

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISILOGIA E FARMACOLOGIA
LABORATÓRIO DE ANGIOGÊNESE

PAPEL DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CCR2 SOBRE OS EVENTOS
VASCULARES E CELULARES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA
INTERAÇÃO IMPLANTE/ HOSPEDEIRO EM CAMUNDONGOS

ALUNA: Pollyana Ribeiro Castro

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Silvia Passos Andrade

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Lucíola da Silva Barcelos

BELO HORIZONTE

2016

POLLYANA RIBEIRO CASTRO

**PAPEL DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CCR2 SOBRE OS EVENTOS
VASCULARES E CELULARES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA
INTERAÇÃO IMPLANTE/ HOSPEDEIRO EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia
da Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sílvia Passos Andrade

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucíola da Silva Barcelos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BELO HORIZONTE

2016

043 Castro, Pollyana Ribeiro.

Papel do receptor de quimiocina CCR2 sobre os eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória na interação implante/ hospedeiro em camundongos [manuscrito] / Pollyana Ribeiro Castro. - 2016.

137 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Passos Andrade. Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucíola da Silva Barcelos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Implantes experimentais. 2. Resposta inflamatória. 3. Receptores CCR2. 4. Fisiologia e farmacologia. I. Andrade, Silvia Passos. II. Barcelos, Lucíola da Silva. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612:615

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora: Prof^a. Dr^a. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitoria de Pós-Graduação

Pró-Reitor: Prof. Dr. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Diretora: Prof^a. Dr^a. Andréa Mara Macedo

Vice-Diretor: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia

Coordenadora: Prof^a. Dr^a. Miriam Teresa Paz Lopes

Sub-coordenador: Prof. Dr. Christopher Kushmerick

Trabalho realizado no Laboratório de Angiogênese, Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

“A biologia molecular tem sido utilizada para fragmentar o homem em seus menores componentes – genes, proteínas e outras tantas moléculas – precisamos, agora, saber como juntar estes pedaços novamente. E é isto o que a fisiologia faz.”

(Prof. Denis Noble)

A Deus primeiramente, à minha família por me incentivar e aos mestres por acreditarem no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me iluminou, deu força e sabedoria nos momentos de dúvidas, fraquezas e dificuldades.

Aos meus pais pelo carinho, paciência e dedicação nas épocas tumultuadas e por sempre acreditarem em mim. Amo vocês!

Às professoras Silvia Passos Andrade e Lucíola da Silva Barcelos pela oportunidade, disponibilidade e pelos valiosos ensinamentos na área de fisiologia.

Ao professor Mark Slevin pela oportunidade, atenção e empenho durante o meu doutorado sanduíche na Manchester Metropolitan University e pelas valiosas discussões e partilha do conhecimento científico.

Ao Doutor Donghui Liu da Manchester Metropolitan University pelas discussões científicas e colaborações.

Aos professores Ricardo Gonçalves, Paula Peixoto Campos, Mônica Diniz pelas valiosas discussões e colaborações.

Aos colegas do Laboratório de Angiogênese e Apoptose pela convivência agradável, amizade e colaboração nos experimentos.

Aos meus irmãos e família por todo carinho, cuidado e compreensão.

Ao João Luiz pelo companheirismo, carinho e paciência.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação e professores dos departamentos de Fisiologia/ Biofísica e Farmacologia do ICB-UFMG.

Às fontes de apoio à pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (Capes); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG); Instituto de Ciência e Tecnologia em Nanobiofarmacêutica (INCT-NanoBiofar).

A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho meus sinceros agradecimentos!

LISTA DE ABREVIATURAS

| Abreviatura | Significado |
|--------------------|--|
| CCL2/ JE | Quimiocina ligante 2 |
| CCR2 | Receptor de quimiocina ligante 2 |
| KO | Animal nocaute |
| c-Kit | Receptor de tirosina cinase proto-oncogene KIT |
| CPE | Célula progenitora endotelial |
| CTH | Célula tronco hematopoiética |
| CXCL1 | Quimiocina ligante 1 (motivo C-X-C) |
| FSC | Dispersão frontal do laser |
| Lin | Coquetel linhagem positiva |
| MPO | Mieloperoxidase |
| NAG | N-acetil- β -D- glicosaminidase |
| NO | Óxido nítrico |
| Sca-1 | Antígeno de células tronco 1 |
| SEM | Erro padrão da média |
| SSC | Dispersão lateral do laser |
| TGF- β 1 | Fator de crescimento transformante β 1 |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral α |
| VEFG | Fator de crescimento do endotélio vascular |
| WT | Animal selvagem |

As demais abreviaturas e siglas foram explicadas quando citadas pela primeira vez no texto.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação temporal da resposta do hospedeiro frente a implantes.
- Figura 2.** Estrutura das classes de quimiocinas.
- Figura 3.** Diagrama mostrando as interações existentes entre ligantes e receptores no sistema de quimiocinas.
- Figura 4.** Modelo de implante de esponja modificado por Andrade *et al* (1987).
- Figura 5.** Técnica de citometria de fluxo.
- Figura 6.** Diagrama esquemático para um ensaio de citometria de fluxo utilizando tecidos sólidos.
- Figura 7.** Efeitos da administração de CCL2/JE sobre a vascularização e influxo de células inflamatórias em implantes de esponja.
- Figura 8.** Número de animais utilizados por teste e número total de animais utilizados no estudo dos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória na interação implante/ hospedeiro em camundongos.
- Figura 9.** Técnica de implantação dos discos de esponja.
- Figura 10.** Esquema representando a técnica de difusão da fluoresceína sódica.
- Figura 11.** Padronização de protocolos de digestão enzimática para isolamento de células em implantes de esponja.
- Figura 12.** Painel de anticorpos utilizados para imunofenotipagem de células intrainplante e sangue de camundongos KO e WT.

- Figura 13.** Fotomicrografia trans-iluminada do padrão vascular de implantes de esponja WT e KO (14 dias).
- Figura 14.** Fluxo sanguíneo em implantes WT e KO
- Figura 15.** Tempo de curso do conteúdo de hemoglobina (Hb) em implantes WT e KO.
- Figura 16.** Tempo de curso dos níveis de VEGF em implantes WT e KO.
- Figura 17.** Tempo de curso da atividade da mieloperoxidase (MPO) em implantes WT e KO como uma medida indireta do acúmulo de neutrófilos.
- Figura 18.** Tempo de curso da atividade da enzima N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) em implantes WT e KO como uma medida indireta do acúmulo de monócitos/macrófagos.
- Figura 19.** Níveis de nitrito em implantes WT e KO como uma medida indireta da produção de NO.
- Figura 20.** Tempo de curso da produção de TNF- α em implantes WT e KO.
- Figura 21.** Tempo de curso da produção de CCL2/JE em implantes WT e KO.
- Figura 22.** Tempo de curso da produção de CXCL1/KC em implantes WT e KO.
- Figura 23.** Tempo de curso da produção de TGF- β 1 em implantes WT e KO.
- Figura 24.** Fibrogênese em implantes WT e KO.
- Figura 25.** Análise densitométrica do colágeno total em implantes WT e KO.
- Figura 26.** Quantificação de colágeno solúvel em implantes WT e KO.
- Figura 27.** Células gigantes em implantes WT e KO.
- Figura 28.** Leitura FSC-A x SSC-A de células isoladas de implantes WT

submetidos a diferentes protocolos de digestão enzimática.

- Figura 29.** Contagem do número de células totais e viáveis em implantes WT submetidos a diferentes protocolos de digestão enzimática.
- Figura 30.** Citometria de fluxo – estratégia de análise para definir a população de células marcadas com anticorpos do painel 1 (anti-Lin, Sca-1, c-Kit, VEGFR2 e CD31) isoladas do sangue periférico de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO implantados.
- Figura 31.** Citometria de fluxo – estratégia de análise para definir a população de células marcadas com anticorpos do painel 1 (anti-Lin, Sca-1, c-Kit, VEGFR2 e CD31) isoladas de implantes de 7 dias de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO.
- Figura 32.** Citometria de fluxo – estratégia de análise para definir a população de células marcadas com anticorpos do painel 2 (anti-CD45, F4/80, CD11b, Ly6C, Ly6G) isoladas de implantes de 7 dias de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO.
- Figura 33.** Imunofenotipagem de células do sangue periférico de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO implantados.
- Figura 34.** Imunofenotipagem de células isoladas de implantes de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO implantados.
- Figura 35.** Imunofenotipagem de células isoladas de implantes de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO.

SUMÁRIO

| | |
|---|---------|
| 1. INTRODUÇÃO | Pág. 01 |
| 1.1. Biomateriais | Pág. 02 |
| 1.2. Interação e resposta do organismo aos biomateriais. | Pág. 03 |
| 1.3. Quimiocinas | Pág. 07 |
| 1.4. Receptores de quimiocinas | Pág. 10 |
| 1.5. CCR2 e interação implante/ hospedeiro | Pág. 12 |
| 1.6. Modelos experimentais para o estudo da interação implante/ hospedeiro | Pág. 16 |
| 1.7. Animais knockout | Pág. 17 |
| 1.8. Modelo de implante de esponja | Pág. 18 |
| 1.9. Citometria de fluxo | Pág. 20 |
| 1.10. Imunofenotipagem celular em implantes | Pág. 24 |
| 2. JUSTIFICATIVA | Pág. 27 |
| 3. OBJETIVOS | Pág. 31 |
| 3.1. Objetivo geral | Pág. 32 |
| 3.2. Objetivos específicos | Pág. 32 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | Pág. 34 |
| 4.1. Animais | Pág. 35 |
| 4.2. Técnica do implante de esponja | Pág. 36 |
| 4.2.1. Confeccção e preparo dos discos de esponja | Pág. 36 |
| 4.2.2. Implante de esponja em camundongos | Pág. 37 |
| 4.2.3. Remoção do implante | Pág. 38 |

| | |
|---|----------------|
| 4.3. Avaliação de parâmetros angiogênicos | Pág. 38 |
| 4.3.1. Dosagem de hemoglobina | Pág. 38 |
| 4.3.2. Avaliação do fluxo sanguíneo por imagem de perfusão por Laser Doppler | Pág. 39 |
| 4.3.3. Avaliação do fluxo sanguíneo pela técnica de difusão da fluoresceína sódica | Pág. 40 |
| 4.4. Avaliação de parâmetros inflamatórios | Pág. 41 |
| 4.4.1. Análise da atividade da mieloperoxidase (MPO)..... | Pág. 41 |
| 4.4.2. Análise da atividade da N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG)..... | Pág. 42 |
| 4.4.3. Dosagem de nitrito | Pág. 43 |
| 4.5. Avaliação de parâmetros fibrogênicos | Pág. 43 |
| 4.5.1. Quantificação de colágeno solúvel..... | Pág. 44 |
| 4.6. Dosagem de citocinas | Pág. 44 |
| 4.7. Análises histológicas e colorações | Pág. 45 |
| 4.8. Padronização de protocolos de digestão enzimática de implantes de esponja | Pág. 46 |
| 4.9. Citometria de fluxo | Pág. 48 |
| 4.9.1. Coleta e preparo das amostras | Pág. 48 |
| 4.9.1.1. Sangue periférico | Pág. 48 |
| 4.9.1.2. Implantes de esponja | Pág. 49 |
| 4.10. Imunofenotipagem por citometria de fluxo | Pág. 50 |
| 4.10.1. Análises..... | Pág. 51 |
| 4.11. Análises estatísticas | Pág. 51 |

| | |
|---|-----------------|
| 5. RESULTADOS | Pág. 53 |
| 5.1. Cinética da angiogênese induzida por implante de esponja | Pág. 55 |
| 5.2. Cinética da inflamação induzida por implante de esponja | Pág. 58 |
| 5.3. Cinética da fibrogênese induzida por implante de esponja | Pág. 64 |
| 5.4. Padronização de protocolos de digestão enzimática em implantes de esponja | Pág. 69 |
| 5.5. Imunofenotipagem por citometria de fluxo | Pág. 71 |
| 5.5.1. Estratégia de análise..... | Pág. 71 |
| 5.5.2. Imunofenotipagem celular de implantes de esponja e sangue periférico de camundongos..... | Pág. 76 |
| 6. DISCUSSÃO | Pág. 81 |
| 7. CONCLUSÕES | Pág. 100 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | Pág. 103 |
| 9. ANEXOS | Pág. 136 |
| 9.1. Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CETEA)..... | Pág. 137 |
| 9.2. Artigo publicado | Pág. 138 |

RESUMO

Interações entre implantes sintéticos e hospedeiro podem induzir uma resposta inflamatória persistente denominada reação do tipo “corpo estranho” que pode ser modulada por diversos componentes inflamatórios como o Receptor de quimiocina ligante 2 (CCR2). Neste trabalho utilizamos camundongos com deleção gênica do CCR2 com o objetivo de caracterizar o papel deste receptor sobre eventos celulares, inflamatórios e vasculares durante a interação implante/hospedeiro em camundongos. Foi avaliada a cinética das alterações vasculares, inflamatórias e fibrogênicas em discos de poliéter-poliuretano removidos 1, 4, 7 e 14 dias pós-implante em camundongos selvagens (WT) e *Knockout* (KO). Foi observado menor fluxo tanto na pele como nos implantes de camundongos KO, além disso, menor conteúdo de hemoglobina (índice vascular) foi encontrado nestes implantes. O acúmulo de neutrófilos foi maior em implantes KO e o acúmulo de macrófagos parece ser menor nestes implantes. Os níveis de CCL2/JE intrainplante foram maiores em implantes KO, mas TGF- β 1, deposição de colágeno e número de células gigante foram menores em implantes de animais KO quando comparados aos implantes de animais WT. A imunofenotipagem revelou que células presentes em implantes e no sangue periférico de animais WT e KO expressam marcadores de superfície celular característicos de células tronco e progenitoras e a deleção do CCR2 levou à maior expressão destes marcadores no sangue periférico de camundongos KO. O sistema experimental utilizado neste estudo contribui para a melhor compreensão do papel do CCR2 sobre eventos vasculares, inflamação, fibrogênese e expressão de marcadores de superfície celular durante a interação implante/ hospedeiro em camundongos.

ABSTRACT

Host and synthetic implants interactions may induce an inflammatory response so called “foreign body” reaction that could be modulated by a range of inflammatory mediators such as Chemokine Receptor 2 (CCR2). In this study, using mice with gene deletion of CCR2 we analysed the role of this receptor on cellular, inflammatory and vascular events during the host/implant interactions in mice. The kinetics of vascular, inflammatory and fibrogenic alterations in polyether-polyurethane discs removed at 1, 4, 7 and 14 days post-implantation in wild type (WT) and knockout (KO) mice was evaluated. It was observed a lower blood flow in both skin and KO implants. Haemoglobin content (vascular index) was lower in implants from KO mice compared with that from wild type counterparts. Neutrophils accumulation was higher in KO implants, but macrophages accumulation was apparently decreased in these implants. CCL2 levels were higher in KO implants, but TGF- β 1, collagen deposition and giant cells number were lower in KO implants compared to WT implants. Immunophenotyping evaluated by flow cytometry revealed that both, implants and peripheral blood from WT and KO mice expressed characteristic cell surface markers of stem and progenitor cells. In addition, CCR2 deletion led to increased expression of these markers in cells of peripheral blood from KO mice. The experimental system used in this study has contributed to a better understanding of the CCR2 role on vascular, inflammatory, fibrogenic events and cell surface markers expression during implant/host interactions in mice.

