Jéssica Alves de Freitas

**Deficiência de *Pkd1* aumenta a expressão cardíaca de galectina-3 e a
supressão da clivagem da policistina-1 induz apoptose dependente
de galectina-3 em cardiomiócitos de camundongo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciência

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Freitas, Jéssica Alves de
Deficiência de Pkdl aumenta a expressão cardíaca
de galectina-3 e a supressão da clivagem da
policistina-1 induz apoptose dependente de
galectina-3 em cardiomiócitos de camundongo /
Jéssica Alves de Freitas. -- São Paulo, 2021.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Luiz Fernando Onuchic.

Descritores: 1.Rim policístico autossômico
dominante 2.Apoptose 3.Galectina-3 4.Cardiomiopatia
5.Fibroblastos 6.Macrófagos 7.Miócitos cardíacos

USP/FM/DBD-236/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Leila** e **Renato**, por terem me ensinado o verdadeiro significado de resiliência, por todo apoio, por toda intercessão, por me fazer acreditar que é possível chegar ao fim, por me incentivarem a fazer sempre o que é correto, por nunca desistirem de mim e por todo patrocínio. Amo vocês.

Ao meu esposo, **Isaac**, pela paciência, pelo apoio oferecido, pela compreensão nos momentos difíceis, por enxugar as minhas lágrimas, pelos conselhos, pelas orações, por todo amor e por todo carinho. Te amo, marido.

À minha querida irmã, **Sabrina**, pelo companheirismo, por me ajudar nos momentos em que mais precisei. Ela sempre esteve ao meu lado me acompanhando e me motivando. Te amo, irmã

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer à **Deus**, pelo fôlego de vida que ele me concedeu, por todas as oportunidades, todas as bênçãos alcançadas e principalmente por ter me dado força e capacitação para chegar até aqui. Sem Ele eu jamais conseguiria.

Ao meu orientador, professor Onuchic, pela oportunidade de me aceitar como aluna de iniciação científica e de mestrado posteriormente, por toda PACIÊNCIA, por todo ensinamento, por todo patrocínio, por todo tempo dedicado a mim e ao projeto, pelos exemplos de vida e, principalmente, pela lealdade.

Ao Gilson, por todo ensinamento, por todo trabalho, que não foi pouco. Agradeço por todo auxílio, suporte e dedicação a este projeto. Agradeço também pela amizade.

Ao Elieser, que muito me ajudou no início dessa jornada, e mais ainda nessa reta final. Agradeço pela amizade, conselhos, por me ajudar a pensar e resolver problemas do projeto e do laboratório.

À Andressa, por todo ensinamento e auxílio a este projeto.

À Larissa, por todo apoio desse mundo. Ela acreditou em mim quando nem mesmo eu acreditava. Mesmo tão distante, esteve tão presente. Obrigada amiga.

À Roxanne, por ter me apresentado um sonho e por me mostrar a direção do caminho a ser percorrido para um dia chegar até aqui.

Aos meus amigos Marciana, Marina, Lívia, Vivian, Eliene, Precil, Andréia, Valkercyo, Jukelson, Lucas, Mirtes, Stefany, Vitória, Camilla, Felipe Ornelas, Giovana, Felipe Lima, Cléo, Priscila, Margoth, Marcinha e Samirah agradeço pela amizade, apoio e companheirismo ao longo desses anos no LIM 29. Com todos vocês com certeza a jornada foi menos pesada do que poderia ter sido.

Ao Dr. Amaro, patologista que me auxiliou nas leituras das lâminas e participação neste projeto.

À Dra. Ana Maria do IMT por todo ensinamento em imunoistoquímica.

Aos colegas da UNICSUL, Dra. Renata e Laiane, pelo auxílio inicial com os experimentos em citometria de fluxo.

À Priscila e Amanda do LIM 60, por todo auxílio nos experimentos de citometria de fluxo.

À Jaqueline e ao Leandro por cuidarem dos meus animais no biotério central e no biotério do LIM 29.

Um agradecimento especial aos professores Luiz Felipe, Luiz F. Onuchic, Maria Lígia, Élia Caldini, Maria Oliveira e Roberto Zatz, pela oportunidade e honra de me permitirem acompanhar suas disciplinas e por todo ensinamento que obtive deles.

Ao Programa de Pós-Graduação de Fisiopatologia Experimental, pelo auxílio e suporte.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro desse projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro de minha bolsa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

<i>INTRODUÇÃO.....</i>	<i>1</i>
Doença renal policística autossômica dominante (DRPAD): epidemiologia e manifestações clínicas	1
Os genes mutados na DRPAD e seus produtos	3
Bases moleculares da cystogênese na DRPAD	7
Patogênese molecular e celular da DRPAD	8
Patogênese metabólica da DRPAD	10
Manifestações cardiovasculares associadas à DRPAD	12
Galectina-3: estrutura e funções	14
Efeitos da galectina-3 sobre o fenótipo cardíaco na deficiência de <i>Pkd1</i>	18
<i>OBJETIVOS.....</i>	<i>20</i>
Objetivo central	20
Objetivos específicos	20
<i>MATERIAIS E MÉTODOS.....</i>	<i>22</i>
Aspectos éticos e eutanásia dos animais.....	22
Modelos animais.....	22

Genotipagem.....	23
Imunoistoquímica	25
<i>Western blot</i>	26
RT-PCR em tempo real	27
Citometria de fluxo.....	28
Isolamento de fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos	30
Análise estatística	31
RESULTADOS	33
A expressão de <i>Lgals3</i> e galectina-3 está aumentada em corações <i>Pkd1</i> ^{V/V} e <i>Pkd1</i> ^{+/-}	33
Um número maior de células expressa galectina-3 em corações de camundongos deficientes em <i>Pkd1</i>	34
Cardiomiócitos ventriculares expressam galectina-3, um perfil potencializado pela deficiência de <i>Pkd1</i>	36
Macrófagos não constituem a principal fonte de galectina-3 nos corações de camundongos deficientes em <i>Pkd1</i>	38
Fibroblastos constituem a principal fonte de galectina-3 nos corações de camundongos deficientes em <i>Pkd1</i>	42
Galectina-3 induz apoptose de cardiomiócitos em camundongos VV	46
Corações VV apresentam inflamação.....	49
Corações deficientes em <i>Pkd1</i> não desenvolvem fibrose até P15-P25	51
DISCUSSÃO	53
CONCLUSÕES	64
ANEXOS	66
REFERÊNCIAS	12121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura e representação dos domínios fundamentais da policistina-1 (PC1) e da policistina-2 (PC2), os produtos de *PKD1* e *PKD2*, respectivamente.....6

Figura 2. Representação esquemática de moléculas de galectina-3 e dos tipos de estrutura formadas por elas.....15

Figura 3. Genotipagem voltada à identificação dos alelos *Pkd1^V* e *Pkd1⁻*. A) Identificação do alelo *Pkd1^V*, 1: Marcador de massa molecular; 2: controle negativo (sem DNA); 3 e 7: camundongos *Pkd1^{V/+}*; 4, 5 e 6 camundongos *Pkd1^{V/V}*; 8 e 9 *Pkd1^{+/+}*. B) Identificação do alelo *Pkd1⁻*, 1: Marcador de massa molecular; 2: controle negativo (sem DNA); 3, 5 e 7: camundongos *Pkd1^{+/+}*; 4, 6, 8 e 9 camundongos *Pkd1^{+/-}*.....25

Figura 4. Estratégia de análise por citometria de fluxo para caracterização do perfil de expressão de galectina-3 em células cardíacas. A) PE x Time, para checar o *status* do laser; B) FSC-H x FSC-A, para excluir células duplicadas na aquisição (inclusão apenas de *singlets*); C) SSC-H x SSC-A, para excluir células duplicadas na aquisição (inclusão apenas de *singlets*); D) SSC-A x FITC, para identificar a população positiva para Troponina I, Vimentina, iNOS ou CD206; E) SSC-A x PE, para identificar a população positiva para galectina-3 ou Caspase-3 clivada dentro da população FITC positiva.....30

Figura 5. A expressão de Gal-3 está aumentada nos corações de camundongos deficientes em *Pkd1*. A) Análises comparativas da expressão do gene *Lgals3* em tecido ventricular entre camundongos WT1 (n=14) e VV (n=14) e entre animais WT2 (n=16) e HT (n=13). B) Inferior: análises comparativas de *western blot* da expressão de Gal-3 em tecido ventricular entre camundongos WT1 (n=15) e VV (n=17) e entre animais WT2 (n=11) e HT (n=11). Superior: imagens representativas. C) Superior: análises comparativas de densidade de células Gal-3+ (marrom) em miocárdio ventricular entre camundongos WT1 (n=8) e VV (n=9) e entre animais WT2 (n=5) e HT (n=5). Inferior: imagens representativas de marcação por imunistoquímica para Gal-3. Magnificação original 400x, barra de escala 50 µm. Os dados paramétricos foram comparados usando o teste t, sendo os resultados apresentados como média±DP. Os dados não paramétricos foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney, com os resultados expressos como mediana e intervalo interquartil. *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001.....35

Figura 6. Uma pequena fração de cardiomiócitos expressa Gal-3, um processo intensificado no cenário de deficiência de *Pkd1*. A) Esquerda: análises comparativas de citometria de fluxo da razão células Gal-3+Troponina I+/células Troponina I+ em ventrículos cardíacos entre camundongos WT (n=15), VV (n=6) e HT (n=6). Direita: imagens representativas de citometria de fluxo. B) Esquerda: Análises imunistoquímica comparativa de densidade de células Gal-3+Troponina I+ em miocárdio ventricular entre camundongos WT1 (n=8) e VV (n=9). Direita: imagens representativas de dupla marcação por imunistoquímica para Gal-3 (marrom) e Troponina I (verde). Magnificação original 400x, ampliação de imagens representativas 630x e 1000x, barra de escala 10-20 µm. Os dados não paramétricos foram comparados usando o teste U de Mann-Whitney, com resultados apresentados como mediana e intervalo interquartil. As comparações em fatores com >2 níveis foram feitas com o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn. Em testes envolvendo comparações múltiplas, as significâncias foram corrigidas com o método de Benjamini-Hochberg. *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001.....37

Figura 7. Perfis de expressão de Gal-3 em macrófagos cardíacos em camundongos deficientes em *Pkd1*. A) Análises comparativas da expressão cardíaca de *Cd206* entre camundongos WT (n=29), VV (n=13) e HT

(n=8); da expressão cardíaca de *Ym1* entre animais WT (n=30), VV (n=14) e HT (n=13); e da expressão cardíaca de *Fizz1* entre camundongos WT (n=26), VV (n=13) e HT (n=13). B) Esquerda: Análise comparativa da densidade de células CD206+ em tecido ventricular cardíaco entre animais WT1 (n=8) e VV (n=9). Direita: Imagens representativas de marcação por imunoistoquímica para CD206 (verde). Magnificação original 400x, barra de escala 50 μ m. C) Esquerda: Análise comparativa de citometria de fluxo da razão células Gal-3+CD206+/células CD206+ em tecido ventricular entre camundongos WT (n=19), VV (n=6) e HT (n=7). Direita: Imagens representativas de citometria de fluxo. D) Análises comparativas da expressão cardíaca de *Nos2* entre animais WT (n=28), VV (n=13) e HT (n=8). E) Esquerda: Análise comparativa da densidade de células iNOS+ em tecido ventricular entre camundongos WT1 (n=5) e VV (n=8). Direita: Imagens representativas de marcação por imunoistoquímica para iNOS (verde). Magnificação original 400x, barra de escala 50 μ m. F) Esquerda: Análise comparativa de citometria de fluxo da razão células Gal-3+iNOS+/células iNOS+ em tecido ventricular cardíaco entre animais WT (n=15), VV (n=6) e HT (n=6). Direita: Imagens representativas de citometria de fluxo. Os dados não paramétricos foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney, com os resultados apresentados como mediana e intervalo interquartil. As comparações em fatores com >2 níveis foram realizadas com o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn. Em testes envolvendo comparações múltiplas, as significâncias foram corrigidas com o método de Benjamini-Hochberg. *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001.....40-41

Figura 8. Fibroblastos constituem a principal fonte de Gal-3 nos corações de camundongos deficientes em *Pkd1*. A) Análises comparativas da expressão cardíaca de *Fnl* entre camundongos WT (n=28), VV (n=10) e HT (n=9); da expressão cardíaca de *Fsp1* entre animais WT (n=30), VV (n=14) e HT (n=12); e da expressão cardíaca de *Vim* entre camundongos WT (n=29), VV (n=14) e HT (n=12). B) Esquerda: Análise comparativa da densidade de células Vimentina+ em miocárdio ventricular entre animais WT1 (n=5) e VV (n=8). Direita: Imagens representativas de marcação por imunoistoquímica para Vimentina (verde). Magnificação original 400x, barra de escala 50 μ m. C) Esquerda: Análise comparativa de citometria de fluxo da razão células Gal-3+Vimentina+/células Vimentina+ em tecido ventricular entre camundongos WT (n=15), VV (n=6) e HT (n=5). Direita: Imagens representativas de citometria de fluxo. D) Imagem representativa de marcação citoplasmática de Gal-3 (marrom) em fibroblastos. Magnificação original 400x, barra de escala 50 μ m. E) Inferior: Análises comparativas de *western blot* da expressão de Gal-3 em fibroblastos cardíacos entre camundongos WT1 (n=5) e VV (n=5) e entre animais WT2 (n=5) e HT (n=5). Superior: Imagens representativas. Os dados paramétricos foram comparados usando o teste t, estando os resultados apresentados como média $\pm$ DP. As comparações em fatores com >2 níveis foram realizadas com o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn. Em testes envolvendo comparações múltiplas, as significâncias foram corrigidas com o método de Benjamini-Hochberg. *P<0,05 e ***P<0,001.....44-45

Figura 9. Apoptose de cardiomiócitos e de fibroblastos está aumentada em corações VV. A) Superior: Análises de citometria de fluxo dos efeitos do genótipo VV e KO de *Lgals3* sobre a razão células Caspase-3 clivada+Troponina I+/células Troponina I+ em tecido ventricular entre camundongos WT1 (n=6), WT1G- (n=8), VV (n=6) e VVG- (n=5). Inferior: Imagens representativas de citometria de fluxo. B) Superior: Análise comparativa de citometria de fluxo da razão células Caspase-3 clivada+Troponina I+/células Troponina I+ em tecido ventricular entre animais WT2 (n=10) e HT (n=8). Inferior: Imagens representativas de citometria de fluxo. C) Superior: Análises de citometria de fluxo dos efeitos do genótipo VV e KO de *Lgals3* sobre a razão células Caspase-3 clivada+Vimentina+/células Vimentina+ em tecido ventricular entre camundongos WT1 (n=6), WT1G- (n=8), VV (n=6) e VVG- (n=5). Inferior: Imagens representativas de citometria de fluxo. D) Superior: Análise comparativa de citometria de fluxo da razão células Caspase-3 clivada+Vimentina+/células Vimentina+ em tecido ventricular entre animais WT2 (n=10) e HT (n=8). Inferior: Imagens representativas de citometria de fluxo. Os dados não paramétricos encontram-se apresentados como mediana e intervalo interquartil e foram analisados para fator único com o teste U de Mann-Whitney e, para fatores múltiplos, usando transformação de ranque alinhado seguida por análise de variância de duas vias. As comparações múltiplas foram corrigidas pelo método de Benjamini-Hochberg.....47-48

Figura 10. Camundongos VV apresentam inflamação cardíaca. A) Análises dos efeitos do genótipo VV e KO de *Lgals3* sobre a expressão cardíaca do gene *Il6* entre camundongos WT1 (n=13), WT1G- (n=11), VV (n=14) e VVG- (n=13). B) Análises dos efeitos do genótipo VV e KO de *Lgals3* sobre a expressão cardíaca de *Il1b* entre animais WT1 (n=14), WT1G- (n=10), VV (n=13) e VVG- (n=12). C) Análises dos efeitos do genótipo VV e KO de *Lgals3* sobre a expressão cardíaca de *Il4r* entre camundongos WT1 (n=13), WT1G- (n=11), VV (n=14) e VVG- (n=13). D) Análise comparativa da expressão cardíaca de *Il6* entre animais WT2 (n=13) e HT (n=9). E) Análise comparativa da expressão cardíaca de *Il1b* entre camundongos WT2 (n=15) e HT (n=11). F) Análise comparativa da expressão cardíaca de *Il4r* entre animais WT2 (n=16) e HT (n=13). Os dados não paramétricos foram apresentados como mediana e intervalo interquartil e foram analisados para fator único com o teste U de Mann-Whitney e, para fatores múltiplos, usando transformação de ranque alinhado seguida por análise de variância de duas vias. As comparações múltiplas foram corrigidas com o método de Benjamini-Hochberg.....50

Figura 11. Avaliação de fibrose cardíaca em camundongos deficientes em *Pkd1*. A) Análises dos efeitos do genótipo VV e KO de *Lgals3* na expressão cardíaca de *Col3a1* entre camundongos WT1 (n=13), WT1G- (n=13), VV (n=14) e VVG- (n=13). B) Análises dos efeitos do genótipo VV e KO de *Lgals3* na expressão cardíaca de *Colla1* entre animais WT1 (n=12), WT1G- (n=11), VV (n=13) e VVG- (n=8). C) Análises dos efeitos do genótipo VV e KO de *Lgals3* na expressão cardíaca de *Tgfb1* entre camundongos WT1 (n=13), WT1G- (n=12), VV (n=14) e VVG- (n=13). D) Análise comparativa da expressão cardíaca de *Col3a1* entre animais WT2 (n=16) e HT (n=13). E) Análise comparativa da expressão de *Colla1* entre camundongos WT2 (n=13) e HT (n=10). F) Análise comparativa da expressão de *Tgfb1* entre animais WT2 (n=16) e HT (n=12). Os dados não paramétricos são apresentados como mediana e intervalo interquartil e foram analisados para fator único com o teste U de Mann-Whitney e, para fatores múltiplos, usando transformação de ranque alinhado seguida por análise de variância de duas vias. As comparações múltiplas foram corrigidas pelo método de Benjamini-Hochberg.....52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados nas análises de expressão gênica por RT-PCR em tempo real.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
<i>Actb</i>	<i>beta actin</i>
ADPKD	<i>autosomal dominant polycystic kidney disease</i>
AIC	aneurismas intracranianos
AKT	proteína quinase B
AMPC	adenosina 3,5-monofosfato cíclico
AMPK	proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
AU	<i>arbitrary units</i>
AVP	arginina-vasopressina
B-BNP	peptídeo natriurético B
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>
BSA	albumina sérica bovina
CAP	cílio apical primário
<i>Cd206</i>	receptor de manose C tipo 1
cDNA	DNA complementar
CET	complexo esclerose tuberosa
CF	citometria de fluxo
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CI	<i>Pkd1^{flox/flox};Nestin^{cre}</i>
CIG-	<i>Pkd1^{flox/flox};Nestin^{cre};Lgals3^{-/-}</i>
<i>Colla1</i>	colágeno tipo 1 alfa 1
<i>Col3a1</i>	colágeno tipo 3 alfa 1
CRD	domínio C-terminal de reconhecimento de carboidratos
DNA	ácido desoxirribonucleico
<i>DNAJB11</i>	<i>DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B11</i>
DNase	desoxirribonuclease
DP	desvio padrão
DREF	doença renal em estágio final
DRPAD	doença renal policística autossômica dominante
DRPAD1	doença renal policística autossômica dominante do tipo 1

DRPAR	doença renal policística autossômica recessiva
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGLN3	<i>egl-9 family hypoxia inducible factor 3</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
EROs	espécies reativas de oxigênio
FEVE	fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
<i>Fizz1</i>	<i>resistin-like molecule alpha 1</i>
<i>Fnl</i>	<i>fibronectin 1</i>
FSC-A	<i>forward scatter - area</i>
FSC-H	<i>forward scatter - height</i>
<i>Fsp1</i>	<i>fibroblast specific protein 1</i>
Gal-3	galectina-3
Gal-3 KO	<i>knockout</i> para galectina-3
<i>GANAB</i>	<i>glucosidase II alpha subunit</i>
<i>Gapdh</i>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GMP	monofosfato cíclico de guanosina
GPS	<i>G protein-coupled receptor proteolytic site</i>
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HT	<i>Pkd1^{+/-}</i>
HTG-	<i>Pkd1^{+/-}:Lgals3^{-/-}</i>
IH	imunoistoquímica
<i>Il1b</i>	<i>interleukin-1b</i>
IL-2	interleucina 2
<i>Il4r</i>	<i>interleukin 4 receptor</i>
IL-5	interleucina 5
<i>Il6</i>	<i>interleukin 6</i>
<i>iNOS</i>	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
KCl	cloreto de potássio

KH ₂ PO ₄	fosfato de potássio
KO	<i>knockout</i>
Kv	<i>potassium voltage-gated channel</i>
<i>Lgals3</i>	<i>galectin-3</i>
<i>Lgals3</i> KO	<i>knockout</i> do gene <i>Lgals3</i>
M1	macrófago pró-inflamatório tipo M1
M2	macrófago anti-inflamatório tipo M2
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin kinase</i>
mTORC1	<i>mechanistic target of rapamycin kinase complex 1</i>
Na ₂ HPO ₄	fosfato de sódio
NaCl	cloreto de sódio
<i>Neor</i>	<i>neomycin resistance</i>
<i>Nos2</i>	<i>nitric oxide synthase 2</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC1	policistina-1
PC2	policistina-2
PCR	reação em cadeia da polimerase
PE	ficoeritrina
PFA	paraformaldeído
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
<i>Pkd1</i>	<i>polycystic kidney disease 1</i>
<i>PKD1</i>	<i>polycystic kidney disease 1</i>
<i>Pkd2</i>	<i>polycystic kidney disease 2</i>
<i>PKD2</i>	<i>polycystic kidney disease 2</i>
<i>PKHD1</i>	<i>polycystic kidney and hepatic disease 1</i>
RE	retículo endoplasmático
RIPA	tampão de ensaio de radioimunoprecipitação
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase antecedita pela transcrição reversa
RyR2	receptor 2 de rianodina

SDS	dodecil sulfato de sódio
SERCA	retículo sarco/endoplasmático
SFB	soro fetal bovino
siRNA	RNA de interferência pequeno
SSC-A	<i>side scatter - area</i>
SSC-H	<i>side scatter - height</i>
TBST	<i>tris-buffered saline acrescida de tween 0,1%</i>
<i>Tgfb1</i>	<i>transforming growth factor beta</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
<i>TSC1</i>	<i>tuberous sclerosis 1</i>
<i>TSC2</i>	<i>tuberous sclerosis 2</i>
UA	unidade arbitrária
UV-B	ultravioleta B
V2R	receptor 2 de vasopressina
<i>Vim</i>	<i>vimentin</i>
VV	<i>Pkd1^{V/V}</i>
VVG-	<i>Pkd1^{V/V};Lgals3^{-/-}</i>
WT	<i>Pkd1^{+/+}</i>
WT1	<i>Pkd1^{+/+}</i>
WT1G-	<i>Pkd1^{+/+};Lgals3^{-/-}</i>
WT2	<i>Pkd1^{+/+}</i>
<i>Yml</i>	<i>chitinase 3-like 3</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

#	cerquilha
%	porcentagem
*	asterisco
+	positiva (o)
+	mais
<	menor
=	igual
>	maior
±	mais ou menos
≤	menor ou igual
Ca ⁺⁺	cálcio
células/mm ²	células por milímetro quadrado
CO ₂	dióxido de carbono
g	gramas
h	hora
hrs	horas
kDa	quilodalton
mg/g	miligrama por grama
mg/g	miligrama por grama
min	minutos
mm	milímetro
mM	milimolar
mm ²	milímetro quadrado
mm ³	milímetro cúbico
mpm	movimentos por minuto
n	número de uma amostra
°C	graus Celsius
O ₂	oxigênio
P	coeficiente de significância estatística
pb	pares de base

pH	potencial hidrogeniônico
U/mL	unidade por mililitro
x	vezes
α	alfa
β	beta
$\Delta\Delta Ct$	<i>delta delta cycle threshold</i>
μg	micrograma
$\mu\text{g/mL}$	micrograma por mililitro
μM	micromolar
μm	micrometro

RESUMO

Freitas JA, *Deficiência de Pkd1 aumenta a expressão cardíaca de galectina-3 e a supressão da clivagem da policistina-1 induz apoptose dependente de galectina-3 em cardiomiócitos de camundongo* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

As manifestações cardíacas da doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) incluem aumento do índice de massa do ventrículo esquerdo e cardiomiopatia dilatada idiopática. Vários estudos recentes realizados com modelos animais deficientes em *Pkd1* e *Pkd2*, por sua vez, apoiam um papel primário da redução de função da policistina-1 (PC1) ou policistina-2 (PC2) no desenvolvimento da cardiomiopatia associada à DRPAD. Envolvimento de anormalidades de cálcio intracelular, e possivelmente de apoptose, tem sido observado nesse processo, enquanto a supressão da expressão de galectina-3 (Gal-3) resgatou o fenótipo cardíaco em camundongos deficientes em *Pkd1*. No presente estudo, investigamos aspectos fundamentais do mecanismo pelo qual Gal-3 exerce seu efeito deletério em corações deficientes em *Pkd1*, utilizando camundongos não císticos haploinsuficientes para *Pkd1* (HT) e camundongos com rins intensamente císticos devido à ausência de clivagem de PC1 (VV), nas idades de 15 e/ou 25 dias. Nossos dados revelaram que a expressão de *Lgals3* e de Gal-3 estão aumentadas em corações VV e HT comparadas às de seus controles selvagens (WT) [expressão de Gal-3 0,67 UA (0,24-1,27) *versus* 0,26 (0,20-0,39), $P=0,049$; e 0,77 UA (0,15-1,03) *versus* 0,12 (0,10-0,49), $P=0,031$; respectivamente]. Esses achados se acompanharam de densidades aumentadas de células que expressam Gal-3 no miocárdio ventricular de ambos os modelos de camundongo deficientes em *Pkd1*. Estudos de citometria de fluxo também demonstraram que cardiomiócitos ventriculares normais podem expressar Gal-3 e que a fração dessas células que expressam essa proteína é maior em animais VV e HT que em WT [5,76% (4,76-6,63) e 2,31% (2,14-3,62) *versus* 1,05 % (0,94-1,56), $P<0,001$ e $P=0,002$, respectivamente]. Interessantemente, a fração de fibroblastos que expressa Gal-3 também se mostrou aumentada em tecido cardíaco ventricular VV e HT, e nossos dados revelaram que tais células, não macrófagos, constituem a principal fonte de Gal-3 em tais corações. É importante destacar que a falta de clivagem de PC1 determinou aumento da taxa de apoptose em cardiomiócitos [9,51% (6,76-13,55) em VV *versus* 3,67% (2,32-4,85) em WT, $P=0,014$], um fenótipo que foi resgatado por *knockout* de Gal-3 [2,84% (1,82-7,41) em VVG- *versus* 9,51% (6,76-13,55) em VV, $P=0,002$]. Corações VV também exibiram expressão aumentada de marcadores inflamatórios. Nossos resultados proporcionam a elucidação inicial do efeito deletério de Gal-3 sobre o coração no contexto da deficiência de *Pkd1*, revelando respostas celulares específicas e sugerindo que fibroblastos possam se constituir no principal mediador celular desse processo. A natureza dos modelos de camundongo empregados sugere que esse mecanismo possa também se aplicar à DRPAD humana, trazendo um novo cenário para o entendimento do fenótipo cardíaco associado a esta doença.

Descritores: Rim policístico autossômico dominante; Apoptose; Galectina-3; Cardiomiopatia; Fibroblastos; Macrófagos; Miócitos cardíacos.

