMP-1, após a administração dos inibidores de Gal-3.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Foram utilizados 140 camundongos isogênicos C57BL/6, fêmeas, pesando entre 12 e 16g, além de 10 camundongos C57BL/6, machos, knockouts para o gene Gal-3 (B6.129S2-Lgals3). Os animais foram obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz/RJ e mantidos em Biotério Experimental da FIOCRUZ-PE. Os camundongos Gal-3<sup>-/-</sup> foram gentilmente cedidos pelos Drs. Fu-Tong Liu e Dan K. Hsu da Universidade da Califórnia. O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ-PE (projeto n° 57/2014) (ANEXO A).

### 5.2 Grupos Experimentais

Quatro experimentos independentes foram realizados:

**a) Experimento 1: Pectina Cítrica Modificada a 1%-** Os camundongos (n=40) foram divididos em quatro grupos experimentais:

- **G1) Controle:** Controle negativo, sem intervenções (n= 10);
- **G2) PCM:** Camundongos que receberam somente PCM a 1% durante 4 meses (n= 10);
- **G3) CCl<sub>4</sub> (4M):** Controle positivo de lesão hepática, no qual camundongos foram estimulados com CCl<sub>4</sub> durante 4 meses (n= 10);
- **G4) CCl<sub>4</sub> + PCM (4M):** Camundongos estimulados com CCl<sub>4</sub>, concomitantemente com a administração de PCM a 1% durante 4 meses (n=10);

**b) Experimento 2: Pectina Cítrica Modificada a 5%-** Os camundongos (n=50) foram divididos em cinco grupos experimentais:

- **G5) Controle:** Controle negativo, sem intervenções (n= 10);
- **G6) CCl<sub>4</sub> (4M):** Controle positivo de lesão hepática, no qual camundongos foram estimulados com CCl<sub>4</sub> durante 4 meses (n= 10);

- **G7) CCl<sub>4</sub> (2M):** Controle positivo de lesão hepática, no qual camundongos foram estimulados com CCl<sub>4</sub> durante 2 meses (n=10);
- **G8) CCl<sub>4</sub> + PCM (4M):** Camundongos estimulados com CCl<sub>4</sub>, concomitantemente com a administração de PCM a 5% durante 4 meses (n=10);
- **G9) CCl<sub>4</sub> (2M) + PCM (2M):** Camundongos estimulados com CCl<sub>4</sub> durante 2 meses e posterior administração de PCM 5% durante 2 meses (n=10).

**c) Experimento 3: LacNAc-** Os camundongos (n=30) foram divididos em três grupos experimentais:

- **G10) Controle:** Controle negativo, sem intervenções (n= 10);
- **G11) CCl<sub>4</sub> (4M):** Controle positivo de lesão hepática, no qual camundongos foram estimulados com CCl<sub>4</sub> durante 4 meses (n= 10);
- **G12) CCl<sub>4</sub> (4M) + LacNAc (2M):** Camundongos estimulados com CCl<sub>4</sub> durante 4 meses e tratados concomitantemente com LacNAc durante os dois últimos meses (n= 10).

**d) Experimento 4: Gal-3<sup>-/-</sup>:** Foram utilizados 20 camundongos selvagens (WT, do inglês *wild type*), os quais foram divididos nos grupos G13 e G14, além de 10 camundongos knockouts para o gene Gal-3 (G15), como um controle dos experimentos:

- **G13) Controle:** Controle negativo, sem intervenções (n= 10);
- **G14) WT + CCl<sub>4</sub> (4M):** Controle positivo de lesão hepática, no qual camundongos foram estimulados com CCl<sub>4</sub> durante 4 meses (n= 10);
- **G15) Gal-3<sup>-/-</sup> + CCl<sub>4</sub> (4M):** Camundongos knockouts para o gene de Gal-3 estimulados com CCl<sub>4</sub> durante 4 meses.

### 5.3 Indução da lesão hepática pela administração crônica de CCl<sub>4</sub>

A fibrose hepática foi induzida em camundongos C57BL/6, pela administração, via orogástrica, de uma solução de CCl<sub>4</sub> a 20%, diluído em azeite de oliva. Cada animal recebeu 0,2 mL da solução, duas vezes por semana, em dias alternados,

durante um período contínuo de quatro meses (G3, G4, G6, G8, G11, G12, G14 e G15) e dois meses (G7 e G9).

#### **5.4 Administração dos inibidores de Gal-3**

Os animais receberam PCM (Pectasol/Nutrigenomics) diluída a 1% (Exp. 1) e 5% (Exp. 2), na água dos bebedouros. A depender do grupo experimental, esta administração ocorreu em períodos diferentes. Os grupos G4 e G8 receberam PCM durante os quatro meses do experimento, enquanto o G9 recebeu apenas nos dois últimos meses, após o estabelecimento da lesão estimulada por CCl<sub>4</sub>.

A LacNAc (A7791 - SIGMA) foi administrada aos camundongos do grupo G12, na dose de 50 µg/kg/dia (preparada em solução salina), pela via intraperitoneal, três vezes por semana, durante dois meses após o estabelecimento da lesão. Os animais de todos os grupos foram submetidos à eutanásia no final dos quatro meses de experimento.

#### **5.5 Morfometria**

A morfometria foi realizada para obtenção do percentual de tecido fibroso. As medidas foram realizadas com o auxílio do Sistema de Processamento de Análise de Imagem LEICA QWIN, versão 2.6 MC (Leica Cambridge, Cambridge – Inglaterra), composto de um computador com o programa de morfometria acima citado e de um microscópio ótico binocular, contendo uma câmara de captura digital LEICA JVC, modelo TK – C 1380, Pine Brook, NJ, USA). Para obtenção do percentual de tecido fibroso, o colágeno foi marcado com picrossírius e quantificado com o auxílio do programa Qwin, obtendo-se, também, a média percentual e erro padrão dos valores mensurados.

#### **5.6 Dosagem de Hidroxiprolina.**

Amostra de fígado, obtida do lobo maior, pesando entre 100 e 200 mg, foi usada para determinação de hidroxiprolina, constituinte do colágeno. As amostras foram processadas e analisadas segundo a metodologia de Bergman e Loxley (1973), analisadas em espectrofotômetro automático (Pharmacia, modelo Ultrospec

3000), em comprimento de onda de 558 nm, para a obtenção dos valores da concentração molar de cada amostra (nM).

### 5.7 RT-qPCR para os alvos Gal-3, TIMP-1 e MMP-9

O RNA total foi extraído pelo método TRIZOL (LIFE TECHNOLOGIES, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com a metodologia proposta pelo fabricante. Posteriormente, foi realizada checagem por espectrofotometria em comprimento de onda de 260nm.

Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit de transcrição reversa *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (APPLIED BIOSYSTEMS, Carlsbad, CA, EUA). Um micrograma de RNA total foi adicionado a 5 µL de Random primers, 5 µL de 10X *First Strand Buffer*, 2 µL de dNTP 10 mM, 3 µL de Enzima *Multiscribe*, todos da marca Applied Biosystems. Foi adicionada água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) em quantidade suficiente para completar um volume final de 50 µL. Essa mistura foi incubada a 25° C por 10 minutos e a 37°C, por duas horas. O armazenamento foi realizado a 4°C.

A análise da expressão dos genes Gal-3 (Mm 00802901m1), TIMP-1 (Mm 99999915g1) e MMP-9 (Mm 00442991m1) foram feitas por PCR em tempo real, a partir de amostras de fígado de camundongos. As reações foram preparadas em placas de 96 poços, utilizando o reagente Taqman *Universal PCR Master Mix* (APPLIED BIOSYSTEMS) e o equipamento *7500 Real Time PCR System* (APPLIED BIOSYSTEMS).

As sondas utilizadas e as reações de amplificação foram feitas de acordo com as especificações propostas pelo fabricante. As reações foram preparadas em duplicatas em um volume final de 10 µL. As condições da reação para todos os genes avaliados envolveram 10 minutos a 95°C para ativação da polimerase e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto. O máximo coeficiente de variação permitido entre as duplicatas foi de 1%. Para a normalização das amostras foi utilizado o gene  $\beta$ -actina (Mm 00607939s1). A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada utilizando-se o modelo matemático denominado delta CT.

Devido a repetições de grupos controles negativos e positivos de lesão ao longo dos quatro experimentos, apenas os seguintes grupos foram avaliados neste ensaio: Controle (G5); CCl<sub>4</sub> (4M) (G6); CCl<sub>4</sub> (2M) (G7); CCl<sub>4</sub> (4M) + PCM 5% (4M)

(G8); CCl<sub>4</sub> (2M) + PCM 5% (2M) (G9); CCl<sub>4</sub> (4M) + LacNAc (2M) (G12); Gal-3<sup>-/-</sup> (G15), onde n=5, por grupo.

### 5.8 Imunofluorescência para Gal-3

Fragmentos dos fígados dos camundongos foram incluídos em parafina e analisados por imunofluorescência, tendo como alvo a Gal-3. A recuperação antigênica foi realizada através da incubação dos cortes histológico em tampão citrato, a 96°C, durante 20 minutos e o bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado utilizando o reagente background blocker (Diagnostic BioSystems, cat. K023) por 10 minutos. As amostras foram incubadas com o anticorpo anti-Galectina-3 produzido em cabra (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA), diluídos em PBS/BSA 1%, overnight, a 4°C. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de cabra conjugado com Alexa Fluor 488 (1:400, Molecular Probes, Carlsbad, USA), por uma hora, a temperatura ambiente e finalizadas com meio de montagem Vectashield com DAPI (Vector Labs, Burlingame, USA). As imagens foram obtidas no microscópio confocal FluoView 1000 (Olympus, Tóquio, Japão). Para quantificação, utilizou-se 7 campos aleatórios por secção, capturados com objetiva de 40x e analisados no software Image Pro Plus v.7.0. (Media Cybernetics, Bethesda, USA). Neste ensaio foram consideradas amostras dos seguintes grupos experimentais: Controle (G5); CCl<sub>4</sub> (4M) (G6); CCl<sub>4</sub> (4M) + PCM 5% (4M); (G9); CCl<sub>4</sub> (4M) + LacNAc (2M) (G12); Gal-3<sup>-/-</sup> (G15).

### 5.9 Análise estatística

O tamanho da amostra foi determinado através da observação na literatura de diversos estudos experimentais, considerando uma perda de animal de 30% durante a execução de todas as etapas do experimento. Após a obtenção dos resultados das amostras testadas, a apresentação das variáveis mensuradas foi realizada através de tabelas e gráficos apresentando média aritmética, desvio padrão ou mediana. Os valores numéricos obtidos foram analisados estatisticamente através dos *softwares* BioEstat, 5.0 e GraphPad Prism 5.01. Quando necessário, a homogeneidade dos grupos foi determinada através do teste de Bartlett e a normalidade dos dados foi através da análise descritiva e do teste de hipótese Shapiro-Wilk. Para análise foram

realizados ANOVA com o pós teste de Tukey ou Kruskal Wallis. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo para todos os testes estatísticos realizados.

### **5.11 Aspectos éticos**

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CPqAM/Fiocruz (protocolado sob número 57/2014) (ANEXO A).