1. Introdução

▪ **1. INTRODUÇÃO**

1.1. Biomateriais

O objetivo final de diversos procedimentos cirúrgicos, desde épocas remotas, tem sido o reparo de órgãos e tecidos. Este reparo pode ser realizado de duas principais formas: através do enxerto de tecidos biológicos ou por meio da substituição do tecido lesionado por algum material sintético biocompatível (HOLLISTER, 2005).

O enxerto de tecidos está amplamente associado à morbidade, além disso, a quantidade limitada de materiais restringe o seu uso. Por outro lado, os denominados biomateriais têm sido cada vez mais utilizados na prática clínica e durante procedimentos cirúrgicos com o intuito de restaurar ou aprimorar a função e estrutura de órgãos e tecidos comprometidos (DAROUICHE, 2004; ZIMMERLI & SENDI, 2011; DiEGIDIO *et al.*, 2014).

Dentro deste contexto, os biomateriais podem ser definidos como sendo qualquer material utilizado para substituir, integral ou parcialmente, sistemas biológicos (WILLIAMS, 1987; TATHE *et al.*, 2010). Além disso, estes materiais se distinguem dos demais devido a sua capacidade de estar em contato com os tecidos sem causar danos de grau extenso aos sistemas biológicos (WILLIAMS, 1987).

Avanços nos campos da ciência de biomateriais e engenharia tecidual têm possibilitado o desenvolvimento de novos materiais com aplicações clínicas e graus de sofisticação diversos. De fato, a medicina regenerativa tem se beneficiado das diversas aplicações dos biomateriais, dentre as quais podemos destacar o uso de dispositivos cardiovasculares como os *stents* e valvas cardíacas, implantes ortopédicos e dentários, lentes de contatos e próteses retiniais, bioeletrodos e biosensores, suturas, tecidos substitutivos análogos à pele e sistemas controlados para a liberação de fármacos (HUEBSCH & MOONEY, 2009; DiEGIDIO *et al.*, 2014; REZAIE *et al.*, 2015).

Muitos avanços têm ocorrido no campo de estudo da ciência dos biomateriais e diversos pesquisadores têm concentrado esforços em solucionar importantes questões relacionadas ao uso de implantes na prática clínica. Desta forma, os principais desafios encontrados são os que se referem ao desenho e seleção de materiais biocompatíveis e a determinação dos efeitos biológicos e interações existentes entre implantes e o hospedeiro (KOHANE & LANGER, 2008; TATHE *et al.*, 2010).

1.2. Interação e resposta do organismo aos biomateriais

Embora os biomateriais sejam desenvolvidos para serem biocompatíveis tanto física como quimicamente, eles não são considerados inertes pelo organismo (LASCHKE *et al.*, 2005). Quando implantados, eles podem induzir

uma resposta inflamatória persistente denominada reação do tipo “corpo estranho”, acompanhada de um processo semelhante ao de reparo tecidual com intensa angiogênese, ativação de fibroblastos e remodelamento de matriz (KIRKPATRICK *et al.*, 2002; MORAIS *et al.*, 2010). Esta resposta, considerada homeostática, ocorre principalmente devido à lesão tecidual causada pelo contato do implante com o tecido e por interações existentes entre a interface implante/tecido (WILLIAMS, 1987; ANDERSON, 2001).

A intensidade da resposta do organismo ao implante depende das propriedades do material implantado, tais como composição, duração do contato, taxa de degradação, morfologia, porosidade, aspereza, forma, tamanho, esterilidade e superfície química do biomaterial (MORAIS *et al.*, 2010). Outros fatores como a extensão da lesão, perda de estruturas membranosas, formação de matriz extracelular, grau de necrose celular e extensão da resposta inflamatória também influenciam na resposta (ANDERSON, 2001).

Ao ser implantado, o biomaterial entra em contato com o tecido adjacente e desencadeia uma cascata de respostas inflamatórias semelhante ao que ocorre durante o reparo tecidual (ANDERSON, 2001; MITCHELL & COTRAN, 2002). Esta cascata de respostas caracteriza-se por um processo dinâmico regulado por mediadores solúveis e elementos da matriz extracelular, que envolve coordenada ativação, migração, proliferação e/ou diferenciação de células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos. Ao mesmo tempo, vigorosa

resposta angiogênica é essencial para promover um reparo tecidual eficiente, pois além de fornecer nutrientes, permitir a migração de células inflamatórias, facilitar a remoção de material residual, ela auxilia no desenvolvimento do tecido de granulação (NISSEN *et al.*, 1998; LINGEN, 2001).

A sequência de eventos associados à resposta do tipo corpo estranho é iniciada tão logo o implante entre em contato com fluidos e tecidos do hospedeiro (Figura 1). Inicialmente há uma adsorção de proteínas do hospedeiro ao longo da superfície do implante em combinação com a geração de detritos celulares e agregação plaquetária. Fatores plaquetários reconhecem a superfície do material recoberta de proteínas e estimula a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos/ macrófagos para o local do implante. Estas células, por sua vez, produzem espécies reativas de oxigênio, enzimas, citocinas, quimiocinas e outros mediadores solúveis (GRAINGER, 2013).

Os macrófagos recrutados para a área do implante se fusionam dando origem a células multinucleadas denominadas “células gigantes do tipo corpo estranho”. Paralelamente, ocorrem apoptose e fagocitose de neutrófilos e produção e secreção de moléculas de sinalização pelos macrófagos levando ao recrutamento de fibroblastos que produzem e depositam colágeno ao redor do implante podendo ocasionar alterações funcionais e falhas na adaptação do implante ao hospedeiro (SHEIKH *et al.* 2015).

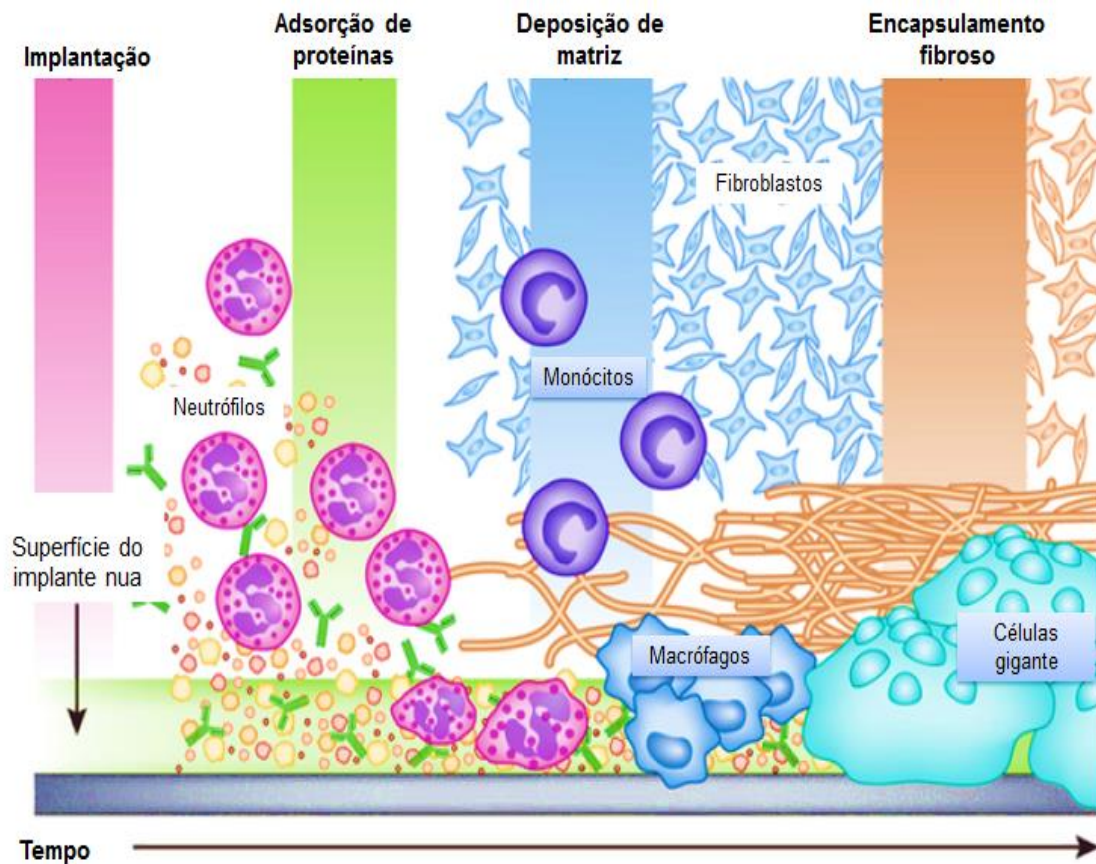


Figura 1. Representação temporal da resposta do hospedeiro frente a implantes. Ao entrar em contato com o hospedeiro uma série de eventos celulares são desencadeados levando à adsorção de proteínas do hospedeiro na superfície do implante, recrutamento de células inflamatórias, deposição de matriz, ativação e recrutamento de fibroblastos, formação de células gigantes e, por fim, encapsulação do implante. Adaptado de Grainger, 2013.

A sequência das respostas celulares desencadeadas pelo hospedeiro frente à implantação de um material são orquestradas e moduladas por diversos mediadores que se encontram na matriz provisória formada durante a reação do tipo corpo estranho (SHEIKH *et al.*, 2015). Os fatores de crescimento e agentes quimiotáticos são responsáveis pelas alterações celulares observadas pós-implantação de materiais.

1.3. Quimiocinas

As quimiocinas compreendem uma família multifuncional de citocinas de baixo peso molecular (~8-14 KDa) estruturalmente relacionadas e que apresentam atividade biológica comum: o controle da migração direcional de leucócitos (PROUDFOOT *et al.*, 2011). Além disso, elas desempenham papel crítico no desenvolvimento, homeostase e função do sistema imunológico (ZLOTNIK & YOSHIE, 2000).

Até o momento, aproximadamente 50 quimiocinas foram identificadas, e a maioria delas apresentam uma estrutura terciária similar que consiste em uma extremidade amino terminal, seguida de uma longa alça e uma extremidade carboxi terminal. Além disso, a maioria das quimiocinas possuem quatro resíduos de cisteína conservados (ALLEN *et al.*; 2007; PROUDFOOT & UGUCCIONI, 2016). Morfologicamente, as quimiocinas são classificadas em quatro diferentes subfamílias: quimiocinas C, CC, CXC e CX₃C (Figura 2), onde, C representa a cisteína e X ou X₃ representa um ou três aminoácidos, respectivamente (ALLEN *et al.*, 2007; BLANCHET *et al.*, 2012; MUNNIK *et al.*, 2015).

Como exceção, apenas as quimiocinas da família C apresentam dois resíduos de cisteína sendo que as demais subfamílias apresentam quatro resíduos de cisteína, e, diferem entre si pela presença ou não de aminoácidos inseridos entre estes resíduos. Quimiocinas da família CC não apresentam

aminoácidos inseridos entre as duplas de cisteína, já as famílias CXC e CX₃C possuem um ou três aminoácidos localizados entre os resíduos de cisteína, respectivamente (BLANCHET *et al.*, 2012; MUNNIK *et al.*, 2015).

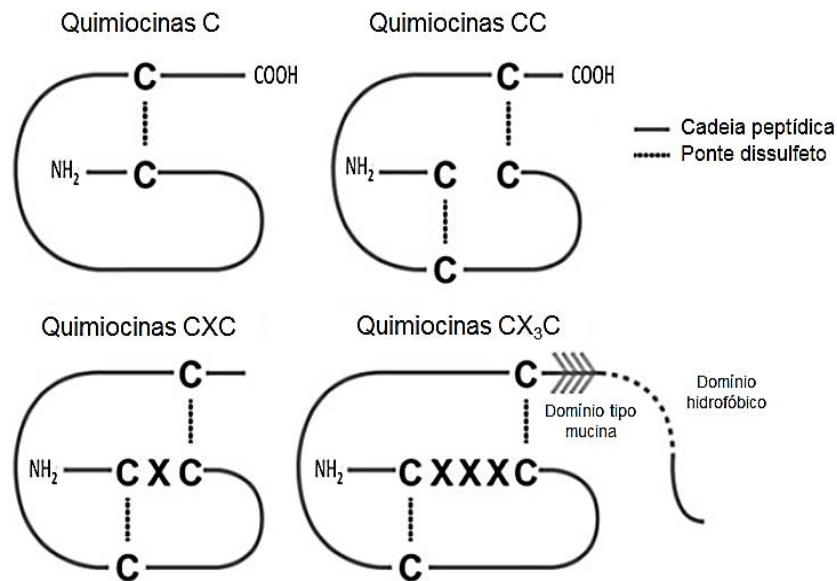


Figura 2. Estrutura das classes de quimiocinas. As quimiocinas são classificadas em quatro famílias de acordo com o número e organização espacial de resíduos cisteína na extremidade N-terminal. Adaptado de Rees *et al.*, 2015.

As quimiocinas da subfamília CXC atuam, principalmente, no recrutamento de leucócitos polimorfonucleares, como os neutrófilos. Além disso, algumas destas quimiocinas possuem uma sequência tripeptídica Glu-Leu-Arg (ELR), o que as tornam potentes agentes angiogênicos e quimiotáticos (CHARO & RANSOHOFF, 2006; SOLDEVILA & GARCIA-ZEPEDA, 2007). Algumas quimiocinas CXC não possuem a sequência ELR e são, portanto, agentes angiostáticos por inibirem o crescimento e progressão

tumoral (ROSSI & ZLOTINIK, 2000; CHARO & RANSOHOFF, 2006; SOLDEVILA & GARCIA-ZEPEDA, 2007).

As quimiocinas CC atuam, predominantemente, na ativação de monócitos, linfócitos, eosinófilos e basófilos e são importantes mediadores dos processos inflamatórios crônicos e alérgicos, além de participarem do processo de proliferação de células hematopoiéticas e migração de células tumorais (CHARO & RANSOHOFF, 2006; SOLDEVILA & GARCIA-ZEPEDA, 2007).

Menos estudadas, as subfamílias C e CX₃C, possuem cada qual um único membro em cada família já identificado: as quimiocinas linfotactina e fractalcina, respectivamente. A linfotactina atua como agente quimiotático para linfócitos, sobretudo de células efetoras como células NK e linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T auxiliares (T CD4⁺). Já a fractalcina ou neurotactina é quimiotática para células mononucleares do sangue periférico (ROSSI & ZLOTINIK, 2000; DAVID, 2000).

De forma alternativa, as quimiocinas podem ser classificadas com base nas funções biológicas que desempenham, sendo consideradas inflamatórias ou homeostáticas. As quimiocinas inflamatórias são aquelas cuja expressão é induzida em resposta a condições inflamatórias, ao passo que as quimiocinas homeostáticas são constitutivamente expressas e estão envolvidas em diversos processos fisiológicos (BLANCHET *et al.*, 2012; MUNNIK *et al.*, 2015).