ABSTRACT

Freitas JA. *Pkd1 deficiency increases galectin-3 cardiac expression and lack of polycystin-1 cleavage leads to galectin-3-dependent apoptosis of cardiomyocytes in mice* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Cardiac manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) include increased left ventricular mass index and idiopathic dilated cardiomyopathy. Several recent studies with *Pkd1*- and *Pkd2*-deficient animal models, in turn, support a primary role for decreased polycystin-1 (PC1) or -2 (PC2) function in the development of ADPKD cardiomyopathy. Intracellular calcium abnormalities, and possibly apoptosis, have been shown to be involved in this process, while suppression of galectin-3 (Gal-3) expression rescued the heart phenotype in *Pkd1*-deficient mice. In the current study we have investigated fundamental aspects of the mechanism through which Gal-3 exerts its deleterious effect on *Pkd1*-deficient hearts, using 15- and/or 25-day-old non-cystic *Pkd1*-haploinsufficient (HT) and severely renal cystic mice, the latter lacking PC1 cleavage (VV). Our data revealed that *Lgals3* and Gal-3 expression are increased in VV and HT hearts compared to their wild-type (WT) controls [Gal-3 expression: 0.67 AU (0.24-1.27) *versus* 0.26 (0.20-0.39), $P=0.049$; and 0.77 AU (0.15-1.03) *versus* 0.12 (0.10-0.49), $P=0.031$; respectively]. These findings were accompanied by increased densities of Gal-3-expressing cells in ventricular myocardium of both *Pkd1*-deficient mouse models. Flow cytometry results also showed that normal ventricular cardiomyocytes can express Gal-3 and that the fraction of these cells that express this protein is higher in VV and HT than in WT animals [5.76% (4.76-6.63) and 2.31% (2.14-3.62) *versus* 1.05% (0.94-1.56), $P<0.001$ and $P=0.002$, respectively]. Interestingly, the fraction of fibroblasts that express Gal-3 was also increased in VV and HT heart ventricular tissue and these cells, not macrophages, were shown to constitute the main source of Gal-3 in such hearts. Notably, lack of PC1 cleavage led to increased apoptotic rate in cardiomyocytes [9.51% (6.76-13.55) in VV *versus* 3.67% (2.32-4.85) in WT, $P=0.014$], a phenotype that was rescued by Gal-3 *knockout* [2.84% (1.82-7.41) in VVG- *versus* 9.51% (6.76-13.55) in VV, $P=0.002$]. VV hearts also exhibited increased expression of inflammatory markers. Our findings provide the initial elucidation of the detrimental effect of Gal-3 on the heart in the setting of *Pkd1* deficiency, revealing specific cell responses and suggesting that fibroblasts may be the main cell mediator of this process. The nature of the employed mouse models suggests that this mechanism may be also applicable to human ADPKD, bringing a new scenario to understand the heart phenotype associated with this disease.

Descriptors: Polycystic kidney, autosomal dominant; Apoptosis; Galectin-3; Cardiomyopathy; Fibroblasts; Macrophages; Myocytes, cardiac.

INTRODUÇÃO

Doença renal policística autossômica dominante (DRPAD): epidemiologia e manifestações clínicas

A doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) é uma doença hereditária presente em todas as etnias que afeta igualmente os sexos masculino e feminino (1). Análises epidemiológicas recentes reportam que a DRPAD apresenta uma prevalência de 3-5:10.000 na população geral (2). Esta doença é responsável por 5% a 10% dos casos de doença renal em estágio final (DREF) em diferentes populações no mundo, constituindo a quarta causa principal desta condição médica (3). Um estudo conduzido no sul do Brasil em quatro centros de diálise constatou que 10,3% dos pacientes dialíticos apresentavam DRPAD (4).

Mutações nos genes *PKD1* (*Polycystic Kidney Disease 1*) e *PKD2* (*Polycystic Kidney Disease 2*) são responsáveis pela quase totalidade dos casos de DRPAD resolvidos geneticamente. O envolvimento renal é caracterizado pelo desenvolvimento focal, bilateral e progressivo de múltiplos cistos renais, tipicamente associado a um aumento gradual do volume renal ao longo dos anos (5). Após um longo período em que a função renal permanece preservada ou declina muito lentamente, segue-se uma fase de inflexão a partir da qual a taxa de filtração glomerular passa a declinar relativamente rápido. O processo de perda significativa de função renal ocorre caracteristicamente em idade adulta (6).

Embora a perda de função renal constitua a manifestação renal de maior repercussão clínica populacional, pacientes com DRPAD podem também apresentar complicações relacionadas ao crescimento dos cistos e dos rins (1). Entre essas complicações, destacam-se o desenvolvimento de dor lombar e/ou abdominal, episódios dolorosos agudos de sangramento intracístico, hematúria macroscópica, infecção de cisto renal, nefrolitíase e perda progressiva

da capacidade de concentração urinária (7). O desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica (HAS) é também relacionado ao fenótipo renal da doença, uma vez que a ativação do sistema renina-angiotensina decorrente da expansão cística e consequente compressão vascular setorial desempenha um papel fundamental em sua gênese e manutenção (8).

Embora as manifestações renais se destaquem na DRPAD, esta enfermidade consiste numa doença sistêmica, associando-se também a manifestações extrarrenais. Tais manifestações incluem prolapso da valva mitral e outras valvopatias cardíacas, derrame pericárdico, cardiomiopatia dilatada idiopática, aneurismas intracranianos (AIC) e da aorta ascendente, cistos hepáticos, cistos pancreáticos, cistos aracnoides, doença diverticular do cólon, hérnias de parede abdominal, cistos da vesícula seminal e bronquiectasias. Entre as manifestações extrarrenais, destaca-se o desenvolvimento de AICs, visto que a ruptura dessas formações se associa a elevada morbimortalidade (9). Sua prevalência é de aproximadamente 5% em pacientes jovens com DRPAD, atingindo até 20% em indivíduos afetados com 60 anos ou mais. Estudos em coortes de pacientes com DRPAD mostraram que a prevalência de AIC assintomático é de aproximadamente 6% na ausência de história familiar de AICs ou hemorragia subaracnóidea (9), e de aproximadamente 20-27% em pacientes com história familiar positiva (3).

O desenvolvimento de cistos hepáticos constitui a manifestação extrarrenal mais comum na DRPAD. De fato, um estudo conduzido com ressonância magnética mostrou a presença de cistos em fígado em 83% dos pacientes entre 15 e 46 anos de idade (10). Embora a prevalência de doença hepática policística seja similar em ambos os sexos, mulheres frequentemente desenvolvem essa manifestação mais precocemente e fígados policísticos muito volumosos ocorrem quase exclusivamente no sexo feminino. Essa maior severidade

de acometimento parece decorrer de sensibilidade subjacente dos cistos hepáticos a hormônios esteroides femininos (11).

Os genes mutados na DRPAD e seus produtos

A DRPAD é geneticamente heterogênea. Mutações em *PKD1* causam a doença em aproximadamente 78% das famílias afetadas, enquanto mutações em *PKD2* se responsabilizam por cerca de 15% das mesmas (12). Estudos baseados em populações canadense e americana, no entanto, reportaram frequências de mutações em *PKD2* de 26% e 36%, respectivamente (3). É importante notar que a idade de evolução para DREF é fortemente influenciada pelo gene mutado e, quando a doença é associada a *PKD1*, pelo tipo de mutação. De fato, um estudo mostrou que a idade mediana para DREF foi maior para pacientes com mutação germinativa em *PKD2* (79 anos) que em *PKD1* (58 anos) e que pacientes com mutação em *PKD1* associada a truncamento da proteína atingiram DREF mais precocemente (55 anos) que indivíduos com mutação em *PKD1* não associada a truncamento (67 anos) (13). Em cerca de 7% das famílias diagnosticadas com DRPAD, entretanto, não são detectadas mutações em *PKD1* ou *PKD2*. Um terceiro gene, *GANAB* (*glucosidase II alpha subunit*), foi recentemente associado a DRPAD ou doença hepática policística autossômica dominante em 12 famílias em que mutações em *PKD1* ou *PKD2* não foram encontradas (14). Mutações no gene *DNAJB11* (*DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B11*) também foram recentemente descritas como causadoras de variante da DRPAD. Esse gene codifica um cofator de BiP, responsável por controlar o enovelamento, tráfego e degradação de proteínas de membrana e secretadas. Mutações em *DNAJB11* foram identificadas em 1,2% das famílias afetadas por DRPAD geneticamente não resolvidas em uma coorte de famílias com essa doença (15).

PKD1 é um gene extenso e complexo, localizado na região cromossômica 16p13.3. Seu segmento genômico compreende cerca de 53 kb e seu transcrito é composto por 46 éxons (16). *PKD2*, por sua vez, localiza-se no cromossomo 4q21 e compreende 15 éxons (17). *PKD1* codifica policistina-1 (PC1), uma glicoproteína integral de membrana com 4302 aminoácidos (aa) e massa molecular estimada de aproximadamente 460 kDa (18). Essa proteína contém uma porção N-terminal extracelular com mais de 3.000 aa, contendo uma combinação complexa de domínios frequentemente envolvidos em interações proteína-proteína e proteína-carboidrato. PC1 apresenta 11 domínios transmembrânicos e uma terminação C-terminal intracitoplasmática curta, onde se localiza um domínio helicoidal (18) (Figura 1). Esse domínio é essencial para sua interação física com um domínio de estrutura similar presente na porção C-terminal da policistina-2 (PC2), o produto do gene *PKD2* (17). PC2 também consiste em uma glicoproteína integral de membrana, formada por 968 aa e com massa molecular de aproximadamente 110 kDa. Essa proteína possui seis domínios transmembrânicos e porções C- e N- terminais intracitosólicas (17) (Figura 1). PC2 funciona como um canal com permeabilidade a cálcio (Ca^{++}) ativado por Ca^{++} na membrana do retículo endoplasmático (RE), mas também pode funcionar independentemente de PC1 no cílio primário de células epiteliais do ducto coletor renal (19). Neste caso forma um canal principalmente permeável a cátions monovalentes ativado por despolarização da membrana e por um aumento no Ca^{++} intraciliar, canal cuja seletividade por Ca^{++} é ainda controversa. Admite-se que PC1 atue como um receptor de membrana e como uma molécula de adesão (5). PC2 é expressa principalmente no RE, mas também no cílio apical primário (CAP), centrossomos, fusos mitóticos e, possivelmente, na membrana plasmática. PC1 compartilha com PC2 localização no cílio primário, onde formam um complexo, mas também é expressa em membrana plasmática e potencialmente no RE. Nos túbulos renais maduros, PC1 é expressa na membrana basolateral em locais de interações célula-célula, bem como nas

estruturas juncionais identificadas como desmossomos e junções aderentes. Um produto de clivagem C-terminal de PC1 pode também se translocar para a matriz mitocondrial (20). Disfunções do complexo PC1/PC2 implicam em desregulação de várias vias de sinalização, levando ao fenótipo da DRPAD.

Bases moleculares da cystogênese na DRPAD

Embora a DRPAD seja uma doença de herança autossômica dominante, no nível celular e molecular o processo de formação cística segue um mecanismo recessivo, ao menos para um grande percentual expressivo dos cistos renais (21). Segundo este modelo knudsoniano, todas as células tubulares renais de um paciente com a doença apresentam um dos alelos de *PKD1* ou *PKD2* com a mutação germinativa, representando o primeiro evento. A formação do cisto, entretanto, ocorre apenas quando o alelo previamente normal é atingido por uma mutação somática, que consiste no segundo evento. Vale notar que um estudo bastante recente foi consistente com tais achados, detectando mutações somáticas em *PKD1* ou *PKD2* nos nove pacientes com DRPAD avaliados e em 90% dos cistos analisados (22). Esse fenômeno de inativação ou intensa redução da atividade de ambos os alelos pode explicar a natureza focal da cystogênese e é consistente com a variabilidade fenotípica observada na doença (21).

Esse modelo foi expandido e aprimorado nos anos que se seguiram. Piontek e cols mostraram que a inativação de ambas as cópias de *Pkd1* induzida em camundongos antes do dia 13 pós-natal determinou desenvolvimento rápido e massivo de cistos, ao passo que quanto tal inativação foi feita no dia 14 ou após, os cistos renais se formaram apenas após cinco meses (23). Em um estudo posterior, Takakura e cols confirmaram que a inativação de ambos os alelos de *Pkd1* em rins maduros não foi suficiente para causar cystogênese renal rápida e ampla em camundongos, porém demonstraram que um insulto por isquemia/reperfusão (I/R) era capaz de deflagrar tal processo em rins adultos (24). De fato, a indução de I/R renal unilateral três semanas após a inativação de ambas as cópias de *Pkd1* - realizada na idade de cinco semanas - acompanhou-se do desenvolvimento rápido e massivo de cistos no rim submetido ao insulto, fenótipo não observado no rim contralateral. Dados de nosso grupo

também apoiam a necessidade de um evento adicional para a indução de cistogênese no rim adulto. Neste estudo, camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* submetidos a I/R renal desenvolveram microcistos renais seis semanas após o insulto (25).

Patogênese molecular e celular da DRPAD

Além de PC1 e PC2, fibrocistina/poliductina (FPC), proteína codificada pelo gene *PKHD1* (*Polycystic Kidney and Hepatic Disease 1*), também se expressa no CAP de células tubulares e ductais renais. É importante mencionar que *PKHD1* é o gene mutado em quase todos os casos de doença renal policística autossômica recessiva (DRPAR). Essas três proteínas são necessárias para a indução de transientes de Ca^{++} em resposta ao curvamento ciliar determinado pelo fluxo de fluido intratubular (26). PC2 também interage com outras proteínas que atuam como canais de Ca^{++} (27). Ainda não conhecemos com precisão, entretanto, como a homeostase intracelular de Ca^{++} é alterada na DRPAD. A maioria dos estudos disponíveis mostram, contudo, que os níveis intracelulares basais de Ca^{++} se encontram diminuídos em células e tecidos com doença renal policística. Essa redução da concentração de Ca^{++} citosólico, por sua vez, associa-se a um aumento dos níveis de AMP cíclico (AMPC) em tecidos císticos. Admite-se que três mecanismos possam atuar na elevação dos níveis intracelulares de AMPC: a) ativação da adenilato ciclase 6 inibível por Ca^{++} ; b) inibição da fosfodiesterase 1 dependente de Ca^{++} -calmodulina; e c) inibição indireta da fosfodiesterase 3 inibível por GMP cíclico (28, 29). Esse aumento de AMPC intracelular, por sua vez, assume uma ação determinante na patogênese da DRPAD, uma vez que em células DRPAD o AMPC estimula vias pró-proliferativas, induzindo uma resposta celular hiperproliferativa anormal. Este efeito contrasta com o que ocorre em células epiteliais do rim normal, nas quais AMPC inibe proliferação (30). Além disso, na DRPAD o AMPC

também atua promovendo secreção transepitelial de fluido, outro mecanismo fundamental envolvido no crescimento cístico (31).

Cascatas de transdução de sinal dependentes de AMPc estão envolvidas na regulação da função renal normal (32). No processo de conservação de água, arginina-vasopressina (AVP) liga-se ao receptor V2 da AVP (V2R) na membrana basolateral das células principais do ducto coletor e do túbulo distal final, ativando a adenilato ciclase e aumentando os níveis intracelulares de AMPc (33). Vale notar que estudos de microdissecção sugerem que na DRPAD os cistos derivados dos ductos coletores são maiores e mais numerosos. Além disso, nas células principais desse segmento o sistema AVP-V2R constitui-se no principal sistema agonista de geração de AMPc (34). Esse mecanismo fundamenta o efeito terapêutico de antagonistas do V2R em pacientes com DRPAD, classicamente o tolvaptan (35).

Em células renais normais, PC1 forma um complexo com E-caderina e cateninas, sugerindo que atue em adesão ou polaridade celular. Interessantemente, o aumento da fosforilação de PC1 em células primárias de pacientes com DRPAD rompeu o complexo PC1/PC2/E-caderina/ β -catenina e removeu PC1 e E-caderina da membrana plasmática. Esses achados sugeriram que o aumento da fosforilação de PC1 em células DRPAD promova alterações em sua localização e em sua capacidade de formar complexos proteicos essenciais à estabilização de junções aderentes e manutenção de um epitélio renal polarizado completamente diferenciado (36). Um outro estudo corroborou com esses resultados, revelando que células DRPAD apresentam polarização anormal das proteínas de desmossomos nos domínios apical e basolateral (37). Em associação com outros trabalhos, tais estudos demonstram a atuação de PC1 como molécula envolvida na adesão celular (38).

As proteínas tuberina e a hamartina formam um complexo que regula a atividade da via mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), envolvida no controle de processos como

crescimento celular, progressão do ciclo celular e apoptose. Tais proteínas são codificadas respectivamente pelos genes *TSC1* (*Tuberous Sclerosis 1*) e *TSC2* (*Tuberous Sclerosis 2*), mutados no complexo esclerose tuberosa (CET). Mutações em *TSC1* ou *TSC2* determinam aumento da atividade de mTOR, causando aumento da síntese de proteínas e crescimento celular (39). É importante mencionar que essa via também se encontra ativada no epitélio cístico renal de pacientes com DRPAD. Um dos mecanismos propostos para explicar tal observação é de que PC1 interage e protege a tuberina de fosforilação na S939 por AKT, favorecendo a retenção da mesma na membrana plasmática e, consequentemente, suprimindo a atividade de mTOR (40). Além disso, *PKD1* e *TSC2* são genes vizinhos cauda a cauda em 16p13.3. Tal relação associa-se ao fato de alguns pacientes cursarem com deleções envolvendo ambos os *loci* (41). Essas deleções levam à síndrome de contiguidade, condição associada a doença renal policística muito severa e precoce.

Outro aspecto interessante da patogênese da DRPAD foi a demonstração recente de que as policistinas regulam um sinal desconhecido dependente do cílio primário, sinal que normalmente atua na manutenção da homeostase da estrutura do néfron (42). Este estudo mostrou que a perda do cílio reduziu o crescimento cístico em um modelo de camundongo ortólogo à DRPAD1 de início mais tardio. A perda do cílio intacto, portanto, suprimiu o crescimento cístico seguindo a inativação das policistinas. Esses resultados revelaram a existência de uma nova via, definida por inibição dependente das policistinas e ativação dependente do cílio primário (43).

Patogênese metabólica da DRPAD

Estudos realizados nos últimos anos revelaram também um componente metabólico na patogênese da DRPAD. Análises iniciais demonstraram consumo elevado de glicose e uso

preferencial de glicólise aeróbica em células *Pkd1*^{-/-}, reproduzindo o efeito de Warburg (44). Tal anormalidade também foi observada em um modelo de camundongo cístico ortólogo à DRPAD1. Interessantemente, tratamento com 2-deoxi-glicose, um análogo não metabolizável da glicose, retardou a evolução da doença renal em modelos de camundongos ortólogos à doença humana (44, 45). Em outro sentido, outro estudo revelou que a β -oxidação de ácidos graxos é comprometida em células renais com inativação de *Pkd1*, enquanto o metabolismo de glicose não teve alterações consideráveis (46). Vale dizer que a redução dietética de lipídeos reduziu a taxa de progressão da doença cística renal em animais com inativação desse gene.

É importante atentar que um estudo prévio mostrou que a ativação farmacológica de AMPK - enzima chave na regulação energética celular - por meio de metformina, reduziu o fenótipo cístico em um camundongo deficiente em *Pkd1* (47). Deve-se destacar que AMPK fosforila sítios da tuberina, aumentando a estabilidade do complexo tuberina/hamartina, e libera Raptor do complexo mTORC1, inibindo a via mTOR (48). Um estudo mais recente, por sua vez, mostrou que jejum agudo determinou redução rápida do volume cístico renal em modelos de DRP em rato, camundongo e felino (49). Esses investigadores demonstraram, também, que a administração oral de β -hidroxibutirato inibiu a progressão da doença renal policística em rato. Tais resultados sugerem que as células de revestimento cístico sejam metabolicamente inflexíveis. Vale notar que a interação de PC1 com EGLN3 (*egl-9 family hypoxia inducible factor 3*) modula a localização e a atividade de canal associada a PC1/PC2 (50). EGLN3 é uma proteína sensível aos níveis de O₂. Assim como a hipóxia, disfunção de PC1 determina redução de liberação de Ca⁺⁺ pelo RE e diminuição da captação de Ca⁺⁺ pela mitocôndria. Em resposta a esta menor captação de Ca⁺⁺, a fosforilação oxidativa mitocondrial é comprometida.

Manifestações cardiovasculares associadas à DRPAD

PC1 e PC2 estão fortemente relacionadas ao desenvolvimento do coração. De fato, camundongos com inativação de ambas as cópias de *Pkd1* ou *Pkd2* cursam com letalidade embrionária associada a defeitos cardíacos graves (51-53). Vale ressaltar que PC2 exerce função importante nos cílios nodais. Esses cílios estão presentes nos cardiomiócitos de embriões, mas se tornam vestigiais no adulto (54).

No cenário clínico, as complicações cardiovasculares tornaram-se a principal causa de mortalidade em pacientes com DRPAD após o acesso dialítico amplo à população. Esse cenário inclui uma incidência aumentada de HAS de início precoce, hipertrofia ventricular esquerda, cardiomiopatia dilatada idiopática, anormalidades valvares cardíacas, aneurisma intracraniano e dissecação/aneurisma da aorta torácica ascendente (55). De modo semelhante às células epiteliais renais, PC1 e PC2 também estão presentes no CAP do endotélio vascular, atuando como reguladores do fluxo sanguíneo e capazes de ajustar a concentração de Ca^{++} intracelular (56). A observação de que pacientes com DRPAD normotensos também podem apresentar maior índice de massa do ventrículo esquerdo, assim como disfunção diastólica biventricular e cardiomiopatia dilatada idiopática, sugeriu que deficiência de PC1 ou PC2 pudesse atuar primariamente na disfunção cardíaca associada à DRPAD (57, 58). Neste cenário, conduzimos em nosso laboratório um estudo que demonstrou redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e da deformidade cardíaca em camundongos haploinsuficientes para *Pkd1* (*Pkd1*^{+/-}), animais não císticos e normotensos, caracterizando a existência de disfunção cardíaca (59). Além dessas alterações, camundongos císticos e hipertensos *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} também apresentaram disfunção diastólica. Ambos os modelos animais cursaram, ainda, com um discreto aumento de fibrose e apoptose cardíaca. Nossos achados sugerem que a disfunção cardíaca associada à DRPAD

seja primariamente causada por deficiência de *PKD1* ou *PKD2*, enquanto a elevação crônica da pressão arterial se associa a agravamento do fenótipo cardíaco.

A relevância do fenótipo cardiovascular na DRPAD encontra-se em linha com a observação de que as policistinas se expressam no coração (60). É importante mencionar que anormalidades relacionadas ao Ca^{++} citosólico contribuem para as alterações cardiovasculares detectadas nesta doença. Interessantemente, PC1 mostrou-se necessária para o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca induzida por estiramento e por sobrecarga de pressão (61). Vale notar que camundongos com *knockout* (KO) para *Pkd1* seletivo em cardiomiócitos também desenvolveram disfunção sistólica (61) e que a atividade elétrica, o manejo de Ca^{++} e a função contrátil do cardiomiócito pode ser modulada por PC1, por meio de interação física com canais Kv (62). Um outro estudo, realizado em *zebrafish*, mostrou que mutantes para *Pkd2* exibiram menor débito cardíaco e cursaram com bloqueio atrioventricular (58). Em acordo com tais achados, o coração desses animais apresentou alterações na ciclagem de Ca^{++} intracelular. Um estudo subsequente demonstrou também acoplamento excitação-contração dessensibilizado e contratilidade aumentada em resposta a estímulo adrenérgico em camundongos haploinsuficientes para *Pkd2* (63). Esse trabalho revelou, ainda, expressão aumentada de receptor 2 de rianodina (RyR2) e Ca^{++} -ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA) no ventrículo esquerdo desses animais, além de uma fosforilação de fosfolambam por PKA diminuída e de Troponina I aumentada. Mais recentemente, e em sintonia com os resultados de nosso grupo, observou-se que camundongos *Pkd2*^{+/-} de nove meses de idade apresentaram paredes mais finas de ventrículo esquerdo, consistentes com cardiomiopatia dilatada, e FEVE diminuída (64). Por fim, empregando um estímulo β -adrenérgico prolongado, Giehl e cols mostraram que estresse cardíaco induz suprarregulação do eixo de sinalização PC2-cromogranina B-BNP, e que esta via regula a produção de peptídeos natriuréticos cardioprotetores (65).

Galectina-3: estrutura e funções

Galectina-3 (Gal-3) constitui-se em uma proteína pleiotrópica de 250 aa e massa molecular de 29-35 kDa, codificada pelo gene *LGALS3* (*Lectin, galactosin binding, soluble 3*) (66). Gal-3 é a única proteína do tipo químera pertencente à família das lectinas, sendo caracterizada por sua capacidade de se ligar a β -galactosídeos (67). Apresenta um domínio C-terminal de reconhecimento de carboidratos altamente conservado (CRD) e uma porção N-terminal rica em repetições glicina, tirosina, alanina e prolina, importante para interações com outras proteínas (67-69) (Figura 2). Uma vez ligada a glicoconjugados, Gal-3 pode formar estruturas multiméricas com geometria irregular na membrana plasmática, a partir de sua porção N-terminal. Essas estruturas, denominadas *lattices* (70), promovem sua estabilidade e contribuem para suas funções biológicas. A formação de tais complexos estruturais é regulada por metaloproteinases, capazes de clivar seu domínio N-terminal e impedir sua oligomerização (71).

Figura 2. Representação esquemática de moléculas de galectina-3 e dos tipos de estrutura formadas por elas.

Gal-3 regula várias vias de transdução de sinais e, em diferentes células e sob diferentes estímulos, pode se localizar no núcleo, no citoplasma ou no meio extracelular (72). Em nível nuclear, associa-se a processos de *splicing* de pré-RNA e expressão gênica, desempenhando um papel pró-apoptótico ainda não bem esclarecido (72). O mecanismo pelo qual Gal-3 é liberada no meio extracelular ainda não é claro. Alguns estudos sugerem que Gal-3 tenha a capacidade de atravessar a bicamada lipídica das células (73). Análises das funções específicas do domínio CRD e N-Terminal na indução de apoptose de células T e células mononucleares de sangue periférico demonstraram que Gal-3 induz apoptose ativando ERK (*extracellular-signal regulated kinase*), PKC (*protein kinase C*) e mediando a produção de EROs (espécies reativas de oxigênio) (74). Por outro lado, alguns estudos

mostraram que a geração de EROs induzida por tratamentos com radiação UV-B e TNF- α foi prevenida de forma significativa por meio de superexpressão de Gal-3 (75). Esse efeito foi consistente com a inibição da indução de morte celular determinada por superexpressão de Gal-3, independentemente de ocorrer por apoptose ou necrose. Ambos os mecanismos incluem um desequilíbrio oxidativo. Esses achados sugerem que Gal-3 possa interferir em estágios muito iniciais de morte celular que estão associados a uma perturbação da homeostase mitocondrial e subsequente formação de EROs (75).

Gal-3 pode se translocar para a membrana perinuclear após vários estímulos apoptóticos (76, 77). É importante atentar que Gal-3 possui uma sequência de aminoácidos semelhante a Bcl-2, uma proteína supressora de apoptose bem caracterizada. Nesse contexto, Yang e cols mostraram que Gal-3 pode interagir com Bcl-2 por meio de um mecanismo inibível por lactose (78). Um outro estudo mostrou que a superexpressão de Gal-3 protege a integridade do potencial elétrico da membrana mitocondrial e impede a liberação de citocromo *c* para o citosol em resposta a estímulos apoptóticos (76). De fato, a translocação de Gal-3 para a mitocôndria estabiliza o transporte de elétrons em sua membrana interna, exercendo um papel anti-apoptótico.

No nível extracelular, esta proteína se liga a glicolipídios e glicoproteínas da superfície celular e da matriz extracelular, mediando adesão célula-célula e célula-matriz extracelular. Os *lattices* atuam como adaptadores, facilitando a endocitose de moléculas não dependente de carreadores de clatrina (79). Dessa forma modulam a localização e o *turnover* de vários receptores presentes na membrana plasmática, participando de diversas vias de sinalização celular.

Gal-3 constitui-se em um regulador chave na inflamação, reparo tecidual, fibrogênese e remodelamento ventricular (80). Esses papéis são mediados por regulação de expressão

gênica, ciclo celular, apoptose, organogênese e interações célula-célula e célula-matriz (77, 81). Seus efeitos na inflamação aguda incluem participação na quimioatração de macrófagos e monócitos, adesão e ativação de neutrófilos, reconhecimento de antígenos de patógenos, fagocitose e produção de IL-2 (82). Ao mesmo tempo, Gal-3 pode ter um efeito supressivo sobre células mielóides, através da inibição da produção de IL-5 em eosinófilos humanos (72). Vale notar que enquanto alguns estudos realizados com administração exógena de Gal-3 mostraram que essa proteína é capaz de influenciar o crescimento de várias células, incluindo células imunes, Gal-3 mostrou-se capaz de induzir apoptose em células T, incluindo linhagens celulares de leucemia, células mononucleares de sangue periférico, neutrófilos e células T ativadas de camundongo (72).

Um estudo anterior mostrou que pacientes que sofreram acidente vascular encefálico isquêmico agudo apresentavam níveis séricos mais elevados de Gal-3 que pacientes controle (83). Nesse estudo, os autores mostraram *in vitro* que *knockdown* de Gal-3 com siRNA aumentou significativamente a viabilidade de células neurológicas em cultura e reduziu a apoptose induzida por hipóxia. A expressão de citocinas pró-inflamatórias, contudo, diminuiu com inibição de Gal-3 (83).

Efeitos deletérios de Gal-3 têm sido descritos em vários distúrbios médicos. Por se constituir em um mitógeno capaz de estimular a proliferação de fibroblastos de forma parácrina por meio da interação com glicoconjugados de superfície celular, Gal-3 exerce um papel importante na remodelação tecidual (84). Em modelo de obstrução ureteral unilateral em camundongos, a expressão de Gal-3 permanece regulada positivamente conforme a fibrose renal aumenta e há uma elevação no recrutamento de macrófagos, sugerindo que a fibrose renal seja dependente de macrófagos Gal-3+ (85).