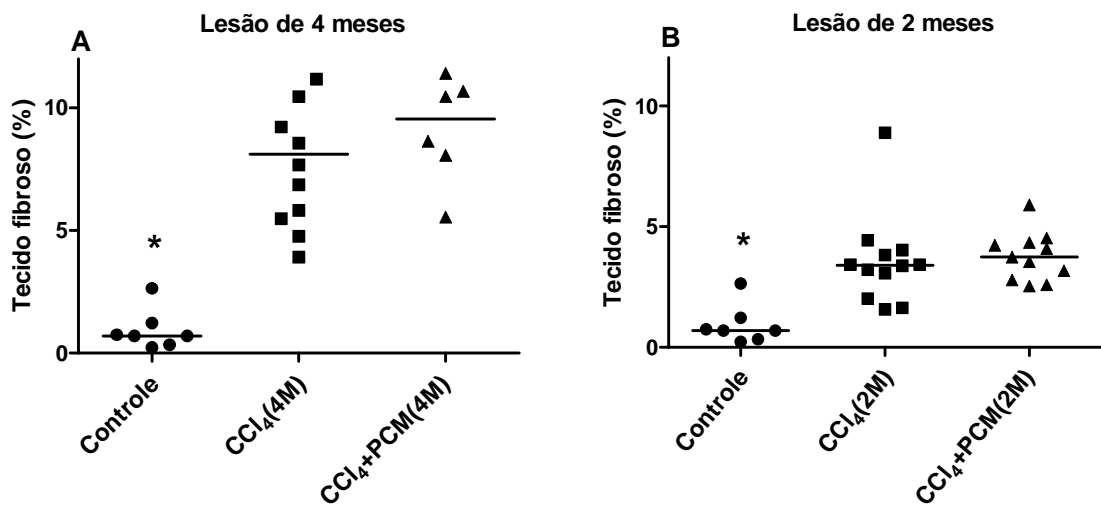


## 6 RESULTADOS

### 6.1 Avaliação do tecido fibroso

A quantificação de tecido fibroso, realizada pela técnica de morfometria, demonstrou que camundongos com lesão hepática crônica, estimulados durante quatro meses com  $\text{CCl}_4$  e tratados concomitantemente com PCM 5% [ $\text{CCl}_4(4\text{M}) + \text{PCM}(4\text{M})$ ], não apresentaram diferença significativa na porcentagem de tecido fibroso (9,13%) quando comparados com seu respectivo controle de lesão [ $\text{CCl}_4(4\text{M})$ ] (8,29%),  $p > 0,05$  (figura 7A, 8A e 8B). Da mesma forma, o tratamento com PCM 5% posteriormente ao estabelecimento da lesão, também não interferiu na quantidade de tecido fibroso [ $\text{CCl}_4(2\text{M})$ : 3,58%;  $\text{CCl}_4(2\text{M}) + \text{PCM}(2\text{M})$ : 3,77%],  $p > 0,05$  (figura 7B, 8C e 8D).

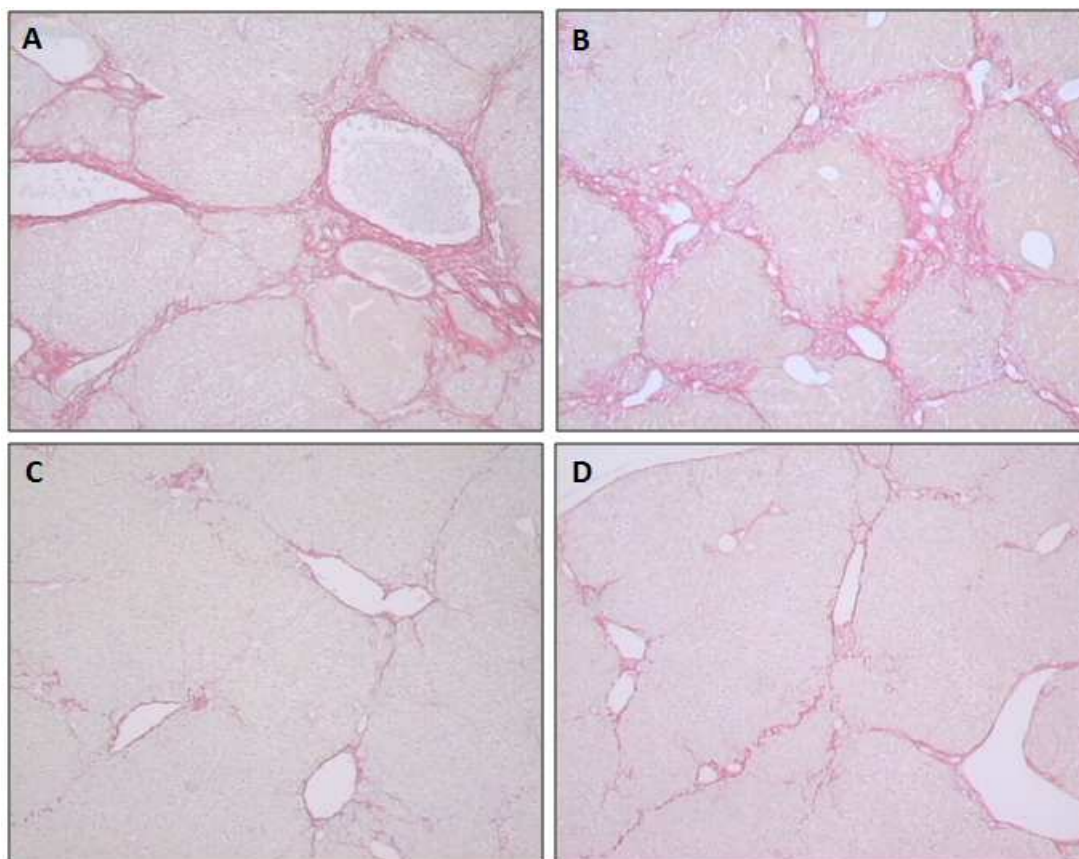
**Figura 7-** Quantificação do percentual de tecido fibroso do experimento utilizando a terapia com PCM 5%.



**Fonte:** Elaborada pela autora.

**Legenda:** Quantificação do percentual de tecido fibroso dos grupos experimentais tratados com (A)  $\text{CCl}_4$  e PCM 5% concomitantemente [ $\text{CCl}_4(4\text{M}) + \text{PCM}(4\text{M})$ ] e (B)  $\text{CCl}_4$  e PCM 5%, posteriormente ao estabelecimento da lesão [ $\text{CCl}_4(2\text{M}) + \text{PCM}(2\text{M})$ ]. Os valores representam as medianas de 6-12 animais por grupo. \* $p < 0,0005$  em relação aos demais grupos.

**Figura 8-** Imagens de cortes histológicos de fígados de camundongos corados com picrossírius para avaliação das fibras colágenas dos grupos do experimento utilizando a terapia com PCM a 5%.

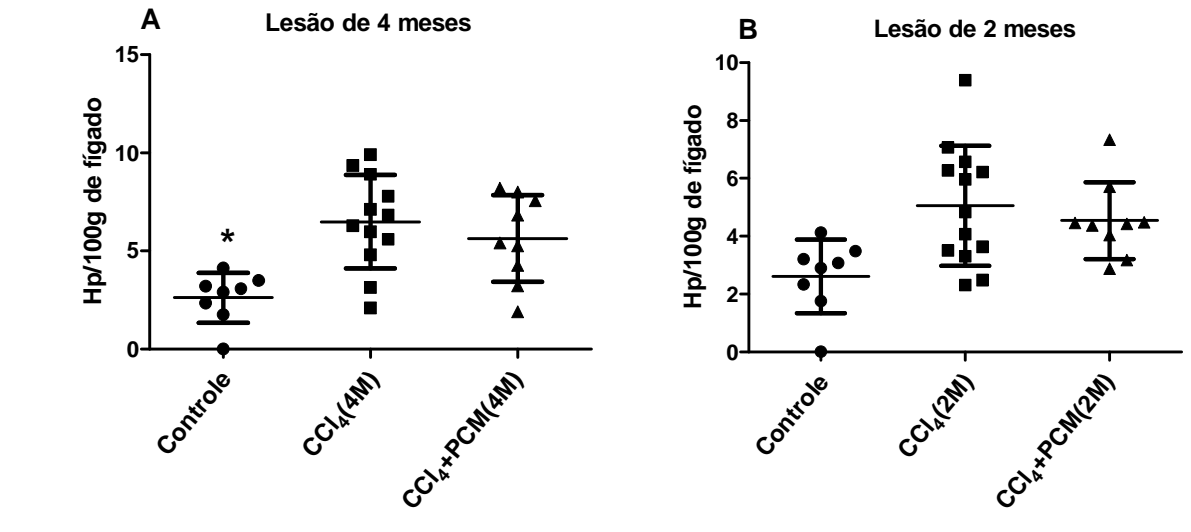


**Fonte:** Elaborada pela autora.

**Legenda:** Nestas secções é possível notar visualmente que o tratamento com a PCM 5% não teve efeito na intensidade da deposição de tecido fibroso. (A e C) Controles positivos de lesão hepática de quatro e dois meses respectivamente e (B e D) camundongos tratados com PCM durante quatro e dois meses, respectivamente. Aumento de 5x.

Em concordância com os resultados obtidos na avaliação morfométrica, também não foi verificada alteração significativa nos níveis de hidroxiprolina após o tratamento com PCM, tanto no grupo de lesão de quatro meses [ $\text{CCl}_4(4\text{M})$ : 6,48 nmol;  $\text{CCl}_4(4\text{M}) + \text{PCM}(4\text{M})$ : 5,62 nmol] (figura 9A), como no de lesão de dois meses [ $\text{CCl}_4(2\text{M})$ : 5,05 nmol;  $\text{CCl}_4(2\text{M}) + \text{PCM}(2\text{M})$ : 4,54 nmol] (figura 9B), com  $p > 0,05$ .