As quimiocinas inflamatórias controlam o recrutamento de leucócitos durante estados infecciosos, inflamação, dano tecidual e durante o processo

tumoral. As quimiocinas homeostáticas, por outro lado, induzem a maturação do sistema imunológico, além de contribuírem para a hematopoiese e vigilância imunológica de tecidos periféricos. Embora esta classificação tenha sido proposta, atualmente, diversos estudos têm indicado que algumas quimiocinas apresentam um papel dual, participando tanto de funções de defesa como de funções homeostáticas (MOSER *et al.*, 2004).

Em adição, as quimiocinas exercem suas funções biológicas ao interagirem com receptores localizados em diversos tipos celulares tais como, células endoteliais, musculares, epiteliais e parenquimais (MACKAY, 2001; BERNARDINI *et al.*, 2003; ROT & VON ANDRIAN, 2004).

1.4. Receptores de quimiocinas

As respostas celulares desencadeadas pelas quimiocinas são mediadas por receptores com sete hélices transmembranares (7 TM) acoplados à proteína G (GPCR) (ZLOTNIK & YOSHIE, 2000). Quando estimulados pelas quimiocinas, as subunidades de proteína G estimulam a ativação da fosfolipase C β (PLC β), levando à formação de inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), que por sua vez, estimulam a liberação de cálcio e ativação de proteína cinase C (PKC). A PKC, então, desencadeia uma cascata de eventos intracitoplasmáticos e nucleares, levando a efeitos biológicos como o estímulo

da quimiotaxia, rearranjo do citoesqueleto, adesão e migração de células ativadas (THELEN, 2001; MOSER *et al.*, 2004; JIN *et al.*, 2008).

Os receptores de quimiocinas são classificados de acordo com os ligantes aos quais interagem. Desta forma, encontramos os receptores XCR, CCR, CXCR e receptores CX₃CR que se ligam à quimiocinas das subfamílias C, CC, CXC e CX₃C, respectivamente (PROUDFOOT *et al.* 2011). As interações entre ligante/receptor são específicas no que diz respeito ao padrão de ligação, onde, quimiocinas de uma mesma família não se ligam aos receptores de outra família. Entretanto, pode-se observar na Figura 3, dentro de uma mesma subfamília, uma ou mais quimiocinas que se ligam a um mesmo receptor, demonstrando certo antagonismo e “promiscuidade” nas interações existentes no sistema de quimiocinas (PROUDFOOT *et al.*, 2011).

Considerando outra perspectiva, a aparente “promiscuidade” e redundância deste sistema podem indicar uma complexa e aprimorada via de regulação dos processos biológicos, em que, uma sinalização única e partilhada de eventos coordena a regulação de diversos processos (OPPERMANN, 2004).

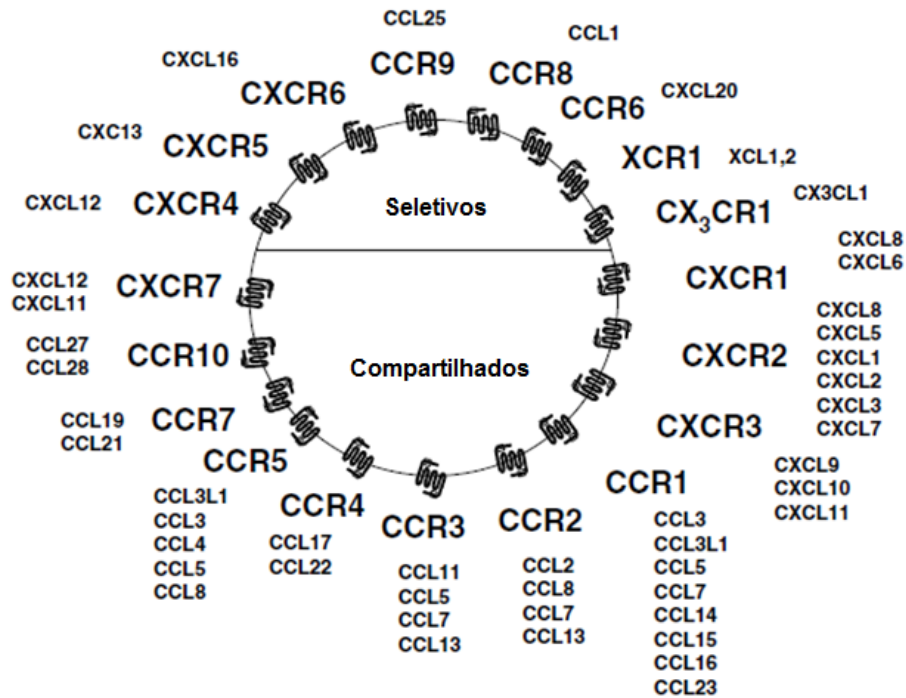


Figura 3. Diagrama mostrando as interações existentes entre ligantes e receptores no sistema de quimiocinas. Alguns receptores são muito seletivos e aceitam apenas um ligante, ao passo que receptores como o CCR2 aceitam diversos outros ligantes. Adaptado de Proudfoot *et al.*, 2011.

Desta forma, uma fina regulação do sistema de quimiocinas desempenha papel crucial no desenvolvimento da resposta imune e uma vez que haja comprometimento nas interações ligantes/receptores, processos biológicos podem ser afetados. As quimiocinas são, portanto, importantes mediadores na exacerbação de condições patológicas, respostas alérgicas, doenças autoimunes e desordens inflamatórias.

1.5. CCR2 e interação implante/ hospedeiro

A implantação de um material biológico e/ou sintético induz uma resposta inflamatória persistente no local da implantação que compromete o funcionamento de implantes (MORAIS *et al.*, 2010). As quimiocinas e seus receptores desempenham um importante papel na modulação desta resposta por promover o recrutamento e ativação de diversos tipos celulares (células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos) responsáveis por desencadear respostas apropriadas (TSIROGIANNI *et al.*, 2006; ARAI *et al.*, 2013).

O receptor de quimiocina CCR2 e seu principal ligante, a quimiocina CCL2, durante as interações implante/ hospedeiro, são responsáveis por recrutar e ativar monócitos/ macrófagos (SAKAI *et al.*, 2006; STAMATOVIC *et al.*, 2006). Os macrófagos secretam fatores de crescimento e mediadores inflamatórios que estimulam a deposição de matriz extracelular e a formação de novos vasos sanguíneos, sendo, portanto, cruciais para o sucesso da integração implante/ hospedeiro (NAYAK *et al.*, 2009; THURAISINGAM *et al.*, 2010). Além disso, contribuem para o estabelecimento e manutenção do sistema vascular funcionando por induzirem a liberação de fatores angiogênicos e de crescimento (RICKERT *et al.*, 2003).

Entretanto, se por um lado, os macrófagos contribuem para a integração do implante ao hospedeiro, por colaborarem no processo de formação da rede vascular, por outro, eles podem induzir o isolamento do implante ao estimular a encapsulação através do aumento da deposição de colágeno o que pode

comprometer a adaptação funcional ao organismo (ANDERSON, 2001; KYRIAKIDES & BORNSTEIN, 2003).

Portanto, é esperado, que alterações na produção da quimiocina e/ou seu receptor, bem como em suas interações, resultem em alterações biológicas nos mediadores e nas respostas celulares observadas durante a interação implante/hospedeiro (NOVAK & KOH, 2013). De fato, camundongos com deleção gênica do receptor CCR2 apresentam uma redução marcante na adesão de leucócitos e no recrutamento de monócitos para áreas lesionadas (KUZIEL *et al.*, 1997; BORING *et al.*, 1997). Além disso, Kyriakides *et al.*, (2004) investigaram o efeito da exclusão do ligante CCL2 na reação tipo corpo estranho em camundongos e constataram que a implantação de matriz sintética de polivinil e de discos de Millipore induziram uma resposta menos intensa (menor número de células gigantes).

Ademais, diversos estudos têm demonstrado que a deleção gênica do CCR2 em camundongos altera componentes importantes da resposta do hospedeiro ao implante, tais como a fibrogênese e vascularização pós-implantação de dispositivos sintéticos. Camundongos *knockout* para o CCR2 apresentaram redução da fibrogênese e menor deposição de colágeno em modelos de úlcera de pressão, em lesão pulmonar e em feridas cutâneas (SAITO *et al.*, 2008; EKERT *et al.*, 2011; WILLENBORG *et al.*, 2012). Também foi demonstrado que o CCR2 modulou processos fibróticos crônicos e o reparo

tecidual em tecidos incluindo pele, pulmão, coração e rim (KIM *et al.*, 2005; KYRIAKIDES *et al.*, 2004; SAKAI *et al.*, 2006).

Em relação à vascularização de implantes, camundongos com deleção gênica do CCR2 (CCR2 KO) apresentaram prejuízo no recrutamento e mobilização de células tronco hematopoiéticas (CTH's) e células progenitoras endoteliais (CPE's), comprometendo o reparo tecidual hepático, muito provavelmente, por apresentarem um mecanismo de neoformação vascular ineficiente (SI *et al.*, 2010). De fato, Stamatovic *et al.* (2006) demonstraram que CCR2 participa de forma direta no processo angiogênico por ativar mecanismos moleculares que estimulam a proliferação e migração de células endoteliais *in vivo*.

Embora estudos importantes e esclarecedores tenham sido conduzidos, demonstrando a importância do eixo CCR2/ CCL2 na coordenação de eventos associados à interação implante/hospedeiro, a literatura ainda carece de estudos que estabeleçam o papel complexo do CCR2 durante a reação do organismo frente a implantes cirúrgicos. Desta forma, novas abordagens experimentais são necessárias visando sanar esta lacuna e permitir maior compreensão dos efeitos do CCR2 durante a resposta do tipo corpo estranho.

1.6. Modelos experimentais para o estudo da interação implante/hospedeiro

O uso de modelos animais para o estudo das interações existentes entre o hospedeiro e materiais sintéticos tem contribuído para a compreensão das respostas biológicas geradas por muitos dispositivos implantáveis em uso atualmente. Os testes em animais, desta forma, desempenham papel crucial na avaliação da eficácia e segurança dos implantes (NATIELLA, 1988). Os modelos animais são, portanto, ferramentas chave de muitos estudos de implantes clínicos e a espécie ideal de cobaia a ser utilizada depende da especificidade do implante testado e da intenção de uso (WANCKET, 2015).

Testes iniciais de laboratório devem ser conduzidos para avaliar a relevância biológica de uma estrutura implantável. Neste estágio, geralmente utilizam-se combinações de testes *in vitro* e *in vivo* e o modelo animal deve ser capaz de fornecer informações iniciais de como o implante pode afetar a fisiologia do animal e quais respostas são desencadeadas pelo hospedeiro. Para estes testes são utilizados animais de pequeno porte (roedores e coelhos) e preferencialmente que incluam animais que mimetizem condições humanas específicas, como por exemplo, animais transgênicos ou *knockout* (WANCKET, 2015).

Na literatura encontram-se vários modelos experimentais *in vivo* desenvolvidos para o estudo dos mecanismos e respostas desencadeadas

pelo hospedeiro frente a dispositivos implantados. Modelos murinos de animais *knockout* têm sido utilizados para determinar a importância de metaloproteinases, citocinas e moléculas de sinalização no desenvolvimento da reação do tipo corpo estranho (KHOUW *et al.*, 2000; HU *et al.*, 2001; KHEIR *et al.*, 2011). Além disso, modelos de implantes cirúrgicos para o estudo da desta reação o tem sido utilizados, incluindo modelos de bolsa de ar subcutânea (TAKAHASHI *et al.*, 2010), implantação de matrizes sintéticas na parede abdominal e intraperitoneal (MOONEY *et al.*, 2010; CASTRO *et al.*, 2012) e modelo de implantação de esponja (CASTRO *et al.*, 2014; OVIEDO-SOCARRÁS *et al.*, 2014). Cada qual apresentando vantagens e desvantagens na avaliação das respostas frente aos implantes.

1.7. Animais knockout

A manipulação genética de camundongos representa uma importante ferramenta experimental para o estudo da função de componentes gênicos específicos em sistemas fisiológicos complexos, além de possibilitar a análise das consequências de deleções gênicas em várias condições patológicas. Além disso, o uso de camundongos *knockout* (KO) na pesquisa básica pode reproduzir modelos para o estudo de doenças humanas e permite explorar potenciais estratégias farmacológicas e abordagens de terapia gênica (HUI, 1998; AUSTIN *et al.*, 2004) .

O uso de camundongos com alterações genéticas em componentes do sistema de quimiocinas têm contribuído na elucidação de processos biológicos complexos e condições patológicas cujo componente inflamatório esteja presente, tais como durante o reparo tecidual e na reação do tipo corpo estranho (KYRIAKIDES *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2005; SAKAI *et al.*, 2006).

Estudos utilizando camundongos transgênicos *knockout* para o gene do receptor CCR2 mostraram que estes animais apresentam redução marcante na adesão de leucócitos e no recrutamento de monócitos para áreas lesionadas (KUZIEL *et al.*, 1997; BORING *et al.*, 1997). Além disso, foi também demonstrado que estes animais induzem uma resposta do tipo corpo estranho menos intensa quando comparados a animais íntegros (KYRIAKIDES *et al.*, 2002). Estes achados indicam um papel modulatório do CCR2 sobre a resposta inflamatória crônica *in vivo*.

1.8. Modelo de implante de esponja

O modelo de implantação subcutânea de esponjas em animais foi descrito inicialmente por Grindlay & Waugh (1951) e foi modificado por Andrade *et al.* (1987). As matrizes sintéticas inicialmente avasculares e acelulares são implantadas no tecido subcutâneo do animal, gerando um processo complexo dirigido inicialmente por células inflamatórias que se acumulam dentro do compartimento da esponja e posteriormente por angiogênese e deposição de

matriz extracelular (Figura 4) (ANDRADE *et al.*, 1997). Assim, uma vez que o estímulo pelo implante de esponja é persistente, tal como o observado durante a implantação de materiais sintéticos, o estudo de processos inflamatórios crônicos e da resposta do hospedeiro à implantação de dispositivos médicos podem ser mimetizados (CASTRO *et al.*, 2014; OVIEDO-SOCARRÁS *et al.*, 2014).

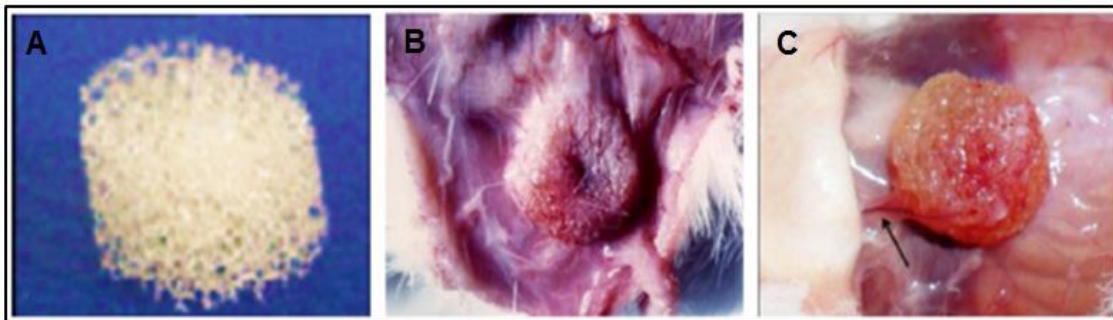


Figura 4. Modelo de implante de esponja modificado por Andrade *et al* (1987). Em A, discos de esponja pré-implantação, inicialmente acelulares. Em B, implante subcutâneo mostrando a integração do implante ao tecido subjacente e em C vascularização do implante a partir de vasos pré-existentes da pele.