O efeito e a função biológica de Gal-3 dependem, portanto, do microambiente, localização celular e alterações sistêmicas; nesse cenário, fatores específicos podem alterar suas ações.

Efeitos da galectina-3 sobre o fenótipo cardíaco na deficiência de *Pkd1*

Gal-3 é marcadamente expressa em doenças humanas e modelos animais associados a fibrose (86). Um estudo prévio revelou aumento significativo na expressão cardíaca de Gal-3 em ratos Ren-2, um modelo transgênico de insuficiência cardíaca (87). Interessantemente, administração de doses baixas de Gal-3 recombinante resultou em disfunção ventricular acompanhada de aumento de expressão de colágeno I. Outros estudos em animais confirmaram expressão aumentada de Gal-3 em modelos de remodelamento ventricular esquerdo associados a infusão de angiotensina II (88), cardiomiopatia associada à administração de interferon (89) e cardiomiopatia diabética associada à administração de estreptozotocina (90).

O entendimento desse cenário ampliou-se em direção à DRPAD com o estudo de Balbo e cols conduzido em nosso laboratório (59). Este estudo iniciou-se pela geração dos seguintes camundongos duplo-mutantes deficientes em *Pkd1* e *knockouts* para Gal-3: a) camundongos não císticos haploinsuficientes para *Pkd1* e *knockout* para Gal-3 (HTG-, *Pkd1*^{+/-}:*Lgals3*^{-/-}); b) camundongos císticos deficientes em *Pkd1* e *knockout* para Gal-3 (CIG-, *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre}:*Lgals3*^{-/-}); e c) camundongos severamente císticos deficientes em *Pkd1* e *knockout* para Gal-3 (VVG-, *Pkd1*^{V/V}:*Lgals3*^{-/-}). Notavelmente, a supressão da expressão da Gal-3 em animais haploinsuficientes e císticos determinou franca melhora da função sistólica e da deformidade cardíaca (*strain*). Camundongos HTG- e CIG- também apresentaram redução de apoptose e fibrose cardíaca comparados a animais HT e CI, atingindo valores semelhantes a seus controles selvagem e não cístico. Na mesma linha, a

supressão de expressão de Gal-3 nos camundongos severamente císticos também determinou melhora da função sistólica e diminuição de apoptose cardíaca. De forma marcante, animais VVG- apresentaram aumento de sobrevida comparados a camundongos VV. É importante mencionar que os níveis séricos de ureia não diferiram entre animais HT e HTG-, CI e CIG-, e VV e VVG-.

Permanecem desconhecidas, no entanto, quais células cardíacas expressam Gal-3 nos estados de deficiência de *Pkd1*, quais propriedades e respostas celulares são afetadas por Gal-3 neste cenário, quais células constituem a principal fonte de Gal-3 nesse contexto, e se os efeitos deletérios em corações deficientes em *Pkd1* são induzidos por Gal-3 extracelular ou intracelular. Essas questões centrais, incluindo a caracterização dos perfis apoptótico e inflamatório, foram abordadas neste estudo em camundongos HT e VV.

OBJETIVOS

Objetivo central

O objetivo central deste estudo foi elucidar aspectos fundamentais da patogênese da cardiomiopatia associada à DRPAD, por meio da análise do mecanismo envolvido nos efeitos deletérios da Gal-3 sobre o coração de camundongos deficientes em *Pkd1*. Tais estudos foram realizados em camundongos não císticos haploinsuficientes para *Pkd1* (HT) e camundongos com rins intensamente císticos, incapazes de clivar policistina-1 (VV), nas idades de 15 e/ou 25 dias.

Objetivos específicos

1. Avaliar e comparar os perfis de expressão quantitativa do gene *Lgals3* em tecido ventricular de camundongos VV, HT e seus respectivos controles selvagens.
2. Analisar e comparar os perfis de expressão quantitativa de Gal-3 em tecido ventricular de camundongos VV, HT e seus respectivos controles selvagens.
3. Avaliar e comparar a densidade de células com expressão de Gal-3 em miocárdio ventricular de camundongos VV, HT e seus respectivos controles selvagens.
4. Analisar e comparar os perfis celulares de expressão de Gal-3 em cardiomiócitos ventriculares de camundongos VV, HT e seus respectivos controles selvagens.
5. Avaliar e comparar a densidade de macrófagos M1 e M2 em miocárdio ventricular de camundongos VV e seus respectivos controles selvagens.

6. Analisar e comparar os perfis de expressão quantitativa dos genes *Cd206*, *Ym1*, *Fizz1* e *Nos2* em tecido ventricular de camundongos VV, HT e seus respectivos controles selvagens.
7. Avaliar e comparar os perfis celulares de expressão de Gal-3 em macrófagos cardíacos M1 e M2 de camundongos VV, HT e seus respectivos controles selvagens.
8. Analisar e comparar a densidade de fibroblastos em miocárdio ventricular de camundongos VV e seus respectivos controles selvagens.
9. Avaliar e comparar os perfis de expressão quantitativa dos genes *Fnl*, *Fsp1* e *Vim* em tecido ventricular de camundongos VV, HT e seus respectivos controles selvagens.
10. Analisar e comparar os perfis celulares de expressão de Gal-3 em fibroblastos cardíacos em camundongos VV, HT e seus respectivos controles selvagens.
11. Avaliar e comparar os perfis de expressão quantitativa de Gal-3 em fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos em camundongos VV, HT e seus respectivos controles selvagens.
12. Analisar e comparar os perfis celulares de apoptose em cardiomiócitos para camundongos VV, HT, *Pkd1*^{V/V}:*Lgals3*^{-/-} (VVG-) e seus respectivos controles selvagens para *Pkd1*.
13. Avaliar e comparar os perfis celulares de apoptose em fibroblastos cardíacos para camundongos VV, HT, VVG- e seus respectivos controles selvagens para *Pkd1*.
14. Analisar e comparar os perfis inflamatórios cardíacos de camundongos VV, HT, VVG- e seus respectivos controles selvagens para *Pkd1*, por meio da análise de expressão quantitativa dos genes *Il6*, *Il1b* e *Il4r*.
15. Avaliar e comparar os perfis fibróticos cardíacos de camundongos VV, HT, VVG- e seus respectivos controles selvagens para *Pkd1*, por meio da análise de expressão quantitativa dos genes *Col3a1*, *Colla1* e *Tgfb1*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos e eutanásia dos animais

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o registro número 090/2017, seguindo os padrões nacionais e internacionais de cuidado e experimentação em animais. Os camundongos foram mantidos em estantes ventiladas sob condições padronizadas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 hrs) e de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), com livre acesso a água e ração. A eutanásia foi realizada por decapitação, após anestesia intraperitoneal por administração de tiopental (0,5 mg/g de peso corpóreo) na idade de 15 e/ou 25 dias. Os estudos de imunoistoquímica (IH) foram realizados com camundongos machos, enquanto todos os outros grupos experimentais incluíram animais machos e fêmeas em proporções equilibradas.

Modelos animais

Três modelos de camundongos geneticamente modificados foram usados neste estudo, todos gerados no fundo genético C57BL/6J. O primeiro modelo consistiu no camundongo VV (*Pkd1^{V/V}*), incapaz de clivar PC1 no sítio GPS (91). Animais *Pkd1^{+/+}* foram empregados como seus controles (WT1). Camundongos VV e WT1 foram obtidos a partir do acasalamento de animais heterozigotos (*Pkd1^{V/+}*), uma vez que esses camundongos são férteis e não apresentam fenótipo cístico renal. Além de doença renal cística inicial massiva e de disfunção sistólica detectada em P18 (59), camundongos VV apresentam peso corporal reduzido. Esse genótipo resulta em sobrevida curta, com mediana de 21 dias de vida.

O segundo modelo foi representado por um camundongo duplo-mutante, homozigoto para o alelo *Pkd1^V* e para um alelo KO de *Lgals3* (*Lgals^{-/-}*), o gene que codifica Gal-3. Este alelo nulo foi gerado pela inserção de um fragmento de DNA acoplado ao gene de resistência à neomicina (*neor*) entre o íntron 4 e o éxon 5 de *Lgals* (92). Animais *Lgals^{-/-}* são saudáveis e férteis e não apresentam alterações fenotípicas óbvias. Camundongos duplo-mutantes (VVG-) foram gerados conforme descrito por Balbo e cols (59), por meio do cruzamento de progenitores *Pkd1^{V/+}:Lgals3^{-/-}*, gerando camundongos *Pkd1^{V/V}:Lgals3^{-/-}* (VVG-) e os respectivos controles *Pkd1^{+/+}:Lgals3^{-/-}* (WT1G-). Animais VVG- exibiram não apenas função sistólica resgatada em relação aos VVs, mas também maior sobrevida, chegando à mediana de 30 dias (59).

O terceiro modelo consiste em haploinsuficiência pura, caracterizada por uma mutação nula em apenas um dos alelos *Pkd1*. Este camundongo HT (*Pkd1^{+/-}*) se assemelha funcionalmente ao *background* genético celular da DRPAD humana. O alelo *Pkd1⁻* teve parte do éxon 2 e todo o éxon 3 substituído por um gene repórter (*lacZ*) clonado em fase com o restante do éxon 2 e seguido pelo gene de resistência à neomicina (*neor*). O fragmento *LacZ-neor* inclui sequências de terminação da transcrição, levando à inativação de *Pkd1* (25, 93). Camundongos HT apresentam disfunção cardíaca, mas não desenvolvem cistos renais ou hipertensão arterial antes de 15 semanas de idade (59).

Genotipagem

Coletamos pequenos fragmentos de cauda para obter amostras de DNA genômico dos camundongos. Os fragmentos foram incubados em tampão de extração (Tris 50 mM, pH8,0, KCl 50 mM, EDTA 2,5 mM e 1% Tween 20) contendo 200 µg/mL de proteinase K. Os fragmentos foram digeridos *overnight* a 55°C. O processo de genotipagem foi realizado pela

técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando iniciadores específicos (*Forward*: 5'-CCAAACAACCTCAGACCAGG-3' e *Reverse*: 5'-ACCAGGACAGCAAGAAAAC-3'). O produto da amplificação de *Pkd1^v* gera uma banda de 329 pares de base (pb) visualizada por eletroforese em gel, enquanto o alelo selvagem *Pkd1⁺* é identificado por um produto de 280 pb (Figura 3A). Camundongos VVG- e WT1- foram genotipados com os mesmos iniciadores empregados para animais VV e WT1. A genotipagem de camundongos HT foi feita utilizando três iniciadores específicos: *Forward*: 5'-AATAGGGGTGGGGCTTGTGGGTCG-3', comum a ambos os alelos *Pkd1^{+/+}* e *Pkd1^{+/-}*, e *Reverse 1*: 5'-TCGAAAGGGGGATGTGCTGC-3' e *Reverse 2*: 5'-TACTCACACCTCCACCAGTGC-3'. Tal reação de PCR pode resultar em duas bandas: uma de 180 bp, referente ao alelo selvagem *Pkd1⁺*, e outra de 220 pb, referente ao alelo mutado *Pkd1⁻* (Figura 3B).

Figura 3. Genotipagem voltada à identificação dos alelos *Pkd1^V* e *Pkd1⁻*. A) Identificação do alelo *Pkd1^V*, 1: Marcador de massa molecular; 2: controle negativo (sem DNA); 3 e 7: camundongos *Pkd1^{V/+}*; 4, 5 e 6 camundongos *Pkd1^{V/V}*; 8 e 9 *Pkd1^{+/+}*. B) Identificação do alelo *Pkd1⁻*, 1: Marcador de massa molecular; 2: controle negativo (sem DNA); 3, 5 e 7: camundongos *Pkd1^{+/+}*; 4, 6, 8 e 9 camundongos *Pkd1^{+/-}*.

Imunoistoquímica

Amostras de tecido cardíaco ventricular de camundongos com 15 dias de idade foram fixadas em formalina tamponada 4% (pH 7,6) por um período de 24-48 hrs e incluídas em parafina. Secções de 3-4 μm foram preparadas para análises de IH. Para tanto, os tecidos foram desparafinizados, reidratados e submetidos a exposição antigênica com tampão Tris/EDTA (Tris 1 mM, EDTA 120 μM , pH9,0) por 15 min. Realizamos o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H_2O_2 3% em metanol, por 30 min. Bloqueamos sinais inespecíficos com solução de leite em pó desnatado em tampão PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM) por 30 min a 37°C. Anticorpos primários anti-Gal-3 (M3/38-hibridoma, gentilmente cedido pelo Prof. Roger Chammas - ICESP), anti-Troponina I (Abcam, Cambridge, MA, Cat #AB47003), anti-Vimentina (Abcam, Cambridge, MA, Cat #AB92547), anti-iNOS (Abcam, Cambridge, MA, Cat #AB15323) e anti-CD206 (Abcam, Cambridge, MA, Cat #AB64693) foram usados em incubações *overnight* a 4°C. O anticorpo anti-Gal-3 foi incubado simultaneamente com anti-Vimentina, anti-Troponina I, anti-CD206 ou anti-iNOS, para obtenção de dupla marcação entre as duas proteínas alvo. As lâminas foram incubadas com seus respectivos anticorpos secundários conjugados a HRP. Anti-Gal-3 foi revelado pelo substrato cromogênico diaminobenzidina tetrahidroxicloreto (DAB) e anti-Vimentina, anti-Troponina I, anti-CD206 e anti-iNOS foram revelados por incubação com *PolyDetector HRP Green Kit* (Bio SB, Santa Bárbara, CA). Utilizamos hematoxilina de Harris para contracorar as lâminas. Vinte imagens foram adquiridas no microscópio Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc., Tallahassee, FL) em aumento de 400x. Os resultados encontram-se expressos como células positivas por mm^2 .

Western blot

Amostras de tecido cardíaco foram coletadas de camundongos com 15 dias de idade da mesma porção do coração (ponta do ventrículo) e homogeneizadas em tampão de ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA, NaCl 150 mM, EDTA pH 8,0 5 mM, Tris pH 8,0 50 mM, NP-40 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1%) contendo inibidores de protease e fosfatase (*Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail*, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Homogeneizamos a mistura no equipamento *Bead Ruptor 24* (Omni Inc., Kennesaw, GA) com microesferas de cerâmica de 1,4 mm de diâmetro a 5000 rpm (movimentos por min). A concentração de proteína foi determinada com um kit de ensaio de proteína BCA (*Pierce BCA Protein Assay Kit*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Trinta µg de proteínas por poço foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 15% e transferidos para membranas de nitrocelulose de 0,45 µm (Bio-Rad, Hercules, CA) (*overnight* a 40 V). As membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado 5% em TBST (NaCl 137 mM, KCl 37 mM, Tris-Base 20 mM e Tween-20 0,01%) por 1 h à temperatura ambiente. As membranas foram incubadas com anticorpo anti-Gal-3 (M3/38-hibridoma) *overnight* a 4 °C, seguido de incubação com o anticorpo secundário correspondente conjugado com HRP. A detecção foi realizada usando substrato ECL (Tris-HCl 100 mM, luminol 2,5 mM, ácido p-cumárico 0,4 mM e H₂O₂ 0,18%), o sinal quimioluminescente foi detectado utilizando o sistema digital de aquisição de imagens ALLIANCE 4.7 (UVITEC, Cambridge, Inglaterra, Reino Unido) e as quantificações foram realizadas por meio de análises densitométricas empregando o *software* IMAGE J (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Os montantes de proteína foram normalizados com o controle endógeno GAPDH (R&D Systems, Minneapolis, MN, Cat #MAB5718).

RT-PCR em tempo real

Realizamos a extração de RNA total de tecido cardíaco de camundongos de 15 e 25 dias de idade a partir da mesma porção do coração (ponta do ventrículo), utilizando o *ReliaPrep RNA Miniprep Systems Kit* (Promega, Madison, WI) segundo as recomendações do fabricante. RNA total foi quantificado por espectrofotometria (*Nanodrop 1000*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). A integridade do RNA foi avaliada em corrida de eletroforese por meio da observação dos fragmentos 18S e 28S ou empregando o sistema *RNA Screen Tape Analysis* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Usamos 1,0 µg de RNA total para sintetizar cDNA. A transcrição reversa foi realizada utilizando o kit *ImProm-II Reverse Transcription Kit* (Promega, Madison, WI). Expressão gênica foi avaliada usando a sonda *Sybr Green* (PowerUp™ SYBR Green Master Mix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) para *Cd206* (receptor de manose C tipo 1), *Col1a1* (colágeno tipo I alfa-1), *Col3a1* (colágeno tipo III alfa-1), *Fnl* (fibronectina), *Fizz1* (molécula resistina-like alfa-1), *Fsp1* (proteína específica de fibroblasto-1), *Lgals3* (galectina-3), *Il6* (interleucina-6), *Il1b* (interleucina-1beta), *Il4r* (receptor de interleucina-4), *Nos2* (sintase do óxido nítrico 2), *Tgfb1* (fator de crescimento transformador beta-1), *Vim* (vimentina), e *Ym1* (quitinase 3-like 3). *Actb* (beta actina) foi usado como controle endógeno das reações. Os resultados foram obtidos por $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e expressos em unidades arbitrárias (UA). As sequências dos iniciadores encontram-se listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores utilizados nas análises de expressão gênica por RT-PCR em tempo real.

Gene	Iniciador <i>forward</i> (5'-3')	Iniciador <i>reverse</i> (5'-3')
<i>Actb</i>	GATGTAATGAAGGCTTTGGTC	TGTGCACTTTTATTGGTCTC
<i>Cd206</i>	CTCTGTTCAGCTATTGGACGC	TGGCACTCCCAAACATAATTTGA
<i>Col1a1</i>	TGCTTTCTGCCCGGAAGA	GGGATGCCATCTCGTCCA
<i>Col3a1</i>	ACTCAAGAGTGGAGAATACTG	AACATGGTTTCTTCTCTGCAC
<i>Fizz1</i>	CCAATCCAGCTAACTATCCCTCC	CCAGTCAACGAGTAAGCACAG
<i>Fn1</i>	AGGAGAACCAGGAGAGCACACC	GCCCAGTGATTTTCAGCAAAGG
<i>Fsp1</i>	TGAGCAACTTGGACAGCAACA	CTTCTTCCGGGGCTCCTTATC
<i>Il1b</i>	TTCAGGCAGGCAGTATCACTC	GAAGGTCCACGGGAAAGACAC
<i>Il4r</i>	TGGATCTGGGAGCATCAAGGT	TGGAAGTGCGGATGTAGTCAG
<i>Il6</i>	TTGGTCCTTAGCCACTCCTCC	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC
<i>Nos2</i>	TCCGAAGTTTCTGGCAGCAG	CTGGAACAGCACTCTCTTGCG
<i>Lgals3</i>	CCCTTTGAGAGTGGCAAACCA	CATCGTTGACCGCAACCTT
<i>Tgfb</i>	GGATACCAACTATTGCTTCAG	TGTCCAGGCTCCAAATATAG
<i>Vim</i>	CGTCCACACGCACCTACAG	GGGGGATGAGGAATAGAGGCT
<i>Ym1</i>	GGGCATACCTTTATCCTGAG	CCACTGAAGTCATCCATGTC

Actb (beta actin), *Cd206* (mannose receptor C-type 1), *Col1a1* (collagen type I alpha-1), *Col3a1* (collagen type III alpha-1), *Fizz1* (resistin-like molecule alpha-1), *Fn1* (fibronectin), *Fsp1* (fibroblast specific protein 1), *Il1b* (interleukin-1beta), *Il4r* (interleukin-4 receptor), *Il6* (interleukin-6), *Nos2* (nitric oxide synthase 2), *Lgals3* (galectin-3), *Tgfb1* (transforming growth factor beta-1), *Vim* (vimentin) e *Ym1* (chitinase 3-like 3).

Citometria de fluxo

Corações de camundongos de 15 dias de vida foram coletados e colocados em solução de PBS gelada. O componente ventricular foi picotado em fragmentos de aproximadamente 1,0 mm³. O tecido ventricular foi então digerido em solução de digestão (colagenase I 450 U/mL, colagenase XI 125 U/mL, DNase I 60 U/mL e hialuronidase 60 U/mL) por 1 h a

37°C, sob suave agitação (94). As células foram permeabilizadas com Triton 0,2%, seguido de bloqueio com soro fetal bovino (SFB) 2% e albumina sérica bovina (BSA) 0,5% em PBS. Os ensaios para detecção da expressão de Gal-3 nos diferentes tipos de células cardíacas foram realizados por incubação concomitante do anticorpo primário anti-Troponina I (Abcam, Cambridge, MA, Cat #AB47003), anti-Vimentina (Abcam, Cambridge, MA, Cat #AB92547), anti-iNOS (Abcam, Cambridge, MA, Cat #AB15323) ou anti-CD206 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Cat #53-2061-82) com o anticorpo anti-Galectina-3 PE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Cat #12-5301-82). As análises para avaliar a taxa apoptótica, por sua vez, foram realizadas por meio de incubação concomitante do anticorpo anti-Troponina I, anti-Vimentina, anti-iNOS ou anti-CD206 com o anticorpo anti-Caspase-3 clivada PE (BD Pharmingen, San Diego, CA, Cat #51-68655X). Em ambos os casos, as incubações foram realizadas por 30 min. Após essa etapa, as células foram incubadas com um anticorpo secundário conjugado com Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Cat #R37116) por mais 30 min. As células foram então fixadas com paraformaldeído (PFA) 2% e filtradas através de um filtro de 100 µm. A compensação foi realizada com *compbeads* (positivas: cobertas com um anticorpo anti-Ig-k e negativas: cobertas com SFB, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). Os dados foram adquiridos em um citômetro BD FACS Canto II (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ), e analisados usando o software FlowJo v10.7 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). Adquirimos 10.000 eventos por tubo. A estratégia de análise encontra-se esquematizada na Figura 4.

Figura 4. Estratégia de análise por citometria de fluxo para caracterização do perfil de expressão de galectina-3 e apoptose em células cardíacas. A) PE x Time, para checar o *status* do laser; B) FSC-H x FSC-A, para excluir células duplicadas na aquisição (inclusão apenas de *singlets*); C) SSC-H x SSC-A, para excluir células duplicadas na aquisição (inclusão apenas de *singlets*); D) SSC-A x FITC, para identificar a população positiva para Troponina I, Vimentina, iNOS ou CD206; E) SSC-A x PE, para identificar a população positiva para Gal-3 ou Caspase-3 clivada dentro da população FITC positiva.

Isolamento de fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos

Corações de camundongos de 15 dias de idade foram coletados e colocados em solução de PBS gelada. Os ventrículos foram picotados a seguir em fragmentos de aproximadamente 1,0 mm³ e digeridos em solução de digestão (colagenase I 450 U/mL, colagenase XI 125 U/mL, DNase I 60 U/mL e hialuronidase 60 U/mL) por 1 h a 37°C, sob suave agitação. O tecido digerido foi então colocado em garrafa de cultura com meio condicionado com SFB 20%, penicilina/estreptomicina 1% e glutamina 1%, para adesão seletiva dos fibroblastos cardíacos. Após 1 h as células que não aderiram foram removidas, novo meio foi adicionado à garrafa e os fibroblastos foram mantidos em estufa úmida a 37°C com CO₂ 5% por sete dias. O sobrenadante contendo as células não aderentes, principalmente cardiomiócitos, foi centrifugado para obter os cardiomiócitos utilizados para análise de *western blot*.

Análise estatística

Os dados foram classificados em paramétricos ou não paramétricos com base na análise de histograma e no teste de Shapiro-Wilks. Os dados paramétricos estão expressos como média±desvio padrão (DP) e os dados não paramétricos como mediana e intervalo interquartil. Para os dados paramétricos, as comparações entre dois grupos foram realizadas por meio do teste t com ou sem correção de Welch, dependendo da análise de igualdade de variâncias realizada com o teste de Levene.

Comparações de dados não paramétricos, incluindo dois grupos, foram realizadas empregando o teste de Mann-Whitney. As comparações em fatores com >2 níveis foram realizadas com o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn. As análises de dois fatores para dados não paramétricos, por sua vez, foram realizadas usando uma análise de variância baseada em ranqueamento robusto (*robust rank-based analysis of variance*), conhecida como transformação de ranque alinhado (*aligned rank transform - ART*). O teste *post-hoc* foi realizado com base na distribuição de médias marginais para fatores com 3 níveis ou mais. Quando interação entre os fatores foi detectada, a análise da interação foi interpretada com base nas medianas e nos *dot plots*. Em testes envolvendo comparações múltiplas, as significâncias foram corrigidas com o método de Benjamini-Hochberg.

Com o objetivo de aumentar o poder do teste estatístico e reduzir o número de animais utilizados no estudo quando um experimento foi realizado com animais WT1 e WT2 e esses grupos apresentaram medidas centrais semelhantes e $P > 0,2$ para diferenças estatísticas, reunimos todos os camundongos selvagens em um único grupo (WT). Aceitamos risco $\alpha \leq 5\%$. Os programas estatísticos utilizados incluíram SPSS 25 (IBM, Armonk, NY),

GraphPad 8.0 (*Prism Software*, GraphPad Software, La Jolla, CA) e R 4.0 (*R Foundation for Statistical Computing*, Viena, Áustria).

RESULTADOS

A expressão de *Lgals3* e galectina-3 está aumentada em corações *Pkd1*^{V/V} e *Pkd1*^{+/-}

A relação entre a deficiência de *Pkd1* e Gal-3 na biologia cardíaca foi inicialmente analisada por Balbo e cols (59), que mostraram um efeito cardíaco deletério desta proteína em três modelos de camundongo associados a função anormal de PC1. Interessantemente, avaliação por *western blot* revelou expressão aumentada de Gal-3 no tecido cardíaco de camundongos císticos *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre}. Esses autores também observaram um valor numericamente maior da expressão de Gal-3 no coração de camundongos VV de 18 dias de idade, porém estatisticamente não significante, e não puderam detectar aumento na expressão dessa proteína em corações de camundongos adultos HT. Para resolver essa incerteza acerca de seu perfil de expressão nesses dois contextos de deficiência de *Pkd1*, no presente estudo analisamos a expressão cardíaca de *Lgals3* em camundongos VV e HT. Os animais foram analisados em idades bastante jovens e semelhantes, dada à curta sobrevida dos camundongos VV (59), ao fato da disfunção cardíaca ter sido documentada em camundongos HT já na idade de cinco semanas (59), e para permitir análises dos fenótipos VV e HT na mesma fase da vida. Nesse contexto, avaliamos os animais com idades de 15 e 25 dias. Todos os experimentos foram realizados com amostras de tecido ventricular. Interessantemente, a expressão do gene *Lgals3* mostrou-se aumentada em corações VV e HT comparadas a seus respectivos controles selvagens WT1 e WT2 [2,20 UA (1,49-3,27) *versus* 1,04 UA (0,71-1,31), $P < 0,001$; e $1,62 \pm 0,62$ UA *versus* $1,05 \pm 0,33$ UA, $P = 0,005$, respectivamente] (Figura 5A).

Análises de *western blot* confirmaram esses resultados no nível proteico, revelando maior expressão de Gal-3 em tecido ventricular VV que em WT1 [0,67 UA (0,24-1,27) *versus* 0,26

UA (0,20-0,39), $P=0,049$] e em corações HT que WT2 [0,77 UA (0,15-1,03) *versus* 0,12 UA (0,10-0,49), $P=0,031$] (Figura 5B).

Um número maior de células expressa galectina-3 em corações de camundongos deficientes em *Pkd1*

Para ampliar a caracterização do padrão de expressão de Gal-3, a densidade de células que expressam Gal-3 foi quantificada em miocárdio ventricular VV e HT. Seguindo a mesma linha dos resultados anteriores, as análises de IH revelaram densidades maiores dessas células em camundongos VV que em WT1 ($84,90 \pm 30,57$ células/mm² *versus* $33,07 \pm 12,16$ células/mm², $P=0,002$) e em animais HT que em WT2 ($56,48 \pm 8,14$ células/mm² *versus* $29,09 \pm 7,51$ células/mm², $P=0,004$) (Figura 5C).

Figura 5. A expressão de Gal-3 está aumentada nos corações de camundongos deficientes em *Pkd1*. **A)** Análises comparativas da expressão do gene *Lgals3* em tecido ventricular entre camundongos WT1 (n=14) e VV (n=14) e entre animais WT2 (n=16) e HT (n=13). **B)** Inferior: análises comparativas de *western blot* da expressão de Gal-3 em tecido ventricular entre camundongos WT1 (n=15) e VV (n=17) e entre animais WT2 (n=11) e HT (n=11). Superior: imagens representativas. **C)** Superior: análises comparativas de densidade de células Gal-3+ (marrom) em miocárdio ventricular entre camundongos WT1 (n=8) e VV (n=9) e entre animais WT2 (n=5) e HT (n=5). Inferior: imagens representativas de marcação por imunistoquímica para Gal-3. Magnificação original 400x, barra de escala 50 μ m. Os dados paramétricos foram comparados usando o teste t, sendo os resultados apresentados como média $\pm$ DP. Os dados não paramétricos foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney, com os resultados expressos como mediana e intervalo interquartil. *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001.