**Figura 9-** Dosagem de hidroxiprolina do experimento utilizando a terapia com PCM a 5%.

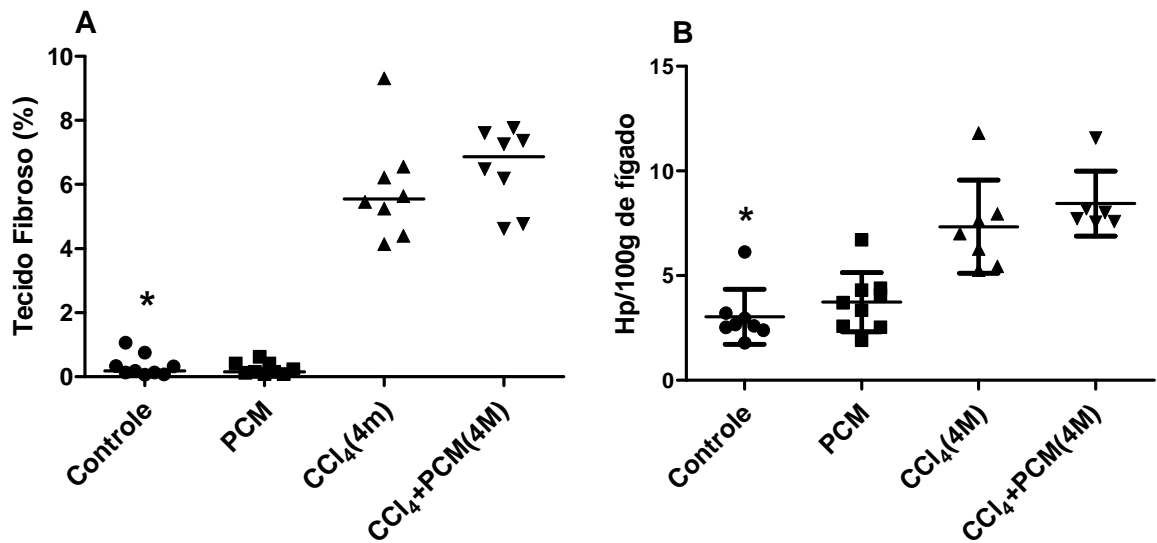


**Fonte:** Elaborada pela autora.

**Legenda:** Dosagem de hidroxiprolina dos grupos experimentais tratados com (A) CCl<sub>4</sub> e PCM 5% concomitantemente [CCl<sub>4</sub>(4M) + PCM(4M)] e (B) CCl<sub>4</sub> e PCM 5%, posteriormente ao estabelecimento da lesão [CCl<sub>4</sub>(2M) + PCM(2M)]. Os valores representam as médias ± DP de 8-13 animais por grupo. \*p < 0,05 em relação aos demais grupos.

Resultados semelhantes foram obtidos quando utilizada a PCM na dose de 1%, tanto pela quantificação de tecido fibroso [CCl<sub>4</sub>(4M): 2,96%; CCl<sub>4</sub>(4M) + PCM 1%(4M): 3,17%], p > 0,05 (figura 10A), quanto pela dosagem de hidroxiprolina [CCl<sub>4</sub>(4M): 7,33 nmol; CCl<sub>4</sub>(4M) + PCM 1%(4M): 8,43 nmol], com p > 0,05 (figura 10B). Adicionalmente, camundongos que receberam apenas PCM a 1% não demonstraram alterações na deposição de tecido fibroso e níveis de hidroxiprolina, quando comparados com o grupo controle sem lesão (p > 0,05) (figura 10A e 10B).

**Figura 10-** Quantificação do percentual de tecido fibroso e dosagem de hidroxiprolina do experimento utilizando a terapia com PCM 1%.

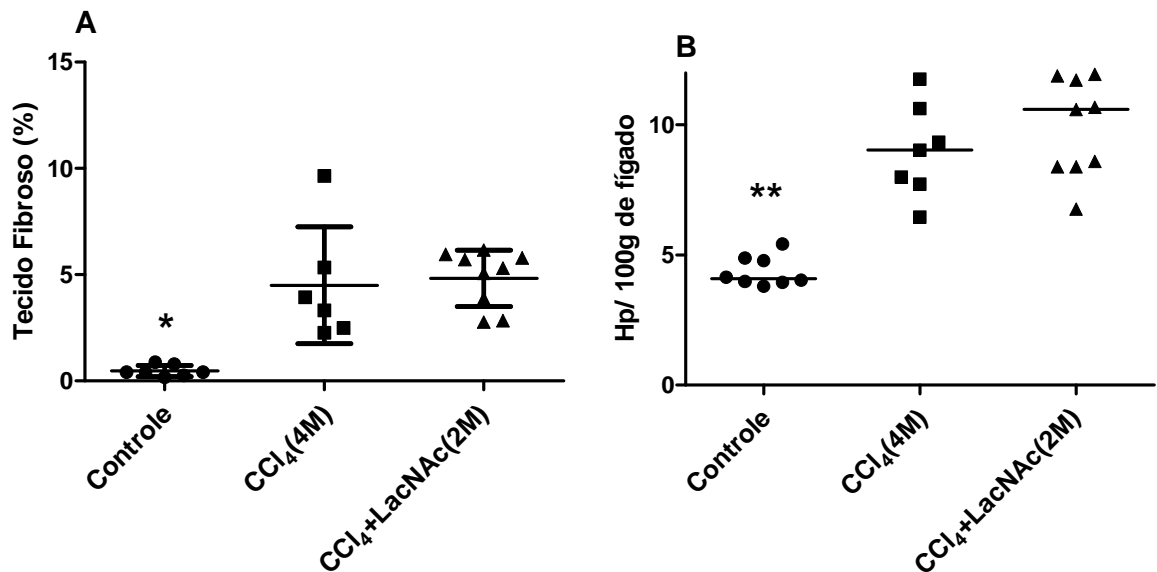


**Fonte:** Elaborada pela autora.

**Legenda:** Quantificação do percentual de tecido fibroso (A) e dosagem de hidroxiprolina (B) dos grupos experimentais tratados concomitantemente com CCl<sub>4</sub> e PEC 1% [CCl<sub>4</sub>(4M) + PCM 1%(4M)]. Os valores dos gráficos representam a média ± DP de 6-9 animais por grupo. \*p< 0,009 em relação aos demais grupos, com exceção do grupo PCM.

A administração da LacNAc, de maneira semelhante à PCM, não interferiu nos níveis de fibrose, não obtendo-se diferença estatística entre os grupos de interesse, analisado tanto pela morfometria [CCl<sub>4</sub>(4M): 4,50%; CCl<sub>4</sub>(4M) + LacNAc(2M): 4,8%] (figura 11A), quanto pela dosagem de hidroxiprolina [CCl<sub>4</sub>(4M): 9,00 nmol; CCl<sub>4</sub>(4M) + LacNAc(2M): 9,89 nmol] (figura 11B). Imagens dos cortes histológicos corados com picrosírius para visualização das fibras colágenas estão demonstradas na figura 12.

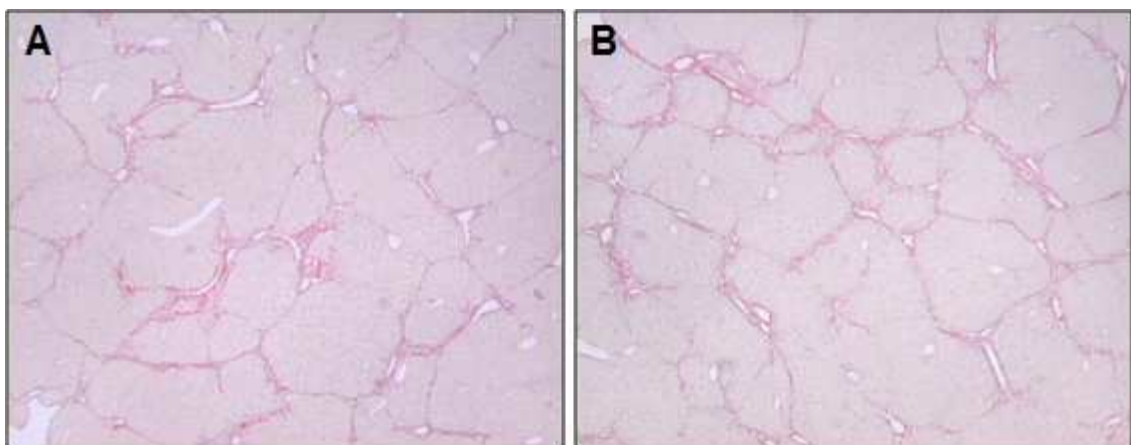
**Figura 11-** Quantificação do percentual de tecido fibroso e dosagem de hidroxiprolina do experimento utilizando a terapia com LacNac.



**Fonte:** Elaborada pela autora.

**Legenda:** Quantificação do percentual de tecido fibroso (A) e dosagem de hidroxiprolina (B) dos grupos experimentais tratados concomitantemente com CCl<sub>4</sub> e LacNac [CCl<sub>4</sub>(4M) + LacNac(2M)]. Os valores do gráfico (A) representam as médias  $\pm$  DP de 6-9 animais por grupo em relação aos demais grupos, com \* $p < 0,0001$  e (B) a mediana de 7-9 animais por grupo, com \*\* $p < 0,0001$  em relação aos demais grupos.

**Figura 12-** Imagens de cortes histológicos de fígados de camundongos corados com picrosírius para avaliação das fibras colágenas dos grupos do experimento utilizando a terapia com LacNac.

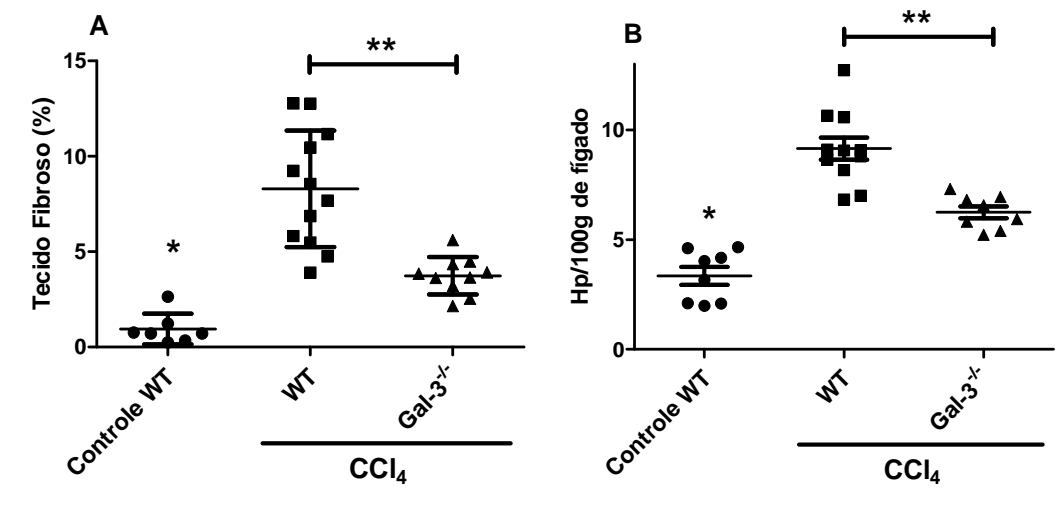


**Fonte:** Elaborada pela autora.

**Legenda:** O tratamento com LacNac não demonstrou efeito na intensidade da deposição de tecido fibroso, podendo ser observado visualmente nestas secções. (A) Controle positivo de lesão hepática de quatro meses e (B) camundongos tratados com LacNac durante 2 meses. Aumento de 5x.

Camundongos Gal-3<sup>-/-</sup> apresentaram uma diminuição significativa do percentual de tecido fibroso quando comparados com WT (WT + CCl<sub>4</sub>(4M): 8,29%; Gal-3<sup>-/-</sup> + CCl<sub>4</sub>(4M): 3,74), com p < 0,0001, bem como redução dos níveis de hidroxiprolina (WT + CCl<sub>4</sub>: 9,15 nmol; Gal-3<sup>-/-</sup> + CCl<sub>4</sub>: 6,15 nmol), p < 0,0001 (figura 13). Imagens dos cortes histológicos corados com picrossírius para visualização das fibras colágenas estão demonstradas na figura 14.