Além disso, este modelo permite o estudo temporal dos vários componentes da reação do hospedeiro frente aos implantes (recrutamento e ativação de células inflamatórias, formação de células gigante, neoformação vascular e deposição de matriz extracelular) através de parâmetros bioquímicos, histológicos e morfométricos (BELO *et al.*, 2005; CAMPOS *et al.*, 2006; OVIEDO-SOCARRÁS *et al.*, 2014).

Desta forma, utilizando-se da abordagem experimental do modelo de implante de esponja aliado à técnica de criação de animais *Knockout*, é

possível estudar as funções biológicas do receptor CCR2, bem como as interações e alterações celulares existentes na interação implante/ hospedeiro.

1.9. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica analítica que permite avaliar múltiplos parâmetros de uma célula e/ou partícula em suspensão (MAECKER *et al.*, 2012). Esta técnica começou a ser utilizada para contagem de células sanguíneas, entretanto, apenas no final dos anos 80, tornou-se mais evidente, devido ao seu uso no monitoramento da proporção de células CD4/ CD8 em pacientes HIV positivos. A partir de então, a técnica se tornou bastante popular no campo biomédico, principalmente, devido à possibilidade de análise de grande número de parâmetros celulares e também pela eficiência e confiabilidade dos dados obtidos (MANZONI *et al.*, 2015).

Atualmente esta tecnologia é considerada uma importante ferramenta na determinação de componentes e propriedades de células e organelas que fluem em uma suspensão celular através de um equipamento denominado citômetro (Figura 5A). A técnica se baseia na dispersão da luz e emissão de fluorescência que ocorre quando um feixe de laser incide sobre uma partícula (amostra). O padrão de dispersão é recebido por detectores de luz posicionados frontalmente e lateralmente ao laser, o FSC (*Forward Scatter*) e o SSC (*Side Scatter*), respectivamente, gerando dados referentes ao tamanho da

célula, granulosidade e complexidade interna da célula (Figura 5B) (MITTAG & TÁRNOK, 2009; MAECKER *et al.*, 2012; ADAN *et al.*, 2016).

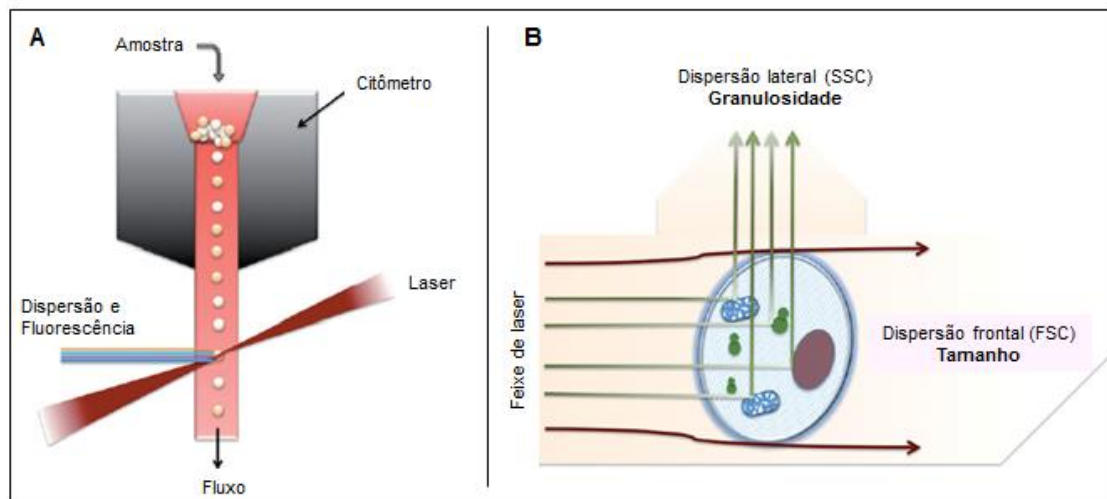


Figura 5. Técnica de citometria de fluxo. Em A, esquema básico representativo de um citômetro de fluxo. Em B, a dispersão da luz, onde FSC é proporcional ao tamanho e SSC é proporcional à granulosidade ou à complexidade celular interna. Adaptado de Adan *et al.*, 2016.

As aplicações da técnica de citometria de fluxo são inúmeras. Esta abordagem experimental pode ser utilizada para avaliar diversos componentes celulares como organelas, núcleos, DNA, RNA, cromossomos, citocinas, hormônios e proteínas. Além disso, esta metodologia tem sido utilizada na análise de proliferação e ciclo celular, avaliações de níveis de cálcio, potenciais de membrana e na identificação de diversos tipos celulares (WLODKOWIC *et al.*, 2013; ADAN *et al.*, 2016).

Para a identificação de tipos celulares específicos, as amostras devem ser incubadas com anticorpos monoclonais específicos que permitam a

identificação da célula. Nesta triagem fenotípica, denominada imunofenotipagem, os anticorpos estão conjugados a fluorocromos que são excitados pela luz do laser. No momento da excitação, eles liberam fluorescência, que é detectada pelo sistema óptico do citômetro. O uso de diferentes fluorocromos permite a identificação de marcadores celulares, e de acordo com a intensidade da fluorescência, é possível analisar a quantidade de anticorpos que está ligada a essas células (MITTAG *et al.*, 2009; NILSSON *et al.*, 2013)

Tradicionalmente, a imunofenotipagem tem sido utilizada na caracterização de subconjuntos e populações de células em tecidos como o sangue e medula óssea, e em tecidos que podem ser facilmente incorporados a uma suspensão, como o baço e linfonodo. Tecidos sólidos, e até mesmo, o tecido fibrovascular formado no interior de materiais implantados, necessitam de etapas adicionais para a análise imunofenotípica de suas populações celulares. Nestes casos, a dissociação mecânica ou enzimática destes tecidos se torna necessária e a qualidade das informações a serem obtidas, através da imunofenotipagem, depende de um rigoroso preparo das amostras, dos instrumentos de calibração e da análise dos dados (DONNENBERG & DONNENBERG, 2011).

As etapas de um típico experimento de citometria de fluxo englobam inicialmente a obtenção e preparo da amostra, configuração dos instrumentos (citômetros e computadores), aquisição e análise de dados. Para boa acurácia

e reprodutibilidade do experimento todas as etapas devem ser cuidadosamente padronizadas e controladas, envolvendo o cuidado desde a escolha de reagentes até a apresentação dos dados obtidos nos ensaios (GRATAMA *et al.*, 1997; MAECKER *et al.*, 2005; MAECKER *et al.*, 2012).

Desta forma, Donnenberg & Donnenberg (2011) criaram um diagrama com o intuito de auxiliar e orientar pesquisadores quanto às etapas necessárias durante a realização de um ensaio de citometria de fluxo, sobretudo em casos onde a amostra seja de natureza sólida (Figura 6).

O uso da técnica de citometria de fluxo para a caracterização de populações celulares no tecido fibroproliferativo induzido por implantes torna-se interessante, uma vez que permite a identificação fenotípica e determinação de marcadores moleculares envolvidos na interação implante/hospedeiro. Desta forma, publicações que orientem pesquisadores quanto às etapas necessárias à realização de um ensaio de imunofenotipagem por citometria de fluxo são importantes, permitindo assim, o delineamento de ensaios mais confiáveis e reprodutivos.

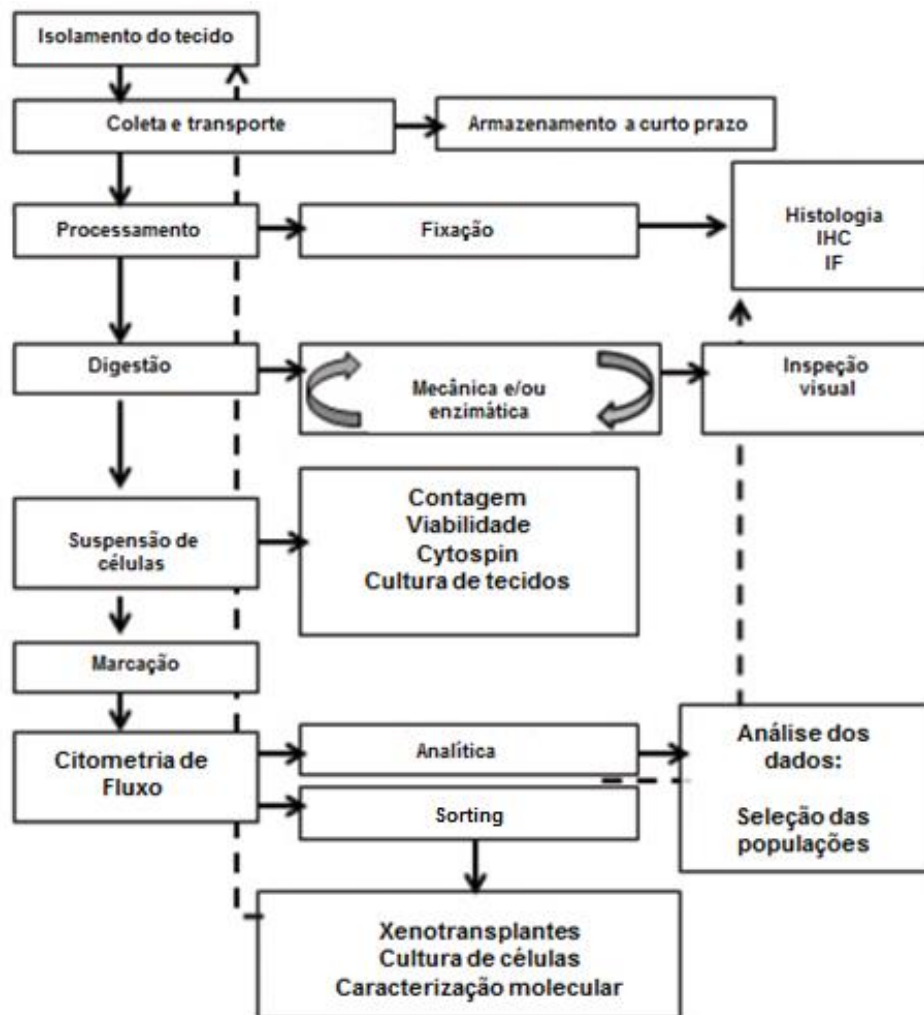


Figura 6. Diagrama esquemático para um ensaio de citometria de fluxo utilizando tecidos sólidos.

1.10. Imunofenotipagem celular em implantes

Durante a formação do tecido de granulação intrainplante é possível encontrar intenso infiltrado de células inflamatórias, fibroblastos e uma rede vascular derivada de vasos pré-existentes contidos nos tecidos adjacentes ao implante. Apesar de haver um crescente interesse clínico em relação às

populações de células contidas nos tecidos de granulação formados em implantes, dados quantitativos que expressem a magnitude da contribuição destas células em uma perspectiva fisiológica são escassos (CROSBY *et al.*, 2000; FUCHS *et al.*, 2006).

A técnica de citometria de fluxo aplicada à identificação e quantificação de grupos específicos de células dentro de uma grande população de células é denominada imunofenotipagem. Nesta técnica, marcadores de superfície celular podem ser detectados através de anticorpos fluorescentes (ADAN *et al.*, 2016).

Análises das populações de células inflamatórias por imunofenotipagem são comuns e tem sido reportado como método para caracterização de células em estudos de cicatrização de feridas *in vivo* (SCOTT *et al.*, 2008; SEMENOVA *et al.*, 2008). Entretanto, poucos trabalhos se propuseram a estudar as populações de células contidas dentro de implantes utilizando a técnica de imunofenotipagem. Tsuji *et al.* (2010), caracterizou populações de células inflamatórias em implantes e constatou que a população de células eram queratinócitos, leucócitos derivados da medula óssea e granulócitos.

Recentemente, nosso grupo caracterizou populações de células inflamatórias em implantes 24 horas e 10 dias pós-implantação. Nesta ocasião foi constatado que em uma fase aguda do processo inflamatório os implantes continham um infiltrado caracterizado pela presença de neutrófilos, monócitos e linfócitos, ao passo que na fase crônica da inflamação a população de células

era composta primordialmente por monócitos/ macrófagos e linfócitos (VIANA *et al.*, 2015).

Por ser um tecido neoformado, acredita-se que células tronco mesenquimais e hematopoiéticas possam estar presentes neste tecido e que muito provavelmente sejam provenientes da medula óssea adentrando o implante via circulação sanguínea (CROSBY *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2014). Apesar de alguns trabalhos terem estudado as populações de células inflamatórias intrainplante, poucos estudos têm avaliado a presença de células progenitoras e células com potencial angiogênico em modelos que abordem a implantação de materiais *in vivo*.

Torna-se importante, portanto, caracterizar populações de células nos implantes, uma vez que estes dados poderiam contribuir para a medicina regenerativa e engenharia tecidual, já que células isoladas de tecidos neoformados podem ser utilizadas na terapia celular e proporcionar a melhor compreensão das repostas desencadeadas durante a interação implante/hospedeiro (CANTU *et al.*, 2012; NEREM, 2014; PANG *et al.*, 2015).

2. Justificativa

▪ **2. JUSTIFICATIVA**

Biomateriais e implantes sintéticos podem interagir com tecidos desencadeando uma resposta adversa do organismo (HOLLISTER, 2005) que pode ser avaliada pelo grau em que os mecanismos homeostáticos são perturbados, pelas condições patofisiológicas criadas e pela resolução da resposta inflamatória (PAPPAS, 1996). Sendo assim, é particularmente importante avaliar as reações ocorridas intrainplante e no tecido adjacente, a fim de se evitar complicações ou danos à saúde do hospedeiro. Deve-se ressaltar, ainda, que embora seja conveniente distinguir mecanismos homeostáticos, os componentes envolvidos nesta resposta são parte de um mesmo processo fisiológico (SIEMINSKI & GOOCH, 2000).

Modelos *in vitro* e *in vivo* têm sido utilizados para caracterizar os mecanismos envolvidos nas interações existentes entre materiais implantados e o hospedeiro, com a finalidade de aperfeiçoar a funcionalidade do biomaterial e modular os componentes envolvidos na resposta inflamatória gerada pelo contato dos implantes com os sistemas biológicos. O implante subcutâneo de esponja, um modelo *in vivo*, induz uma resposta inflamatória crônica, semelhante àquela que ocorre durante a reação gerada por implantes médicos, que culmina com formação de tecido de granulação, constituído de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e infiltrado de células inflamatórias (LAGE & ANDRADE, 2000).

Este modelo já foi utilizado para investigar relações temporais existentes entre angiogênese, acúmulo de leucócitos e geração endógena de quimiocinas pró-inflamatórias, como a quimiocina ligante 2/JE (CCL2/JE). Além disso, os efeitos da administração exógena desta quimiocina também foram estudados. Os resultados obtidos demonstraram que a CCL2/JE foi gerada dentro do compartimento da esponja e que a administração exógena da mesma aumentou a vascularização bem como o influxo de células inflamatórias para o implante (Figura 7) (BARCELOS *et al.*, 2004).