Cardiomiócitos ventriculares expressam galectina-3, um perfil potencializado pela deficiência de *Pkd1*

A expressão potencial de Gal-3 por cardiomiócitos normais é ainda matéria de debate, enquanto sua expressão por tais células em algumas doenças cardíacas já foi bem documentada (95, 96). Nossos resultados resolveram esse ponto conceitual por meio de dupla marcação para Troponina I e Gal-3 em uma plataforma de citometria de fluxo (CF). Embora em baixa porcentagem, células com dupla marcação foram observadas em miocárdio ventricular de animais VV, HT e WT (grupo WT1 + WT2, conforme explicado em métodos, análise estatística). Vale destacar que a fração de cardiomiócitos que expressa Gal-3 (células Gal-3+Troponina I+/todas as células Troponina I+) foi maior em miocárdio ventricular VV e HT que dos controles WT [5,76% (4,76-6,63) e 2,31% (2,14-3,62) *versus* 1,05% (0,94-1,56), $P<0,001$ e $P=0,002$, respectivamente] (Figura 6A). Experimentos de IH confirmaram esse achado em miocárdio ventricular VV, revelando um aumento da densidade de células duplamente marcadas [16,79 células/mm² (6,57-25,73) *versus* 3,50 células/mm² (1,96-4,92), $P=0,023$] (Figura 6B). Interessantemente, camundongos VV, um modelo mais grave que HT, exibiram uma fração maior de cardiomiócitos com expressão de Gal-3 que animais HT [5,76% (4,76-6,63) *versus* 2,31% (2,14-3,62), $P<0,001$] (Figura 6A)].

Análises complementares de *western blot* com extratos proteicos de cardiomiócitos isolados de corações VV, HT, WT1 e WT2 revelaram sinal extremamente fraco para todos os grupos, não permitindo quantificação adequada por densitometria (dados não mostrados).

Apesar desses dados novos altamente relevantes, nossos achados mostraram que mesmo no cenário de deficiência de *Pkd1* apenas uma minoria significativa de tais células expressa Gal-3, e em níveis muito baixos.

Figura 6. Uma pequena fração de cardiomiócitos expressa Gal-3, um processo intensificado no cenário de deficiência de *Pkd1*. **A)** Esquerda: análises comparativas de citometria de fluxo da razão células Gal-3+Troponina I+/células Troponina I+ em ventrículos cardíacos entre camundongos WT (n=15), VV (n=6) e HT (n=6). Direita: imagens representativas de citometria de fluxo. **B)** Esquerda: Análises imunohistoquímica comparativa de densidade de células Gal-3+Troponina I+ em miocárdio ventricular entre camundongos WT1 (n=8) e VV (n=9). Direita: imagens representativas de dupla marcação por imunohistoquímica para Gal-3 (marrom) e Troponina I (verde). Magnificação original 400x, ampliação de imagens representativas 630x e 1000x, barra de escala 10-20 μ m. Os dados não paramétricos foram comparados usando o teste U de Mann-Whitney, com resultados apresentados como mediana e intervalo interquartil. As comparações em fatores com >2 níveis foram feitas com o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn. Em testes envolvendo comparações múltiplas, as significâncias foram corrigidas com o método de Benjamini-Hochberg. *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001.

Macrófagos não constituem a principal fonte de galectina-3 nos corações de camundongos deficientes em *Pkd1*

Estudos clínicos e experimentais mostraram forte correlação entre os níveis séricos de Gal-3 e disfunção cardíaca (97-99). Além disso, essa proteína é altamente expressa por macrófagos (85, 87). Baseados nos achados anteriores e nessas considerações, passamos a investigar os macrófagos como fonte potencial de Gal-3 cardíaca em nossos modelos animais. As análises de expressão gênica usando três marcadores para macrófagos M2 (anti-inflamatório) - *Cd206*, *Ym1* e *Fizz1* - foram realizadas em ambos os modelos e mostraram resultados heterogêneos. A expressão de *Cd206* em tecido ventricular não diferiu significativamente entre camundongos VV e WT e entre animais HT e WT (Figura 7A). Análise por IH revelou densidades muito baixas de células CD206+ em miocárdio ventricular de camundongos VV e WT1 e, em linha com os dados de expressão gênica, não foi detectada diferença entre os dois grupos (Figura 7B). A expressão de *Ym1*, por sua vez, mostrou-se aumentada em tecido ventricular VV comparado ao de controles WT [13,05 UA (2,96-47,67) *versus* 0,88 UA (0,58-1,65), $P < 0,001$], contudo não foi detectada diferença entre camundongos HT e WT (Figura 7A). A expressão de *Fizz1*, por outro lado, foi mais baixa em tecido ventricular VV que WT [0,18 UA (0,05-0,28) *versus* 0,87 UA (0,61-1,40), $P < 0,001$], ao passo que não se observou diferença entre ventrículos HT e WT (Figura 7A). Com base no perfil de IH que não identificou células marcadas positivamente para CD206 não consistentes com macrófagos, passamos a utilizar este marcador para selecionar macrófagos M2 por CF. Esses experimentos não revelaram diferença na fração de células CD206+ que expressam Gal-3 (células Gal-3+CD206+/todas as células CD206+) entre corações VV e WT nem entre corações HT e WT (Figura 7C). Em conjunto, nossos dados sugerem que subpopulações de macrófagos M2 possam se alterar no miocárdio ventricular

de camundongos VV, mas não em miocárdio ventricular HT, enquanto as densidades de células M2 permanecem muito baixas. Além disso, independentemente da intensidade do fenótipo, a fração de macrófagos M2 CD206+ cardíacos que expressa Gal-3 não aumenta no contexto de deficiência de *Pkd1*.

A expressão de *Nos2*, o gene que codifica iNOS - um marcador de macrófago M1 (pró-inflamatório), não diferiu entre camundongos VV e WT e entre animais HT e WT (Figura 7D). Análise por IH revelou densidades muito baixas de células iNOS+ em miocárdio ventricular VV e WT1, embora maior em VV [0,94 (0,12-3,02) *versus* 0,00 células/mm² (0,00-0,23), P=0,044; Figura 7E]. Esses resultados sugerem que corações VV e HT abriguem populações muito pequenas de macrófagos M1. A observação de um perfil imunoistoquímico de iNOS específico para macrófagos nos permitiu conduzir análises de CF utilizando este marcador. Esta investigação revelou frações aumentadas de células Gal-3+iNOS+ (células Gal-3+iNOS+/todas as células iNOS+) em tecido ventricular VV e HT comparados com WT [6,01% (5,67-7,42) e 4,08% (2,68-4,43) *versus* 2,11 % (1,88-2,28), P<0,001 e P=0,003; respectivamente] (Figura 7F). Vale notar que camundongos VV apresentaram uma fração maior de células cardíacas Gal-3+iNOS+ que animais HT [6,01% (5,67-7,42) *versus* 4,08% (2,68-4,43), P=0,002] (Figura 7F). Uma vez que macrófagos M1 expressam *Lgals3* apenas em condições muito específicas (100), o sinal de Gal-3 nessas células pode ser interpretado como proteína endocitada ou, possivelmente, como Gal-3 produzida pela própria célula. Macrófagos sem marcação para CD206 ou iNOS não foram quantificados, visto que os mesmos não expressam e secretam Gal-3 de forma significativa.

Nossos achados de uma população muito baixa de macrófagos e uma fração não aumentada de células M2 Gal-3+ em corações VV e HT indicam que macrófagos não são a principal fonte de Gal-3 em tais corações.

Figura 7. Perfis de expressão de Gal-3 em macrófagos cardíacos em camundongos deficientes em *Pkd1*.

A) Análises comparativas da expressão cardíaca de *Cd206* entre camundongos WT (n=29), VV (n=13) e HT (n=8); da expressão cardíaca de *Ym1* entre animais WT (n=30), VV (n=14) e HT (n=13); e da expressão cardíaca de *Fizz1* entre camundongos WT (n=26), VV (n=13) e HT (n=13). **B)** Esquerda: Análise comparativa da densidade de células CD206⁺ em miocárdio ventricular entre animais WT1 (n=8) e VV (n=9). Direita: Imagens representativas de marcação por imunohistoquímica para CD206 (verde). Magnificação original 400x, barra de escala 50 μ m. **C)** Esquerda: Análise comparativa de citometria de fluxo da razão células Gal-3+CD206⁺/células CD206⁺ em tecido ventricular entre camundongos WT (n=19), VV (n=6) e HT (n=7). Direita: Imagens representativas de citometria de fluxo. **D)** Análises comparativas da expressão cardíaca de *Nos2* entre animais WT (n=28), VV (n=13) e HT (n=8). **E)** Esquerda: Análise comparativa da densidade de células iNOS⁺ em miocárdio ventricular entre camundongos WT1 (n=5) e VV (n=8). Direita: Imagens representativas de marcação por imunohistoquímica para iNOS (verde). Magnificação original 400x, barra de escala 50 μ m. **F)** Esquerda: Análise comparativa de citometria de fluxo da razão células Gal-3+iNOS⁺/células iNOS⁺ em tecido ventricular cardíaco entre animais WT (n=15), VV (n=6) e HT (n=6). Direita: Imagens representativas de citometria de fluxo. Os dados não paramétricos foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney, com os resultados apresentados como mediana e intervalo interquartil. As comparações em fatores com >2 níveis foram realizadas com o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn. Em testes envolvendo comparações múltiplas, as significâncias foram corrigidas com o método de Benjamini-Hochberg. *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001.

Fibroblastos constituem a principal fonte de galectina-3 nos corações de camundongos deficientes em *Pkd1*

Níveis elevados de Gal-3 e seu RNAm foram detectados em fibroblastos em proliferação (81). Além disso, Gal-3 pode ser liberada no miocárdio por efeito parácrino, estimulando a proliferação de miofibroblastos (101). Diante dos resultados anteriores e de tais considerações, passamos a analisar o cenário de fibroblastos e suas potenciais ligações com a expressão de Gal-3 no coração de nossos modelos animais. Avaliamos a expressão dos genes *Fnl*, *Fsp1* e *Vim* em miocárdio ventricular. Essas análises não mostraram diferenças significantes entre camundongos VV e WT e entre os animais HT e WT (Figura 8A). Em concordância com esse achado, análise de IH revelou densidades altas, mas não diferentes, de células positivas para Vimentina em miocárdio ventricular entre VV e WT1 ($585,90 \pm 367,10$ células/mm² versus $491,80 \pm 346,2$ células/mm²; $P=0,655$; Figura 8B). Apesar de Vimentina se constituir no melhor marcador para fibroblastos, ela não é completamente específica para essas células (102). Seu perfil celular em miocárdio ventricular, entretanto, associado a uma avaliação por IH que mostrou que as células positivas para Vimentina eram essencialmente todas fibroblastos, nos permitiu utilizá-la como marcador de fibroblastos para análises de CF. Tais análises não mostraram razões células Vimentina+/todas as células diferentes entre corações VV e WT e entre corações HT e WT (dados não mostrados). Interessantemente, frações mais elevadas de fibroblastos com expressão de Gal-3 (células Gal-3+Vimentina+/todas as células Vimentina+) foram encontradas em tecido ventricular VV e HT comparados ao do grupo controle WT [4,71% (4,02-6,67) e 2,33% (2,15-2,96) versus 1,20% (0,96-1,89), $P<0,001$ e $P=0,032$, respectivamente] (Figura 8C). Nessas células, Gal-3 foi predominantemente encontrada no

citoplasma (Figura 8D). Não detectamos diferença significativa entre camundongos VV e HT.

Ampliamos a avaliação da expressão de Gal-3 em fibroblastos realizando análise de *western blot* com fibroblastos isolados de corações VV, WT1, HT e WT2. Um sinal muito forte foi obtido para os quatro grupos, sugerindo que fibroblastos sejam a principal fonte cardíaca de Gal-3, tanto em camundongos deficientes em *Pkd1* como em camundongos selvagens (Figura 8E). Conforme esperado, a expressão de Gal-3 mostrou-se aumentada em fibroblastos VV em comparação a controles WT1 ($0,75 \pm 0,13$ versus $0,53 \pm 0,08$, $P=0,002$), embora não tenhamos detectado diferença entre fibroblastos HT e WT2. Nossos achados apoiam, portanto, que fibroblastos constituem a principal fonte de Gal-3 no coração e que diferentes cenários de deficiência de *Pkd1* aumentam a fração dessas células com expressão dessa proteína.

Figura 8. Fibroblastos constituem a principal fonte de Gal-3 nos corações de camundongos deficientes em *Pkd1*. **A)** Análises comparativas da expressão cardíaca de *Fnl* entre camundongos WT (n=28), VV (n=10) e HT (n=9); da expressão cardíaca de *Fsp1* entre animais WT (n=30), VV (n=14) e HT (n=12); e da expressão cardíaca de *Vim* entre camundongos WT (n=29), VV (n=14) e HT (n=12). **B)** Esquerda: Análise comparativa da densidade de células Vimentina+ em miocárdio ventricular entre animais WT1 (n=5) e VV (n=8). Direita: Imagens representativas de marcação por imunoistoquímica para Vimentina (verde). Magnificação original 400x, barra de escala 50 μ m. **C)** Esquerda: Análise comparativa de citometria de fluxo da razão células Gal-3+Vimentina+/células Vimentina+ em tecido ventricular entre camundongos WT (n=15), VV (n=6) e HT (n=5). Direita: Imagens representativas de citometria de fluxo. **D)** Imagem representativa de marcação citoplasmática de Gal-3 (marrom) em fibroblastos (setas). Magnificação original 400x, barra de escala 50 μ m. **E)** Inferior: Análises comparativas de *western blot* da expressão de Gal-3 em fibroblastos cardíacos entre camundongos WT1 (n=5) e VV (n=5) e entre animais WT2 (n=5) e HT (n=5). Superior: Imagens representativas. Os dados paramétricos foram comparados usando o teste t, estando os resultados apresentados como média $\pm$ DP. As comparações em fatores com >2 níveis foram realizadas com o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn. Em testes envolvendo comparações múltiplas, as significâncias foram corrigidas com o método de Benjamini-Hochberg. *P<0,05 e ***P<0,001.

Galectina-3 induz apoptose de cardiomiócitos em camundongos VV

Com base nos dados de Balbo e cols de que corações deficientes em *Pkd1* apresentam apoptose aumentada (59), procuramos investigar se esse processo incluía aumento de apoptose em cardiomiócitos. As análises de CF confirmaram essa hipótese para o modelo VV, mostrando que esse perfil de deficiência de *Pkd1* aumenta a fração de cardiomiócitos apoptóticos (células Caspase-3 clivada+Troponina I+/todas as células Troponina I+) ($P=0,014$). Em concordância com o efeito pró-apoptótico de Gal-3 em corações VV, KO de *Lgals3* resgatou a taxa de apoptose em cardiomiócitos para seu nível basal em camundongos VV ($P=0,002$) [9,51% (6,76-13,55) em VV; 3,67% (2,32-4,85) em WT1; 2,84% (1,82-7,41) em camundongos *Pkd1*^{V/V}:*Lgals3*^{-/-} (VVG-); e 2,06% (1,25-3,09) em animais *Pkd1*^{+/+}:*Lgals3*^{-/-} (WT1G-); Figura 9A]. Interessantemente, detectamos interação entre o genótipo VV e KO para *Lgals3* ($P=0,015$). O efeito pró-apoptótico de Gal-3 em cardiomiócitos, no entanto, não pôde ser detectado em corações HT ($P=0,689$, Figura 9B).

O mesmo efeito pró-apoptótico foi observado para fibroblastos VV ($P<0,001$), assim como uma discreta tendência não significante de um efeito de resgate de KO para *Lgals3* ($P=0,240$) [3,27% (2,65-6,24) em VV; 1,35% (0,82-1,60) em WT1; 2,47% (2,00-2,80) em VVG-; e 1,52 (1,31-2,46) em WT1G-; Figura 9C]. Detectamos interação entre o genótipo VV e KO para *Lgals3* ($P=0,006$). A taxa de apoptose de fibroblastos também não diferiu entre corações HT e WT2 (Figura 9D).

Figura 9. Apoptose de cardiomiócitos e de fibroblastos está aumentada em corações VV. **A)** Superior: Análises de citometria de fluxo dos efeitos do genótipo VV e KO de *Lgals3* sobre a razão células Caspase-3 clivada+Troponina I+/células Troponina I+ em tecido ventricular entre camundongos WT1 (n=6), WT1G- (n=8), VV (n=6) e VVG- (n=5). Inferior: Imagens representativas de citometria de fluxo. **B)** Superior: Análise comparativa de citometria de fluxo da razão células Caspase-3 clivada+Troponina I+/células Troponina I+ em tecido ventricular entre animais WT2 (n=10) e HT (n=8). Inferior: Imagens representativas de citometria de fluxo. **C)** Superior: Análises de citometria de fluxo dos efeitos do genótipo VV e KO de *Lgals3* sobre a razão células Caspase-3 clivada+Vimentina+/células Vimentina+ em tecido ventricular entre camundongos WT1 (n=6), WT1G- (n=8), VV (n=6) e VVG- (n=5). Inferior: Imagens representativas de citometria de fluxo. **D)** Superior: Análise comparativa de citometria de fluxo da razão células Caspase-3 clivada+Vimentina+/células Vimentina+ em tecido ventricular entre animais WT2 (n=10) e HT (n=8). Inferior: Imagens representativas de citometria de fluxo. Os dados não paramétricos encontram-se apresentados como mediana e intervalo interquartil e foram analisados para fator único com o teste U de Mann-Whitney e, para fatores múltiplos, usando transformação de ranque alinhado seguida por análise de variância de duas vias. As comparações múltiplas foram corrigidas pelo método de Benjamini-Hochberg.

Corações VV apresentam inflamação

Atentos à relevância da inflamação no fenótipo renal da DRPAD e ao papel de Gal-3 extracelular no processo inflamatório (103, 104), investigamos o potencial estado inflamatório nos corações de ambos os modelos. Esta avaliação foi realizada quantificando a expressão dos genes *Il6*, *Il1b* e *Il4r*. Notavelmente, corações VV exibiram expressão aumentada de *Il6* ($P=0,020$), porém KO de *Lgals3* não a reduziu significativamente [1,89 UA (0,69-2,90) em VV; 0,95 UA (0,67-1,15) em WT1; 1,69 UA (1,19-4,37) em VVG-; e 1,46 UA (0,68-1,85) em WT1G-; Figura 10A]. O genótipo VV também aumentou a expressão de *Il1b* ($P=0,024$), enquanto KO de *Lgals3* também não resgatou seu nível de expressão [1,68 UA (1,01-2,27) em VV; 1,06 UA (0,55-1,49) em WT1; 1,55 UA (1,00-2,95) em VVG-; e 1,03 UA (0,71-1,31) em WT1G-; Figura 10B]. O genótipo VV também se associou a maior expressão de *Il4r* ($P=0,008$) e, à semelhança dos outros genes analisados, *Lgals3* não afetou significativamente seu nível no tecido ventricular [1,58 UA (1,12-2,00) em VV; 0,92 UA (0,68-1,37) em WT1; 1,52 UA (1,22-2,67) em VVG-; e 1,11 UA (0,83-1,68) em WT1G-; Figura 10C]. Por outro lado, os níveis de expressão de *Il6*, *Il1b* e *Il4r* não se mostraram significativamente aumentados em tecido ventricular HT comparados aos de WT2 (Figuras 10D, 10E e 10F).

Figura 10. Camundongos VV apresentam inflamação cardíaca. **A)** Análises dos efeitos do genótipo VV e KO de *Lgals3* sobre a expressão cardíaca do gene *Il6* entre camundongos WT1 (n=13), WT1G- (n=11), VV (n=14) e VVG- (n=13). **B)** Análises dos efeitos do genótipo VV e KO de *Lgals3* sobre a expressão cardíaca de *Il1b* entre animais WT1 (n=14), WT1G- (n=10), VV (n=13) e VVG- (n=12). **C)** Análises dos efeitos do genótipo VV e KO de *Lgals3* sobre a expressão cardíaca de *Il4r* entre camundongos WT1 (n=13), WT1G- (n=11), VV (n=14) e VVG- (n=13). **D)** Análise comparativa da expressão cardíaca de *Il6* entre animais WT2 (n=13) e HT (n=9). **E)** Análise comparativa da expressão cardíaca de *Il1b* entre camundongos WT2 (n=15) e HT (n=11). **F)** Análise comparativa da expressão cardíaca de *Il4r* entre animais WT2 (n=16) e HT (n=13). Os dados não paramétricos foram apresentados como mediana e intervalo interquartil e foram analisados para fator único com o teste U de Mann-Whitney e, para fatores múltiplos, usando transformação de ranque alinhado seguida por análise de variância de duas vias. As comparações múltiplas foram corrigidas com o método de Benjamini-Hochberg.

Corações deficientes em *Pkd1* não desenvolvem fibrose até P15-P25

Também analisamos fibrose em corações VV e HT em P15-P25, visto que Gal-3 se constitui em um regulador deste processo em coração, fígado e rim, e fibrose desempenha um papel fundamental no curso da doença renal na DRPAD (105). Surpreendentemente, o genótipo VV se associou a diminuição da expressão de *Col3a1* ($P<0,001$), enquanto KO de *Lgals3* não afetou significativamente a expressão desse gene [0,54 UA (0,19-0,84) em VV; 1,22 UA (0,60-1,47) em WT1; 0,23 UA (0,17-0,45) em VVG-; e 1,08 UA (0,92-1,63) em WT1G-; Figura 11A]. Por outro lado, o genótipo VV não impactou significativamente a expressão de *Colla1*, mas KO de *Lgals3* se associou a redução de sua expressão [$P<0,001$; 0,64 UA (0,44-1,77) em VV; 1,02 UA (0,61-1,34) em WT; 0,31 UA (0,20-0,33) em VVG-; e 0,41 UA (0,17-0,64) em WT1G-, Figura 11B]. A expressão de *Tgfb1* seguiu o mesmo padrão, não sendo significativamente influenciada pelo *background* VV, enquanto KO de *Lgals3* determinou redução de sua expressão cardíaca [$P=0,010$; 0,85 UA (0,44-1,38) em VV; 1,06 UA (0,77-1,40) em WT; 0,54 UA (0,46-0,89) em VVG-; e 0,67 UA (0,51-0,80) em WT1G-; Figura 11C]. A expressão dos três genes, *Col3a1*, *Colla1* e *Tgfb1*, no entanto, não foi significativamente alterada em tecido ventricular HT comparado ao de WT2 (Figuras 11D, 11E e 11F).

Figura 11. Avaliação de fibrose cardíaca em camundongos deficientes em *Pkd1*. **A)** Análises dos efeitos do genótipo VV e KO de *Lgals3* sobre a expressão cardíaca de *Col3a1* entre camundongos WT1 (n=13), WT1G- (n=13), VV (n=14) e VVG- (n=13). **B)** Análises dos efeitos do genótipo VV e KO de *Lgals3* sobre a expressão cardíaca de *Colla1* entre animais WT1 (n=12), WT1G- (n=11), VV (n=13) e VVG- (n=8). **C)** Análises dos efeitos do genótipo VV e KO de *Lgals3* sobre a expressão cardíaca de *Tgfb1* entre camundongos WT1 (n=13), WT1G- (n=12), VV (n=14) e VVG- (n=13). **D)** Análise comparativa da expressão cardíaca de *Col3a1* entre animais WT2 (n=16) e HT (n=13). **E)** Análise comparativa da expressão de *Colla1* entre camundongos WT2 (n=13) e HT (n=10). **F)** Análise comparativa da expressão de *Tgfb1* entre animais WT2 (n=16) e HT (n=12). Os dados não paramétricos são apresentados como mediana e intervalo interquartil e foram analisados para fator único com o teste U de Mann-Whitney e, para fatores múltiplos, usando transformação de ranque alinhado seguida por análise de variância de duas vias. As comparações múltiplas foram corrigidas pelo método de Benjamini-Hochberg.

DISCUSSÃO

A compreensão dos mecanismos básicos envolvidos na cardiomiopatia associada à DRPAD aumentou significativamente nos últimos oito anos. Várias lacunas que impedem a ligação entre diferentes descobertas e conceitos, contudo, permanecem não resolvidas. Observações de que camundongos homozigotos para inativação dos alelos *Pkd1* ou *Pkd2* apresentam letalidade embrionária associada a defeitos cardíacos graves encontram-se disponíveis há duas décadas (51, 52). Esses achados orientaram estudos mais recentes que apoiam um papel primário para a deficiência de *PKD1* ou *PKD2* no desenvolvimento da cardiomiopatia associada a esta doença (58, 59), enquanto sugerem que hipertensão crônica leve ao agravamento desse fenótipo (59). Resultados dos últimos anos demonstraram que anormalidades do Ca^{++} citosólico desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da disfunção cardíaca em modelos animais deficientes em *Pkd1* e *Pkd2* (58, 61). Vale destacar que PC1 é necessária para o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca induzida por estímulos de estiramento e baseados em pressão em camundongos, por meio da estabilização do canal de Ca^{++} do tipo L (61). Além desses achados, nosso grupo mostrou que essa disfunção cardíaca se associou a uma taxa de apoptose cardíaca aumentada e fibrose leve em modelos de camundongo com perfis distintos de deficiência de *Pkd1* (59). A supressão da expressão de Gal-3 não apenas resgatou a função sistólica e a deformidade cardíaca nos modelos HT, *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} e VV, como também resgatou o fenótipo de apoptose aos níveis basais nos três modelos avaliados e o fenótipo de fibrose cardíaca em camundongos HT e *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre}. Esses achados apoiam Gal-3 como um contribuinte maior para o desenvolvimento de cardiomiopatia no cenário de deficiência de *Pkd1*, um efeito provavelmente também aplicável à DRPAD humana.

Os mecanismos e a natureza dos efeitos celulares deletérios da Gal-3 em corações deficientes em *Pkd1*, entretanto, permanecem desconhecidos. No presente estudo elucidamos aspectos fundamentais desse processo utilizando camundongos HT e VV, animais com perfis distintos e complementares de deficiência de *Pkd1*. Camundongos HT constituem um modelo animal com fenótipo cardíaco mais brando e sem disfunção renal, enquanto animais VV desenvolvem cardiomiopatia precoce e mais grave, além de se associarem a disfunção renal. O camundongo VV é homozigoto para a variante T3041V em *Pkd1*, a qual impede a clivagem de PC1 no sítio de proteólise de receptor acoplado à proteína G (GPS) (91). A clivagem no sítio GPS dá origem a dois fragmentos que permanecem associados não covalentemente, formando um heterodímero estável que pode se dissociar (106, 107). Esta clivagem é uma modificação pós-traducional extremamente importante, essencial para a biogênese e maturação da PC1 (108). Como consequência, camundongos VV apresentam desenvolvimento renal tardio anormal, cursando com cystogênese intensa no néfron distal que se inicia alguns dias após o nascimento (91).

Uma vez que camundongos HT não desenvolvem insuficiência renal, todos os achados fenotípicos no coração ocorrem primariamente devido à diminuição da atividade funcional de PC1 no órgão. Nos corações VV, por sua vez, as alterações fenotípicas podem ser mediadas pela falta de clivagem de PC1 nas células cardíacas ou ter contribuição da insuficiência renal. Embora essa separação causal não fosse o objetivo deste estudo, mas sim a investigação do fenótipo cardíaco associado à ausência de clivagem de PC1 de caráter germinativo, dados de nosso grupo atualmente sob revisão (109) e relatados anteriormente (59) sugerem que a falta de clivagem de PC1 em cardiomiócitos contribua significativamente, ao menos parcialmente, para a disfunção cardíaca desenvolvida por camundongos VV. Esses dados incluem ausência de hipertrofia, de fibrose, de supra-ativação de mTOR e de desenvolvimento de longo prazo, além de anormalidades

metabólicas em cardiomiócitos em P1-P3 - uma idade ainda não associada a disfunção renal, e do efeito de resgate da função cardíaca determinado por KO de *Lgals3*, seguindo a mesma resposta observada em camundongos HT e *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre}.

Gal-3 é uma proteína pleiotrópica, membro da família das lectinas de ligação a carboidrato (66). É expressa em diferentes células e tecidos, regulando vias de transdução de sinais envolvidas em crescimento, apoptose, adesão, migração e invasão celular, resposta imune, endocitose e angiogênese (86, 103). Sua localização pode variar significativamente de acordo com o tipo de célula, microambiente e estímulos, podendo ser encontrada extracelularmente, no citoplasma ou no núcleo. Efeitos deletérios de Gal-3 são relatados em várias doenças. De fato, seus níveis circulantes têm sido associados a insuficiência cardíaca, doença renal crônica incidental, fibrose hepática e fibrose pulmonar idiopática (110-113). Embora Balbo e cols tenham demonstrado efeito deletério de Gal-3 em corações VV e HT, os perfis de expressão de *Lgals3* e Gal-3 em tais corações e nas diferentes células cardíacas permaneceram indefinidos. Nossos dados mostraram que a expressão de *Lgals3* e Gal-3 estão aumentadas em tecido ventricular VV e HT. Esses achados revelam que deficiência de *Pkd1* determina aumento da expressão cardíaca de Gal-3 nos níveis gênico e proteico, sugerindo que o efeito deletério da deficiência de *Pkd1* no coração envolva de dois fatores: um efeito danoso de Gal-3 em corações deficientes em *Pkd1* e aumento dos níveis desta proteína no coração.