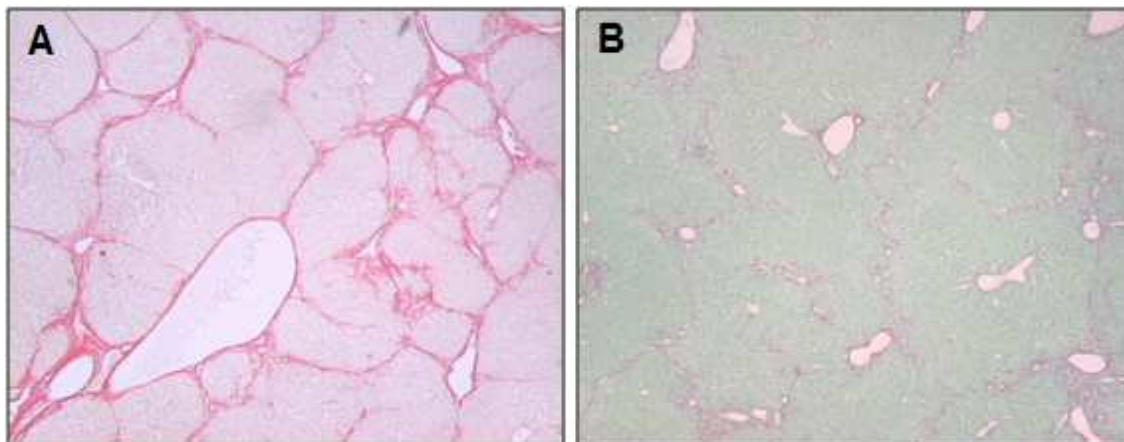
**Figura 13-** Quantificação do percentual de tecido fibroso e dosagem de hidroxiprolina dos animais knockouts para Gal-3, após estímulo com CCl<sub>4</sub>.



**Fonte:** Elaborada pela autora.

**Legenda:** Quantificação do percentual de tecido fibroso (A) e dosagem de hidroxiprolina (B) dos camundongos Gal-3<sup>-/-</sup>. WT= Camundongos selvagens, do inglês *wild type*. Os valores do gráfico (A) representam as médias ± DP de 7-12 animais por grupo, com \*p < 0,0001 em relação aos demais grupos e \*\* p < 0,0001 entre os grupos com lesão por CCl<sub>4</sub>.

**Figura 14-** Imagens de cortes histológicos de fígados de camundongos WT e Gal-3<sup>-/-</sup> corados com picrosírius para avaliação das fibras colágenas.



**Fonte:** Elaborada pela autora

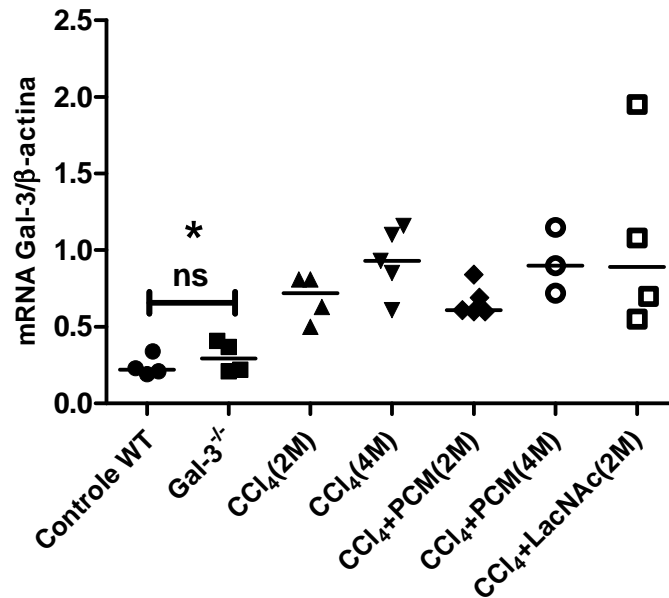
**Legenda:** A seções demonstram a diferença nos níveis de tecido fibroso entre (A) Camundongos WT e (B) Gal-3<sup>-/-</sup>, ambos tratados com CCl<sub>4</sub> durante quatro meses. WT= Camundongos selvagens, do inglês *wild type*. Aumento de 5x.

## 6.2 Avaliação da expressão gênica da Gal-3, MMP-9 e TIMP-1

### 6.2.1 Gal-3

Os inibidores PCM (5%) ou LacNAc não foram capazes de inibir a expressão da Gal-3 no fígado de camundongos com lesão, visto que não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparados os níveis de Gal-3 entre os grupos tratados e os controles positivos (animais com lesão hepática de dois ou quatro meses). Todos os grupos que receberam CCl<sub>4</sub> (com exceção do Gal 3<sup>-/-</sup>) apresentaram aumento da expressão da lectina ( $P < 0,0001$ ). Ao avaliar os grupos submetidos a diferentes tempos de lesão hepática (dois ou quatro meses) observou-se uma tendência a maior expressão da Gal-3 nos animais com lesão prolongada ( $p = 0,05$ ). Os animais Gal 3<sup>-/-</sup> submetidos a quatro meses de intoxicação pelo CCl<sub>4</sub>, apresentaram níveis de mRNA do gene da Gal-3 semelhantes aos animais sem lesão ( $p = 0,62$ ) (figura 15).

**Figura 15-** Análise da expressão gênica da Gal-3 no fígado de camundongos com lesão hepática crônica, após tratamento com os inibidores de Gal-3.



**Fonte:** Elaborada pela autora.

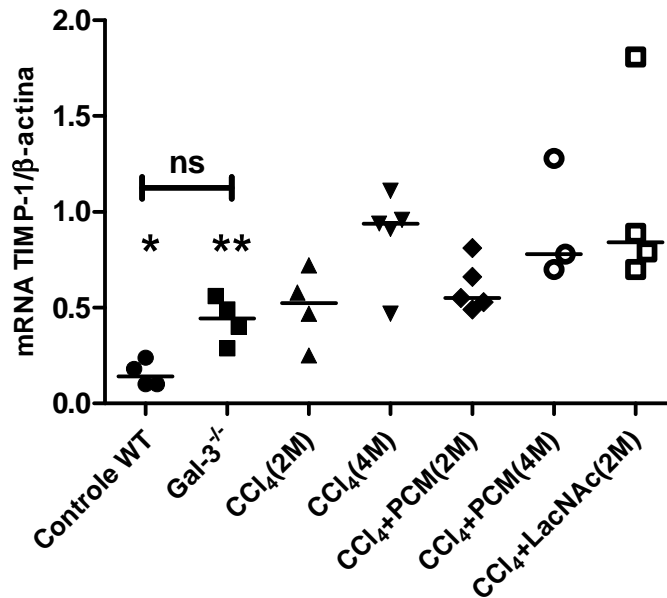
**Legenda:** Representação gráfica dos níveis de mRNA do gene da Gal-3 no fígado de camundongos de sete grupos experimentais. Os valores representam as medianas de 3-5 animais por grupo. \* $p < 0,001$  em relação aos demais grupos. ns= não significativo. WT= Camundongos selvagens, do inglês *wild type*.

### 6.2.2 TIMP-1

Níveis elevados de mRNA do gene TIMP-1 foram observados em todos os grupos tratados com CCl<sub>4</sub> ( $p < 0,01$ ). Este aumento ocorreu de uma maneira proporcional à duração da lesão, onde os camundongos controles positivos de quatro meses apresentaram níveis superiores quando comparados com os de lesão de dois meses ( $p = 0,008$ ). O tratamento com PCM (5%) ou LacNAc não foram capazes de inibir a expressão da TIMP-1 no fígado de camundongos com fibrose, visto que, níveis semelhantes desta proteína foram encontrados nos grupos tratados com os inibidores e os seus respectivos controles de lesão, com  $p > 0,05$ . Os animais Gal 3<sup>-/-</sup> estimulados com CCl<sub>4</sub> apresentaram níveis inferiores de mRNA do gene da TIMP-1 quando comparados com o controle positivo de quatro meses ( $p < 0,001$ ) e tendência a expressar quantidades semelhantes ao controle sem lesão ( $p = 0,07$ ).



**Figura 16-** Análise da expressão gênica de TIMP-1 no fígado de camundongos com lesão hepática crônica, após tratamento com os inibidores de Gal-3.



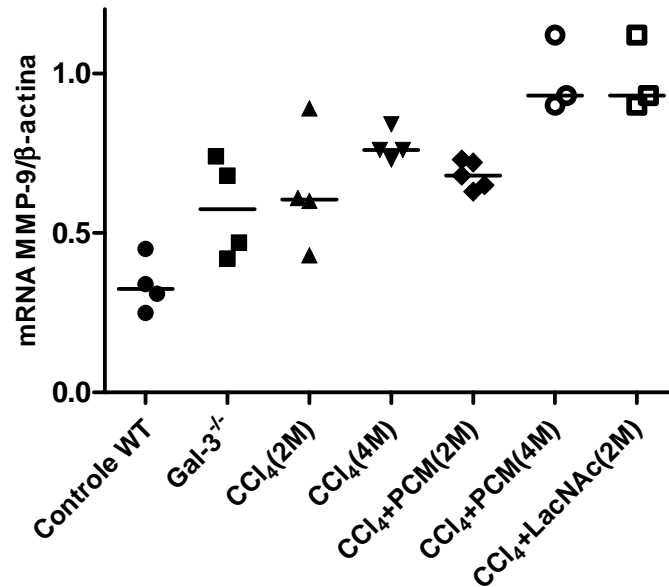
**Fonte:** Elaborada pela autora.

**Legenda:** Representação gráfica dos níveis de mRNA do gene TIMP-1 no fígado de camundongos de sete grupos experimentais. Os valores representam a mediana de 3-5 animais por grupo. \* $p < 0,01$  em relação aos demais grupos. \*\* $p < 0,005$  em relação aos grupos tratados com CCl<sub>4</sub> por quatro meses. WT= Camundongos selvagens, do inglês *wild type*.

### 6.2.3 MMP-9

A terapia com PCM (5%) ou LacNAc não influenciou na expressão dos níveis de MMP-9, uma vez que não verificou-se diferenças entre os animais tratados e os controles positivos ( $p > 0,05$ ). Os animais Gal-3<sup>-/-</sup> após estímulo agressor por CCl<sub>4</sub>, apresentaram níveis de mRNA do gene da MMP-9 superiores aos animais selvagens sem lesão e inferiores aos animais controles positivos de quatro meses, porém os resultados não foram estatisticamente significativos, com  $p = 0,10$  e  $p = 0,26$  respectivamente.

**Figura 17-** Análise da expressão gênica de MMP-9 no fígado de camundongos com lesão hepática crônica, após tratamento com os inibidores de Gal-3.



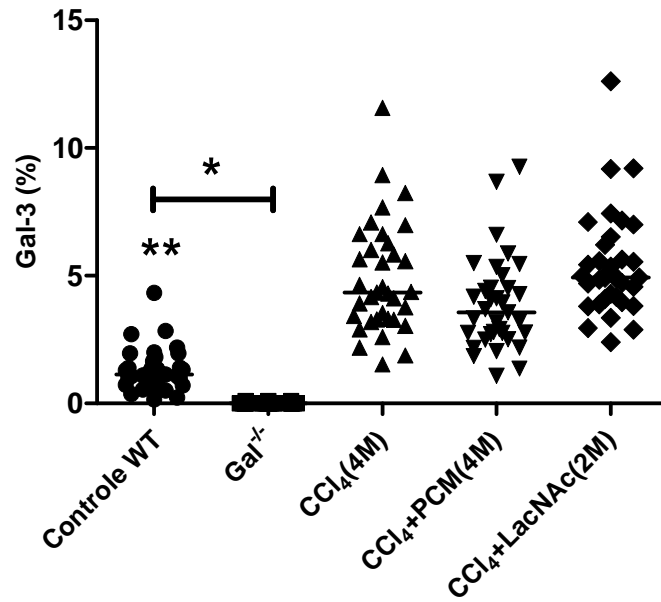
**Fonte:** Elaborada pela autora.