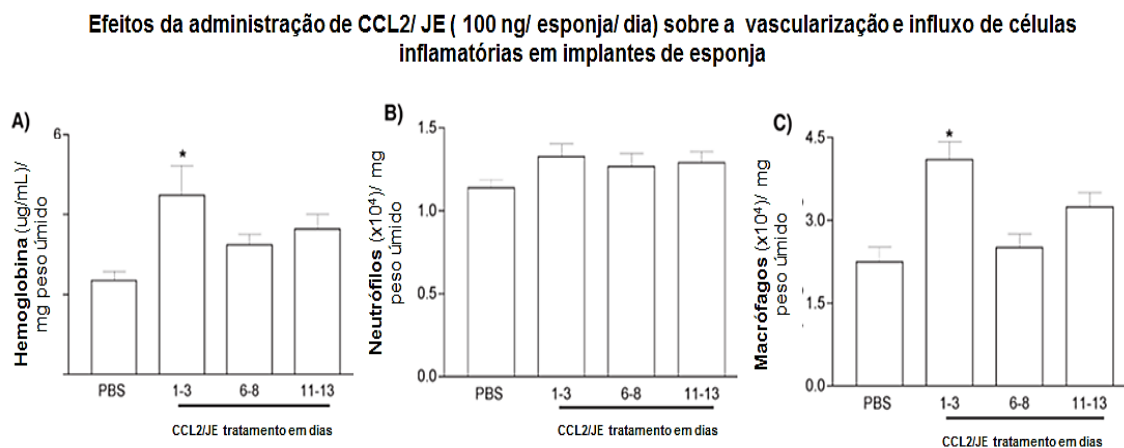


Figura 7. Efeitos da administração de CCL2/JE sobre a vascularização (A) e influxo de células inflamatórias (B, C) em implantes de esponja. Adaptado de Barcelos *et al.*, 2004.

Desta forma, CCL2/JE parece ser capaz de modular importantes componentes presentes na resposta inflamatória induzida pela implantação de materiais sintéticos em camundongos. Apesar de o trabalho ter demonstrado um papel regulatório da CCL2/JE sobre os componentes inflamatórios e angiogênicos da interação implante de esponja/ hospedeiro, a função biológica

do receptor da CCL2 (CCR2) bem como os tipos celulares envolvidos na resposta ao implante não foram avaliados.

No presente estudo, optou-se por utilizar camundongos geneticamente modificados, *knockout* para o CCR2, para estudar os efeitos e papéis biológicos que este receptor desempenha durante as interações existentes entre materiais sintéticos implantados e hospedeiros. Os resultados obtidos podem contribuir para melhor compreensão do papel do CCR2 durante processos em que a plataforma implante/hospedeiro esteja presente, possibilitando, ainda, delinear intervenções e estratégias farmacológicas que possam modular efeitos adversos provenientes desta interação.

3.Objetivos



▪ **3. OBJETIVOS**

3.1. Objetivo geral

- Caracterizar o papel do receptor de quimiocina CCR2 sobre os eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória na interação implante/hospedeiro em camundongos.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar através de parâmetros bioquímicos a cinética das alterações vasculares, inflamatórias e fibrogênicas presentes no tecido fibrovascular desenvolvido em implantes sintéticos em camundongos CCR2 KO e CCR2 WT;
- Avaliar e comparar características histológicas (celularidade, infiltrado inflamatório e deposição de colágeno) presentes no tecido fibrovascular desenvolvido em esponjas sintéticas implantadas em camundongos CCR2 KO e CCR2 WT;
- Desenvolver e padronizar a metodologia de citometria de fluxo para avaliar tipos celulares presentes no tecido fibrovascular desenvolvido em esponjas sintéticas implantadas em camundongos CCR2 KO e CCR2 WT;

- Determinar o perfil fenotípico das diferentes populações de células presentes no tecido fibrovascular desenvolvido em esponjas sintéticas e no sangue periférico de camundongos CCR2 KO e CCR2 WT;
- Avaliar a expressão de marcadores de superfície celular específicos de células tronco hematopoiéticas (CTH's) e de células progenitoras endoteliais (CPE's) no tecido fibrovascular desenvolvido em esponjas sintéticas e no sangue periférico de camundongos CCR2 KO e CCR2 WT;
- Caracterizar a expressão de marcadores de superfície celular característicos de células inflamatórias, no tecido fibrovascular desenvolvido em esponjas sintéticas em camundongos CCR2 KO e CCR2 WT.

4. Materiais e Métodos

▪ **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

4.1. Animais

Foram utilizados neste estudo camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, idade de 7 a 8 semanas (25 a 30 gramas), com deleção gênica para o CCR2 (CCR2 KO) e camundongos sem deleção gênica (CCR2 WT). Os animais CCR2 KO foram gentilmente cedidos pelo professor Fernando Cunha (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto) e os animais CCR2 WT foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Os animais foram alojados em gaiolas individuais e receberam ração e água *ad libitum*. O alojamento, anestesia e pós-operatório foram realizados em conformidade com as diretrizes estabelecidas pelo Comitê Institucional do Bem Estar Animal da UFMG e os protocolos experimentais aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CETEA) da UFMG sob protocolo de número 43/2014 (Anexo I).

A figura abaixo especifica o número de animais utilizados nos testes realizados e aprovados pelo CETEA - UFMG.

| | Grupo CCR2 WT | Grupo CCR2 KO |
|--|--|--|
| Análises bioquímicas (Hemoglobina, MPO, NAG, colágeno solúvel, citocinas) e análises de fluxo sanguíneo | Cinética: 1 dia: n= 8 4 dias: n= 8 7 dias: n=8 14 dias: n=8 Total: n=32 | Cinética: 1 dia: n= 8 4 dias: n= 8 7 dias: n=8 14 dias: n=8 Total: n=32 |
| Histologia | 4 dias: n= 5 7 dias: n=5 14 dias: n=5 Total: n=15 | 4 dias: n= 5 7 dias: n=5 14 dias: n=5 Total: n=15 |
| Padronização protocolos de digestão enzimática | n=5 | n=5 |
| Imunofenotipagem | n= 5 | n=5 |
| Total | n= 57 animais | n= 57 animais |

Figura 8. Número de animais utilizados por teste e número total de animais utilizados no estudo dos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória na interação implante/ hospedeiro em camundongos.

4.2. Técnica do implante de esponja

4.2.1. Confeção e preparo dos discos de esponja

Foram confeccionados discos de esponja de poliéter-poliuretano com 8 milímetros (mm) de diâmetro e 5 mm de espessura, com ajuda de um *punch* cirúrgico. Em seguida, os discos foram acondicionados em etanol 70% v/v durante 24 horas antes da implantação dos mesmos. Previamente à

implantação das esponjas, as mesmas foram lavadas e fervidas em água destilada por 30 minutos.

4.2.2. Implante de esponja em camundongos

Para o implante dos discos de esponja os animais foram anestesiados com uma solução de ketamina (150 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) (Syntec), e submetidos à tricotomia e à assepsia da região dorsal. Em seguida foi realizada uma incisão de aproximadamente 0,5 cm na pele e, após delicada divulsão do tecido subcutâneo, o disco de esponja foi introduzido no subcutâneo do dorso próximo à região cervical do animal. Após o implante, a incisão foi suturada com fio de Nylon inabsorvível 5-0 (Procare) e os animais mantidos em observação. A figura 9 ilustra os procedimentos realizados para a implantação da matriz sintética nos camundongos. Após o período de observação e recuperação cirúrgica, os camundongos foram acomodados em gaiolas individuais com livre acesso à água e ração (ANDRADE *et al.*, 1987).



Figura 9. Técnica de implantação dos discos de esponja.

4.2.3. Remoção do implante

Em intervalos de tempo pré-determinados, a saber, 1, 4, 7 e 14 dias pós-implantação os animais foram eutanasiados por aprofundamento da anestesia (dose: 450 mg/Kg de ketamina e 30 mg/Kg de xilazina/ Syntec). Os implantes foram, então, removidos, pesados e congelados para posterior avaliação de parâmetros de vascularização, inflamação e fibrogênese.

4.3. Avaliação de parâmetros angiogênicos

4.3.1. Dosagem de hemoglobina

A dosagem do conteúdo de hemoglobina (Hb) intrainplante quantifica indiretamente a neovascularização presente nos tecidos e tem sido utilizada

como índice de vascularização em modelos de angiogênese. Esta técnica utiliza o método do reagente de Drabkin (DRABKIN & AUSTIN, 1932).

Cada implante extraído dos animais foram pesados, fragmentados e homogeneizados (Tekmar TR-10, Ohio, EUA) em 2,0 mililitros (mL) de reagente de Drabkin (Labtest, São Paulo, Brazil) por cerca de 30 minutos (min). Em seguida, foram centrifugados a 4° C a 1200 g por 40 min. Após centrifugação os sobrenadantes foram filtrados em membranas de 0,22 micrômetros (μm) (Millipore) e colocados em placas com 96 poços.

A leitura foi realizada por espectrofotometria a 540 nanômetros (nm) e a concentração de hemoglobina foi determinada por comparação a uma curva padrão de hemoglobina. Os resultados obtidos foram expressos em concentração de hemoglobina microgramas (μg) por miligramas (mg) de peso úmido do implante (FERREIRA *et al.*, 2004; BARCELOS *et al.*, 2005).

4.3.2. Avaliação do fluxo sanguíneo por imagem de perfusão por Laser Doppler

Esta técnica é baseada na foto-deteção de um feixe de laser de baixa intensidade emitido pelo equipamento e que é disperso pelas hemácias circulantes.

Animais de cada grupo (WT e KO) em cada ponto da cinética (1, 4,7, e 14 pós-implantação) foram previamente anestesiados, tricotomizados (região dorsal) e colocados sob o equipamento (Laser Doppler-MoorLDI-2) à

temperatura constante de 37°C. Quando o procedimento de escaneamento da área de interesse foi finalizado, a perfusão do tecido foi codificada em um mapa de cores. Pouca ou nenhuma perfusão foi apresentada na cor azul escura e o máximo de perfusão em vermelho.

4.3.3. *Análise do fluxo sanguíneo pela técnica de difusão da fluoresceína sódica*

Esta técnica foi descrita por Andrade *et al.* (1997) e foi utilizada neste estudo para estimar o fluxo sanguíneo na pele e nos implantes dos animais. Ela consiste na difusão da fluoresceína aplicada na pele e sua posterior detecção na corrente sanguínea (Figura 10) (ANDRADE *et al.*, 1997; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Animais de cada grupo (WT e KO) não implantados e em cada ponto da cinética (1, 4,7, e 14 pós-implantação) foram previamente anestesiados com uma solução de ketamina (150mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg) (Syntec) e receberam *in situ* (via intradérmica) 10 µl de uma solução de fluoresceína sódica estéril (Sigma, EUA, 1%).

A difusão da fluoresceína foi monitorada nos tempos 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a injeção, em amostras de sangue colhidas na veia da cauda. As amostras de sangue foram diluídas em 3 ml de solução salina isotônica, centrifugadas durante 5 minutos a 6000 rpm e o sobrenadante foi mantido para determinação da fluorescência em um fluorímetro Jeway (modelo 6200) com excitação/emissão de 485/520 nm.

O tempo de detecção do marcador fluorescente na corrente sanguínea foi expresso em termos de meia-vida ($t_{1/2}$ - tempo calculado para a fluoresceína alcançar 50% do pico máximo da sua detecção na circulação sistêmica).

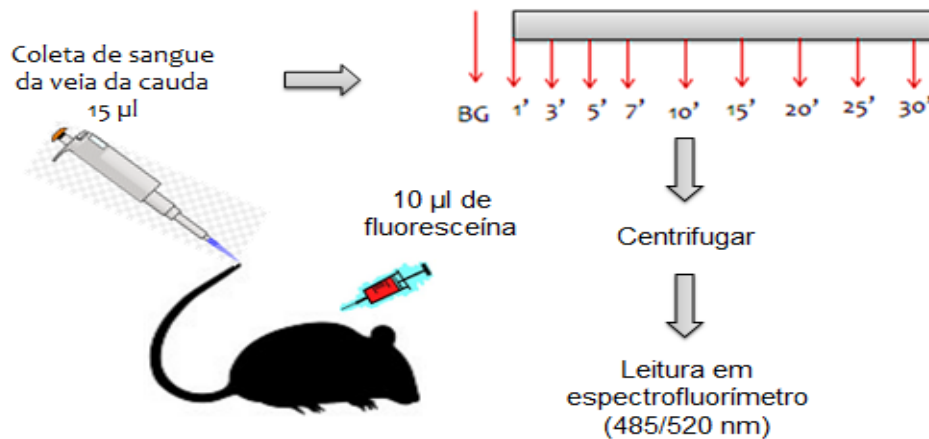


Figura 10. Esquema representando a técnica de difusão da fluoresceína sódica.

4.4. Avaliação de parâmetros inflamatórios

4.4.1. Análise da atividade da mieloperoxidase (MPO)

O acúmulo de neutrófilos é um clássico indicador de resposta inflamatória. Esse tipo de célula possui função fagocítica, contribuindo para eliminação de detritos (MCDONAL *et al.*, 2010). A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente em grânulos azurofílicos de neutrófilos sendo, portanto, utilizada para indicar a presença e acúmulo desse tipo celular (CAMPOS, *et al.*, 2008; XAVIER *et al.*, 2010; ARAUJO *et al.*, 2011; MOURA, *et al.*, 2011).

Após a dosagem de hemoglobina, os implantes fragmentados foram divididos em duas metades e, em seguida, os sedimentos foram utilizados para a dosagem da atividade da MPO e da N-acetil- β -D- glicosaminidase (NAG).

Os implantes foram pesados, homogeneizados em tampão 4,7 (0,1M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,0015 M NaEDTA), centrifugados (12,000g, 10 min, 4°C). Os *pellets* foram então ressuspensos em 0,05 M NaPO₄ contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio bromido (HTAB). A atividade de MPO no sobrenadante das amostras foi mensurada através da mudança de absorvância (densidade óptica, OD) a 450 nm utilizando tetrametilbenzidina (1,6 mM) a H₂O₂ (0,3 mM). A reação foi paralisada pela adição de 50 μ L de H₂SO₄ (4 M).

4.4.2. Análise da atividade da N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG)

A quantificação de células mononucleares nos fragmentos de implantes de esponja pôde ser feita avaliando-se a atividade da enzima N-acetil- β -D- glicosaminidase (NAG), presente em altos níveis em lisossomos de macrófagos ativados (BELO *et al.*, 2005). Os implantes foram homogeneizados em uma solução de NaCl (0,9% v/v) contendo 0,1% v/v de Triton X-100 (Promega) e centrifugadas (3000g, 10 min, 4°C). 100 μ L do sobrenadante foram incubados por 10 minutos com 100 μ L de p-nitrofenil-N-acetil- β -D- glicosaminidase (Sigma) preparada em tampão citrato/fosfato (0,1M de ácido cítrico, 0,1 M

Na₂HPO₄, pH 4,5) com concentração final de 2,24 mM. A reação foi paralisada pela adição de 100 µL de 0,2 M de tampão glicina (pH 10,6).

4.4.3. Dosagem de nitrito

Para a determinação do conteúdo de nitrito (medida indireta da presença de óxido nítrico) nos implantes, os mesmos foram pesados e posteriormente incubados em 250 µL de tampão PBS à 37°C por 10 minutos. Foram, então, utilizados 100 µL dos sobrenadantes para a dosagem do nitrito pela técnica da Reação de Griess (GREEN, 1982).