Uma vez caracterizada a dependência da intensidade de expressão de Gal-3 em relação ao estado de deficiência de *Pkd1*, procuramos determinar este efeito quantitativamente em nível celular. Análises de IH revelaram uma maior densidade de células com expressão de Gal-3 em corações VV e HT. Interessantemente, esse aumento foi mais expressivo em camundongos VV que HT, sugerindo que um maior grau de deficiência em *Pkd1*

provavelmente leve um maior número de células cardíacas a expressarem Gal-3. Não se pode descartar, contudo, que diferentes densidades de células Gal-3+ estejam associadas ao tipo de disfuncionalidade de PC1. Independentemente do mecanismo subjacente, esses achados sugerem que o número de células que expressam Gal-3 possa contribuir para o efeito prejudicial dessa proteína sobre corações de camundongos deficientes em *Pkd1*.

Estudos anteriores não definiram quais células cardíacas expressam Gal-3 em animais deficientes em *Pkd1*. Visto que KO de *Lgals3* resgatou a função cardíaca em camundongos deficientes em *Pkd1*, cardiomiócitos se tornaram bons candidatos a expressarem significativamente Gal-3 em tais modelos animais. Cardiomiócitos em cultura expressam Gal-3, expressão que é aumentada por estiramento mecânico (114). Em cardiomiócitos ventriculares de camundongo normal, entretanto, expressão de Gal-3 não foi observada, enquanto em condições de doença tais células expressam essa proteína (96). Nossas análises de CF trouxeram informações adicionais para esse cenário, identificando células ventriculares com dupla marcação para Troponina I e Gal-3 em corações WT, VV e HT. Cardiomiócitos ventriculares normais, portanto, podem expressar Gal-3, embora em número muito reduzido. Vale notar que corações VV e HT exibiram uma fração maior de cardiomiócitos com expressão de Gal-3 que WTs, e que um número maior de tais células foi identificado em corações VV que em HT. Esses dados sugerem que um declínio mais intenso da atividade de *Pkd1* - ou padrões específicos de deficiência gênica - levem a uma fração maior de cardiomiócitos que expressem Gal-3. Embora dados anteriores tenham sugerido que Gal-3 expressa em cardiomiócitos possa se associar a remodelamento adverso e disfunção em miocárdio submetido a sobrecarga de pressão, KO para Gal-3 não afetou disfunção sistólica e diastólica (96). Além disso, deve-se destacar que apenas uma fração muito limitada de cardiomiócitos expressou Gal-3 nos três perfis genéticos. A detecção de um sinal extremamente fraco para Gal-3 em *western blots* realizados para cardiomiócitos

VV, HT and WT mostrou-se consistente com esse achado. Uma vez que a função sistólica é essencialmente determinada pela função contrátil dos cardiomiócitos, esses dados apoiam que o efeito deletério de Gal-3 nos corações de camundongos deficientes em *Pkd1* não resulta, pelo menos em um nível significativo, de um efeito intracelular de Gal-3 em cardiomiócitos.

Os resultados até então obtidos nos levaram a analisar outras células como fontes potenciais da Gal-3 envolvida na ação deletéria considerada. Gal-3 é altamente expressa e secretada por macrófagos ativados, processos intensificados em alguns distúrbios cardíacos (96). Nesse contexto, analisamos o ambiente macrofágico cardíaco e sua relação com a expressão de Gal-3 em nossos modelos animais. Análises de IH revelaram densidade muito baixa e não aumentada de macrófagos M2 CD206+ em tecido ventricular VV. Esse achado está de acordo com um estudo anterior que relatou, em miocárdio de ventrículo esquerdo de camundongo, que Gal-3 foi detectada em um número escasso de células intersticiais com características morfológicas de macrófago (96). A expressão do gene *Cd206* mostrou-se consistente com os resultados de IH e não se mostrou aumentada em tecido ventricular HT. Uma maior expressão de *Ym1* e uma menor expressão de *Fizz1*, entretanto, foram detectadas em corações VV, enquanto não foram observadas alterações em tecido ventricular HT. Esses resultados sugerem que corações VV possam apresentar subpopulações alteradas de macrófagos M2, um padrão não observado em HTs. A avaliação por IH revelou uma densidade maior mas também muito baixa de macrófagos M1 iNOS+ em tecido ventricular VV. A expressão do gene *Nos2*, entretanto, não se mostrou aumentada em corações VV ou HT.

Nossos estudos de CF revelaram frações aumentadas de macrófagos M1 com expressão de Gal-3 em tecido ventricular VV e HT, achados não observados para macrófagos M2. Essa

observação foi surpreendente, uma vez que macrófagos pró-inflamatórios geralmente não expressam Gal-3 significativamente, com exceção de quando se encontram em ambiente aterosclerótico (100), e macrófagos alternativamente ativados se associam ao fenótipo renal de camundongos deficientes em *Pkd1* (115, 116). Marcação positiva para Gal-3 em células M1, portanto, pode refletir proteína endocitada, uma vez que esse processo pode ocorrer seguindo-se à ativação de macrófagos M1 (117) e poderia estar ligeiramente aumentado em corações VV e HT ou, talvez, refletir Gal-3 produzida pela própria célula M1. Interessantemente, o aumento da fração de células M1 com expressão de Gal-3 foi mais elevado em corações VV que HT, sugerindo que o nível de funcionalidade de PC1 provavelmente influencie a captação de Gal-3 ou a transcrição de *Lgals3* por essas células cardíacas. Uma vez que os macrófagos que secretam Gal-3 são geralmente M2 (104, 118), a fração não aumentada de células CD206+ com expressão de Gal-3 e a população muito baixa de macrófagos ativados em corações VV e HT não apoiam que essas células sejam uma fonte fundamental de Gal-3 no contexto de deficiência de *Pkd1* ou que se constituam no principal determinante do efeito mediado por Gal-3 em tais corações.

Fibroblastos cardíacos também expressam Gal-3 em modelos animais de doença cardíaca (96). De fato, fibroblastos são células capazes de expressar *Lgals3* e Gal-3 em níveis apreciáveis (96, 119). Nesse cenário, essas células se tornaram nossas próximas candidatas a explicar o efeito prejudicial mediado por Gal-3 sobre corações de camundongos deficientes em *Pkd1*. Nossos dados não mostraram aumento da densidade de fibroblastos em tecido ventricular de camundongos VV e as avaliações de expressão gênica sugerem resultados similares em animais VV e HT. Análises de *western blot*, por sua vez, mostraram sinal muito forte para Gal-3 em fibroblastos cardíacos isolados de camundongos deficientes em *Pkd1* e selvagens, apoiando fortemente estas células como a principal fonte de Gal-3 no coração.

Vale notar que as análises de CF revelaram frações aumentadas de fibroblastos com expressão de Gal-3 em corações VV e HT. Estudos anteriores mostraram que fibroblastos em cultura podem secretar Gal-3 (119), ao passo que a capacidade de tais células secretarem Gal-3 *in vivo* ainda não foi completamente determinada. Se este processo ocorrer *in vivo* no coração, Gal-3 poderia ser liberada no miocárdio por meio de um efeito parácrino no cenário de deficiência de *Pkd1*, afetando a função dos cardiomiócitos. A constatação de que o sinal de Gal-3 é predominantemente citoplasmático nos fibroblastos cardíacos de nossos animais favorece este modelo mecanístico. Outro mecanismo que requeriria a expressão de Gal-3 em fibroblastos, mas não sua secreção por essas células, também deve ser considerado como possibilidade para o efeito mediado pela Gal-3 em corações VV e HT. De acordo com este modelo, a expressão de Gal-3 ou outros estímulos ativaria os fibroblastos, o que faria com que tais células afetassem a atividade funcional dos cardiomiócitos. De fato, fibroblastos ativados podem afetar a eletrofisiologia de cardiomiócitos (120) e exercer efeitos negativos sobre outras células (121). Nossos resultados apoiam, portanto, que cenários diferentes de deficiência de *Pkd1* aumentam a fração de fibroblastos cardíacos que expressam Gal-3 e que o efeito deletério cardíaco mediado por Gal-3 e associado à deficiência de *Pkd1* pode ser dirigido primariamente por fibroblastos que expressam Gal-3, por meio de um mecanismo que pode ou não requerer secreção dessa proteína.

Uma vez esclarecido o padrão de expressão de Gal-3 nos corações de animais deficientes em *Pkd1*, passamos a analisar seus efeitos sobre fenótipos potencialmente associados à disfunção cardíaca. O primeiro passo foi definir se o aumento de apoptose cardíaca relatada por Balbo e cols (59) incluía uma taxa mais elevada em cardiomiócitos. Essa era uma questão central, uma vez que um resultado positivo apoiaria o modelo proposto de que o aumento da apoptose de cardiomiócitos contribui para a disfunção cardíaca no cenário de diminuição da

atividade do PC1. O aumento da fração de cardiomiócitos positivos para Caspase-3 clivada em camundongos VV confirmou essa hipótese. Além disso, KO de *Lgals3* resgatou a taxa apoptótica de cardiomiócitos VV para níveis basais, indicando que esse efeito deletério é mediado por Gal-3. Essa descoberta indica que a supressão da clivagem de PC1 induz apoptose mediada por Gal-3 em cardiomiócitos jovens. Em corações HT, no entanto, não pudemos mostrar aumento significativo de apoptose em cardiomiócitos. Visto que Balbo e cols mostraram aumento da taxa apoptótica cardíaca em camundongos HT adultos (59), é possível que o aumento na taxa apoptótica dos cardiomiócitos leve mais tempo para ocorrer neste modelo deficiente em *Pkd1* com um fenótipo mais brando. Nesta altura, portanto, não podemos excluir que o aumento de apoptose em cardiomiócitos desempenhe um papel relevante na disfunção cardíaca de camundongos HT. Uma análise futura da taxa de apoptose em cardiomiócitos deve ser realizada em corações adultos HT para resolver este ponto conceitual.

Gal-3 extracelular é capaz de induzir apoptose de linfócitos T por meio de ligação a glicanos na superfície celular (122), um efeito também observado em outros tipos de células (123). Gal-3 intracelular, por outro lado, inibe apoptose em linfócitos T e outras células (122, 124). O aumento de apoptose observado em cardiomiócitos de camundongos VV dá suporte à hipótese de que Gal-3 secretada por fibroblastos exerce o efeito deletério cardíaco, uma vez que Gal-3 extracelular secretada por fibroblastos poderia reproduzir seu efeito pró-apoptótico sobre cardiomiócitos VV. Além disso, o efeito anti-apoptótico de Gal-3 intracelular sugere que Gal-3 expressa em cardiomiócitos não aumente a apoptose em cardiomiócitos VV. Uma vez que em certas circunstâncias fibroblastos podem induzir apoptose em outras células (121), é também possível que o aumento de apoptose em

cardiomiócitos VV possa ocorrer devido a um efeito de fibroblastos Gal-3⁺ independente de Gal-3 secretada.

Apoptose aumentada também foi observada em fibroblastos cardíacos VV, porém o efeito de resgate fenotípico por KO de *Lgals3* não foi significativo. Essa observação sugere que a maior taxa apoptótica de fibroblastos VV não seja dependente de Gal-3 de forma significativa, mas sim da diminuição da atividade funcional de PC1. Por outro lado, a taxa de apoptose não se elevou em fibroblastos cardíacos HT, sugerindo que o aumento de apoptose nessas células também possa levar mais tempo para se desenvolver nestes camundongos. Estudo adicional conduzido em tecido cardíaco adulto HT é também necessário para investigar esta possibilidade.

Na inflamação aguda, Gal-3 participa da quimioatração de monócitos, adesão e ativação de neutrófilos, fagocitose, produção de IL-2 e geração de superóxido (82, 125), enquanto na inflamação crônica Gal-3 modula negativamente a ativação de células T, reduz a produção de IL-5 e favorece a polarização de macrófagos M2 (126). Além disso, em situações de doença fibroblastos ativados produzem citocinas, fatores de crescimento e proteases no tecido inflamado (127). Merece destaque, ainda, o fato da inflamação se constituir em um componente chave do fenótipo renal na DRPAD (128). Com base nessas considerações, avaliamos o potencial estado inflamatório em corações VV e HT. Nossos achados revelaram expressão aumentada de *Il6*, *Il1b* e *Il4r* em tecido ventricular VV, mas KO de *Lgals3* não resgatou tais expressões aos níveis basais. Embora o aumento na expressão de *Il6* e *Il1b* tenha sido mostrado anteriormente por nosso grupo em corações VV (109), nossos dados atuais expandiram o espectro inflamatório nesse genótipo e revelaram que a supressão da expressão de Gal-3 não o alterou. A expressão anormal de Gal-3, portanto, parece não contribuir de maneira central ao desenvolvimento de inflamação em corações VV, sugerindo

que outras vias deflagradas pela supressão da clivagem de PC1 sejam responsáveis por esse fenótipo. A expressão desses genes, entretanto, não se mostrou aumentada em tecido ventricular HT. Dado seu fenótipo mais brando, é provável que a inflamação cardíaca requeira mais tempo para se desenvolver em camundongos HT. Análises futuras de parâmetros de inflamação deverão ser realizadas em tecido cardíaco adulto de animais HT para esclarecer esta questão.

Níveis elevados de Gal-3 associam-se a insuficiência cardíaca ou sugerem o desenvolvimento de um processo inflamatório e fibrótico (72, 98, 129-131), enquanto fibroblastos residentes ativados constituem a principal fonte de fibrose cardíaca (132). Gal-3, por sua vez, é capaz de estimular a proliferação de fibroblastos e pode atuar como um cofator de TGF- β no processo de diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos ativados (84, 111). É importante destacar que fibrose é um determinante central da progressão da doença renal na DRPAD (105). Esse cenário nos levou a avaliar marcadores de fibrose em corações VV e HT. A expressão cardíaca de *Colla1* e *Tgf- β* , no entanto, não se alterou significativamente em camundongos VV mas, interessante, KO de *Lgals3* reduziu sua expressão. A ausência de fibrose cardíaca significativa em camundongos VV confirmou os dados anteriores de Balbo e cols (59). No entanto, a observação de marcadores inflamatórios aumentados em corações VV, associada à diminuição na expressão de *Colla1* e *Tgfb* promovida por *Lgals3* KO, sugere que animais VV poderiam desenvolver fibrose cardíaca se tivessem uma sobrevida significativamente maior. Surpreendentemente, a expressão cardíaca de *Col3a1* mostrou-se diminuída em camundongos VV, um achado para o qual ainda não temos uma explicação razoável. Os três genes não tiveram sua expressão significativamente afetada em tecido ventricular HT. Uma vez que Balbo e cols relataram fibrose aumentada, porém leve, em corações adultos HT (59), é provável que a fibrose

cardíaca requeira um período de tempo mais longo para se desenvolver neste camundongo. Estudos futuros de avaliação de fibrose em tecido cardíaco adulto serão necessários para esclarecer este tópico.

Neste estudo mostramos expressão aumentada de Gal-3 e uma maior densidade de células com expressão de Gal-3 nos corações de dois modelos de camundongo com perfis diferentes de deficiência de *Pkd1*, já em uma idade bastante precoce. Nossos dados também revelaram que cardiomiócitos ventriculares normais podem expressar Gal-3 e que condições distintas de deficiência de *Pkd1* aumentam este perfil de expressão. Interessantemente, nossos achados mostraram que fibroblastos constituem a principal fonte cardíaca de Gal-3 e sugerem que estas células, não macrófagos, possam afetar a função de cardiomiócitos e contribuir para a disfunção cardíaca no contexto de função reduzida de PC1. Nossos resultados também revelaram que Gal-3 induz apoptose em cardiomiócitos incapazes de clivar PC1. Este estudo elucidou aspectos fundamentais do mecanismo envolvido nos efeitos deletérios de Gal-3 sobre o coração de camundongos deficientes em *Pkd1*, um mecanismo provavelmente também relevante na DRPAD humana.

CONCLUSÕES

Camundongos VV e HT apresentam aumento da expressão cardíaca de *Lgals3* e Gal-3, sugerindo que o efeito deletério da deficiência de *Pkd1* no coração envolva de um efeito negativo de Gal-3 e aumento dos níveis cardíacos dessa proteína.

Corações de camundongos VV e HT apresentam um número maior de células com expressão de Gal-3, sugerindo que o maior número de células com esse perfil de expressão possa contribuir para o efeito deletério de Gal-3 sobre corações de camundongos deficientes em *Pkd1*.

Cardiomiócitos ventriculares normais de camundongo podem expressar Gal-3, embora em fração muito limitada.

Camundongos VV e HT apresentam uma maior fração de cardiomiócitos ventriculares com expressão de Gal-3. O contingente muito limitado dessas células, porém, sugere que o efeito deletério dessa proteína sobre os corações de camundongos deficientes em *Pkd1* não resulte, ao menos em nível significativo, de um efeito intracelular de Gal-3 em cardiomiócitos.

A fração de cardiomiócitos com expressão de Gal-3 é maior em camundongos VV que HT, sugerindo que o perfil quantitativo ou qualitativo do comprometimento da atividade de *Pkd1* afete o número de cardiomiócitos que expressam essa proteína.

Macrófagos não são a principal fonte de Gal-3 nos corações de camundongos deficientes em *Pkd1*.

A fração não aumentada de macrófagos M2 CD206+ com expressão de Gal-3 e a população muito baixa de macrófagos ativados em corações VV e HT sugerem que essas células não sejam o determinante principal do efeito mediado por Gal-3 em tais corações.

Fibroblastos são a principal fonte de Gal-3 em corações de camundongos com deficiência em *Pkd1*.

Camundongos VV e HT apresentam frações aumentadas de fibroblastos cardíacos com expressão de Gal-3.

Nossos achados sugerem que o efeito deletério cardíaco mediado por Gal-3 sobre animais deficientes em *Pkd1* possa ser determinado primariamente por fibroblastos que expressam essa proteína, por meio de um mecanismo que pode ou não requerer secreção da mesma.

Gal-3 induz apoptose de cardiomiócitos em camundongos VV.

Camundongos VV apresentam taxa apoptótica aumentada de fibroblastos.

Camundongos VV apresentam inflamação cardíaca.

Camundongos deficientes em *Pkd1* não desenvolvem fibrose cardíaca até P15-P25.

ANEXOS

Pkd1 deficiency increases galectin-3 cardiac expression and lack of polycystin-1 cleavage leads to galectin-3-dependent apoptosis of cardiomyocytes

Journal:	Journal of the American Society of Nephrology
Manuscript ID:	JASN-2021-07-0901
Manuscript Type:	Original Article - Basic Research
Date Submitted by the Author:	07-Jul-2021
Complete List of Authors:	Freitas, Jessica; University of São Paulo School of Medicine, Department of Medicine, Divisions of Nephrology and Molecular Medicine Murata, Gilson; University of São Paulo School of Medicine, Department of Medicine, Divisions of Nephrology and Molecular Medicine Amaral, Andressa; University of São Paulo School of Medicine, Department of Medicine, Divisions of Nephrology and Molecular Medicine Neto, Amaro; University of São Paulo School of Medicine, Department of Medicine, Division of Emergency Medicine Pinto, Vivian; University of São Paulo School of Medicine, Department of Medicine, Divisions of Nephrology and Molecular Medicine Ornellas, Felipe; University of São Paulo School of Medicine, Department of Medicine, Divisions of Nephrology and Molecular Medicine Watanabe, Elieser; University of São Paulo School of Medicine, Department of Medicine, Divisions of Nephrology and Molecular Medicine Onuchic, Luiz; University of São Paulo School of Medicine, Department of Medicine, Divisions of Nephrology and Molecular Medicine
Keywords:	Pkd1 deficiency, Polycystin-1 cleavage, Heart dysfunction, Galectin-3, Cardiac fibroblast, Cardiomyocyte apoptosis

SCHOLARONE™
Manuscripts

***Pkd1* deficiency increases galectin-3 cardiac expression and lack of polycystin-1 cleavage leads to galectin-3-dependent apoptosis of cardiomyocytes**

Jéssica A. Freitas¹, Gilson M. Murata¹, Andressa G. Amaral¹, Amaro N. D. Neto², Vívian C. D. Pinto¹, Felipe M. Ornellas¹, Elieser H. Watanabe¹ and Luiz F. Onuchic^{1*}

¹Divisions of Nephrology and Molecular Medicine and ²Division of Emergency Medicine, Department of Medicine, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil.

***Correspondence should be addressed to:**

Luiz F. Onuchic, MD, PhD

Divisions of Nephrology and Molecular Medicine

University of São Paulo School of Medicine

Avenida Dr. Arnaldo, 455 - Sala 4304, São Paulo, SP, 01246-903, Brazil

Telephone number: +55 11 30618399

Email: lonuchic@usp.br

Key words: *Pkd1* deficiency, Polycystin-1 cleavage, Heart dysfunction, Galectin-3, Cardiac fibroblast, Cardiomyocyte apoptosis

SIGNIFICANCE STATEMENT

Cardiovascular events constitute the main cause of death in ADPKD. Recent studies support a primary role for decreased polycystin-1 or polycystin-2 function in the development of ADPKD cardiomyopathy, while galectin-3 knockout prevented heart dysfunction in *Pkd1*-deficient mice. This study revealed increased galectin-3 cardiac expression in two *Pkd1*-deficient mouse models. It also showed that cardiomyocytes can express galectin-3 and that *Pkd1* deficiency enhances this expression. Our findings identified fibroblasts as the main myocardial source of galectin-3 and suggest that they affect the function of cardiomyocytes in the setting of decreased polycystin-1 function. Galectin-3 was also shown to induce apoptosis in cardiomyocytes lacking polycystin-1 cleavage. This study elucidated fundamental aspects of heart dysfunction associated with *Pkd1* deficiency and likely with human ADPKD.

ABSTRACT

Cardiac manifestations of ADPKD include increased left ventricular mass and idiopathic dilated cardiomyopathy. Studies with *Pkd1*- and *Pkd2*-deficient animal models support a primary role for decreased polycystin-1 or polycystin-2 function in the development of cardiomyopathy. Intracellular calcium abnormalities, and possibly apoptosis, have been shown to contribute to this process, while galectin-3 knockout rescued the phenotype in *Pkd1*-deficient mice. Herein, we investigated this mechanism using 15-25-day-old non-cystic *Pkd1*^{+/-} and severely cystic mice lacking polycystin-1 cleavage (*Pkd1*^{V/V}). Galectin-3 expression was increased in *Pkd1*^{V/V} and *Pkd1*^{+/-} hearts compared to *Pkd1*^{+/+} controls. Densities of galectin-3-expressing cells were also higher in ventricular myocardia of both *Pkd1*-deficient models. Flow cytometry analyses showed galectin-3 expression in few wild-type cardiomyocytes and that the fraction of these cells that express galectin-3 is higher in *Pkd1*^{V/V} and *Pkd1*^{+/-} mice. Fibroblasts, not macrophages, constituted the main source of galectin-3 and the fraction of such cells that express galectin-3 was also increased in *Pkd1*^{V/V} and *Pkd1*^{+/-} hearts. *Pkd1*^{V/V} animals displayed increased apoptosis in cardiomyocytes, a phenotype that was rescued by galectin-3 knockout. *Pkd1*^{V/V} hearts also exhibited increased expression of inflammatory markers. Our findings revealed, therefore, increased cardiac galectin-3 expression in different settings of *Pkd1* deficiency and suggest that fibroblasts may be the main cell mediator of the deleterious effect of galectin-3 on such hearts. Our data also unveiled that lack of polycystin-1 cleavage leads to increased cardiomyocyte apoptosis, an effect that is blocked by suppressing galectin-3 expression. These findings significantly expand the heart phenotype scenario in ADPKD, opening new perspectives of investigation.

INTRODUCTION

According to recent epidemiologic analyses, autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) presents a point prevalence of 3-5:10,000 in the general population¹. Mutations in the *PKD1* (*Polycystic Kidney Disease 1*) or *PKD2* (*Polycystic Kidney Disease 2*) genes are responsible for approximately 78% and 15% of the affected families, respectively². While renal manifestations account for most of the ADPKD clinical impact, cardiovascular events currently represent its main cause of death³.

Hypertension in ADPKD has been associated with higher left ventricular mass index than essential hypertension in men for over two decades⁴, whereas biventricular diastolic dysfunction was linked to this disease in 2005⁵. The mechanisms involved in the cardiac manifestations of ADPKD, however, have been just recently studied in detail, being still largely unclear. The recognition of idiopathic dilated cardiomyopathy as an extrarenal manifestation of ADPKD dates from 2013⁶. Recent studies supported a primary role for defective function of polycystin-1 (PC1, the *PKD1* protein product) or polycystin-2 (PC2) in the development of ADPKD cardiomyopathy. Balbo et al. showed reduced left ventricular ejection fraction in three different *Pkd1*-deficient mouse models: non-cystic and normotensive *Pkd1*^{+/-} animals (HT), cystic and hypertensive *Pkd1*^{flox/flox};*Nestin*^{cre} mice, and severely cystic animals unable to cleave PC1 *Pkd1*^{V/V} (VV)⁷. Additional studies revealed that mice with selective *Pkd1* knockout (KO) in cardiomyocytes also developed systolic dysfunction⁸ and that cardiomyocyte electrical activity, Ca⁺⁺ handling and contractile function can be modulated by PC1⁹. Similarly, with aging *Pkd2*-haploinsufficient mice also develop cardiac dysfunction not related to renal failure¹⁰.

It is currently thought that a lack of appropriate balance between proliferation and apoptosis constitutes a major driver of ADPKD renal disease progression¹¹. Interestingly, all three *Pkd1*-deficient models previously mentioned displayed increased cardiac apoptosis⁷. This study, however, could not specify the apoptotic cells, hindering the analysis of its potential role in this cardiac dysfunction. In addition, patients with this illness present more active pro-inflammatory and less active anti-inflammatory systems¹², while cyst-derived chemokines, cytokines and growth factors result in progression to renal fibrosis¹³. Notably, HT and *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} mice presented increased cardiac fibrosis at adult ages, a finding not observed in 18-day-old VV animals⁷. Inflammation, however, was not analyzed in such hearts.

A central finding by Balbo et al. was that KO of *Lgals3*, the gene that encodes galectin-3 (Gal-3), rescued the systolic function in the three models. Gal-3 is a β -galactoside-binding lectin that regulates inflammation, tissue repair, fibrogenesis and ventricular remodeling^{14,15}. These roles are mediated by modulating gene expression, cell cycle, apoptosis, organogenesis, and cell-cell and cell-matrix interactions^{16,17}. Suppression of Gal-3 expression also rescued cardiac apoptosis to baseline in the three *Pkd1*-deficient animals, and fibrosis in the two adult models. It remains unknown, however, which cardiac cells express Gal-3 in the *Pkd1*-deficient settings, which cell properties and responses are affected by Gal-3 in this scenario, which cells are the main source of Gal-3 in this context, and whether the deleterious effects on *Pkd1*-deficient hearts are driven by extracellular or intracellular Gal-3.

Our current study addressed these fundamental questions, including the characterization of the apoptotic and inflammatory profiles, in HT and VV mice. Our findings revealed increased Gal-3 cardiac expression in both models, established fibroblasts as the major

source of cardiac Gal-3 in such animals, and showed that VV mice present increased apoptosis of cardiomyocytes, an effect that requires Gal-3.

METHODS

Ethical approval

This project was approved by the Research Ethics Committee of the University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil, under the approval number 090/2017. This study followed the national and international standards for animal care and experimentation.