**Legenda:** Representação gráfica dos níveis de mRNA da MMP-9 no fígado de camundongos de sete grupos experimentais. Os valores representam as médias ± DP de 3-5 animais por grupo. WT= Camundongos selvagens, do inglês *wild type*

### 6.3 Análise dos níveis da proteína Gal-3 por imunofluorescência

Através do ensaio de imunofluorescência, foi possível observar que não houve diferenças significativas dos níveis de Gal-3, entre os grupos tratados com PCM 5% ou LacNAc e o controle positivo de lesão de quatro meses ( $p > 0,05$ ), confirmando o resultado obtido pela RTqPCR para a Gal-3 (figura 18 e 19). Além disso, todos os grupos que receberam CCl<sub>4</sub>, demonstraram níveis elevados desta lectina ( $p < 0,0001$ ), principalmente em células morfologicamente semelhantes aos macrófagos, co-localizadas em áreas de intensa deposição de fibras colágenas. Com este ensaio, foi possível confirmar a ausência da proteína Gal-3 nos camundongos Gal-3<sup>-/-</sup>, visto que não houve marcação desta lectina no tecido hepático destes animais (figura 19B).

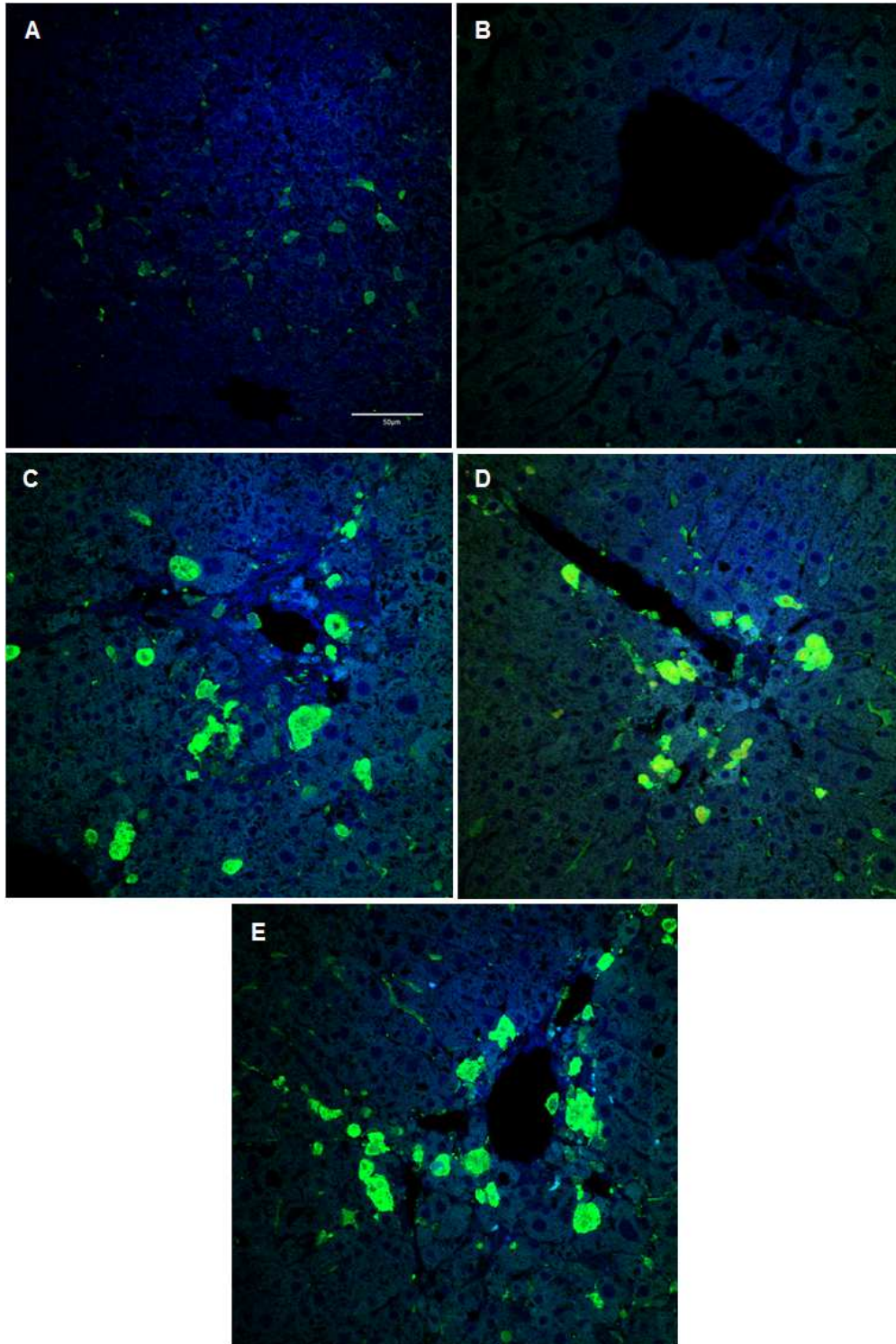
**Figura 18-** Quantificação da Gal-3, pela técnica de imunofluorescência, no fígado de camundongos com lesão hepática, após tratamento com PCM 5% e LacNac.



**Fonte:** Elaborada pela autora.

**Legenda:** Representação gráfica dos níveis da proteína Gal-3 no fígado de camundongos de cinco grupos experimentais. Os valores representam as médias  $\pm$  DP da quantificação de 7 campos randômicos por secção, 5 animais por grupo. \* $p < 0,0001$ , em relação aos demais grupos; \*\* $p < 0,01$ , em relação ao grupo Gal-3<sup>-/-</sup>. WT= Camundongos selvagens, do inglês *wild type*.

**Figura 19-** Imunofluorescência para a Gal-3 no fígado de camundongos com lesão hepática crônica, após tratamento com os inibidores de Gal-3.



**Fonte:** Elaborada pela autora.

**Legenda:** Imagens de imunofluorescência para Gal-3 em cinco grupos experimentais: (A) Controle WT; (B) Camundongos Gal-3<sup>-/-</sup>; (C) Controle positivo de lesão de quatro meses [CCl<sub>4</sub>(4M)]; (D) Camundongos tratados concomitantemente com CCl<sub>4</sub> e PCM 5% [CCl<sub>4</sub>(4M) + PCM 5%(4M)]; (E) Camundongos tratados com CCl<sub>4</sub> e LacNAc [CCl<sub>4</sub>(4M) + LacNAc(2M)]. Verde: marcação para Gal-3; Azul (DAPI): marcação de núcleo. As imagens foram obtidas no microscópio confocal FluoView 1000 (Olympus, Tóquio, Japão). Para quantificação, utilizou-se 7 campos aleatórios por secção, de 5 animais por grupo, capturados com objetiva de 40x (escala de barra 5 µm) e analisados no software Image Pro Plus v.7.0. (Media Cybernetics, Bethesda, USA).

## 7 DISCUSSÃO

A pectina cítrica modificada vem sendo amplamente estudada como uma molécula inibidora natural da Gal-3 e ganhando destaque por possuir um importante papel na redução e prevenção da carcinogênese. Até o momento, o uso da PCM tem trazido bons resultados na redução da metástase tumoral, como já foi mostrado em estudos utilizando modelo animal (DEMOTTI et al., 2010; GILLEN; LOTT, 2000; HAYASHI; LIU et al., 2008; LIU; HUANG; YANG, 2008; NANGIA-MAKKER et al., 2002; PIANTA et al., 1995; PLATT; RAZ, 1992).

Além disso, um estudo clínico realizado com pacientes com tumores sólidos em estágio avançado demonstrou que 20,7% dos pacientes obtiveram melhora clínica após ingestão de PCM. (AZÉMAR et al., 2007). Estas evidências reforçam a capacidade da PCM em interagir com a Gal-3, e inibir suas atividades, em modelo oncológico em uma variedade de órgãos. Contudo, pouco se sabe sobre o seu potencial terapêutico nas doenças fibróticas.

No presente estudo, foi verificado que a PCM não foi capaz de diminuir a intensidade da fibrose em modelo experimental de lesão hepática crônica induzida pelo CCl<sub>4</sub>, tanto quando administrada durante o desenvolvimento da lesão, como após o seu estabelecimento. Este achado entrou em concordância com os resultados da quantificação da Gal-3, tanto a nível de mRNA, como a nível de proteína, onde ambos permaneceram inalterados após terapia. Embora a PCM não tenha apresentado a atuação terapêutica desejada nos nossos experimentos, esse inibidor da Gal-3 demonstrou atividade protetora em modelo de nefropatia aguda induzida por ácido fólico, com redução da expressão de Gal-3, associada com a diminuição da fibrose renal (KOLATSI-JOANNOU et al., 2011). A mesma resposta protetora da PCM também foi observada na fibrose vascular, em estudo de disfunções cardíacas, em ratos (CALVIER et al., 2013). As discordâncias nos resultados obtidos podem ser decorrentes das metodologias utilizadas, uma vez que PCM, no modelo de lesão renal, embora utilizada na mesma concentração do presente trabalho (1%), foi administrada antes da indução da nefropatia (KOLATSI-JOANNOU et al., 2011). Já no modelo de fibrose vascular, foi utilizada por via orogástrica, na concentração 100 mg/kg/dia, o que fornece uma maior precisão da quantidade de droga administrada por camundongo do que quando fornecido *ad libitum*, na água de beber (CALVIER et al., 2013). Na tentativa de mimetizar os

danos hepáticos que acontecem nos seres humanos, administramos a PCM simultaneamente a indução da lesão, ou após o seu estabelecimento. Em nenhuma das metodologias utilizadas o PCM foi capaz de alterar o quadro de fibrose hepática.

O uso da PCM em modelo de câncer de cólon e metástase hepática é o único estudo disponível na literatura que avalia o efeito deste inibidor no fígado (LIU et al., 2008; LIU, HUANG, YANG, 2008). Neste trabalho, a metástase hepática foi reduzida pela administração oral de PCM de uma maneira dose-dependente. Camundongos tratados com PCM a 1%, 2,5%, 5%, *ad libitum*, apresentaram um decréscimo da metástase de 20, 36,7 e 40%, respectivamente, em relação aos controles. Contudo, apesar do efeito anti-metastático demonstrado pela droga, não foi possível observar diferenças significativas nos níveis de Gal-3, tanto no soro, como no fígado entre os grupos experimentais. Isto sugere que a PCM pode possuir outros mecanismos de ação, que não através da inibição da Gal-3 (LIU et al., 2008; LIU, HUANG, YANG, 2008).