Para a realização do ensaio, 100 µL do sobrenadante foi colocado em uma placa de 96 poços. Em seguida foram adicionados 100 µL de uma solução contendo 1,0 g de sulfanilamida (Sigma-Aldrich) em 100 ml de ácido fosfórico (Sigma-Aldrich) 2,5% e 0,1 g de Need (naphthylethylenediamine) (Sigma-Aldrich) em 10 µL de ácido fosfórico 2,5% na proporção de 1:1 nas amostras e na curva padrão. A absorbância foi medida em leitor de microplaca (Termoplate) em comprimento de onda de 540 nm. A quantificação de nitrito foi determinada através da comparação com uma curva utilizando como padrão uma solução de nitrito de sódio e os resultados expressos em µg/ml/g de tecido úmido.

4.5. Avaliação de parâmetros fibrogênicos

4.5.1. Quantificação de colágeno solúvel total

A quantidade de colágeno solúvel total foi determinada colorimetricamente baseada na reação de *Picrossirius Red*. Para isso, os implantes foram homogeneizados com tampão (1 mL Triton X, pH 7,8). Em seguida, foram centrifugados. Posteriormente, foram adicionados 50 µL do reagente *Picrossirius Red* a 10 µL da amostra. Após incubação de 30 minutos a temperatura ambiente, o complexo colágeno-*Picrossirius Red* foi centrifugado a 10000 G por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e o sedimento lavado com 500 µL de etanol (Synth, 99% puro e livre de metanol) e o complexo colágeno-corante foi reconstituído em 1 mL de reagente alcalino (NaOH 0,5 M) (Synth). A absorbância foi quantificada a 540 nm em leitor de microplacas (Thermoplate). A quantificação de colágeno foi determinada através da comparação com uma curva utilizando padrão de gelatina (Merck) e os resultados expressos em µg de colágeno por mg de implante ou músculo (CAMPOS *et al.*, 2008).

4.6. Dosagem de citocinas

Para a determinação da produção de citocinas (VEGF, TGF-β1, TNF-α, CXCL1/KC e CCL2/JE) no tecido de granulação intrainplante foram utilizados 100 µL do sobrenadante restante da dosagem de hemoglobina.

Para a realização do ensaio, diluições do sobrenadante foram adicionadas em duplicata à placa de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) que continham um anticorpo monoclonal específico. Em seguida, foi adicionado um anticorpo de detecção. Após realizar a lavagem para remover os anticorpos que não se ligaram, uma solução de substrato foi adicionada a placa de ELISA (50 µL de uma 1:1 solução de peróxido de hidrogênio, Sigma e 10mg/ml de OPD, Sigma). A reação foi interrompida após 20 minutos de incubação com 50 µL de ácido sulfúrico (2M) e a intensidade da cor quantificada a 540 nm em leitor de microplaca (Thermoplate). Os resultados foram expressos como picogramas (pg) de citocina por mg de peso úmido.

4.7. Análises histológicas e colorações

Os implantes destinados à avaliação histológica foram previamente excisados cuidadosamente, dissecados sem tecido aderente e fixados em formalina (10% v/v em solução salina isotônica) por no mínimo 48 horas, e, posteriormente, submetidos aos processos de desidratação, diafanização, banho e inclusão em parafina.

Após estes procedimentos cortes de 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina e eosina (H&E) e processados para estudos do infiltrado inflamatório e alterações vasculares no tecido de granulação intrainplante em microscópio de luz.

Para determinar e visualizar as fibras de colágeno os cortes histológicos foram corados com vermelho de *Picrossirius Red* seguido por microscopia de luz polarizada (MOURA *et al.*, 2011).

A visualização e captura de imagens foi realizada em microscopia convencional para determinação do número de células gigantes derivadas de macrófagos e sob luz polarizada para visualização e determinação das fibras de colágeno. As análises morfométricas foram realizadas a partir de 15 campos ($8533 \mu\text{m}^3$), capturadas com uma objetiva planocromática (40x para H&E) ou (20x para *Picrossirius Red*) usando microscopia de luz (resolução final, 400x). As imagens foram digitalizadas com a ajuda de uma microcâmera e transferidas para um analisador.

4.8. Padronização de protocolos de digestão enzimática de implantes de esponja

Foi realizada a padronização para escolha de um protocolo de digestão enzimática do tecido fibrovascular formado intrainplante. Para isso, animais WT foram implantados e eutanasiados aos 7, 10 e 14 dias pós-implante. As esponjas foram coletadas e usadas para o teste do melhor protocolo (maior número de células viáveis) de digestão enzimática. Os protocolos testados estão esquematizados e especificados na Figura 11.

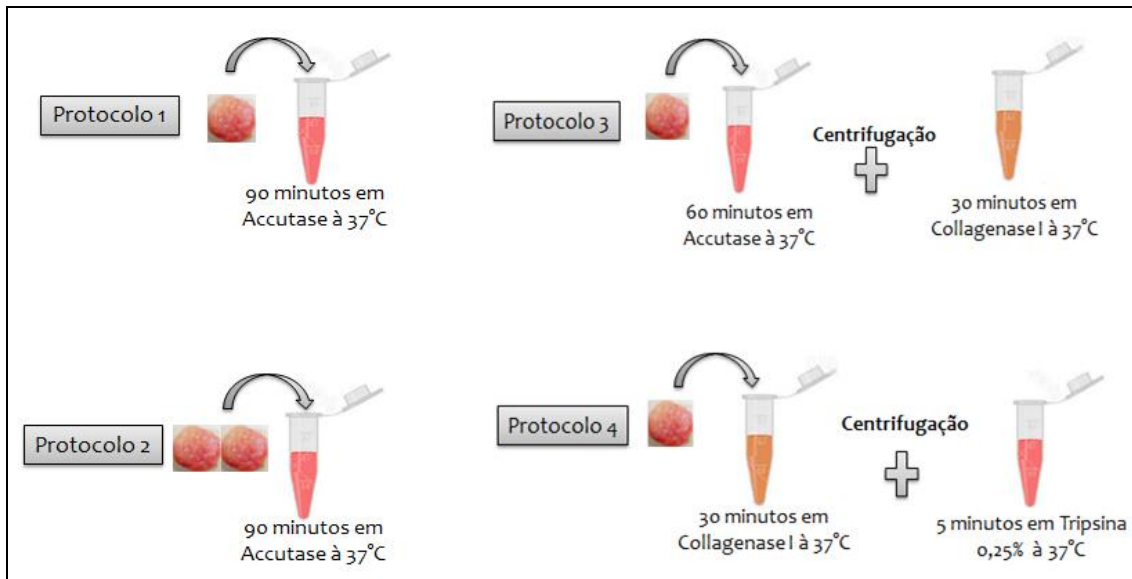


Figura 11. Padronização de protocolos de digestão enzimática para isolamento de células em implantes de esponja.

Após a etapa de digestão enzimática, as células foram centrifugadas (1200 rpm, 5 min, 4°C). O sobrenadante descartado e o *pellet* formado ressuspendidos em 1mL de PBS (BSA 0,1%). As células foram filtradas em membranas de 40 µm (Cell strainer) e as hemácias lisadas com 4 mL de solução de lise (RBC Lysis Buffer, eBioscience). As células foram novamente centrifugadas (1200 rpm, 5 minutos, 4°C) e ressuspendidas em PBS (BSA 0,1%). Em seguida foi realizado o teste de viabilidade celular utilizando-se uma câmara de Neubauer e Azul de Tripán.

As células foram, então, passadas através de um citômetro FACSCanto-II (BD Biosciences) e adquiridos 30.000 eventos, sangue periférico de camundongo foi utilizado como controle positivo para a leitura. Cada célula foi avaliada com relação ao tamanho (feixe de luz frontal FSC-A) e granulosidade e complexidade interna (feixe de luz lateral SSC-A).

4.9. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que mensura múltiplas características físicas de uma única célula, tais como tamanho e granulosidade, simultaneamente. Além disso, esta abordagem possibilita a análise detalhada de populações de células de uma amostra num curto período de tempo (ADAN *et al.*, 2016). Neste trabalho a técnica de citometria de fluxo foi utilizada para caracterizar o perfil imunofenotípico de implantes e do sangue de camundongos CCR2 KO.

4.9.1. Coleta e preparo das amostras

4.9.1.1. Sangue periférico

O sangue periférico de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO que receberam implantes de esponja por um período de 7 dias foi coletado através do plexo braquial e adicionados a tubos de 15 mL contendo 2,0 mL de PBS (EDTA 5mM). As amostras foram homogeneizadas delicadamente e manualmente por 3 minutos, centrifugadas (1600 rpm, 10 min, 4°C) e o sobrenadante descartado em seguida. A lise das hemácias foi realizada acrescentando-se 15 mL de tampão de lise de eritrócitos (ACK, pH 7,2) às amostras seguida de homogeneização manual por 3 minutos. As células foram centrifugadas (1600 rpm, 10 min, 4°C) e o *pellet* ressuspendido em 15 mL de

PBS (BSA 0,1%) para lavagem do tampão de lise. Novamente as células foram centrifugadas (1600 rpm, 10 min, 4°C) e o *pellet* ressuspendido em 500 µl de PBS (BSA 0,1%). A seguir, foi realizada a contagem do número de células presentes na suspensão utilizando Câmara de Newbauer e, após a contagem as células foram encaminhadas para marcação com anticorpos monoclonais.

4.9.1.2. *Implantes de esponja*

Animais CCR2 WT e CCR2 KO foram implantados conforme a técnica descrita anteriormente e eutanasiados 7 dias após implantação das esponjas. Os implantes coletados foram cuidadosamente extraídos e submetidos ao protocolo de digestão enzimática para o isolamento das células contidas nos mesmos. Para isso, os implantes foram picotados com o auxílio de uma lâmina de bisturi e incubados em solução de Collagenase I (0,2%) por 30 minutos à 37°C. As células foram, então, centrifugadas (1200 rpm, 5 minutos, 4°C) e o sobrenadante descartado. Em seguida o *pellet* foi incubado por 5 minutos em tripsina 0,25% à 37°C. As células foram centrifugadas novamente (1200 rpm, 5 min, 4°C) e o *pellet* ressuspendido em 500 µl de PBS (BSA 0,1%). A seguir, foi realizada a contagem do número de células presentes na suspensão utilizando Câmara de Newbauer e, após contagem, as células, foram encaminhadas para marcação com anticorpos monoclonais.

4.10. *Imunofenotipagem por citometria de fluxo*

As células isoladas do sangue periférico e dos implantes foram ressuspensas em tampão de coloração (PBS- BSA 2%) e incubadas por 15 minutos a 4°C com *Fc blocking* (monoclonal Anti-CD16/32) (Bioscience, San Diego, CA, USA). A seguir as células foram lavadas com tampão FACS (PBS- BSA 1%, pH 7,2 – 7,4) e adicionadas a poços de uma placa com fundo chato (5×10^5 células/poço). Cada amostra foi corada com os anticorpos monoclonais de interesse por 30 minutos a 4°C.

Após incubação, as células foram lavadas com tampão FACS (180 µl por poço), ressuspensas e mantidas em tampão fixador (PBS; Glicose 2%, paraformaldeído 2%) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Pelo menos 500.000 eventos foram adquiridos no *gate* para a realização das análises utilizando-se o leitor FACSCanto-II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

Cada amostra foi marcada com dois painéis de anticorpos monoclonais distintos: o primeiro englobou anticorpos comumente utilizados na marcação de CTH's e CPE's (Painel 1) e o segundo com anticorpos para marcação de células inflamatórias (Painel 2). Os anticorpos monoclonais incluídos em cada painel são detalhados na figura 12.

| Painel de anticorpos 1 | | Painel de anticorpos 2 | |
|--|-----------------|--|-----------------|
| <i>Anticorpo monoclonal</i> | <i>Diluição</i> | <i>Anticorpo monoclonal</i> | <i>Diluição</i> |
| Anti- Lin** (clones 145-2c11, RB6-8CS, M1170, RA3-6B2, Ter-119 – Cat. 558074/ BD Pharmigen™) – APC | 1:100 | Anti- CD45 (clone 30-F11 – Cat. 559864/ BD Pharmigen™) - APC | 1:200 |
| Anti- VEGFR2 (clone AVAS 12α1 – Cat. 555308/ BD Pharmigen™) – PE | 1:100 | Anti- Ly6G (clone 1A8 – Cat. 560603/ BD Pharmigen™) – V450 | 1:200 |
| Anti- CD31 (clone 390 – Cat. 25-0311/ e-Bioscience™) – PE-Cy7 | 1:100 | Anti- Ly6C (clone AL-21, cat. 560525/ BD Pharmigen™) - Percp-Cy5.5 | 1:200 |
| Anti- Sca-1 (clone D7- Cat. 11-5981/ e-Bioscience™) – FITC | 1:100 | Anti- CD11b (clone M1170, cat. 553310/ BD Pharmigen™) – FITC | 1:200 |
| Anti- c-Kit (CD 117) (clone 2B8 – Cat. 560557/ BD Pharmigen™) – Percp-Cy5.5 | 1:100 | Anti- F4/80 (clone T45-2342, cat. 565410/ BD Pharmigen™) – PE | 1:200 |

Figura 12. Painel de anticorpos utilizados para imunofenotipagem de células intrainplante e sangue de camundongos KO e WT. *Todos os anticorpos monoclonais utilizados são Rat anti-mouse. ** Lin coquetel é composto pelos seguintes anticorpos: CD3, Ly6G – Ly6C, mCD11b, CD45.1, Ter-119.

4.10.1. Análises

Os dados foram analisados usando o software FlowJo Version 9.8.2 (TreeStar, Carrum Downs, Australia).

4.11. Análises estatísticas

Todos os dados foram expressos como média±erro padrão da média (SEM). Comparações entre os dois grupos (WT vs KO) foram realizados

usando o teste t de Student para grupos não pareados. Comparação entre mais grupos foi realizado teste one-way (ANOVA) seguido do fator de correção para múltiplas comparações (teste de Bonferroni). Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5. Resultados

5. Resultados

A matriz de esponja foi bem tolerada pelos animais. Não foram detectados sinais de infecção ou rejeição no local do implante durante o período experimental máximo de 14 dias. Além disso, os implantes tornaram-se progressivamente mais vascularizados e aderidos ao tecido adjacente (pele ou músculo). O exame *in situ* dos implantes sob microscopia óptica evidenciou que a deleção do CCR2 afetou a formação vascular, devido à ausência de vasos característicos de neoformação vascular (bem definidos e tortuosos) (Figura 13B) quando comparado ao tecido de granulação formado intrainplante em animais WT (Figura 13A).