Mouse models

Three genetically-modified mouse models were used in this study, all generated on the C57BL/6J genetic background. All experiments were performed at the ages of 15 and/or 25 days. The first model consisted in the VV (*Pkd1*^{V/V}) mouse, which lacks PC1 cleavage at the G-protein-coupled receptor proteolysis site (GPS)¹⁸. *Pkd1*^{+/+} animals were employed as their controls (WT1). VV and WT1 animals were obtained from the mating of heterozygous mice (*Pkd1*^{V/+}), since these animals are fertile and have no kidney cystic phenotype. In addition to massive early cystic disease and systolic dysfunction detected on P18⁷, VV mice displayed lower body weight. This phenotype results in short survival, with a median of 21 days of life. Genotyping was performed by PCR using the primers 5'-CCAAACAACCTCAGACCAGG-3' (forward) and 5'-ACCAGGACAGCAAGAAAAC-3' (reverse). The second model was represented by a double-mutant mouse, homozygous for the *Pkd1*^V allele and for a *Lgals3* KO allele (*Lgals*⁻). This null allele was generated by the insertion of a DNA fragment coupled to the neomycin resistance gene (*neor*) between *Lgals3* intron 4 and exon 5¹⁹. *Lgals3*^{-/-} are healthy and fertile and present no obvious phenotypic

alterations. Double mutant animals were generated as described by Balbo et al.⁷ through the crossing of *Pkd1*^{V/+}:*Lgals3*^{-/-} parents, spawning *Pkd1*^{V/V}:*Lgals3*^{-/-} (VVG-) and respective *Pkd1*^{+/+}:*Lgals3*^{-/-} (WT1G-) control mice. VVG- animals exhibited not only rescued systolic function compared to VVs but also increased survival, which reached 30 days⁷. The third model includes pure haploinsufficiency, characterized by a null mutation in only one of the *Pkd1* alleles. This *Pkd1*^{+/-} (HT) mouse functionally resembles the cellular genetic background of human ADPKD. The *Pkd1*⁻ allele had part of exon 2 and the entire exon 3 replaced with a reporter gene (*lacZ*) cloned in frame to the remainder of exon 2 and followed by the neomycin resistance gene (*neor*). The fragment *LacZ-neor* includes transcription termination sequences, leading to *Pkd1* inactivation^{20,21}. HT mice display heart dysfunction but do not develop kidney cysts or arterial hypertension by 15 weeks of age⁷. Immunohistochemistry (IHC) studies were performed with male mice while all other experimental groups included male and female animals in balanced proportions. All heart samples were obtained from ventricular tissue.

Immunohistochemistry

Tissues of 15-day-old mice were fixed in 4% buffered formalin and included in paraffin. Sections of 3-4 μ m were prepared for IHC analyses. Primary antibodies anti-Gal-3 (M3/38-hybridoma, kindly provided by Roger Chammas), anti-Troponin I (Abcam, Cambridge, MA, Cat# AB47003), anti-Vimentin (Abcam, Cambridge, MA, Cat# AB92547), anti-iNOS (Abcam, Cambridge, MA, Cat# AB15323) and anti-CD206 (Abcam, Cambridge, MA, Cat# AB64693) were used in overnight incubations at 4°C. Anti-Gal-3 antibody was simultaneously incubated with anti-Vimentin, anti-Troponin I, anti-CD206 or anti-iNOS, to obtain double staining between these markers. The slides were incubated with their

respective secondary antibodies conjugated to HRP. Anti-Gal-3 was revealed with the chromogenic substrate diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) while anti-Vimentin, anti-Troponin I, anti-CD206 and anti-iNOS were incubated with PolyDetector HRP Green Kit (Bio SB, Santa Barbara, CA). Twenty images were acquired under the microscope Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc., Tallahassee, FL) at x400 magnification. The scale bar represents 50 μm . Results are expressed as positive cells per mm^2 .

Western blot

Cardiac tissue samples were collected from 15-day-old mice from the same portion of the heart - the ventricle tip - and homogenized in radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) containing protease and phosphatase inhibitors (Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail - Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Protein concentration was determined with a BCA protein assay kit (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Thirty μg of proteins/lane were electrophoresed in 15% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were incubated with anti-Gal-3 (M3/38-hybridoma) primary antibody overnight at 4°C, followed by incubation with the corresponding secondary antibody conjugated to HRP. Detection was performed using ECL substrate. The chemiluminescent signal was detected using the digital system of image acquisition ALLIANCE 4.7 (UVITEC, Cambridge, England, UK) and quantifications were performed by densitometric analyses with the software IMAGE J (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Protein loads were normalized with the endogenous control GAPDH (R&D Systems, Minneapolis, MN, Cat# MAB5718).

Real-time RT-PCR

Total RNA extraction of cardiac tissue from 15 and 25-day-old mice was performed using the ReliaPrep RNA Miniprep Systems Kit (Promega, Madison, WI) following the manufacturer's recommendations. RNA was quantified in Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). We used 1.0 µg of total RNA extracted from cardiac tissue samples to synthesize cDNA. Reverse transcription was performed using the ImProm-II Reverse Transcription Kit (Promega, Madison, WI). Gene expression was assessed using Sybr Green probe (PowerUp SYBR Green Master Mix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) for *Cd206* (mannose receptor C-type 1), *Colla1* (collagen type I α-1), *Col3a1* (collagen type III α-1), *Fnl* (fibronectin), *Fizz1* (resistin-like molecule α-1), *Fsp1* (fibroblast specific protein-1), *Lgals3* (galectin-3), *Il6* (interleukin-6), *Il1b* (interleukin-1β), *Il4r* (interleukin-4 receptor), *Nos2* (nitric oxide synthase 2), *Tgfb1* (transforming growth factor β-1), *Vim* (Vimentin), and *Ym1* (chitinase 3-like 3). *Actb* (β-actin) was used as an endogenous control of the reactions. The results were obtained by $2^{-\Delta\Delta C_t}$ and expressed in arbitrary units. Primer sequences are listed in Table 1.

Flow cytometry

Fifteen-day-old mice were euthanized by decapitation under anesthesia induced by intraperitoneal administration of thiopental (0.5 mg/g body weight). The heart was collected and placed in ice-cold PBS solution. The ventricular component was sliced into fragments of approximately 1.0 mm³. A ventricular sample was digested thereafter with 450 U/mL of collagenase I, 125 U/mL of collagenase XI, 60 U/mL of DNase I and 60 U/mL of hyaluronidase, diluted in PBS/20 mM HEPES for 1 h at 37°C, under gentle agitation²². The

cells were permeabilized with 0.2% Triton followed by blocking with 2% FBS and 0.5% BSA in PBS. Assays for detection of Gal-3 expression in the different cardiac cell types were performed by concomitant incubation with the primary antibody anti-Troponin I (Abcam, Cambridge, MA, Cat# AB47003), anti-Vimentin (Abcam, Cambridge, MA, Cat# AB92547), anti-iNOS (Abcam, Cambridge, MA, Cat# AB15323) or anti-CD206 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Cat# 53-2061-82) with PE anti-galectin-3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Cat# 12-5301-82). Analyses of the apoptotic rate, in turn, were performed by concomitant incubation with the antibody anti-Troponin I, anti-Vimentin, anti-iNOS or anti-CD206 with PE anti-Cleaved caspase-3 (BD Pharmingen, San Diego, CA, Cat# 51-68655X). In both cases the incubations were carried out for 30 min. After this step, the cells were incubated with a secondary antibody conjugated with Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Cat# R37116) for another 30 min. The cells were then fixed with 2% paraformaldehyde and filtered through a 100- μ m filter. The data were acquired on a BD FACS Canto II cytometer (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) and analyzed using the software FlowJo v10.7 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). We acquired 10.000 events per tube.

Isolation of cardiac fibroblasts and cardiomyocytes

Following euthanasia performed as previously described, the ventricular mass was sliced into fragments of approximately 1.0 mm³. A tissue sample was digested following the protocol described above. Cardiac fibroblasts were separated by selective adhesion for 1 h and maintained in conditioned medium with 20% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin and 1% Glutamine in a humid oven at 37°C, 5% CO₂. The supernatant containing the non-adhering

cells, mostly cardiomyocytes, was centrifuged to obtain the cardiomyocytes used for western blot analysis.

Statistical analyses

The data were classified in parametric or nonparametric based on the histogram analysis and the Shapiro-Wilks test. Parametric data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) and nonparametric data as median and interquartile range. For parametric data, comparisons between two groups were performed using the t-test with or without Welch's correction, depending on the analysis of equality of variances carried out with the Levene test.

Comparisons of nonparametric data including two groups were performed employing the Mann–Whitney test. Comparisons in factors with >2 levels were performed with the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn post-hoc test. Two-factor analyses for nonparametric data, in turn, were carried out using a robust rank-based analysis of variance, known as aligned rank transform. The post-hoc test was performed based on the marginal means distribution for factors with 3 levels or more. When interaction between factors was detected, analysis of their interaction was interpreted based on the medians and the dot plots. In tests involving multiple comparisons, the significances were corrected with the Benjamini-Hochberg method.

Aiming to improve the power of statistical test and spare the number of experimental animals, when an experiment was performed with WT1 and WT2 animals and these groups presented similar central measures and $P > 0.2$ for statistical differences, we joined all wild-type mice in a single group (WT). We accepted α risk $\leq 5\%$. Statistical programs included

SPSS 25 (IBM, Armonk, NY), GraphPad 8.0 (Prism Software, GraphPad Software, La Jolla, CA) and R 4.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

RESULTS

***Lgals3* and galectin-3 expression are increased in *Pkd1*^{V/V} and *Pkd1*^{+/-} hearts**

Western blot analysis by Balbo et al. revealed increased Gal-3 expression in cardiac tissue of *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} cystic mice⁷. A numerically higher value was also observed in 18-day-old VV mice, however statistically not significant, while increased expression could not be detected in adult HT hearts. In this study we aimed to resolve this issue with strict control of all involved variables. *Lgals3* expression was assessed in samples from the ventricle tips of VV and HT mice. The animals were analyzed at young and similar ages due to the short survival of VV mice⁷, because heart dysfunction had been documented in HT mice already at five weeks of age⁷, and to allow analyses of VV and HT phenotypes at the same stage of life. In this context, we evaluated the animals at the ages of 15 and 25 days. Notably, *Lgals3* expression was found increased in VV and HT cardiac ventricular tissue compared to their respective wild-type controls WT1 and WT2 [2.20 (1.49-3.27) *versus* 1.04 AU (0.71-1.31), $P < 0.001$; and 1.62 ± 0.62 *versus* 1.05 ± 0.33 , $P = 0.005$, respectively] (Figure 1A).

Western blot analyses confirmed these results at the protein level, unveiling higher Gal-3 expression in VV than WT1 [0.67 (0.24-1.27) *versus* 0.26 AU (0.20-0.39), $p = 0.049$] and in HT than WT2 ventricular tissue (0.77 (0.15-1.03) *versus* 0.12 AU (0.10-0.49), $P = 0.031$) (Figure 1B).

A higher number of cells express galectin-3 in the hearts of *Pkd1*-deficient mice

To further characterize the Gal-3 expression pattern, the density of Gal-3-expressing cells was quantified in VV and HT ventricular myocardium. In line with the previous results, IHC

analyses revealed higher densities of such cells in VV than WT1 (84.90 ± 30.57 *versus* 33.07 ± 12.16 cells/mm², $P=0.002$) and in HT than WT2 mice (56.48 ± 8.14 *versus* 29.09 ± 7.51 cells/mm², $P=0.004$) (Figure 1C).

Ventricular cardiomyocytes can express galectin-3, a profile enhanced by *Pkd1* deficiency

Whether normal cardiomyocytes express Gal-3 is still a matter of debate, while its expression by such cells in some cardiac diseases has been well documented^{23,24}. We resolved this point using double-staining for Troponin I and Gal-3 in a flow cytometry (FC) platform. Although in low percentage, double-staining cells were observed in VV, HT and WT ventricular myocardium. Notably, the fraction of cardiomyocytes expressing Gal-3 (Gal-3+Troponin I+ cells/all Troponin I+ cells) was higher in VV and HT ventricles compared to WT controls [5.76% (4.76-6.63) and 2.31% (2.14-3.62) *versus* 1.05% (0.94-1.56), $P<0.001$ and $P=0.002$, respectively] (Figure 2A). IHC experiments confirmed this finding in VV myocardium, revealing an increased density of double-stained cells [16.79 (6.57-25.73) *versus* 3.50 cell/mm² (1.96-4.92), $P=0.023$] (Figure 2B). Interestingly, VV mice, a more severe model, displayed a higher fraction of cardiomyocytes expressing Gal-3 than HT animals [5.76% (4.76-6.63) *versus* 2.31% (2.14-3.62), $P<0.001$] (Figure 2A)].

Complementary western blot analysis with VV, WT1, HT and WT2 cardiomyocytes revealed a very weak signal for all groups, not allowing appropriate quantification (data not shown).

Despite their novelty and meaningfulness, our findings showed that even in the setting of *Pkd1* deficiency only a significant minority of cardiomyocytes express Gal-3, and at very limited amounts.

Macrophages are not the main source of galectin-3 in the hearts of *Pkd1*-deficient mice

Clinical and experimental studies show strong correlation between Gal-3 serum levels and cardiac dysfunction^{25,26}. Moreover, this protein is highly expressed by macrophages^{27,28}. Based on these considerations, we investigated macrophages as a potential cardiac source of Gal-3. Gene expression analyses using three markers for M2 (anti-inflammatory) macrophages - *Cd206*, *Ym1* and *Fizz1* - led to heterogeneous results. *Cd206* expression did not significantly differ between VV and WT and between HT and WT hearts (Figure 3A). IHC analysis showed very low densities of CD206+ cells in ventricular myocardium of VV and WT1 mice and, in line with the gene expression data, no difference was detected between the two groups (Figure 3B). *Ym1* expression, in turn, was found increased in VV compared to WT hearts, however no difference was detected between HT and WT mice (Figure 3A). *Fizz1* expression, on the other hand, was lower in VV than WT whereas no difference was observed between HT and WT hearts (Figure 3A). Based on the IHC profile that did not identify CD206+ cells not consistent with macrophages, we used this marker to select M2 macrophages with FC. These experiments did not reveal difference in the fraction of CD206+ cells that express Gal-3 (Gal-3+CD260+ cells/all CD260+ cells) between VV and WT neither between HT and WT ventricles (Figure 3C). Overall, our data suggest that M2 macrophage subpopulations may change in VV but not in HT hearts, while the M2 cell densities remain very low. Moreover, regardless the severity of the phenotype, the fraction

of cardiac CD206+ M2 macrophages that express Gal-3 does not increase in *Pkd1* deficiency.

Expression of *Nos2*, the gene that encodes iNOS - an M1 (pro-inflammatory) macrophage marker, did not differ between VV and WT and between HT and WT hearts (Figure 3D). IHC revealed very low densities of iNOS+ cells in VV and WT1 ventricular myocardium, although higher in VV [0.94 (0.12-3.02) *versus* 0.00 cell/mm² (0.00-0.23), P=0.044; Figure 3E]. These results suggest that VV and HT hearts harbor very small populations of M1 macrophages. The observation of a specific immunohistochemical iNOS profile for macrophages allowed FC analyses using this marker. This assessment revealed increased fractions of Gal-3+iNOS+ cells (Gal-3+iNOS+ cells/all iNOS+ cells) in VV and HT ventricles compared to WT [6.01% (5.67-7.42) and 4.08% (2.68-4.43) *versus* 2.11% (1.88-2.28), P<0.001 and P=0.003; respectively] (Figure 3F). Of note, VV mice presented a higher fraction of cardiac Gal-3+iNOS+ cells than HT [6.01% (5.67-7.42) *versus* 4.08% (2.68-4.43), P=0.002] (Figure 3F). Since M1 macrophages express *Lgals3* only in very specific conditions²⁹, the Gal-3 signal in these cells can be interpreted as endocytosed protein or, possibly, as Gal-3 produced by the cell itself. Macrophages with no staining for CD206 and iNOS were not quantified, since they do not significantly express and secrete Gal-3.

The very low population of activated macrophages and the non-increased fraction of Gal-3+ M2 cells in VV and HT hearts indicate that macrophages are not the major source of Gal-3 in such hearts.

Fibroblasts are the main source of galectin-3 in the hearts of *Pkd1*-deficient mice

Increased levels of Gal-3 and its mRNA have been detected in proliferating fibroblasts^{17,30}. In addition, Gal-3 can be released in the myocardium through a paracrine effect, stimulating the proliferation of myofibroblasts³¹. We therefore investigated the fibroblast scenario and links with Gal-3 expression. Expression analyses of *Fn1*, *Fsp1* and *Vim* did not show significant differences between VV and WT and between HT and WT hearts (Figure 4A). In line with this finding, IHC revealed high but not different densities of Vimentin+ cells between VV and WT1 hearts (585.90 ± 367.10 versus 491.80 ± 346.2 cells/mm²; $P=0.655$; Figure 4B). In spite of Vimentin being the best marker for fibroblasts, it is not completely specific for these cells³². The myocardium cellular profile, however, associated with the IHC assessment that showed that Vimentin+ cells were essentially all fibroblasts, allowed us to use Vimentin as a fibroblast marker for FC. These analyses did not show different ratios of Vimentin+ cells/all cells between VV and WT and between HT and WT hearts. Interestingly, higher fractions of fibroblasts expressing Gal-3 (Gal-3+Vimentin+ cells/all Vimentin+ cells) were found in VV and HT ventricles compared to WT [4.71% (4.02-6.67) and 2.33% (2.15-2.96) versus 1.20% (0.96-1.89), $P<0.001$ and $P=0.032$, respectively] (Figure 4C). In these cells, Gal-3 was predominantly found in cytoplasm (Figure 4D). No significant difference was detected between VV and HT mice.

Western blot analysis with VV, WT1, HT and WT2 fibroblasts yielded very strong signals for all four groups, supporting fibroblasts as the main cardiac source of Gal-3 in *Pkd1*-deficient and wild-type mice (Figure 4E). As expected, Gal-3 expression was increased in VV fibroblasts compared to WT1 (0.75 ± 0.13 versus 0.53 ± 0.08 AU, $P=0.002$), although no difference was detected between HT and WT2 fibroblasts.

Galectin-3 induces apoptosis of cardiomyocytes in VV mice

FC analyses revealed an increased fraction of apoptotic cardiomyocytes (Cleaved caspase-3+Troponin I+ cells/all Troponin I+ cells) ($P=0.014$) in VV ventricles, clarifying a central point of the VV heart phenotype. Remarkably, and in line with the pro-apoptotic effect of extracellular Gal-3, Gal-3 KO rescued the apoptotic rate to baseline in VV cardiomyocytes ($P=0.002$) [9.51% (6.76-13.55) in VV; 3.67% (2.32-4.85) in WT1; 2.84% (1.82-7.41) in VVG- mice; and 2.06% (1.25-3.09) in WT1G- animals; Figure 5A]. Interestingly, we detected interaction between the VV genotype and Gal-3 KO ($P=0.015$). The Gal-3 pro-apoptotic effect, however, could not be detected in HT cardiomyocytes ($P=0.689$, Figure 5B).

The same pro-apoptotic effect was observed in VV fibroblasts ($P<0.001$), with a mild nonsignificant trend of a rescuing effect of Gal-3 KO ($P=0.240$) [3.27% (2.65-6.24) in VV; 1.35% (0.82-1.60) in WT1; 2.47% (2.00-2.80) in VVG-; and 1.52 (1.31-2.46) in WT1G-; Figure 5C]. Interaction between the VV genotype and Gal-3 KO was detected ($P=0.006$). No difference was verified between HT and WT2 fibroblasts (Figure 5D).

VV mice develop cardiac inflammation

Given the role of extracellular Gal-3 in acute and chronic inflammation^{33,34}, we quantified *Il6*, *Il1b* and *Il4r* expression. Notably, VV hearts displayed increased *Il6* expression ($P=0.020$) but Gal-3 KO did not significantly reduce it [1.89 (0.69-2.90) in VV; 0.95 (0.67-1.15) in WT1; 1.69 (1.19-4.37) in VVG-; and 1.46 AU (0.68-1.85) in WT1G-; Figure 6A]. The VV genotype also increased *Il1b* expression ($P=0.024$), with no rescuing effect of Gal-3 KO [1.68 (1.01-2.27) in VV; 1.06 (0.55-1.49) in WT1; 1.55 (1.00-2.95) in VVG-; and 1.03

AU (0.71-1.31) in WT1G-; Figure 6B]. *Il4r* expression was also higher in VV hearts (P=0.008), again not followed by a Gal-3 KO rescuing effect [1.58 (1.12-2.00) in VV; 0.92 (0.68-1.37) in WT1; 1.52 (1.22-2.67) in VVG-; and 1.11 AU (0.83-1.68) in WT1G-; Figure 6C). In contrast, *Il6*, *Il1b* and *Il4r* expression were not significantly increased in HT hearts compared to WT2 (Figures 6D-F).

***Pkd1*-deficient hearts do not develop fibrosis by P15-P25**

We also analyzed cardiac fibrosis, since Gal-3 regulates this process. Unexpectedly, the VV genotype associated with decreased *Col3a1* gene expression (P<0.001) and Gal-3 KO did not affect it [0.54 (0.19-0.84) in VV; 1.22 (0.60-1.47) in WT1; 0.23 (0.17-0.45) in VVG-; and 1.08 AU (0.92-1.63) in WT1G-; Figure 7A]. The VV status did not significantly impact *Colla1* expression, but Gal-3 KO reduced it [P<0.001; 0.64 (0.44-1.77) in VV; 1.02 (0.61-1.34) in WT; 0.31 (0.20-0.33) in VVG-; and 0.41 AU (0.17-0.64) in WT1G-; Figure 7B]. *Tgfb1* expression was not influenced by the VV background either, whereas Gal-3 KO decreased its expression (P=0.010; Figure 7C). Expression of all three genes, however, were not significantly changed in HT hearts (Figures 7D-F).

DISCUSSION

The understanding of basic mechanisms involved in ADPKD-associated cardiomyopathy has significantly increased in the past eight years, however a number of gaps still hinder the linkage of different findings and concepts. Recent studies support a primary role for *PKD1* or *PKD2* deficiency in the development of this phenotype^{6,7}, while suggest that chronic hypertension leads to its aggravation⁷. Cytosolic calcium abnormalities have been shown to play a fundamental role in heart dysfunction in the setting of *Pkd1* and *Pkd2* deficiency^{6,8,9}. Interestingly, PC1 is required for the development of heart hypertrophy induced by stretch and pressure-based stimuli in mice and, apparently, can modulate cardiomyocyte electrical activity and contractile function by physically interacting with Kv channels^{8,9}. In addition to such findings, we have previously shown that heart dysfunction was associated with increased cardiac apoptosis and mild fibrosis in mouse models with distinct *Pkd1*-deficient profiles⁷. Notably, Gal-3 KO rescued systolic function and apoptosis to baseline in all three evaluated models. The mechanism of the detrimental effects of Gal-3 on *Pkd1*-deficient hearts, however, remains unknown. Fundamental aspects of this process were addressed in this study using HT and VV mice, animals with complementary profiles of *Pkd1* deficiency. HT mice reflect a model with a milder heart phenotype and no renal dysfunction (HT) while VV animals develop an early, more severe cardiomyopathy and are associated with kidney dysfunction. The VV mouse is homozygous for the *Pkd1* T3041V variant, which precludes PC1 cleavage at the GPS site¹⁸. Cleavage at GPS gives rise to two fragments that remain non-covalently associated, forming a stable heterodimer that can dissociate^{35,36}. This cleavage is a major post-translational modification, essential for PC1 biogenesis and maturation³⁷. As consequence, VV mice display abnormal late renal development, presenting severe distal nephron cystogenesis starting a few days after birth¹⁸.

Since HT mice do not develop renal insufficiency, all phenotypic findings in the heart occur primarily due to decreased PC1 cardiac activity. In VV hearts, on the other hand, phenotypic alterations could be mediated by the lack of PC1 cleavage in cardiac cells or have the contribution of renal insufficiency. Although this causal separation was not the aim of this study, but instead the investigation of the heart phenotype associated with the germline lack of PC1 cleavage, data from our group currently under review³⁸ and previously reported⁷ suggest that the primary lack of PC1 cleavage in cardiomyocytes significantly contribute, at least partially, to VV heart dysfunction. These data include absence of hypertrophy, fibrosis, mTOR upregulation and long-term development, as well as metabolic abnormalities in VV cardiomyocytes at P1-P3 - an age not yet associated with kidney dysfunction, and the rescuing effect of heart dysfunction by *Lgals3* KO, following the same response observed in HT and *Pkd1*^{flox/flox}:*Nestin*^{cre} mice.

Gal-3 is a member of the carbohydrate-ligand lectin family with pleiotropic effects³⁹. It is expressed in different cells and tissues, regulating signal transduction pathways involved in cell growth, apoptosis, adhesion, migration, invasion, immune function, and endocytosis^{33,40}. Its location may vary according to the cell type, microenvironment and stimuli, being potentially found extracellularly, in the cytoplasm or in the nucleus. Its circulating levels have been associated with heart failure, incidental chronic kidney disease, liver fibrosis and idiopathic pulmonary fibrosis⁴¹⁻⁴⁴. While a deleterious effect of Gal-3 has been documented in VV and HT hearts, the *Lgals3* and Gal-3 expression profiles in such hearts and cardiac cells remain unclear. Our data showed that *Lgals3* and Gal-3 expression are increased in VV and HT ventricular tissue. These findings reveal that *Pkd1* deficiency leads to increased Gal-3 cardiac expression at the gene and protein levels and suggest that the deleterious effect of *Pkd1* deficiency likely involves a detrimental effect of Gal-3 upon *Pkd1*-deficient hearts and increased cardiac levels of this protein.

IHC analyses revealed higher densities of Gal-3-expressing cells in VV and HT hearts. Interestingly, this increase was more prominent in VV than HT mice, suggesting that a higher degree of *Pkd1* deficiency likely leads a higher number of heart cells expressing Gal-3. One cannot exclude, however, that the different Gal-3+ cell densities are associated with the type of PC1 dysfunctionality. Regardless the underlying mechanism, these findings suggest that the number of Gal-3-expressing cells may contribute to the effect of this protein on hearts of *Pkd1*-deficient mice.

Cultured cardiomyocytes have been shown to express Gal-3, a process that is enhanced by mechanical stretching⁴⁵. Gal-3 expression was not observed, however, in ventricular cardiomyocytes of normal mice, while in disease settings cardiomyocytes expressed this protein²⁴. Our FC analyses brought additional information to this scenario, identifying Gal-3+Troponin I+ ventricular cells in WT, VV and HT hearts. Normal cardiomyocytes, therefore, can express Gal-3. Of note, VV and HT mice displayed higher fractions of cardiomyocytes expressing Gal-3 than WTs, and more of such cells were identified in VV than HT hearts. These data suggest that a more severe *Pkd1* deficiency - or specific patterns of gene deficiency - lead to higher fractions of cardiomyocytes expressing Gal-3. Although previous data suggested that Gal-3 expressed in cardiomyocytes may associate with adverse remodeling and dysfunction in pressure-overloaded myocardium, Gal-3 KO did not affect systolic and diastolic dysfunction⁴⁶. Moreover, it must be noted that in our three genetic profiles only a very limited fraction of cardiomyocytes expressed Gal-3. The detection of extremely weak signals for Gal-3 in western blots performed for VV, HT and WT cardiomyocytes is consistent with this finding. Since systolic function is essentially determined by the contractile function of cardiomyocytes, these data support that the deleterious effect of Gal-3 on the hearts of *Pkd1*-deficient mice does not result, at least to a significant extent, from an intracellular effect of Gal-3 on cardiomyocytes.

Gal-3 is highly expressed and secreted by activated macrophages, processes that are increased in some cardiac disorders²⁴. IHC analyses revealed very low and no increased density of CD206+ M2 macrophages in VV hearts. This finding is in accordance with a previous study that reported, in mouse left ventricular myocardium, that Gal-3 was detected in a scarce number of interstitial cells with morphological features of macrophages²⁴. *Cd206* expression was in line with the IHC results and was not increased in HT ventriculi. Higher *Ym1* and lower *Fizz1* expression, however, were detected in VV hearts, while no change was observed in HT organs. These results suggest that VV hearts may display altered M2 macrophage subpopulations, a pattern not observed in HTs. IHC assessment revealed higher but also very low density of iNOS+ M1 macrophages in VV myocardium. *Nos2* expression, however, was not increased in VV or HT hearts. FC studies revealed increased fractions of Gal-3+ M1 macrophages in VV and HT ventriculi, findings not observed for M2 macrophages. This observation was surprising, since M1 macrophages usually do not significantly express Gal-3, except when in the atherosclerosis environment²⁹, and M2 macrophages have been associated with the renal phenotype of *Pkd1*-deficient mice^{47,48}. Gal-3+ signal in M1 cells, therefore, can reflect endocytosed protein, since this process may occur upon activation of M1 macrophages⁴⁹ and might be mildly enhanced in VV and HT hearts or, perhaps, Gal-3 produced by the M1 cell itself. Interestingly, the increase in Gal-3+ M1 cell fraction was higher in VV than HT hearts, suggesting that the level of PC1 functionality likely influences Gal-3 uptake or *Lgals3* transcription by these cardiac cells. Since the macrophages that secrete Gal-3 are usually M2^{34,50}, the non-increased fraction of Gal-3+CD206+ cells and the very low population of activated macrophages in VV and HT hearts do not support these cells as a major source of Gal-3 in the *Pkd1*-deficiency setting and as the main driver of the Gal-3-mediated effect on such hearts.