Jackson et al. (2007) observaram que a PCM tinha pouca ou nenhuma atividade apoptótica em células cancerosas humanas da próstata (LNCaP), enquanto que a pectina fracionada em pó (FPP), modificada por fragmentação térmica, induziu a apoptose. No entanto, as células LNCaP utilizadas no referido trabalho, interessantemente não expressam Gal-3 (CALIFICE et al., 2004), sugerindo que os efeitos apoptóticos de pectinas nele relatados são devidos a mecanismos não mediados pela Gal-3, possivelmente pela interação com a Galectina-1 (JACKSON et al., 2007).

O termo Pectina Modificada é uma denominação abrangente, englobando pectinas com diferentes composições de açúcares, pesos moleculares, níveis de acetilação e métodos de fragmentação (enzimático, químico e térmico), o que pode originar moléculas com diferentes propriedades e conseqüentemente, atuações divergentes (MORRIS et al., 2013). Isto certamente se apresenta como um obstáculo para os estudos que avaliam estas moléculas como possível terapia, visto que muitas vezes não é especificado o tipo de pectina utilizada.

De maneira semelhante à PCM, a utilização da LacNAc não interferiu nos níveis de Gal-3 no fígado e, dessa forma, não foi capaz de atenuar os efeitos fibróticos promovidos pelo CCl<sub>4</sub>. Isto sugere que esta droga não atua como inibidora de Gal-3 neste órgão, o que não foi observado nos modelos de insuficiência cardíaca e nefropatia hipertensiva (FRENAY et al., 2014; YU et al., 2013). Nesses

dois últimos trabalhos, foi observada diminuição da Gal-3, associada com a atenuação das lesões, após tratamento com LacNAc na mesma dose e pela mesma via de administração utilizada no nosso trabalho (50 µg/kg/dia, por via intraperitoneal). Contudo, não se tem evidências na literatura do efeito da LacNAc em modelo de lesão hepática crônica.

A elevada expressão de Gal-3 tem sido associada à fibrose em diversos modelos experimentais de lesões hepáticas, como no modelo tóxico por CCl<sub>4</sub> (HENDERSON et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2012), pela ligação do ducto biliar (JIANG et al., 2012) e na esteato-hepatite não alcoólica (NASH) induzida por estreptozotocina (TRABER; ZOMER, 2013). Nossos resultados corroboram com estes achados, visto que constatamos um aumento da expressão de Gal-3 no fígado dos camundongos com lesão hepática. Também foi verificada que a produção desta lectina ocorreu de maneira proporcional à intensidade da lesão, visto que, camundongos estimulados com CCl<sub>4</sub> durante quatro meses apresentaram níveis mais elevados de Gal-3 quando comparados com os estimulados durante apenas dois meses. As terapias com os inibidores, por sua vez, não influenciaram os níveis hepáticos de Gal-3. Até o momento, não existe evidência do bloqueio desta proteína no fígado por parte dos dois inibidores.

Em relação aos níveis dos reguladores da degradação do tecido fibroso, não foi observada alteração na expressão tanto de MMP-9, como de TIMP-1, após tratamento com os inibidores de Gal-3. Este resultado foi esperado, uma vez que a terapia não teve ação na resolução da lesão hepática. Adicionalmente, nossos dados indicam que camundongos com fibrose apresentam níveis elevados de TIMP-1, assim como observado em estudos anteriores com pacientes (BENYON et al., 1996) e em modelos animais (IREDALE et al., 1996; IREDALE, 2007). Além disso, o aumento de TIMP-1 nestes animais ocorreu proporcionalmente à progressão da lesão, onde os grupos de camundongos com lesão de quatro meses expressaram mais TIMP-1 em relação aos grupos de dois meses. Estes resultados estão em concordância com dados da literatura que mostram esse aumento proporcional de TIMP-1 e o apontam como um dos marcadores utilizados para avaliar o grau de fibrose hepática em pacientes com diferentes hepatopatias (ALKHOURI et al., 2011; PARKES et al., 2010; ROSENBERG et al., 2004).

A MMP-9, por sua vez, tem apresentado resultados inconsistentes sobre os seus níveis em modelos animais de lesões hepáticas agudas e crônicas (HEMMANN

et al., 2007). De maneira geral, níveis elevados de MMP-9 são encontrados em fígados com lesão, porém de uma forma não relacionada ao grau de fibrose (HEMMANN et al., 2007). De fato, isto foi evidenciado no nosso trabalho, uma vez que camundongos com fibrose apresentaram níveis mais altos de MMP-9, porém de uma maneira não proporcional à intensidade da lesão.

No nosso trabalho, animais knockouts para o gene da Gal-3, foram utilizados como um controle do experimento, e a ausência desta lectina foi confirmada a nível de proteína. Nossos resultados demonstraram que os camundongos Gal-3<sup>-/-</sup> apresentaram redução significativa da fibrose hepática induzida pelo CCl<sub>4</sub>, corroborando com dados de estudos anteriores (HENDERSON et al., 2006; JIANG et al., 2012). Este achado reforça o conceito de que a Gal-3 desempenha um papel importante durante a deposição de tecido fibroso durante a lesão hepática.

Os camundongos Gal-3<sup>-/-</sup> apresentaram uma diminuição dos níveis de TIMP-1 em relação ao seu controle positivo de lesão de quatro meses, demonstrando tendência a expressar quantidades semelhantes ao controle sem lesão. Esta atenuação da expressão de TIMP-1 já foi demonstrada por Jiang et al. (2012), em camundongos Gal-3<sup>-/-</sup> submetidos à ligação do ducto biliar. Sabe-se que a elevada produção de TIMP-1 nas lesões hepáticas se dá em grande parte pelas CEHs ativadas (HEMMANN et al., 2007). Em camundongos Gal-3<sup>-/-</sup> a ativação dessa população celular é deficiente, o que explica a diminuição da expressão de TIMP-1. Essa glicoproteína estando diminuída, atenua a inibição da MMP-9, a qual está livre para degradar o tecido fibroso, podendo ser este um dos mecanismos pelo qual camundongos Gal-3<sup>-/-</sup> desenvolvem menos fibrose em relação aos selvagens.

Diferentes inibidores de Gal-3 têm sido descritos com potencial terapêutico frente a desordens hepáticas (TRABER, 2013; TRABER; ZOMER, 2013). A utilização de GR-MD-02 (Galactoarabino-rhamnogalaturonan) e GM-CT-01 (Galactomannan), dois complexos de carboidratos, acentuadamente melhoraram a regeneração hepática e promoveram redução de gordura hepatocelular e de tecido fibroso em camundongos com NASH (TRABER; ZOMER, 2013). Resultados semelhantes foram obtidos em modelo tóxico induzido por tioacetamida (TAA) em ratos, onde além de reduzir os níveis de tecido fibroso, o tratamento foi capaz de reverter o quadro de cirrose hepática (TRABER et al., 2013). Assim, apesar da PCM e a LacNAc não terem apresentado resultados promissores no presente trabalho,



maiores estudos referentes a via de administração e concentração dos compostos testados precisam ser avaliados.

## 8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nessa dissertação permitiram concluir que tanto a PCM quanto a LacNAc, nas condições experimentais utilizadas no presente trabalho, não foram capazes de bloquear a expressão da Gal-3 e conseqüentemente não apresentaram atividade anti-fibrótica no modelo de lesão hepática. Contudo, maiores estudos devem ser realizados a fim avaliar a real capacidade de ligação dos inibidores à Gal-3 nesse modelo experimental, bem como testar a eficácia do tratamento utilizando diferentes concentrações dos inibidores e outras vias de administração.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, H.H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. **ELSEVIER**, 7. ed., Rio de Janeiro, 2011.

ALKHOURI, N. et al. A combination of the pediatric NAFLD fibrosis index and enhanced liver fibrosis test identifies children with fibrosis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, Filadélfia, v. 9, p. 150-155, 2011.

ANDERSSON, K. L.; CHUNG, R.T. Hepatic schistosomiasis. **Current Treatment Options in Gastroenterology**, Filadélfia, v. 10, n. 6, p. 504–512, 2007.

ARGUËSO, P.; PANJWANI, N. Focus on Molecules: Galectin-3. **Experimental Eye Research**, Londres, v. 92, n. 1, p. 2-3, 2011.

AZÉMAR, M. et al. Clinical benefit in patients with advanced solid tumors treated with modified citrus pectin: a prospective pilot study. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, Nova Zelândia, p. 73-80, 2007.

BAYES-GENIS, A. et al. Head-to-head comparison of 2 myocardial fibrosis biomarkers for long-term heart failure risk stratification: ST2 versus galectin-3. **Journal of the American College of Cardiology**, Nova Iorque, v. 63, p. 158–166, 2014.

BENYON, R. C. et al. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 110, p. 821–831, 1996.

BERGMAN, I.; LOXLEY R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 35, n. 12, p. 1961-1965, 1963.

BINH, N. H. et al. Galectin-3 in preneoplastic lesions of glioma. **Journal of Neurooncology**, Nova Iorque, v. 111, p. 123-132, 2013.

BLUMBERG, R. S. et al. Primary hepatocellular carcinoma in idiopathic hemochromatosis after reversal of cirrhosis. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 95, p. 1399–1402, 1988.

BRAEUER, R. R. et al. Galectin-3 contributes to melanoma growth and metastasis via regulation of NFAT1 and autotaxin. **Cancer Research**, Chicago, v. 72, p. 5757-5766, 2012.

CALIFICE, S. et al. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs. tumor production of cytoplasmic galectin-3. **Oncogene**, Basingstoke, v. 23, p. 7527–7536, 2004.

CALVIER, L. et al. Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v. 33, p. 67-75, 2013.

CARBOSYNTH. **N-Acetyl-D-lactosamine**. Disponível em: <[http://www.carbosynth.com/carbosynth/website.nsf/\(w-productdisplay\)/40150F1C100D345180256A6B003598A3](http://www.carbosynth.com/carbosynth/website.nsf/(w-productdisplay)/40150F1C100D345180256A6B003598A3)>. Acesso em: 15 de março de 2015.

CASSIMAN, D. et al. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. **Journal of Hepatology**, Copenhagen, v. 36, n. 2, p. 200-209, 2002.

CHAUHAN, D. et al. A novel carbohydrate-based therapeutic GCS-100 overcomes Bortezomib resistance and enhances dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. **Cancer Research**, Chicago, v. 65, p. 8350–8358, 2005.

CHENG, K.; YANG, N.; MAHATO, R. I. TGF- $\beta$ 1 gene silencing for treating liver fibrosis, **Molecular Pharmacology**, Washington, v. 6, p. 772–779, 2009.

CHIU, C. G. et al. Diagnostic utility of galectin-3 in thyroid cancer. **American Journal of Pathology**, Filadélfia, v. 176, p. 2067-2081, 2010.

COLNOT, C. et al. Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. **Immunology**, Oxford, v. 94, p. 290-296, 1998.

COMPAGNO, D. et al. Glycans and galectins in prostate cancer biology, angiogenesis and metastasis. **Glycobiology**, Oxford, v. 24, p. 899-906, 2014.