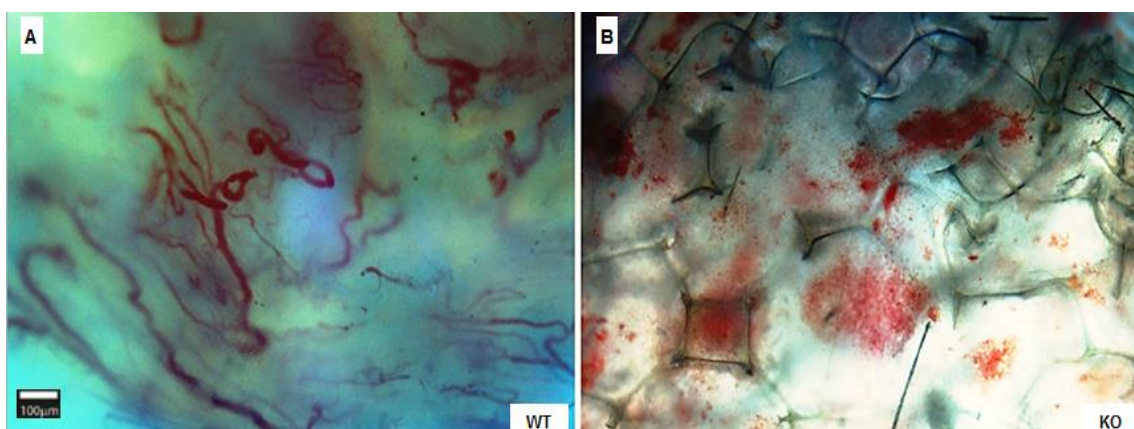


Figura 13. Fotomicrografia trans-iluminada do padrão vascular de implantes de esponja WT e KO (14 dias). A, implantes de animais WT mostrando a tortuosidade e padrão característico da neoformação vascular. Em B, os implantes KO não apresentam vasos sanguíneos característicos da neoformação, mas somente áreas hemorrágicas difusas. Barra 100 µm; aumento 20x.

5.1. Cinética da angiogênese induzida por implante de esponja

A deleção do CCR2 alterou o fluxo sanguíneo da pele de animais não implantados segundo a técnica de difusão da fluoresceína sódica (KO=20±1 min, n=5 vs WT= 9±1 min, n=5) (Figura 14A – linhas pontilhadas), sugerindo um importante papel deste receptor na manutenção do tônus vascular e fluxo sanguíneo em condições fisiológicas ou basais. O fluxo sanguíneo no tecido de granulação neoformado também foi menor em implantes de animais KO avaliado tanto pela técnica de difusão da fluoresceína sódica (maior tempo gasto para obtenção do pico de fluorescência na corrente sanguínea) como pela técnica de perfusão por Laser Doppler (Figuras 14 A-D – linhas contínuas).

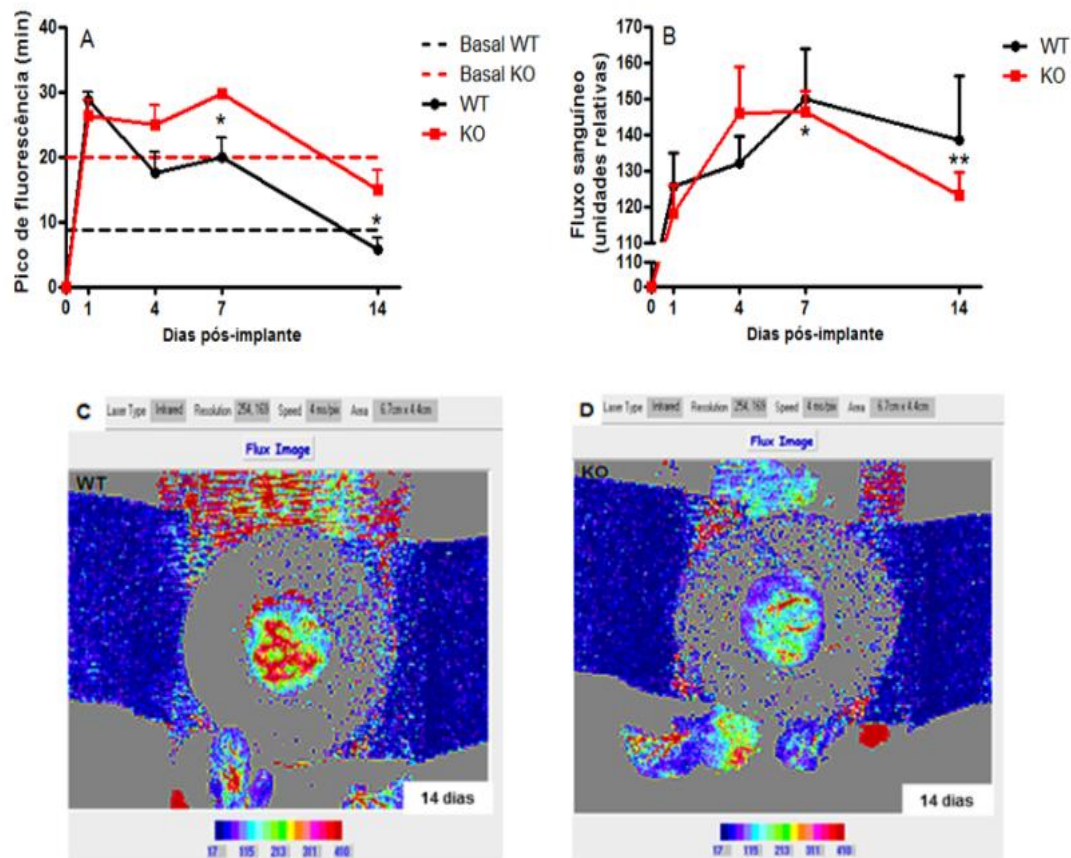


Figura 14. Fluxo sanguíneo em implantes WT e KO. A, Fluxo sanguíneo determinado pela difusão da fluoresceína sódica. A difusão de um corante fluorescente injetado intradermicamente é mostrada como tempo para o pico de fluorescência ser detectado no sangue periférico. As linhas pontilhadas no gráfico demonstram os valores de fluxo sanguíneo antes da implantação (valores basais). B, Fluxo sanguíneo determinado pela técnica de perfusão por Laser Doppler. Valores mostrados em A e B são as médias (\pm SEM) de grupos de 6-8 animais em cada ponto da cinética. *Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,05$; **Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,01$. C, Fluxo sanguíneo em implantes WT. Uma imagem típica da técnica de perfusão por Laser Doppler é mostrada. As faixas azuis são áreas de menor fluxo na pele íntegra e o disco preto é o delimitante para isolar o implante. As cores vermelhas indicam os fluxos sanguíneos elevados. D, Fluxo sanguíneo em implantes KO. Uma típica imagem da técnica de difusão por Laser Doppler em camundongos KO.

A mensuração do conteúdo de hemoglobina nos implantes proporciona um índice bem validado de neovascularização (HU *et al.*, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 2006; MENDES *et al.*, 2009) e foi utilizado neste estudo como uma medida

adicional aos ensaios de determinação do fluxo sanguíneo para a avaliação da vascularização dos implantes. O conteúdo de hemoglobina foi menor no tecido de granulação proveniente de implantes de animais KO ao final do período experimental estudado (Figura 15).

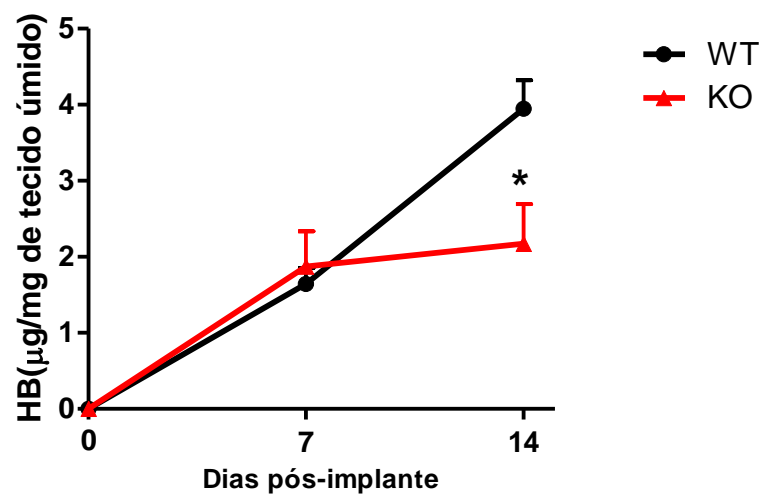


Figura 15. Tempo de curso do conteúdo de hemoglobina (Hb) em implantes WT e KO. O conteúdo de Hb é claramente menor em implantes de camundongos KO aos 14 dias pós-implante. Valores mostrados são as médias (\pm SEM) de grupos de 6-8 animais em cada ponto da cinética. *Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,05$.

A deleção do CCR2 também alterou os níveis de VEGF, a principal citocina pró-angiogênica, no tecido de granulação proveniente de implantes de animais KO 14 dia após a implantação dos discos de esponja (Figura 16).

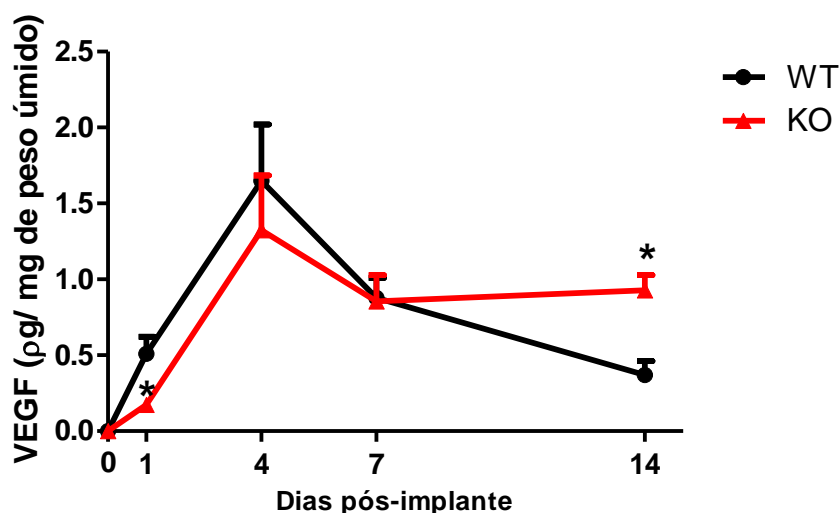


Figura 16. Tempo de curso dos níveis de VEGF em implantes WT e KO. Uma clara diferença é mostrada aos 14 dias pós-implante, mas aqui, os níveis de VEGF são mais elevados em implantes KO. Valores mostrados são as médias (\pm SEM) de grupos de 6-8 animais em cada ponto da cinética. *Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,05$.

5.2. Cinética da inflamação induzida por implante de esponja

Na avaliação do processo inflamatório induzido por implantes foram dosadas as atividades das enzimas MPO e NAG, níveis de nitrito (medida indireta da produção de NO) e produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , CCL2/JE e CXCL1/KC) no tecido de granulação formado em implantes provenientes de animais íntegros e *knockout*.

O tempo de curso das atividades de enzimas envolvidas no processo inflamatório foi utilizado como indicadores do acúmulo de neutrófilos e monócitos/macrófagos. A deleção do CCR2 levou à uma re-agudização do processo inflamatório do tecido de granulação formado em implantes de

animais KO, evidenciado pelos picos de atividade da MPO aos 4 e 14 dias pós-implantação (Figura 17).

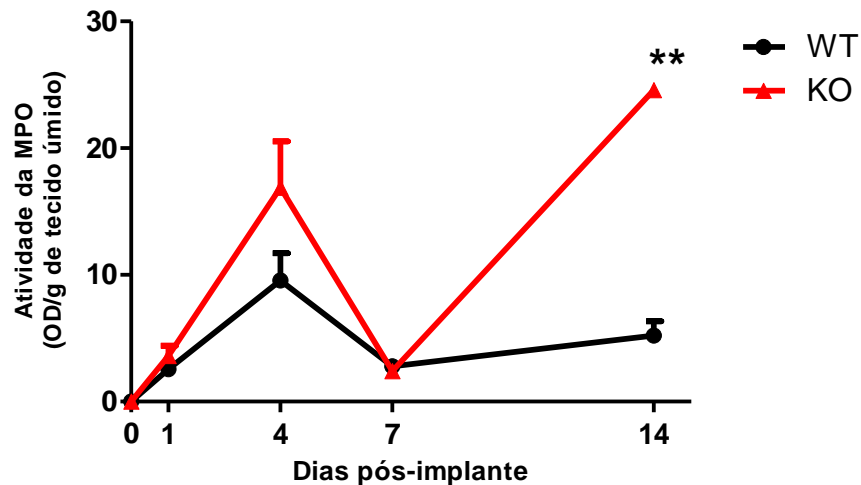


Figura 17. Tempo de curso da atividade da mieloperoxidase (MPO) em implantes WT e KO como uma medida indireta do acúmulo de neutrófilos. Um pico precoce com rápida queda para níveis basais nos implantes WT contrasta com o perfil de duplo pico nos implantes KO. Valores mostrados representam as médias (\pm SEM) de grupos de 6-8 animais em cada ponto da cinética. *Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,05$; **Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,01$.

O perfil da curva da atividade da NAG foi semelhante entre os grupos avaliados, embora a intensidade da atividade da enzima seja menor no tecido de granulação intrainplante oriundos de animais KO (Figura 18).

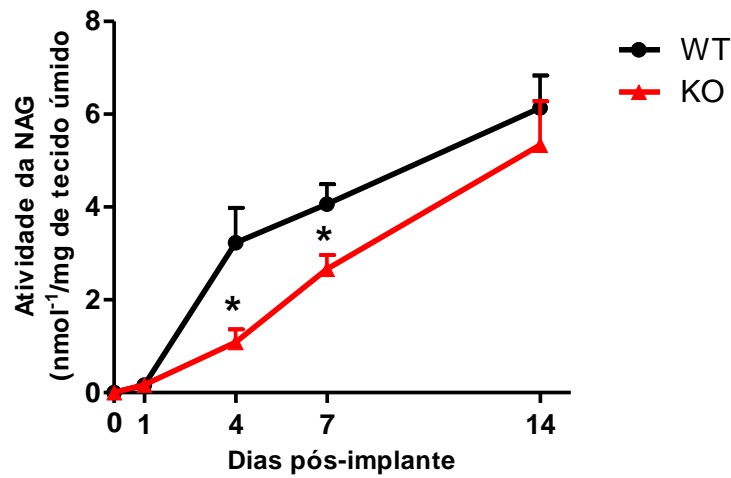


Figura 18. Tempo de curso da atividade da enzima N-acetil- β -D- glicosaminidase (NAG) em implantes WT e KO como uma medida indireta do acúmulo de monócitos/macrófagos. Houve um menor acúmulo de macrófagos em implantes KO aos 4 e 7 dias, mas aos 14 dias não houve diferença entre os dois grupos de implantes. Valores mostrados representam as médias (\pm SEM) de grupos de 6-8 animais em cada ponto da cinética. *Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,05$; **Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,01$.

A produção de óxido nítrico (NO), avaliada indiretamente pelo conteúdo de nitrito, foi inicialmente maior no tecido fibrovascular intrainplante proveniente de animais KO e estes níveis elevados não se sustentaram ao longo do período experimental estudado (Figura 19).