Fibroblasts are cells that significantly express *Lgals3* and Gal-3^{24,51}. Cardiac fibroblasts, in fact, express Gal-3 in animal models of heart disease²⁴. Our data did not show increased density of fibroblasts in VV ventriculi and gene expression assessments suggest similar results in VV and HT animals. Western blot analyses, in turn, showed very strong Gal-3 signals for *Pkd1*-deficient and wild-type cardiac fibroblasts, strongly supporting these cells as the main source of Gal-3 in the heart. Notably, FC analyses revealed increased fractions of fibroblasts expressing Gal-3 in VV and HT hearts. Previous studies have shown that cultured fibroblasts can secrete Gal-3⁵¹ while their capacity to secrete Gal-3 *in vivo* has not been fully determined. If such a process occurs in the living heart, Gal-3 could be released into the myocardium through a paracrine effect in the *Pkd1*-deficient settings, affecting the cardiomyocyte function. The finding of predominantly cytoplasmic Gal-3 signal in the fibroblasts favors this proposed model. Another mechanism that requires Gal-3 expression in fibroblasts but does not require its secretion should be also considered as a possibility for the Gal-3-mediated effect on VV and HT hearts. According to this mechanism, Gal-3 or other stimuli would activate the fibroblasts, which would make them affect the functional activity of cardiomyocytes. Activated fibroblasts, in fact, can affect cardiomyocyte electrophysiology⁵² and exert negative effects on other cells⁵³. Our findings support, therefore, that different *Pkd1*-deficient settings increase the fraction of cardiac fibroblasts that express Gal-3 and that the Gal-3-mediated deleterious effect on the heart associated with *Pkd1* deficiency may be primarily driven by Gal-3-expressing fibroblasts, through a mechanism that may or may not require secretion of this protein.

The finding of increased fraction of Cleaved caspase-3+ cardiomyocytes in VV mice strongly supported the previous hypothesis that increased cardiomyocyte apoptosis contributes to cardiac dysfunction in *Pkd1*-deficient animals. Moreover, *Lgals3* KO rescued

VV cardiomyocyte apoptosis to baseline, indicating that this process is mediated by Gal-3. While suppression of PC1 cleavage induced Gal-3-mediated apoptosis in young cardiomyocytes, the same was not observed in HT hearts. Since Balbo et al. showed increased cardiac apoptosis in adult HT mice⁷, it is possible that the increase in cardiomyocyte apoptotic rate takes longer to occur in this milder *Pkd1*-deficient model. Future analyses should be performed in HT adult hearts to resolve this matter.

Extracellular Gal-3 can induce apoptosis of T cells by binding to glycans on the cell surface⁵⁴, an effect also seen in other cell types⁵⁵. Intracellular Gal-3, on the other hand, inhibits apoptosis in T lymphocytes and other cells^{54,56}. The observed increased cardiomyocyte apoptosis in VV animals provides support to the hypothesis that Gal-3 secreted by fibroblasts exerts the cardiac deleterious effect, since fibroblast-secreted extracellular Gal-3 could reproduce its pro-apoptotic effect on VV cardiomyocytes. In addition, the anti-apoptotic effect of intracellular Gal-3 suggests that Gal-3 expressed in cardiomyocytes does not increase apoptosis in VV cardiomyocytes. Since in certain circumstances fibroblasts can induce apoptosis in other cells⁵³, it is also possible that increased VV cardiomyocyte apoptosis could occur due to an effect of Gal-3+ fibroblasts through a mechanism independent of secreted Gal-3. Increased apoptosis was also observed in VV cardiac fibroblasts but the rescuing effect of Gal-3 KO was not significant. This observation suggests that the increased apoptosis in VV fibroblasts is not significantly dependent on Gal-3, but instead on *Pkd1* deficiency. Apoptosis was not increased in HT cardiac fibroblasts, suggesting that apoptosis of such cells may also take longer to develop.

Inflammation is a key component of the ADPKD kidney phenotype⁵⁷. Gal-3, in turn, participates in inflammation, mediating several processes³⁴. Moreover, in disease settings activated fibroblasts produce cytokines, growth factors and proteases⁵⁸. Our findings

revealed increased *Il6*, *Il1b* and *Il4r* expression in VV hearts but the phenotype was not rescued by *Lgals3* KO. While we had previously shown increased *Il6* and *Il1b* expression in VV hearts³⁸, our current data expanded this inflammatory spectrum and revealed that Gal-3 KO does not change it. The abnormal Gal-3 expression, therefore, appears not to be a major contributor to inflammation in VV hearts, suggesting that other pathways triggered by suppression of PC1 cleavage account for it. Expression of *Il6*, *Il1b* and *Il4r*, however, were not increased in HT hearts. Given the milder phenotype, it is likely that cardiac inflammation takes longer to develop in HT mice. Future analyses in adult HT hearts should address this point.

Resident activated fibroblasts constitute the main source of cardiac fibrosis⁵⁹ while Gal-3 can stimulate fibroblast proliferation and serve as a cofactor for TGF- β to differentiate fibroblasts into activated myofibroblasts^{42,60}. Importantly, fibrosis is a major determinant of kidney disease progression in ADPKD. *Colla1* and *Tgfb1* expression, however, did not significantly change in VV ventriculi but, interestingly, Gal-3 KO reduced their expression. The absence of fibrosis in VV hearts confirms our previous data⁷, however the observation of increased inflammation associated with decreased *Colla1* and *Tgfb1* expression induced by *Lgals3* KO suggests that VV animals might develop cardiac fibrosis if they survived significantly longer. Surprisingly, *Col3a1* expression was reduced in VV myocardium; we currently have no reasonable explanation for it. All three genes had their expression not significantly affected in HT hearts. Since Balbo et al. reported increased but mild fibrosis in adult HT hearts⁷, cardiac fibrosis likely requires a longer time to develop in this model. Future studies are necessary to clarify this issue.

This study revealed increased Gal-3 expression and number of Gal-3-expressing cells in the hearts of two mouse models with different profiles of *Pkd1* deficiency, already at a very

early age. It also showed that normal ventricular cardiomyocytes can express Gal-3 and that *Pkd1* deficiency enhances this expression. Remarkably, our findings unraveled fibroblasts as the main source of Gal-3 and suggest that these cells, not macrophages, may affect the function of cardiomyocytes and contribute to cardiac dysfunction in the setting of decreased PC1 function. Our data also revealed that Gal-3 induces apoptosis in cardiomyocytes lacking PC1 cleavage. This study elucidates fundamental aspects of how Gal-3 mediates its detrimental heart effects in the setting of *Pkd1* deficiency, a mechanism likely applicable to the human ADPKD cardiac phenotype.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.A.F. carried out experiments and drafted the paper; G.M.M. carried out some of the experiments and provided technical support; A.G.A. provided technical support; A.N.D.N. quantified double-staining experiments for Gal-3; V.C.D.P. provided technical support in animal care; F.M.O provided technical support in immunohistochemistry; E.H.W. performed the statistical analyses; and L.F.O. designed and mentored the study, drafted and revised the paper. All authors approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ana M. G. Silva, PhD, for support in immunohistochemistry; Éspér G. Kállas, MD, PhD, Priscila Ramos, PhD, Amanda Cabral and Renata Gorjão, PhD, for support in flow cytometry. We thank Roger Chammas, MD, PhD, for fruitful discussion about the data and for providing the anti-Galectin3 antibody.

FUNDING

This study was sponsored by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; grant 2018/24846-0 to LFO); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; training grant to JAF under the mentoring of LFO); and the National Institute Digestive and Kidney Disease-sponsored Baltimore Polycystic Kidney Disease Research and Clinical Core Center (grant P30DK090868).

DISCLOSURES

None.

DATA AVAILABILITY

Additional information about this study can be requested through electronic mail.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

1. Lanktree MB, Haghighi A, Guiard E, Iliuta I-A, Song X, Harris PC, et al.: Prevalence Estimates of Polycystic Kidney and Liver Disease by Population Sequencing. *Journal of the American Society of Nephrology*, 29: 2593-2600, 2018 10.1681/asn.2018050493
2. Cornec-Le Gall E, Torres VE, Harris PC: Genetic Complexity of Autosomal Dominant Polycystic Kidney and Liver Diseases. *J Am Soc Nephrol*, 29: 13-23, 2018 10.1681/ASN.2017050483
3. Chapman AB, Stepniakowski K, Rahbari-Oskoui F: Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*, 17: 153-163, 2010 10.1053/j.ackd.2010.01.001
4. Martinez-Vea A, Valero FA, Bardaji A, Gutierrez C, Broch M, Garcia C, et al.: Left ventricular hypertrophy in hypertensive patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: Influence of blood pressure and humoral and neurohormonal factors. *American Journal of Nephrology*, 20: 193-200, 2000 10.1159/000013583
5. Oflaz H, Alisir S, Buyukaydin B, Kocaman O, Turgut F, Namli S, et al.: Biventricular diastolic dysfunction in patients with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney International*, 68: 2244-2249, 2005 10.1111/j.1523-1755.2005.00682.x
6. Paavola J, Schliffke S, Rossetti S, Kuo IYT, Yuan S, Sun Z, et al.: Polycystin-2 mutations lead to impaired calcium cycling in the heart and predispose to dilated cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 58: 199-208, 2013 10.1016/j.yjmcc.2013.01.015
7. Balbo BE, Amaral AG, Fonseca JM, de Castro I, Salemi VM, Souza LE, et al.: Cardiac dysfunction in Pkd1-deficient mice with phenotype rescue by galectin-3 knockout. *Kidney International*, 90: 580-597, 2016 10.1016/j.kint.2016.04.028
8. Pedrozo Z, Criollo A, Battiprolu PK, Morales CR, Contreras-Ferrat A, Fernández C, et al.: Polycystin-1 Is a Cardiomyocyte Mechanosensor That Governs L-Type Ca²⁺ Channel Protein Stability. *Circulation*, 131: 2131-2142, 2015 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013537

9. Altamirano F, Schiattarella GG, French KM, Soo Y, Engelberger F, Kyrychenko S, et al.: Polycystin-1 Assembles With Kv Channels to Govern Cardiomyocyte Repolarization and Contractility. *Circulation Research*, 125, 2019
10. Kuo IY, Duong SL, Nguyen L, Ehrlich BE: Decreased Polycystin 2 Levels Result in Non-Renal Cardiac Dysfunction with Aging. *Plos One*, 11, 2016 10.1371/journal.pone.0153632
11. Lee EJ: Cell Proliferation and Apoptosis in ADPKD. *Cystogenesis*, 933: 25-34, 2016 10.1007/978-981-10-2041-4_3
12. Merta M, Tesar V, Zima T, Jirsa M, Rysavá R, Zabka J: Cytokine profile in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Biochem Mol Biol Int*, 41: 619-624, 1997 10.1080/15216549700201651
13. Grantham JJ, Mulamalla S, Swenson-Fields KI: Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 7: 556-566, 2011 10.1038/nrneph.2011.109
14. Gehlken C, Suthahar N, Meijers WC, de Boer RA: Galectin-3 in Heart Failure An Update of the Last 3 Years. *Heart Failure Clinics*, 14: 75-+, 2018 10.1016/j.hfc.2017.08.009
15. Lok DJ, Lok SI, Bruggink-André de la Porte PW, Badings E, Lipsic E, van Wijngaarden J, et al.: Galectin-3 is an independent marker for ventricular remodeling and mortality in patients with chronic heart failure. *Clin Res Cardiol*, 102: 103-110, 2013 10.1007/s00392-012-0500-y
16. Krzeslak A, Lippinska A: Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 9: 305-328, 2004
17. Dumic J, Dabelic S, Flogel M: Galectin-3: An open-ended story. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1760: 616-635, 2006 10.1016/j.bbagen.2005.12.020
18. Yu S, Hackmann K, Gao J, He X, Piontek K, Garcia Gonzalez MA, et al.: Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 18688-18693, 2007 10.1073/pnas.0708217104

19. Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, et al.: Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol*, 156: 1073-1083, 2000 10.1016/S0002-9440(10)64975-9
20. Bastos AP, Piontek K, Silva AM, Martini D, Menezes LF, Fonseca JM, et al.: Pkd1 Haploinsufficiency Increases Renal Damage and Induces Microcyst Formation following Ischemia/Reperfusion. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20: 2389-2402, 2009 10.1681/asn.2008040435
21. Piontek KB, Huso DL, Grinberg A, Liu L, Bedja D, Zhao H, et al.: A functional floxed allele of Pkd1 that can be conditionally inactivated in vivo. *J Am Soc Nephrol*, 15: 3035-3043, 2004 10.1097/01.ASN.0000144204.01352.86
22. Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, et al.: Embryonic and Adult-Derived Resident Cardiac Macrophages Are Maintained through Distinct Mechanisms at Steady State and during Inflammation. *Immunity*, 40: 91-104, 2014 10.1016/j.immuni.2013.11.019
23. Nguyen MN, Ziemann M, Kiriazis H, Su Y, Thomas Z, Lu Q, et al.: Galectin-3 deficiency ameliorates fibrosis and remodeling in dilated cardiomyopathy mice with enhanced Mst1 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 316: H45-H60, 2019 10.1152/ajpheart.00609.2018
24. Frunza O, Russo I, Saxena A, Shinde AV, Humeres C, Hanif W, et al.: Myocardial Galectin-3 Expression Is Associated with Remodeling of the Pressure-Overloaded Heart and May Delay the Hypertrophic Response without Affecting Survival, Dysfunction, and Cardiac Fibrosis. *Am J Pathol*, 186: 1114-1127, 2016 10.1016/j.ajpath.2015.12.017
25. Polat V, Bozcali E, Uygun T, Opan S, Karakaya O: Diagnostic significance of serum galectin-3 levels in heart failure with preserved ejection fraction. *Acta Cardiologica*, 71: 191-197, 2016 10.1080/ac.71.2.3141849
26. van Kimmenade RR, Januzzi JL, Ellinor PT, Sharma UC, Bakker JA, Low AF, et al.: Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 48: 1217-1224, 2006 10.1016/j.jacc.2006.03.061

27. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, et al.: Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *American Journal of Pathology*, 172: 288-298, 2008 10.2353/ajpath.2008.070726
28. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, et al.: Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation*, 110: 3121-3128, 2004 10.1161/01.CIR.0000147181.65298.4D
29. Varasteh Z, De Rose F, Mohanta S, Li Y, Zhang X, Miritsch B, et al.: Imaging atherosclerotic plaques by targeting Galectin-3 and activated macrophages using (Theranostics, 11: 1864-1876, 2021 10.7150/thno.50247
30. Agrwal N, Wang JL, Voss PG: Carbohydrate-binding protein 35. Levels of transcription and mRNA accumulation in quiescent and proliferating cells. *J Biol Chem*, 264: 17236-17242, 1989
31. Bayes-Genis A, de Antonio M, Vila J, Penafiel J, Galan A, Barallat J, et al.: Head- to-Head Comparison of 2 Myocardial Fibrosis Biomarkers for Long-Term Heart Failure Risk Stratification. *Journal of the American College of Cardiology*, 63: 158-166, 2014 10.1016/j.jacc.2013.07.087
32. Tarbit E, Singh I, Peart JN, Rose'Meyer RB: Biomarkers for the identification of cardiac fibroblast and myofibroblast cells. *Heart Fail Rev*, 24: 1-15, 2019 10.1007/s10741-018-9720-1
33. Liu FT, Rabinovich GA: Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 1183: 158-182, 2010 10.1111/j.1749-6632.2009.05131.x
34. Henderson NC, Sethi T: The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev*, 230: 160-171, 2009 10.1111/j.1600-065X.2009.00794.x
35. Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Xu HX, Liu LJ, Ahrabi AK, et al.: Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 16981-16986, 2002 10.1073/pnas.252484899

36. Wei W, Hackmann K, Xu H, Germino G, Qian F: Characterization of cis-autoproteolysis of polycystin-1, the product of human polycystic kidney disease 1 gene. *J Biol Chem*, 282: 21729-21737, 2007 10.1074/jbc.M703218200
37. Kurbegovic A, Kim H, Xu HX, Yu SQ, Cruanes J, Maser RL, et al.: Novel Functional Complexity of Polycystin-1 by GPS Cleavage In Vivo: Role in Polycystic Kidney Disease. *Molecular and Cellular Biology*, 34: 3341-3353, 2014 10.1128/mcb.00687-14
38. Amaral AG, Silva CCCd, Honorato-Sampaio K, Duarte-Neto AN, Bloise AC, Cassina L, et al.: Disruption of polycystin-1 cleavage leads to cardiac metabolic rewiring in mice. Under Review, 2021
39. Mostacada K, Oliveira FL, Villa-Verde DMS, Martinez AMB: Lack of galectin-3 improves the functional outcome and tissue sparing by modulating inflammatory response after a compressive spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 271: 390-400, 2015 10.1016/j.expneurol.2015.07.006
40. Li LC, Li J, Gao J: Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. *J Pharmacol Exp Ther*, 351: 336-343, 2014 10.1124/jpet.114.218370
41. O'Seaghda CM, Hwang S-J, Ho JE, Vasan RS, Levy D, Fox CS: Elevated Galectin-3 Precedes the Development of CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24: 1470-1477, 2013 10.1681/asn.2012090909
42. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, et al.: Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 5060-5065, 2006 10.1073/pnas.0511167103
43. Ho JE, Liu CY, Lyass A, Courchesne P, Pencina MJ, Vasan RS, et al.: Galectin-3, a Marker of Cardiac Fibrosis, Predicts Incident Heart Failure in the Community. *Journal of the American College of Cardiology*, 60: 1249-1256, 2012 10.1016/j.jacc.2012.04.053
44. Nishi Y, Sano H, Kawashima T, Okada T, Kuroda T, Kikkawa K, et al.: Role of galectin-3 in human pulmonary fibrosis. *Allergol Int*, 56: 57-65, 2007 10.2332/allergolint.O-06-449
45. Wu CK, Su MY, Lee JK, Chiang FT, Hwang JJ, Lin JL, et al.: Galectin-3 level and the severity of cardiac diastolic dysfunction using cellular and animal models and clinical indices. *Scientific Reports*, 5, 2015 10.1038/srep17007

46. Frunza O, Russo I, Saxena A, Shinde AV, Humeres C, Hanif W, et al.: Myocardial Galectin-3 Expression Is Associated with Remodeling of the Pressure-Overloaded Heart and May Delay the Hypertrophic Response without Affecting Survival, Dysfunction, and Cardiac Fibrosis. *American Journal of Pathology*, 186: 1114-1127, 2016 10.1016/j.ajpath.2015.12.017
47. Cassini MF, Kakade VR, Kurtz E, Sulkowski P, Glazer P, Torres R, et al.: Mcp1 Promotes Macrophage-Dependent Cyst Expansion in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 29: 2471-2481, 2018 10.1681/asn.2018050518
48. Karihaloo A, Koraishy F, Huen SC, Lee Y, Merrick D, Caplan MJ, et al.: Macrophages Promote Cyst Growth in Polycystic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22: 1809-1814, 2011 10.1681/asn.2011010084
49. Lepur A, Carlsson MC, Novak R, Dumić J, Nilsson UJ, Leffler H: Galectin-3 endocytosis by carbohydrate independent and dependent pathways in different macrophage like cell types. *Biochim Biophys Acta*, 1820: 804-818, 2012 10.1016/j.bbagen.2012.02.018
50. Quenum Zangbede FO, Chauhan A, Sharma J, Mishra BB: Galectin-3 in M2 Macrophages Plays a Protective Role in Resolution of Neuropathology in Brain Parasitic Infection by Regulating Neutrophil Turnover. *J Neurosci*, 38: 6737-6750, 2018 10.1523/JNEUROSCI.3575-17.2018
51. Zhou Y, He CH, Yang DS, Tung N, Cao Y, Kamle S, et al.: Galectin-3 Interacts with the CHI3L1 Axis and Contributes to Hermansky-Pudlak Syndrome Lung Disease. *Journal of Immunology*, 200: 2140-2153, 2018 10.4049/jimmunol.1701442
52. Klesen A, Jakob D, Emig R, Kohl P, Ravens U, Peyronnet R: Cardiac fibroblasts : Active players in (atrial) electrophysiology? *Herzschrittmacherther Elektrophysiol*, 29: 62-69, 2018 10.1007/s00399-018-0553-3
53. Itoh G, Chida S, Yanagihara K, Yashiro M, Aiba N, Tanaka M: Cancer-associated fibroblasts induce cancer cell apoptosis that regulates invasion mode of tumours. *Oncogene*, 36: 4434-4444, 2017 10.1038/onc.2017.49

54. Hsu DK, Yang RY, Saegusa J, Liu FT: Analysis of the intracellular role of galectins in cell growth and apoptosis. *Methods Mol Biol*, 1207: 451-463, 2015 10.1007/978-1-4939-1396-1_29
55. Zubieta MR, Furman D, Barrio M, Bravo AI, Domenichini E, Mordoh J: Galectin-3 expression correlates with apoptosis of tumor-associated lymphocytes in human melanoma biopsies. *Am J Pathol*, 168: 1666-1675, 2006 10.2353/ajpath.2006.050971
56. Nakahara S, Oka N, Raz A: On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis*, 10: 267-275, 2005 10.1007/s10495-005-0801-y
57. Song CJ, Zimmerman KA, Henke SJ, Yoder BK: Inflammation and Fibrosis in Polycystic Kidney Disease. *Results Probl Cell Differ*, 60: 323-344, 2017 10.1007/978-3-319-51436-9_12
58. Enzerink A, Vaheri A: Fibroblast activation in vascular inflammation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9: 619-626, 2011 10.1111/j.1538-7836.2011.04209.x
59. Gibb AA, Lazaropoulos MP, Elrod JW: Myofibroblasts and Fibrosis: Mitochondrial and Metabolic Control of Cellular Differentiation. *Circ Res*, 127: 427-447, 2020 10.1161/CIRCRESAHA.120.316958
60. Inohara H, Akahani S, Raz A: Galectin-3 stimulates cell proliferation. *Exp Cell Res*, 245: 294-302, 1998 10.1006/excr.1998.4253

Table 1. Primer sequences.

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>Actb</i>	GATGTAATGAAGGCTTTGGTC	TGTGCACTTTTATTGGTCTC
<i>Cd206</i>	CTCTGTTTCAGCTATTGGACGC	TGGCACTCCCAAACATAATTTGA
<i>Col1a1</i>	TGCTTTCTGCCCCGGAAGA	GGGATGCCATCTCGTCCA
<i>Col3a1</i>	ACTCAAGAGTGGAGAATACTG	AACATGGTTTCTTCTCTGCAC
<i>Fizz1</i>	CCAATCCAGCTAACTATCCCTCC	CCAGTCAACGAGTAAGCACAG
<i>Fn1</i>	AGGAGAACCAGGAGAGCACACC	GCCCAGTGATTTTCAGCAAAGG
<i>Fsp1</i>	TGAGCAACTTGGACAGCAACA	CTTCTTCCGGGGCTCCTTATC
<i>Il1b</i>	TTCAGGCAGGCAGTATCACTC	GAAGGTCCACGGGAAAGACAC
<i>Il4r</i>	TGGATCTGGGAGCATCAAGGT	TGGAAGTGCGGATGTAGTCAG
<i>Il6</i>	TTGGTCCTTAGCCACTCCTCC	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC
<i>Nos2</i>	TCCGAAGTTTCTGGCAGCAG	CTGGAACAGCACTCTCTTGCG
<i>Lgals3</i>	CCCTTTGAGAGTGGCAAACCA	CATCGTTGACCGCAACCTT
<i>Tgfb1</i>	GGATACCAACTATTGCTTCAG	TGTCCAGGCTCCAAATATAG
<i>Vim</i>	CGTCCACACGCACCTACAG	GGGGGATGAGGAATAGAGGCT
<i>Ym1</i>	GGGCATACCTTTATCCTGAG	CCACTGAAGTCATCCATGTC

Actb (beta actin), *Cd206* (mannose receptor C-type 1), *Col1a1* (collagen type I alpha-1), *Col3a1* (collagen type III alpha-1), *Fizz1* (resistin-like alpha 1), *Fn1* (fibronectin), *Fsp1* (fibroblast specific protein 1), *Il1b* (interleukin-1beta), *Il4r* (interleukin-4 receptor), *Il6* (interleukin-6), *Nos2* (nitric oxide synthase 2), *Lgals3* (galectin-3), *Tgfb1* (transforming growth factor beta1), *Vim* (vimentin) and *Ym1* (chitinase 3-like 3).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Gal-3 expression is increased in the hearts of *Pkd1*-deficient mice. **A)** Comparative analyses of *Lgals3* gene expression in ventricular tissue between WT1 (n=14) and VV (n=14) and between WT2 (n=16) and HT (n=13) mice. **B)** Bottom: Comparative western blot analyses of Gal-3 expression in ventricular tissue between WT1 (n=15) and VV (n=17) and between WT2 (n=11) and HT (n=11) animals. Top: Representative images. **C)** Top: Comparative analyses of Gal-3+ (brown color) cell density in ventricular myocardium between WT1 (n=8) and VV (n=9) and between WT2 (n=5) and HT (n=5) mice. Bottom: Representative images of immunohistochemical staining for Gal-3. Original magnification x400, scale bar 50 μ m. Parametric data were compared using t-test with results presented as mean $\pm$ SD. Non-parametric data were compared by the Mann-Whitney U test, with results expressed as median (lower and upper quartile). *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001.

Figure 2. A small fraction of cardiomyocytes express Gal-3, a process that is enhanced in the setting of *Pkd1* deficiency. **A)** Left: Comparative flow cytometry analyses of the ratio Gal-3+Troponin I+ cells/Troponin I+ cells in ventricular myocardium among WT (n=15), VV (n=6) and HT (n=6) mice. Right: Representative flow cytometry images. **B)** Left: Comparative immunohistochemical analysis of Gal-3+Troponin I+ cell density in ventricular myocardium between WT1 (n=8) and VV (n=9) mice. Right: Representative images of immunohistochemical staining for Gal-3 (brown color) and Troponin I (green color). Original magnification x400, images at x630 and x1000 magnification, scale bars 10 and 20 μ m, respectively. Non-parametric data were compared using the Mann-Whitney U test, with results presented as median (lower and upper quartile). Comparisons in factors with >2 levels were performed with the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn post-hoc

test. In tests involving multiple comparisons, the significances were corrected with the Benjamini-Hochberg method. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Figure 3. Gal-3 expression profiles in cardiac macrophages in *Pkd1*-deficient mice. **A)** Comparative analyses of *Cd206* cardiac expression among WT (n=29), VV (n=13) and HT (n=8) mice; of *Ym1* cardiac expression among WT (n=30), VV (n=14) and HT (n=13) animals; and of *Fizz1* cardiac expression among WT (n=26), VV (n=13) and HT (n=13) mice. **B)** Left: Comparative analysis of CD206⁺ cell density in ventricular myocardium between WT1 (n=8) and VV (n=9) animals. Right: Representative images of immunohistochemical staining for CD206 (green color). Original magnification x400, scale bar 50 μ m. **C)** Left: Comparative flow cytometry analysis of the ratio Gal-3⁺CD206⁺ cells/CD206⁺ cells in ventricular tissue among WT (n=19), VV (n=6) and HT (n=7) mice. Right: Representative flow cytometry images. **D)** Comparative analyses of *Nos2* cardiac expression among WT (n=28), VV (n=13) and HT (n=8) animals. **E)** Left: Comparative analysis of iNOS⁺ cell density in ventricular myocardium between WT1 (n=5) and VV (n=8) mice. Right: Representative images of immunohistochemical staining for iNOS (green color). Original magnification x400, scale bar 50 μ m. **F)** Left: Comparative flow cytometry analysis of the ratio Gal-3⁺iNOS⁺ cells/iNOS⁺ cells in ventricular tissue among WT (n=15), VV (n=6) and HT (n=6) animals. Right: Representative flow cytometry images. Non-parametric data were compared by the Mann-Whitney U test, with results presented as median (lower and upper quartile). Comparisons in factors with >2 levels were performed with the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn post-hoc test. In tests involving multiple comparisons, the significances were corrected with the Benjamini-Hochberg method. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Figure 4. Fibroblasts are the major source of Gal-3 in the hearts of *Pkd1*-deficient mice. **A)** Comparative analyses of *Fnl* cardiac expression among WT (n=28), VV (n=10) and HT (n=9) mice; of *Fsp1* cardiac expression among WT (n=30), VV (n=14) and HT (n=12) animals; and of *Vim* cardiac expression among WT (n=29), VV (n=14) and HT (n=12) mice. **B)** Left: Comparative analysis of Vimentin+ cell density in ventricular myocardium between WT1 (n=5) and VV (n=8) animals. Right: Representative images of immunohistochemical staining for Vimentin (green color). Original magnification x400, scale bar 50 μ m. **C)** Left: Comparative flow cytometry analysis of the ratio Gal-3+Vimentin+ cells/Vimentin+ cells in ventricular tissue among WT (n=15), VV (n=6) and HT (n=5) mice. Right: Representative flow cytometry images. **D)** Representative image of Gal-3 cytoplasmic staining (brown color) in fibroblasts (arrow). Original magnification x400, scale bar 50 μ m. **E)** Bottom: Comparative western blot analyses of Gal-3 expression in cardiac fibroblasts between WT1 (n=5) and VV (n=5) and between WT2 (n=5) and HT (n=5) animals. Top: Representative images. Parametric data were compared using t-test with results presented as mean $\pm$ SD. Comparisons in factors with >2 levels were performed with the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn post-hoc test. In tests involving multiple comparisons, the significances were corrected with the Benjamini-Hochberg method. *P<0.05 and ***P<0.001.