CORRAO, G.; ARICO, S. Independent and combined action of hepatitis C virus infection and alcohol consumption on the risk of symptomatic liver cirrhosis. **Hepatology**, Baltimore, v. 27, p. 914-919, 1998.

CUSTER, B. et al. Global epidemiology of hepatitis B virus. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 38, p. 158–168, 2004.

DAS, K. et al. Nonobese population in a developing country has a high prevalence of nonalcoholic fatty liver and significant liver disease. **Hepatology**, Baltimore, v. 51, n. 5, p. 1593–1602, 2010.

DEMOTTE, N. et al. A galectin-3 ligand corrects the impaired function of human CD4 and CD8 tumor-infiltrating lymphocytes and favors tumor rejection in mice. **Cancer Research**, Chicago, v. 70, n. 19, p. 7476-7488, 2010.

DRAGOMIR, A. C. et al. Role of Galectin-3 in Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity and Inflammatory Mediator Production. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 127, n. 2, p. 609–619, 2012.

- DRANOFF, L. Z. et al. Transforming growth factor-beta and substrate stiffness regulate portal fibroblast activation in culture. **Hepatology**, Baltimore, v. 46, p. 1246–1256, 2007.
- DUARTE, S. et al. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. **Matrix Biology**, Stuttgart, 2015.
- EBRAHIM, A. H. et al., Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy. **Annals of Translational Medicine**, Hong Kong, v. 2, n. 9, p. 88, 2014.
- ELIAZ, I. Binding of galectin-3 by low molecular weight pectin. **US Patent Application** No.:20110294755, 2011.
- FARNWORTH, S. **The role of galectin-3 in inflammation**. A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy- University of Edinburgh, 2007.
- FRIEDMAN, S. L. et al. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 82, p. 8681-8685, 1985.
- FRIEDMAN, S. L. et al. Therapy for Fibrotic Diseases: Nearing the Starting Line. **Science Translational Medicine**, Washington, v. 5, n. 167, p. 167, 2013.
- FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 134, p. 1655–1669, 2008
- FRIEDMAN, S. L. Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, p. 2247-2250, 2000.
- GEERTS, A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. **Seminars in Liver Disease**, Nova Iorque, v. 21, p. 311-335, 2001.
- GLINSKII, O. et al. Mechanical entrapment is insufficient and intercellular adhesion is essential for metastatic cell arrest in distant organs. **Neoplasia**, Nova Iorque, v. 7, n. 5, p. 522–527, 2005.
- GOTO, T. et al. Mechanical stretch induces matrix metalloproteinase 1 production in human hepatic stellate cells. **Pathophysiology**, Amsterdam, v. 11, n. 3, p. 153–158, 2004.
- GRESSNER, A. M. et al. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. **Frontiers in Bioscience**, Searington, v. 17, p. 793-807, 2002.
- GUNNING, A. P.; BONGAERTS, R. J.; MORRIS, V. J. Recognition of galactan components of pectin by galectin-3. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 23, p. 415–424, 2009.

HADZIYANNIS, S. J. et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 348, p. 800–807, 2003.

HAYASHI, A.; GILLEN, A. C.; LOTT, J. R. Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin on implanted colon-25 tumor growth in Balb-c mice. **Alternative Medicine Review**, Sandpoint, v. 5, n. 6, p. 546–552, 2000.

HEMMANN, E. et al. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis – a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. **Journal of Hepatology**, Copenhagen, v. 46, n. 5, p. 955-975, 2007.

HENDERSON, N. C. et al. Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. **American Journal of Pathology**, Filadélfia, v. 172, p. 288–298, 2008.

HENDERSON, N. C. et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 5060–5065, 2006.

HENDERSON, N. C.; SETHI, T. The regulation of inflammation by galectin-3. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 230, p. 160–171, 2009.

HERNANDES, V.; FRIEDMAN, S. L. Pathogenesis of Liver Fibrosis. **Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease**, Palo Alto, v. 6, p. 425–456, 2011.

HERNANDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN, S. L. Pathogenesis of Liver Fibrosis. **Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease**, Palo Alto, v. 6, p. 425–56, 2011.

HO, J. E. et al. Galectin-3, a marker of cardiac fibrosis, predicts incident heart failure in the community. **Journal of the American College of Cardiology**, Nova Iorque, v. 60, p. 1249–1256, 2012.

HSIEH, T. C.; WU, J. M. Changes in cell growth, cyclin/kinase, endogenous phosphoproteins and nm23 gene expression in human prostatic JCA-1 cell treated with modified citrus pectin. **Biochemistry and Molecular Biology International**, Sydney, v. 37, p. 833–841, 1995.

HSU, D. K. et al. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. **International Journal of Cancer**, Genève, v.81, n. 4, p. 519-526, 1999.

HSU, D. K. et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. **American Journal of Pathology**, Filadélfia, v.156, p.1073–1083, 2000.

HTWE, T. T. et al. Differential expression of galectin-3 in advancing thyroid cancer cells: a clue toward understanding tumour progression and metastasis. **Singapore Medical Journal**, Cingapura, v. 51, n. 11, p. 856-859, 2010.

IDIKIO, H. Galectin-3 expression in human breast carcinoma: correlation with cancer histologic grade. **International Journal of Oncology**, Atenas, v. 12, n. 6, p. 1287-1290, 1998.

INOHARA, H.; AKAHANI, S.; RAZ, A. Galectin-3 stimulates cell proliferation. **Experimental Cell Research**, Nova Iorque, v. 245, n. 2, p. 294-302, 1998.

INOHARA, H.; RAZ, A. Effects of natural complex carbohydrate (citruspectin) on murine melanoma cell properties related to galectin-3 functions. **Glycoconjugate Journal**, Lund, v. 11, n. 6, p. 527–532, 1994.

IREDALE, J. P. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. **Hepatology**, Baltimore, v. 24, p. 176–184, 1996.

IREDALE, J. P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 117, p. 539–548, 2007.

IREDALE, J. P.; THOMPSON, A.; HENDERSON, N. C. Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1832, n. 7, p. 876-883, 2013.

JACKSON, C. L. et al. Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. **Glycobiology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 805–819, 2007.

JIANG, J. X. et al. Galectin-3 modulates phagocytosis-induced stellate cell activation and liver fibrosis in vivo. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 302, p. 439–446, 2012.

JIANG, J. X.; TÖRÖK, N. J. Liver Injury and the Activation of the Hepatic Myofibroblasts. **Current Pathobiology Reports**, Estados Unidos, v. 1, n. p. 215-223, 2013.

JUNQUEIRA, L. C. U., BIGNOLOS, G., BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue section. **Histochemical Journal**, Londres, v.11, p. 447-455, 1979.

KAIMORI, A. et al. Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes *in vitro*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, p. 22089–22101, 2007.

KALLURI, R.; NEILSON, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 112, p. 1776–1784, 2003.

KEEFFE, E. B. Liver Transplantation: Current Status and Novel Approaches to Liver Replacement, Keefe EB. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 120, p. 749-762, 2001.

KERSHENOBICH, D. et al. Colchicine in the treatment of cirrhosis of the liver. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 318, n. 26, p. 1709-1713, 1988.

KIM, S. J. et al. Galectin-3 increases gastric cancer cell motility by up-regulating fascin-1 expression. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 138, p. 1035-1045, 2010.

KISSELEVA, T. et al. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, Copenhagen, v. 45, p. 429–438, 2006.

KOLATSI-JOANNOU, M. et al. Modified Citrus Pectin Reduces Galectin-3 Expression and Disease Severity in Experimental Acute Kidney Injury. **PLoS One**, São Francisco, v. 6, n. 4, e18683, 2011.

KURZEPA, J. et al. Role of MMP-2 and MMP-9 and their natural inhibitors in liver fibrosis, chronic pancreatitis and non-specific inflammatory bowel diseases. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, Qingchunru, v. 13, n. 6, p. 570-579, 2014.

LAI, C. L. et al. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 339, p. 61–68, 1998.

LEE, J. et al. Immunohistochemical localization of galectin-3 in the granulomatous lesions of paratuberculosis-infected bovine intestine. **Journal of Veterinary Science**, Seoul, v. 10, p. 177-180, 2009.

LEE, U. E.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, Baltimore, v. 25, n. 2, p. 195-206, 2011.

LEFKOWITCH, J. H. Hepatobiliary pathology. **Current Opinion in Gastroenterology**, Baltimore, v. 22, n. 3, p. 198–208, 2006.

LI, L. C.; LI, J. GAO, J. Functions of Galectin-3 and Its Role in Fibrotic Diseases. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 351, n. 2, p. 336-343, 2014.

LIM, Y. S. et al. Susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis is associated with shared amino acid sequences at positions 70–74 of the HLA-DRB1 molecule. **Journal of Hepatology**, Copenhagen, v. 48, n. 1, p. 133–139, 2008.

LIU, F. T. et al. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. **American Journal of Pathology**, Filadélfia, v. 147, p. 1016-1028, 1995.

LIU, H. Y. et al. Inhibitory effect of modified citrus pectin on liver metastases in a mouse colon cancer model. **World Journal of Gastroenterology**, Pequim, v. 14, n. 48, p. 7386–7391, 2008.



LIU, H. Y., HUANG, Z. L., YANG, G. H. Inhibitory effect of modified citrus pectin on liver metastases in a mouse colon cancer model. **Journal of Practical Oncology**, v. 23, n. 6, p. 509–514, 2008.

LIU, X. et al. Reversibility of Liver Fibrosis and Inactivation of Fibrogenic Myofibroblasts. **Current Pathobiology Reports**, Estados Unidos, v. 1, p. 209–214, 2013

LOK, D. J. A. et al. Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study. **Clinical Research in Cardiology**, Darmstadt, v. 99, p. 323–328, 2010.

LOPEZ-ANDRÈS, N. et al. Association of galectin-3 and fibrosis markers with long-term cardiovascular outcomes in patients with heart failure, left ventricular dysfunction, and dyssynchrony: insights from the CARE-HF (Cardiac Resynchronization in Heart Failure) trial. **European Journal of Heart Failure**, Amsterdam, v. 14, p. 74–81, 2012.

MACKINNON, A. C. et al. Regulation of transforming growth factor- $\beta$ 1-driven lung fibrosis by galectin-3. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, Nova lorque, v. 185, p. 537–546, 2012.

MACKINNON, A. C. et al. Regulation of Alternative Macrophage Activation by Galectin-3. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 180, p. 2650-2658, 2008.

MACKINNON, A. C. et al. Regulation of transforming growth factor- $\beta$ 1-driven lung fibrosis by galectin-3. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, Nova lorque, v. 185, n. 5, p. 537-46, 2012.

MARRA, F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. **Journal of Hepatology**, Copenhagen, v. 31, p. 1120-1130, 1999.

MAXWELL, E. G. et al. Pectin - An emerging new bioactive food polysaccharide. **Trends in Food Science & Technology**, v. 24, p. 64-73, 2012.

MERSEBURGER, A. S. et al. Involvement of decreased galectin-3 expression in the pathogenesis and progression of prostate cancer. **Prostate**, Nova lorque, v. 68, n. 1, p. 72-77, 2008.

MILLER, A. M. et al. Molecular mechanisms of alcoholic liver disease: Innate immunity and cytokines. **Alcoholism, clinical and experimental research**, Nova lorque, v. 35, n. 5, p. 787–793, 2011.

MOISA, A. et al. Growth/adhesion-regulatory tissue lectin galectin-3: stromal presence but not cytoplasmic/nuclear expression in tumor cells as a negative prognostic factor in breast cancer. **Anticancer Research**, Atenas, v. 27, p. 2131-2139, 2007.

MORGAN, T. R. et al. Colchicine treatment of alcoholic cirrhosis: a randomized, placebo-controlled clinical trial of patient survival. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 128, p. 882–890, 2005.

MORMONE, E.; GEORGE, J.; NIETO, N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 193, p. 225–231, 2011.

MORRIS, V. J. et al. The bioactivity of modified pectin fragments. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 21–37, 2013.

MORRIS, V. J. et al. Using AFM and force spectroscopy to determine pectin structure and (bio) functionality. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, p. 230–237, 2011.

MORROW, D. A.; O'DONOGHUE, M. L. Galectin-3 in cardiovascular disease a possible window into early myocardial fibrosis. **Journal of the American College of Cardiology**, Nova Iorque, v. 60, n. 14, p. 1257–1258, 2012.

MOULTSATSOS, I. K. et al. Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 84, p. 6452, 1987.

NANGIA-MAKKER, P. et al. Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 94, n. 24, p. 1854–1862, 2002.

NISHI, Y. et al. Role of galectin-3 in human pulmonary fibrosis. **Allergology International**, Carlton, v. 56, p. 57-65, 2007.

NOVOBRANTSEVA, T. I. et al. Delivering silence: advancements in developing siRNA therapeutics. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, Londres, v. 11, p. 217–224, 2008.

OCHIENG, J.; LEITE-BROWNING, M. L.; WARFIELD, P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova Iorque, v. 246, p. 788-791, 1998.

OLIVEIRA, S. A. et al. Reduction of galectin-3 expression and liver fibrosis after cell therapy in a mouse model of cirrhosis. **Cytotherapy**, Oxford, v. 14, p. 339–349, 2012.

PARKES, J. et al. Enhanced liver fibrosis test can predict clinical outcomes in patients with chronic liver disease, **Gut**, Londres, v. 59, p. 1245–1251, 2010.

PELLICORO, A.; RAMACHANDRAN, P.; IREDALE, J. P. Reversibility of liver fibrosis. **Fibrogenesis Tissue Repair**, Londres, v. 5, p. 26, 2012.

PIENTA, K. J. et al. Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate-cancer model by oral-administration of modified citrus pectin. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 87, n. 5, p. 348–353, 1995.

PINZANI, M. et al. Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 84, p. 1786-1793, 1989.

PLATT, D., & RAZ, A. Modulation of the lung colonization of B16-F1 melanoma-cells by citrus pectin. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 84, n. 6, p. 438–442, 1992.

POVEGLIANO, L. Z. et al. Immunoexpression of galectin-3 in colorectal cancer and its relationship with survival. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, Nova Iorque, v. 42, n. 4, p. 217-221, 2011.

POYNARD, T. et al. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 122, p. 1303–1313, 2002.

RABINOVICH, G. A. Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. **Cell Death and Differentiation**, Londres, v. 6, n. 8, p. 711-721, 1999.

RAMBALDI, A.; GLUUD, C. Colchicine for alcoholic and non-alcoholic liver fibrosis or cirrhosis. **Liver**, Copenhagen, v. 21, n. 2, p. 129-36, 2001.

ROCKEY, D. C. Translating an Understanding of the Pathogenesis of Hepatic Fibrosis to Novel Therapies. **Clinical gastroenterology and hepatology**, Filadélfia, v. 11, p. 224–231, 2013.

ROCKEY, D. C. Translating an Understanding of the Pathogenesis of Hepatic Fibrosis to Novel Therapies. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, Filadélfia, v. 11, p. 224–231, 2013.

ROCKEY, D. C. Current and future anti-fibrotic therapies for chronic liver disease. **Clinical Liver Disease**, Filadélfia, v. 12, p. 939–962, 2008.

ROCKEY, D. C. Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. **Clinical Liver Disease**, Filadélfia, v. 10, p. 459–479, 2006.

ROSENBERG, W. M. et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 127, p. 1704–1713, 2004.

SAID, A.; LUCEY, M. R. Liver transplantation: an update 2008. **Current Opinion in Gastroenterology**, Londres, v. 24, n. 3, p. 339-345, 2008.

SAKAKI, M. et al. Clinical significance of Galectin-3 in clear cell renal cell carcinoma. **Journal of Investigative Medicine**, Tokushima, v. 57, p. 152-157, 2010.

SANJUAN, X. et al. Galectin-3 expression and prognostic implications in colorectal cancer progression. **Laboratory Investigation**, Nova Iorque, v. 76, n. 1, p. 359, 1997.

SANZ, R. T.; FUENTES, L. G.; BERENGUEL, A. V. Human Galectin-3 Selective and High Affinity Inhibitors. Present State and Future Perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 20, p. 2979-2990, 2013.

SASAKI, S.; BAO, Q.; HUGHES, R. C. Galectin-3 modulates rat mesangial cell proliferation and matrix synthesis during experimental glomerulonephritis induced by anti-Thy1. 1 antibodies. **Journal of Pathology**, Londres, v. 187, n. 4, p. 481–489, 1999.

SATHISHA, U. V. et al. Inhibition of galectin-3 mediated cellular interactions by pectic polysaccharides from dietary sources. **Glycoconjugate Journal**, Lund, v. 24, n. 8, p. 497–507, 2007.

SONG, S. et al. Overexpressed galectin-3 in pancreatic cancer induces cell proliferation and invasion by binding Ras and activating Ras signaling. **PLoS One**, São Francisco, v. 7, e42699, 2012.

SÖRME, P. et al. Design and synthesis of galectin inhibitors: Inrecognition of carbohydrates by biological systems, part B: specific applications. **Methods in Enzymology**, v. 363, p. 157–169, 2003.

SÖRME, P. et al. Low micromolar inhibitors of galectin-3 based on 3'-derivatization of N-acetyllactosamine. **ChemBiochem**, Weinheim, v. 3, p. 183-189, 2002.

STRAUBE, T. et al. Changes in the expression and subcellular distribution of galectin-3 in clear cell renal cell carcinoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, Inglaterra, v. 30, p. 89, 2011.

TAKENAKA, Y; FUKUMORI, T.; RAZ, A. Galectin-3 and metastasis. **Glycoconjugate Journal**, Lund, v. 19, p. 543–549, 2004.

TANIGUCHI, T. et al. Serum levels of galectin-3: possible association with fibrosis, aberrant angiogenesis, and immune activation in patients with systemic sclerosis. **Journal of Rheumatology**, Toronto, v. 39, n. 3, p. 539–544, 2012

TORONTO RESEARCH CHEMICALS INC. **Products for innovative research.**  
Disponível em: [http://www.trc-canada.com/detail.php?CatNum=A180000&CAS=32181-59-2&Chemical\\_Name=N-Acetyllactosamine&Mol\\_Formula=C14H25NO11&Synonym=LacNAc,%20-\(Acetylamino\)-2-deoxy-4-O-%CE%B2-D-galactopyranosyl-%EF%BF%BDD-glucose%EF%BF%BD;%20-Acetamido-2-deoxy-4-O-%CE%B2-D-galactopyranosyl-D-glucopyranose;%20N-Acetyl-4-O-%CE%B2-D-galactopyranosyl-D-glucosamine;%20%EF%BF%BDGal%CE%B2-\(1-4\)-D-GlcNAc](http://www.trc-canada.com/detail.php?CatNum=A180000&CAS=32181-59-2&Chemical_Name=N-Acetyllactosamine&Mol_Formula=C14H25NO11&Synonym=LacNAc,%20-(Acetylamino)-2-deoxy-4-O-%CE%B2-D-galactopyranosyl-%EF%BF%BDD-glucose%EF%BF%BD;%20-Acetamido-2-deoxy-4-O-%CE%B2-D-galactopyranosyl-D-glucopyranose;%20N-Acetyl-4-O-%CE%B2-D-galactopyranosyl-D-glucosamine;%20%EF%BF%BDGal%CE%B2-(1-4)-D-GlcNAc);  
Acesso em: 15 de março de 2015.

TRABER, P. G. et al. Regression of Fibrosis and Reversal of Cirrhosis in Rats by Galectin Inhibitors in Thioacetamide-Induced Liver Disease. **PLoS One**, São Francisco, v. 8, n. 10, e75361, 2013.

TRABER, P. G.; ZOMER, E. Therapy of Experimental NASH and Fibrosis with Galectin Inhibitors. **PLoS One**, São Francisco, v. 8, n. 12, e83481, 2013.

TSUBOI, K. et al. Galectin-3 expression in colorectal cancer: relation to invasion and metastasis. **Anticancer Research**, Atenas, v. 27, p. 2289-2296, 2007.

TSUI, J. I. et al. Hepatitis C and hospital outcomes in patients admitted with alcohol-related problems. **Journal of Hepatology**, Copenhagen, v. 44, p. 262–266, 2006.

UMEMOTO, K. et al. Conformational differences in liganded and unliganded states of Galectin-3. **Biochemistry**, Washington, v. 42, n. 13, p. 3688-3695, 2003.

VAISHNAW, A. K. et al. A status report on RNAi therapeutics. **Silence**, Londres, v. 1, n. 14, 2010.

WANG, Y. et al. Regulation of Prostate Cancer Progression by Galectin-3. **American Journal of Pathology**, Filadélfia, v. 174, p. 1515–1523, 2009.

WICK, G. et al. The immunology of fibrosis. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 31, p. 107-135, 2013.

WU, K. L. Overexpression of galectin-3 enhances migration of colon cancer cells related to activation of the K-Ras-Raf-Erk1/2 pathway. **Journal of Gastroenterology**, Tóquio, v. 48, p. 350-359, 2013.

XIE, Q. et al. The Performance of Enhanced Liver Fibrosis (ELF) Test for the Staging of Liver Fibrosis: A Meta-Analysis. **PLoS One**, São Francisco, v. 9, n. 4, 2014.

YU, L. et al. Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis. **Circulation: Heart Failure**, Hagerstown, v. 6, n. 1, p. 107-117, 2013.

ZHANG, H. Y. et al. RUNX1 and RUNX2 up regulate Galectin-3 expression in human pituitary tumors. **Endocrine**, Houndsmills, v. 35, p. 101-111, 2009.

## ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: **Avaliação do papel de galectina-3 na patogênese da hepatopatia experimental**, protocolado sob nº 57/2014 pelo (a) pesquisador (a) Sheilla Andrade de Oliveira.

Está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 12/05/2014. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 12 de maio de 2018.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongo isogênico C57BL/6	243
Camundongo Knockout B6.129S2-Lgals3	75

We certify that project entitled **Avaliação do papel de galectina-3 na patogênese da hepatopatia experimental**. Protocol nº 57/2014, coordinated by Sheilla Andrade de Oliveira. Is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz on May, 12, 2014. In present version this project is licensed and valid until May, 12 2018.

Recife (PE, Brazil) May, 12, 2014.

  
  
 Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil  
 Coordenadora CEUA/CPqAM