Figure 5. Cardiomyocyte and fibroblast apoptosis are increased in VV hearts. **A)** Top: Flow cytometry analyses of the effects of VV genotype and *Lgals3* KO on the ratio Cleaved caspase-3+Troponin I+ cells/Troponin I+ cells in ventricular tissue among WT1 (n=6), WT1G- (n=8), VV (n=6) and VVG- (n=5) mice. Bottom: Representative flow cytometry images. **B)** Top: Comparative flow cytometry analysis of the ratio Cleaved caspase-3+Troponin I+ cells / Troponin I+ cells in ventricular tissue between WT2 (n=10) and HT (n=8) animals. Bottom: Representative flow cytometry images. **C)** Top: Flow cytometry

analyses of the effects of VV genotype and *Lgals3* KO on the ratio Cleaved caspase-3+Vimentin+ cells/Vimentin+ cells in ventricular tissue among WT1 (n=6), WT1G- (n=8), VV (n=6) and VVG- (n=5) mice. Bottom: Representative flow cytometry images. **D)** Top: Comparative flow cytometry analysis of the ratio Cleaved caspase-3+Vimentin+ cells/Vimentin+ cells in ventricular tissue between WT2 (n=10) and HT (n=8) animals. Bottom: Representative flow cytometry images. Non-parametric data are presented as median (lower and upper quartile) and were analyzed for single factor with the Mann-Whitney U test and, for multiple factors, using aligned rank transform followed by two-way analysis of variance. Multiple comparisons were corrected by the Benjamini-Hochberg method.

Figure 6. VV mice develop inflammation in the heart. **A)** Analyses of the effects of VV genotype and *Lgals3* KO on *Il6* cardiac expression among WT1 (n=13), WT1G- (n=11), VV (n=14) and VVG- (n=13) mice. **B)** Analyses of the effects of VV genotype and *Lgals3* KO on *Il1b* cardiac expression among WT1 (n=14), WT1G- (n=10), VV (n=13) and VVG- (n=12) animals. **C)** Analyses of the effects of VV genotype and *Lgals3* KO on *Il4r* cardiac expression among WT1 (n=13), WT1G- (n=11), VV (n=14) and VVG- (n=13) mice. **D)** Comparative analyses of *Il6* cardiac expression between WT2 (n=13) and HT (n=9) animals. **E)** Comparative analyses of *Il1b* cardiac expression between WT2 (n=15) and HT (n=11) mice. **F)** Comparative analyses of *Il4r* cardiac expression between WT2 (n=16) and HT (n=13) animals. Non-parametric data are presented as median (lower and upper quartile) and were analyzed for single factor with the Mann-Whitney U test and, for multiple factors, using aligned rank transform followed by two-way analysis of variance. Multiple comparisons were corrected with the Benjamini-Hochberg method.

Figure 7. Assessment of cardiac fibrosis in *Pkd1*-deficient mice. **A)** Analyses of the effects of VV genotype and *Lgals3* KO on *Col3a1* cardiac expression among WT1 (n=13), WT1G-

(n=13), VV (n=14) and VVG- (n=13) mice. **B)** Analyses of the effects of VV genotype and *Lgals3* KO on *Colla1* cardiac expression among WT1 (n=12), WT1G- (n=11), VV (n=13) and VVG- (n=8) animals. **C)** Analyses of the effects of VV genotype and *Lgals3* KO on *Tgfb1* cardiac expression among WT1 (n=13), WT1G- (n=12), VV (n=14) and VVG- (n=13) mice. **D)** Comparative analysis of *Col3a1* cardiac expression between WT2 (n=16) and HT (n=13) animals. **E)** Comparative analysis of *Colla1* cardiac expression between WT2 (n=13) and HT (n=10) mice. **F)** Comparative analysis of *Tgfb1* cardiac expression between WT2 (n=16) and HT (n=12) animals. Non-parametric data are presented as median (lower and upper quartile) and were analyzed for single factor with the Mann-Whitney U test and, for multiple factors, using aligned rank transform followed by two-way analysis of variance. Multiple comparisons were corrected by the Benjamini-Hochberg method.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

Figure 7

REFERÊNCIAS

1. Chapman AB. Cystic disease in women: clinical characteristics and medical management. *Adv Ren Replace Ther*. 2003;10(1):24-30.
2. Lanktree MB, Haghighi A, Guiard E, Iliuta I-A, Song X, Harris PC, et al. Prevalence Estimates of Polycystic Kidney and Liver Disease by Population Sequencing. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2018;29(10):2593-600.
3. Chebib FT, Torres VE. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Core Curriculum 2016. *American Journal of Kidney Diseases*. 2016;67(5):792-810.
4. Alves EF, Tsuneto LT, Pelloso SM, Torres PR, Otto GL, Silva AA, et al. [Autosomal dominant polycystic kidney disease in hemodialysis patients in Southern Brazil]. *J Bras Nefrol*. 2014;36(1):18-25.
5. Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int*. 2009;76(2):149-68.
6. Antignac C, Calvet JP, Germino GG, Grantham JJ, Guay-Woodford LM, Harris PC, et al. The Future of Polycystic Kidney Disease Research--As Seen By the 12 Kaplan Awardees. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(9):2081-95.
7. Grantham JJ, Chapman AB, Torres VE. Volume progression in autosomal dominant polycystic kidney disease: the major factor determining clinical outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1(1):148-57.
8. Fonseca JM, Bastos AP, Amaral AG, Sousa MF, Souza LE, Malheiros DM, et al. Renal cyst growth is the main determinant for hypertension and concentrating deficit in Pkd1-deficient mice. *Kidney Int*. 2014;85(5):1137-50.
9. Pirson Y, Chauveau D, Torres V. Management of cerebral aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(1):269-76.
10. Bae KT, Zhu F, Chapman AB, Torres VE, Grantham JJ, Guay-Woodford LM, et al. Magnetic resonance imaging evaluation of hepatic cysts in early autosomal-dominant polycystic kidney disease: the Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease cohort. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1(1):64-9.

11. Luciano RL, Dahl NK. Extra-renal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): considerations for routine screening and management. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(2):247-54.
12. Cornec-Le Gall E, Torres VE, Harris PC. Genetic Complexity of Autosomal Dominant Polycystic Kidney and Liver Diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(1):13-23.
13. Cornec-Le Gall E, Audrézet MP, Chen JM, Hourmant M, Morin MP, Perrichot R, et al. Type of PKD1 mutation influences renal outcome in ADPKD. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(6):1006-13.
14. Porath B, Gainullin VG, Cornec-Le Gall E, Dillinger EK, Heyer CM, Hopp K, et al. Mutations in GANAB, Encoding the Glucosidase IIa Subunit, Cause Autosomal-Dominant Polycystic Kidney and Liver Disease. *American Journal of Human Genetics*. 2016;98(6):1193-207.
15. Cornec-Le Gall E, Olson RJ, Besse W, Heyer CM, Gainullin VG, Smith JM, et al. Monoallelic Mutations to DNAJB11 Cause Atypical Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease. *American Journal of Human Genetics*. 2018;102(5):832-44.
16. Hughes J, Ward CJ, Peral B, Aspinwall R, Clark K, San Millán JL, et al. The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet*. 1995;10(2):151-60.
17. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, et al. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science*. 1996;272(5266):1339-42.
18. Oatley P, Stewart AP, Sandford R, Edwardson JM. Atomic force microscopy imaging reveals the domain structure of polycystin-1. *Biochemistry*. 2012;51(13):2879-88.
19. Douguet D, Patel A, Honoré E. Structure and function of polycystins: insights into polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2019;15(7):412-22.
20. Lin CC, Kurashige M, Liu Y, Terabayashi T, Ishimoto Y, Wang T, et al. A cleavage product of Polycystin-1 is a mitochondrial matrix protein that affects mitochondria morphology and function when heterologously expressed. *Sci Rep*. 2018;8(1):2743.

21. Qian F, Watnick TJ, Onuchic LF, Germino GG. The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell*. 1996;87(6):979-87.
22. Tan AY, Zhang T, Michael A, Blumenfeld J, Liu G, Zhang W, et al. Somatic Mutations in Renal Cyst Epithelium in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(8):2139-56.
23. Piontek K, Menezes LF, Garcia-Gonzalez MA, Huso DL, Germino GG. A critical developmental switch defines the kinetics of kidney cyst formation after loss of Pkd1. *Nat Med*. 2007;13(12):1490-5.
24. Takakura A, Contrino L, Beck AW, Zhou J. Pkd1 inactivation induced in adulthood produces focal cystic disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(12):2351-63.
25. Bastos AP, Piontek K, Silva AM, Martini D, Menezes LF, Fonseca JM, et al. Pkd1 Haploinsufficiency Increases Renal Damage and Induces Microcyst Formation following Ischemia/Reperfusion. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2009;20(11):2389-402.
26. Wang S, Zhang J, Nauli SM, Li X, Starremans PG, Luo Y, et al. Fibrocystin/polyductin, found in the same protein complex with polycystin-2, regulates calcium responses in kidney epithelia. *Mol Cell Biol*. 2007;27(8):3241-52.
27. Li Y, Wright JM, Qian F, Germino GG, Guggino WB. Polycystin-2 interacts with type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to modulate intracellular Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem*. 2005;280(50):41298-306.
28. Gattone VH, Wang X, Harris PC, Torres VE. Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. *Nat Med*. 2003;9(10):1323-6.
29. Wang X, Ward CJ, Harris PC, Torres VE. Cyclic nucleotide signaling in polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 2010;77(2):129-40.
30. Torres VE, Harris PC. Strategies targeting cAMP signaling in the treatment of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(1):18-32.

31. Belibi FA, Wallace DP, Yamaguchi T, Christensen M, Reif G, Grantham JJ. The effect of caffeine on renal epithelial cells from patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(11):2723-9.
32. Devuyst O, Torres VE. Osmoregulation, vasopressin, and cAMP signaling in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2013;22(4):459-70.
33. Chou CL, Yip KP, Michea L, Kador K, Ferraris JD, Wade JB, et al. Regulation of aquaporin-2 trafficking by vasopressin in the renal collecting duct. Roles of ryanodine-sensitive Ca²⁺ stores and calmodulin. *J Biol Chem.* 2000;275(47):36839-46.
34. Torres VE, Meijer E, Bae KT, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, et al. Rationale and design of the TEMPO (Tolvaptan Efficacy and Safety in Management of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease and its Outcomes) 3-4 Study. *Am J Kidney Dis.* 2011;57(5):692-9.
35. Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, Grantham JJ, Higashihara E, et al. Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med.* 2012;367(25):2407-18.
36. Roitbak T, Ward CJ, Harris PC, Bacallao R, Ness SA, Wandering-Ness A. A polycystin-1 multiprotein complex is disrupted in polycystic kidney disease cells. *Mol Biol Cell.* 2004;15(3):1334-46.
37. Silberberg M, Charron AJ, Bacallao R, Wandering-Ness A. Mispolarization of desmosomal proteins and altered intercellular adhesion in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288(6):F1153-63.
38. O Bukanov N, Husson H, Dackowski WR, Lawrence BD, Clow PA, Roberts BL, et al. Functional polycystin-1 expression is developmentally regulated during epithelial morphogenesis in vitro: downregulation and loss of membrane localization during cystogenesis. *Hum Mol Genet.* 2002;11(8):923-36.
39. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 20):3589-94.

40. Cabrera-López C, Bullich G, Martí T, Català V, Ballarín J, Bissler JJ, et al. Insight into response to mTOR inhibition when PKD1 and TSC2 are mutated. *BMC Med Genet.* 2015;16:39.
41. Brook-Carter PT, Peral B, Ward CJ, Thompson P, Hughes J, Maheshwar MM, et al. Deletion of the TSC2 and PKD1 genes associated with severe infantile polycystic kidney disease--a contiguous gene syndrome. *Nat Genet.* 1994;8(4):328-32.
42. Kunnen SJ, Leonhard WN, Semeins C, Hawinkels LJAC, Poelma C, Ten Dijke P, et al. Fluid shear stress-induced TGF- β /ALK5 signaling in renal epithelial cells is modulated by MEK1/2. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(12):2283-98.
43. Ma M, Tian X, Igarashi P, Pazour GJ, Somlo S. Loss of cilia suppresses cyst growth in genetic models of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Genet.* 2013;45(9):1004-12.
44. Rowe I, Chiaravalli M, Mannella V, Ulisse V, Quilici G, Pema M, et al. Defective glucose metabolism in polycystic kidney disease identifies a new therapeutic strategy. *Nat Med.* 2013;19(4):488-93.
45. Chiaravalli M, Rowe I, Mannella V, Quilici G, Canu T, Bianchi V, et al. 2-Deoxy-d-Glucose Ameliorates PKD Progression. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(7):1958-69.
46. Menezes LF, Lin CC, Zhou F, Germino GG. Fatty Acid Oxidation is Impaired in An Orthologous Mouse Model of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *EBioMedicine.* 2016;5:183-92.
47. Takiar V, Nishio S, Seo-Mayer P, King JD, Li H, Zhang L, et al. Activating AMP-activated protein kinase (AMPK) slows renal cystogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(6):2462-7.
48. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 2008;30(2):214-26.
49. Torres JA, Kruger SL, Broderick C, Amaralkhagva T, Agrawal S, Dodam JR, et al. Ketosis Ameliorates Renal Cyst Growth in Polycystic Kidney Disease. *Cell Metab.* 2019;30(6):1007-23.e5.

50. Padovano V, Kuo IY, Stavola LK, Aerni HR, Flaherty BJ, Chapin HC, et al. The polycystins are modulated by cellular oxygen-sensing pathways and regulate mitochondrial function. *Mol Biol Cell*. 2017;28(2):261-9.
51. Wu GQ, Markowitz GS, Li L, D'Agati VD, Factor SM, Geng L, et al. Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2. *Nature Genetics*. 2000;24(1):75-8.
52. Boulter C, Mulroy S, Webb S, Fleming S, Brindle K, Sandford R. Cardiovascular, skeletal, and renal defects in mice with a targeted disruption of the Pkd1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(21):12174-9.
53. Muto S, Aiba A, Saito Y, Nakao K, Nakamura K, Tomita K, et al. Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant. *Hum Mol Genet*. 2002;11(15):1731-42.
54. Kuo IY, Chapman AB. Polycystins, ADPKD, and Cardiovascular Disease. *Kidney International Reports*. 2020;5(4):396-406.
55. Chebib FT, Hogan MC, El-Zoghby ZM, Irazabal MV, Senum SR, Heyer CM, et al. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Patients May Be Predisposed to Various Cardiomyopathies. *Kidney Int Rep*. 2017;2(5):913-23.
56. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Lil XG, et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nature Genetics*. 2003;33(2):129-37.
57. Oflaz H, Alisir S, Buyukaydin B, Kocaman O, Turgut F, Namli S, et al. Biventricular diastolic dysfunction in patients with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney International*. 2005;68(5):2244-9.
58. Paavola J, Schliffke S, Rossetti S, Kuo IYT, Yuan S, Sun Z, et al. Polycystin-2 mutations lead to impaired calcium cycling in the heart and predispose to dilated cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2013;58:199-208.

59. Balbo BE, Amaral AG, Fonseca JM, de Castro I, Salemi VM, Souza LE, et al. Cardiac dysfunction in Pkd1-deficient mice with phenotype rescue by galectin-3 knockout. *Kidney International*. 2016;90(3):580-97.
60. Geng L, Segal Y, Pavlova A, Barros EJ, Löhning C, Lu W, et al. Distribution and developmentally regulated expression of murine polycystin. *Am J Physiol*. 1997;272(4 Pt 2):F451-9.
61. Pedrozo Z, Criollo A, Battiprolu PK, Morales CR, Contreras-Ferrat A, Fernandez C, et al. Polycystin-1 Is a Cardiomyocyte Mechanosensor That Governs L-Type Ca²⁺ Channel Protein Stability. *Circulation*. 2015;131(24):2131-42.
62. Altamirano F, Schiattarella GG, French KM, Soo Y, Engelberger F, Kyrychenko S, et al. Polycystin-1 Assembles With Kv Channels to Govern Cardiomyocyte Repolarization and Contractility. *Circulation Research*. 2019;125.
63. Kuo IY, Kwaczala AT, Nguyen L, Russell KS, Campbell SG, Ehrlich BE. Decreased polycystin-2 expression alters calcium-contraction coupling and changes β -adrenergic signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(46):16604-9.
64. Kuo IY, Duong SL, Nguyen L, Ehrlich BE. Decreased Polycystin-2 Levels Result in Non-Renal Cardiac Dysfunction with Aging. *Plos One*. 2016;11(4).
65. Giehl E, Lemos FO, Huang Y, Giordano FJ, Kuo IY, Ehrlich BE. Polycystin-2-dependent cardio-protective mechanisms revealed by cardiac stress. *Pflugers Arch*. 2017;469(11):1507-17.
66. Mostacada K, Oliveira FL, Villa-Verde DMS, Martinez AMB. Lack of galectin-3 improves the functional outcome and tissue sparing by modulating inflammatory response after a compressive spinal cord injury. *Experimental Neurology*. 2015;271:390-400.
67. Li Z, Lv F, Dai C, Wang Q, Jiang C, Fang M, et al. Activation of Galectin-3 (LGALS3) Transcription by Injurious Stimuli in the Liver Is Commonly Mediated by BRG1. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:310.
68. Hirabayashi J, Kasai K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*. 1993;3(4):297-304.

69. Halimi H, Rigato A, Byrne D, Ferracci G, Sebban-Kreuzer C, ElAntak L, et al. Glycan dependence of Galectin-3 self-association properties. *PLoS One*. 2014;9(11):e111836.
70. Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS, Vasta GR. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol*. 2007;17(5):513-20.
71. Ochieng J, Leite-Browning ML, Warfield P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;246(3):788-91.
72. Suarez G, Meyerrose G. Heart failure and galectin 3. *Ann Transl Med*. 2014;2(9):86.
73. Lukyanov P, Furtak V, Ochieng J. Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;338(2):1031-6.
74. Xue H, Liu L, Zhao Z, Zhang Z, Guan Y, Cheng H, et al. The N-terminal tail coordinates with carbohydrate recognition domain to mediate galectin-3 induced apoptosis in T cells. *Oncotarget*. 2017;8(30):49824-38.
75. Matarrese P, Tinari N, Semeraro ML, Natoli C, Iacobelli S, Malorni W. Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis. *FEBS Lett*. 2000;473(3):311-5.
76. Yu F, Finley RL, Raz A, Kim HR. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem*. 2002;277(18):15819-27.
77. Krzeslak A, Lippinska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2004;9(2):305-28.
78. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(13):6737-42.
79. Baek J, Lou J, Coelho S, Lim YJ, Seidlitz S, Nicovich PR, et al., editors. Imaging galectin-3 dependent endocytosis with lattice light-sheet microscopy. 5th International Conference on Biophotonics (ICOB); 2017 2017

Apr 30-May 01; Perth, AUSTRALIA2017.

80. Lok DJ, Lok SI, Bruggink-André de la Porte PW, Badings E, Lipsic E, van Wijngaarden J, et al. Galectin-3 is an independent marker for ventricular remodeling and mortality in patients with chronic heart failure. *Clin Res Cardiol*. 2013;102(2):103-10.
81. Domic J, Dabelic S, Fogel M. Galectin-3: An open-ended story. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. 2006;1760(4):616-35.
82. Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, et al. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol*. 2000;165(4):2156-64.
83. Dong H, Wang ZH, Zhang N, Liu SD, Zhao JJ, Liu SY. Serum Galectin-3 level, not Galectin-1, is associated with the clinical feature and outcome in patients with acute ischemic stroke. *Oncotarget*. 2017;8(65):109752-61.
84. Inohara H, Akahani S, Raz A. Galectin-3 stimulates cell proliferation. *Exp Cell Res*. 1998;245(2):294-302.
85. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, et al. Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *American Journal of Pathology*. 2008;172(2):288-98.
86. Li LC, Li J, Gao J. Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;351(2):336-43.
87. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation*. 2004;110(19):3121-8.
88. Sharma U, Rhaleb NE, Pokharel S, Harding P, Rasoul S, Peng H, et al. Novel anti-inflammatory mechanisms of N-Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro in hypertension-induced target organ damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(3):H1226-32.
89. Reifenberg K, Lehr HA, Torzewski M, Steige G, Wiese E, Küpper I, et al. Interferon-gamma induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice. *Am J Pathol*. 2007;171(2):463-72.

90. Thandavarayan RA, Watanabe K, Ma M, Veeraveedu PT, Gurusamy N, Palaniyandi SS, et al. 14-3-3 protein regulates Ask1 signaling and protects against diabetic cardiomyopathy. *Biochem Pharmacol*. 2008;75(9):1797-806.
91. Yu S, Hackmann K, Gao J, He X, Piontek K, Garcia Gonzalez MA, et al. Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(47):18688-93.
92. Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol*. 2000;156(3):1073-83.
93. Piontek KB, Huso DL, Grinberg A, Liu L, Bedja D, Zhao H, et al. A functional floxed allele of Pkd1 that can be conditionally inactivated in vivo. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(12):3035-43.
94. Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, et al. Embryonic and Adult-Derived Resident Cardiac Macrophages Are Maintained through Distinct Mechanisms at Steady State and during Inflammation. *Immunity*. 2014;40(1):91-104.
95. Nguyen MN, Ziemann M, Kiriazis H, Su Y, Thomas Z, Lu Q, et al. Galectin-3 deficiency ameliorates fibrosis and remodeling in dilated cardiomyopathy mice with enhanced Mst1 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019;316(1):H45-H60.
96. Frunza O, Russo I, Saxena A, Shinde AV, Humeres C, Hanif W, et al. Myocardial Galectin-3 Expression Is Associated with Remodeling of the Pressure-Overloaded Heart and May Delay the Hypertrophic Response without Affecting Survival, Dysfunction, and Cardiac Fibrosis. *Am J Pathol*. 2016;186(5):1114-27.
97. Polat V, Bozcali E, Uygun T, Opan S, Karakaya O. Diagnostic significance of serum galectin-3 levels in heart failure with preserved ejection fraction. *Acta Cardiologica*. 2016;71(2):191-7.
98. Besler C, Lang D, Urban D, Rommel KP, von Roeder M, Fengler K, et al. Plasma and Cardiac Galectin-3 in Patients With Heart Failure Reflects Both Inflammation and Fibrosis: Implications for Its Use as a Biomarker. *Circ Heart Fail*. 2017;10(3).

99. Grupper A, Nativi-Nicolau J, Maleszewski JJ, Geske JR, Kremers WK, Edwards BS, et al. Circulating Galectin-3 Levels Are Persistently Elevated After Heart Transplantation and Are Associated With Renal Dysfunction. *Jacc-Heart Failure*. 2016;4(11):847-56.
100. Varasteh Z, De Rose F, Mohanta S, Li Y, Zhang X, Miritsch B, et al. Imaging atherosclerotic plaques by targeting Galectin-3 and activated macrophages using (Theranostics. 2021;11(4):1864-76.
101. Bayes-Genis A, de Antonio M, Vila J, Penafiel J, Galan A, Barallat J, et al. Head- to-Head Comparison of 2 Myocardial Fibrosis Biomarkers for Long-Term Heart Failure Risk Stratification. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(2):158-66.
102. Tarbit E, Singh I, Peart JN, Rose'Meyer RB. Biomarkers for the identification of cardiac fibroblast and myofibroblast cells. *Heart Fail Rev*. 2019;24(1):1-15.
103. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1183:158-82.
104. Henderson NC, Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev*. 2009;230(1):160-71.
105. Norman J. Fibrosis and progression of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(10):1327-36.
106. Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Xu HX, Liu LJ, Ahrabi AK, et al. Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(26):16981-6.
107. Wei W, Hackmann K, Xu H, Germino G, Qian F. Characterization of cis-autoproteolysis of polycystin-1, the product of human polycystic kidney disease 1 gene. *J Biol Chem*. 2007;282(30):21729-37.
108. Kurbegovic A, Kim H, Xu HX, Yu SQ, Cruanes J, Maser RL, et al. Novel Functional Complexity of Polycystin-1 by GPS Cleavage In Vivo: Role in Polycystic Kidney Disease. *Molecular and Cellular Biology*. 2014;34(17):3341-53.

109. Amaral AG, Silva CCCd, Honorato-Sampaio K, Duarte-Neto AN, Bloise AC, Cassina L, et al. Disruption of polycystin-1 cleavage leads to cardiac metabolic rewiring in mice. 2021:Under Review.
110. O'Seaghdha CM, Hwang S-J, Ho JE, Vasan RS, Levy D, Fox CS. Elevated Galectin-3 Precedes the Development of CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2013;24(9):1470-7.
111. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(13):5060-5.
112. Nishi Y, Sano H, Kawashima T, Okada T, Kuroda T, Kikkawa K, et al. Role of galectin-3 in human pulmonary fibrosis. *Allergol Int*. 2007;56(1):57-65.
113. Ho JE, Liu CY, Lyass A, Courchesne P, Pencina MJ, Vasan RS, et al. Galectin-3, a Marker of Cardiac Fibrosis, Predicts Incident Heart Failure in the Community. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(14):1249-56.
114. Wu CK, Su MY, Lee JK, Chiang FT, Hwang JJ, Lin JL, et al. Galectin-3 level and the severity of cardiac diastolic dysfunction using cellular and animal models and clinical indices. *Scientific Reports*. 2015;5.
115. Karihaloo A, Koraihy F, Huen SC, Lee Y, Merrick D, Caplan MJ, et al. Macrophages Promote Cyst Growth in Polycystic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011;22(10):1809-14.
116. Cassini MF, Kakade VR, Kurtz E, Sulkowski P, Glazer P, Torres R, et al. Mcp1 Promotes Macrophage-Dependent Cyst Expansion in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2018;29(10):2471-81.
117. Lepur A, Carlsson MC, Novak R, Dumić J, Nilsson UJ, Leffler H. Galectin-3 endocytosis by carbohydrate independent and dependent pathways in different macrophage like cell types. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(7):804-18.
118. Quenum Zangbede FO, Chauhan A, Sharma J, Mishra BB. Galectin-3 in M2 Macrophages Plays a Protective Role in Resolution of Neuropathology in Brain Parasitic Infection by Regulating Neutrophil Turnover. *J Neurosci*. 2018;38(30):6737-50.

119. Zhou Y, He CH, Yang DS, Tung N, Cao Y, Kamle S, et al. Galectin-3 Interacts with the CHI3L1 Axis and Contributes to Hermansky-Pudlak Syndrome Lung Disease. *Journal of Immunology*. 2018;200(6):2140-53.
120. Klesen A, Jakob D, Emig R, Kohl P, Ravens U, Peyronnet R. Cardiac fibroblasts : Active players in (atrial) electrophysiology? *Herzschrittmacherther Elektrophysiol*. 2018;29(1):62-9.
121. Itoh G, Chida S, Yanagihara K, Yashiro M, Aiba N, Tanaka M. Cancer-associated fibroblasts induce cancer cell apoptosis that regulates invasion mode of tumours. *Oncogene*. 2017;36(31):4434-44.
122. Hsu DK, Yang RY, Saegusa J, Liu FT. Analysis of the intracellular role of galectins in cell growth and apoptosis. *Methods Mol Biol*. 2015;1207:451-63.
123. Zubietta MR, Furman D, Barrio M, Bravo AI, Domenichini E, Mordoh J. Galectin-3 expression correlates with apoptosis of tumor-associated lymphocytes in human melanoma biopsies. *Am J Pathol*. 2006;168(5):1666-75.
124. Nakahara S, Oka N, Raz A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis*. 2005;10(2):267-75.
125. Robinson BS, Arthur CM, Evavold B, Roback E, Kamili NA, Stowell CS, et al. The Sweet-Side of Leukocytes: Galectins as Master Regulators of Neutrophil Function. *Front Immunol*. 2019;10:1762.
126. Pugliese G, Iacobini C, Pesce CM, Menini S. Galectin-3: an emerging all-out player in metabolic disorders and their complications. *Glycobiology*. 2015;25(2):136-50.
127. Enzerink A, Vaheri A. Fibroblast activation in vascular inflammation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011;9(4):619-26.
128. Song CJ, Zimmerman KA, Henke SJ, Yoder BK. Inflammation and Fibrosis in Polycystic Kidney Disease. *Results Probl Cell Differ*. 2017;60:323-44.
129. Hara A, Niwa M, Kanayama T, Noguchi K, Niwa A, Matsuo M, et al. Galectin-3: A Potential Prognostic and Diagnostic Marker for Heart Disease and Detection of Early Stage Pathology. *Biomolecules*. 2020;10(9).

130. Amin HZ, Amin LZ, Wijaya IP. Galectin-3: a novel biomarker for the prognosis of heart failure. *Clujul Med.* 2017;90(2):129-32.
131. de Boer RA, Voors AA, Muntendam P, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. *Eur J Heart Fail.* 2009;11(9):811-7.
132. Gibb AA, Lazaropoulos MP, Elrod JW. Myofibroblasts and Fibrosis: Mitochondrial and Metabolic Control of Cellular Differentiation. *Circ Res.* 2020;127(3):427-47.