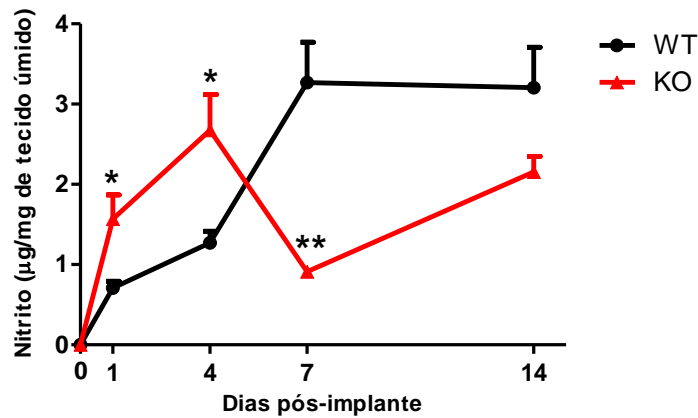


Figura 19. Níveis de nitrito em implantes WT e KO como uma medida indireta da produção de NO. Um aumento mais gradual, mas sustentado de nitrito em implantes WT contrastam com o perfil mais variável em implantes de camundongos KO. Valores mostrados representam as médias (\pm SEM) de grupos de 6-8 animais em cada ponto da cinética. *Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,05$; **Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,01$.

Em relação às citocinas pró-inflamatórias, a deleção do CCR2 leva a uma alteração na produção destes mediadores. Um atraso no pico de liberação de TNF- α foi observado no tecido de granulação proveniente de animais KO quando comparado aos animais íntegros (KO= 7 dias vs WT= 1 dia pós-implante) (Figura 20).

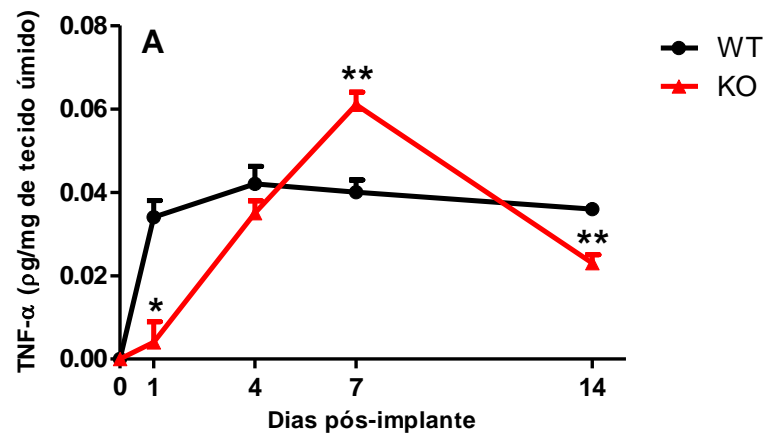


Figura 20. Tempo de curso da produção de TNF- α em implantes WT e KO. Os níveis de TNF- α em implantes KO foram mais elevados, embora tenham aumentado mais lentamente quando comparados aos implantes WT aos 7 dias. *Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,05$; **Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,01$.

Paralelamente, o perfil do tempo de curso para liberação da CCL2/JE foi notavelmente semelhante entre os dois grupos estudados. Ambos os grupos apresentaram picos de CCL2/JE aos 4 e 14 dias pós implantação, embora a intensidade na liberação tenha sido maior no tecido fibrovascular derivado de implantes de animais KO (Figura 21).

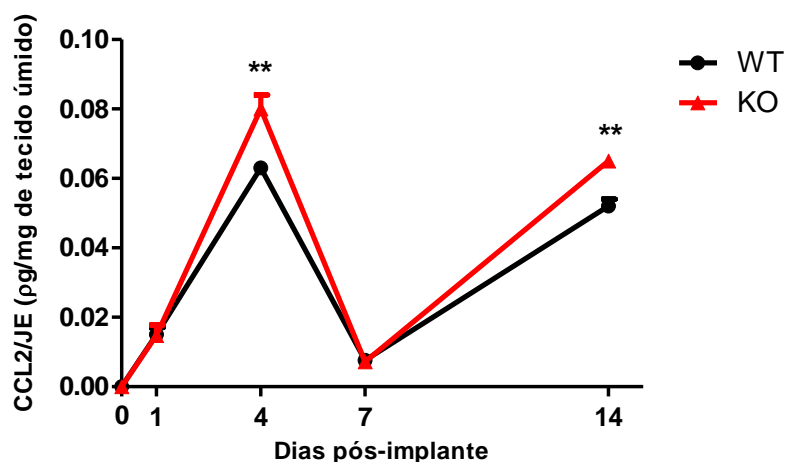


Figura 21. Tempo de curso da produção de CCL2/JE em implantes WT e KO. Embora ambos os grupos de implantes tenham apresentado uma resposta bifásica, os implantes KO tiveram um maior conteúdo desta citocina aos 4 e 14 dias. *Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,05$; **Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,01$.

O perfil do tempo de curso da produção da citocina inflamatória CXCL1/KC foi semelhante em ambos os grupos, entretanto, os níveis desta citocina foram maiores no tecido de granulação proveniente de implantes de animais KO (Figura 22).

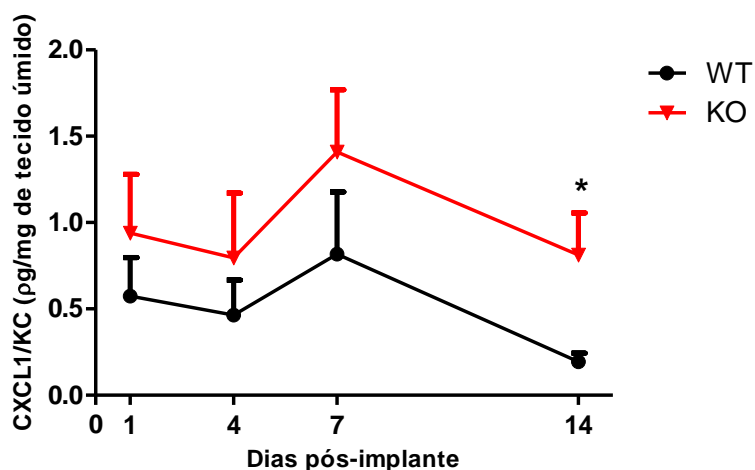


Figura 22. Tempo de curso da produção de CXCL1/KC em implantes WT e KO. Embora ambos os grupos de implantes tenham apresentado perfil de produção semelhante, os implantes KO apresentaram maiores níveis desta citocina aos 14 dias pós-implante. *Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,05$; **Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,01$.

5.3. Cinética da fibrogênese induzida por implante de esponja

A avaliação da resposta fibrogênica frente ao implante de esponja foi realizada através da dosagem dos níveis da citocina pró-fibrogênica TGF- β 1 e da deposição de colágeno em implantes de camundongos WT e KO.

O tempo de curso para liberação do TGF- β 1 revelou que a deleção do CCR2 comprometeu o padrão da produção desta citocina pelo tecido de granulação formado nos implantes. É possível observar, ainda, que a falta do receptor prejudica a liberação sustentada de TGF- β 1 evidenciado pelas quedas bruscas nos níveis desta citocina 4 e 14 dias após implantação (Figura 23).

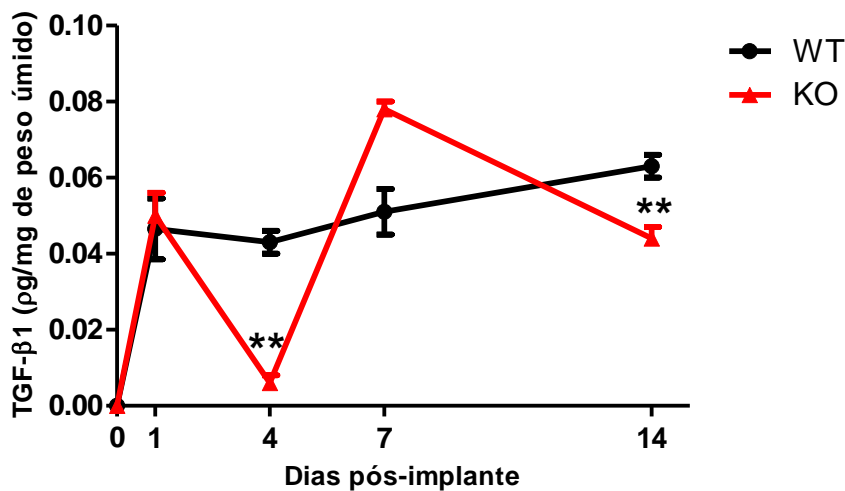


Figura 23. Tempo de curso da produção de TGF- β 1 em implantes WT e KO. Os altos níveis iniciais dessa citocina foram sustentados em implantes WT, ao passo que, em implantes KO os níveis de TGF- β 1 caíram acentuadamente aos 4, e, novamente aos 14 dias. Valores mostrados representam as medias (\pm SEM) de grupos de 6-8 animais em cada ponto da cinética. *Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,05$; **Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,01$.

Para confirmação adicional da deposição de colágeno nos implantes foi realizada a análise densitométrica de secções histológicas coradas com *Picrosirius Red* o que possibilitou a visualização do tecido conjuntivo depositado (Figura 24A e B) sob microscopia convencional. Além disso, a visualização dos cortes histológicos sob microscopia de luz polarizada foi possível identificar o tipo de colágeno produzido intrainplante. A deleção do CCR2 leva a uma maior prevalência de fibras colágenas imaturas (cores esverdeadas) em detrimento de fibras colágenas maduras (cores amarelo/ avermelhadas) no tecido de granulação formado intrainplante (Figura 24C e D).

Além disso, os dados da análise densitométrica do colágeno total indicam uma deposição de colágeno cerca de 30% menor em implantes KO (Figura 25)

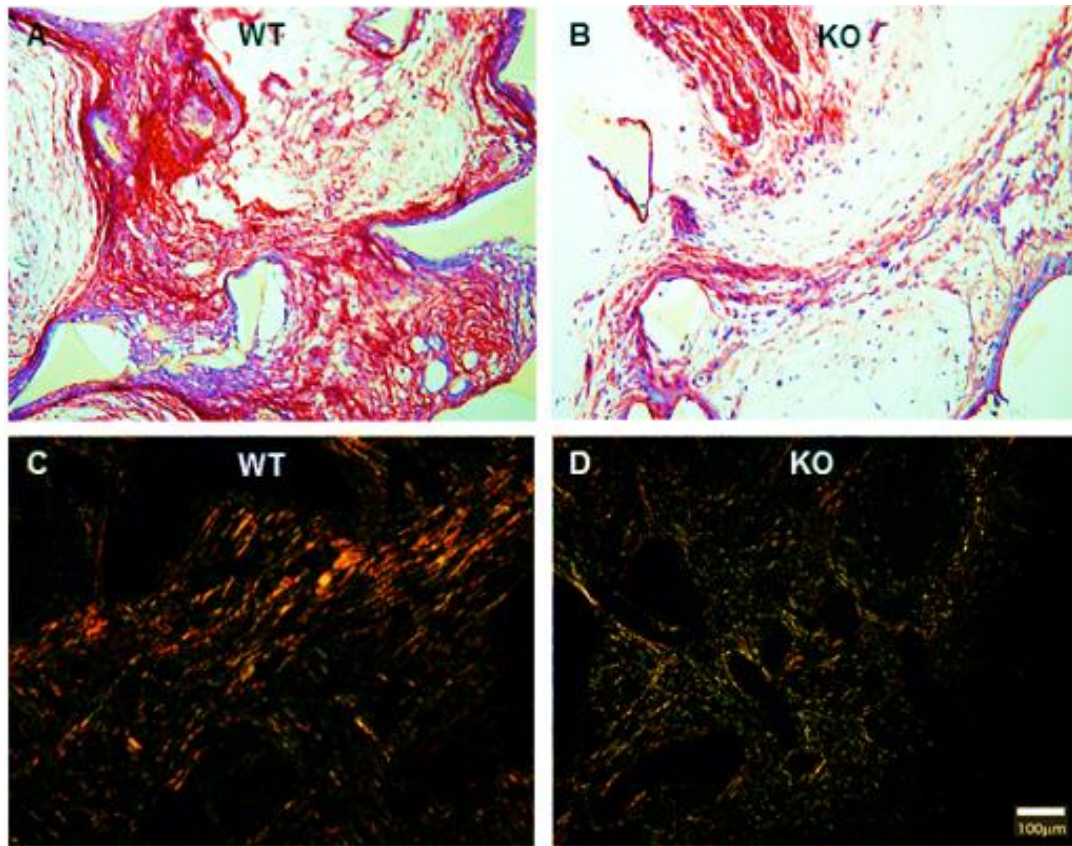


Figura 24. Fibrogênese em implantes WT e KO. Cortes histológicos (5 µm) representativos de implantes WT (A) e KO (B) aos 14 dias pós-implante corados com *Picrossirius Red*. Em C e D imagens representativas coradas com *Picrossirius Red* de implantes WT e KO, respectivamente. Colágeno do tipo I (imagens amareladas) foram claramente mais prevalentes e mais intensas em implantes WT. Colágeno do tipo III, imaturo, (imagens esverdeadas) foi predominante em implantes KO. Barra 100 µm; aumento 20x.

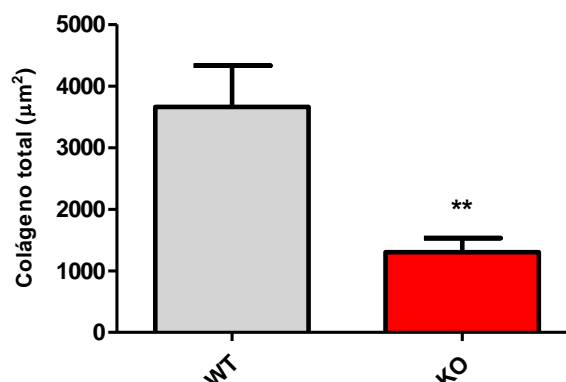


Figura 25. Análise densitométrica do colágeno total em implantes WT e KO. Valores mostram as médias (\pm SEM) de grupos de 6-8 animais em cada ponto da cinética. ** Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,01$.

Para confirmar a quantificação de colágeno histológica, foi realizada a mensuração da quantidade de colágeno solúvel no tecido de granulação formado em implantes de animais WT e KO 14 dias pós-implante. Através da análise dos níveis de colágeno solúvel foi possível verificar novamente uma menor deposição de colágeno em implantes KO (Figura 26).

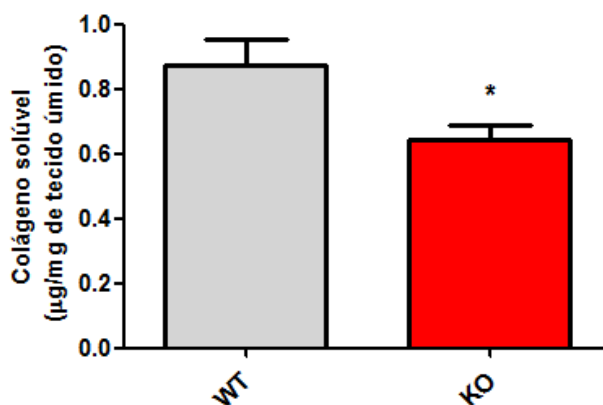


Figura 26. Quantificação de colágeno solúvel em implantes WT e KO. A análise do colágeno solúvel em implantes WT e KO (14 dias) demonstra uma menor deposição de colágeno entre os implantes KO. Valores mostram as médias (\pm SEM) de grupos de 6-8 animais em cada ponto da cinética. ** Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,01$.

Adicionalmente, como marcador da intensidade da fibrogênese, avaliamos o número de células gigantes derivadas de macrófagos nos implantes (Figura 27A- D). O número de células gigantes foi cerca de 30% menor no tecido de granulação proveniente de implantes KO quando comparado aos implantes WT (Figura 27E).

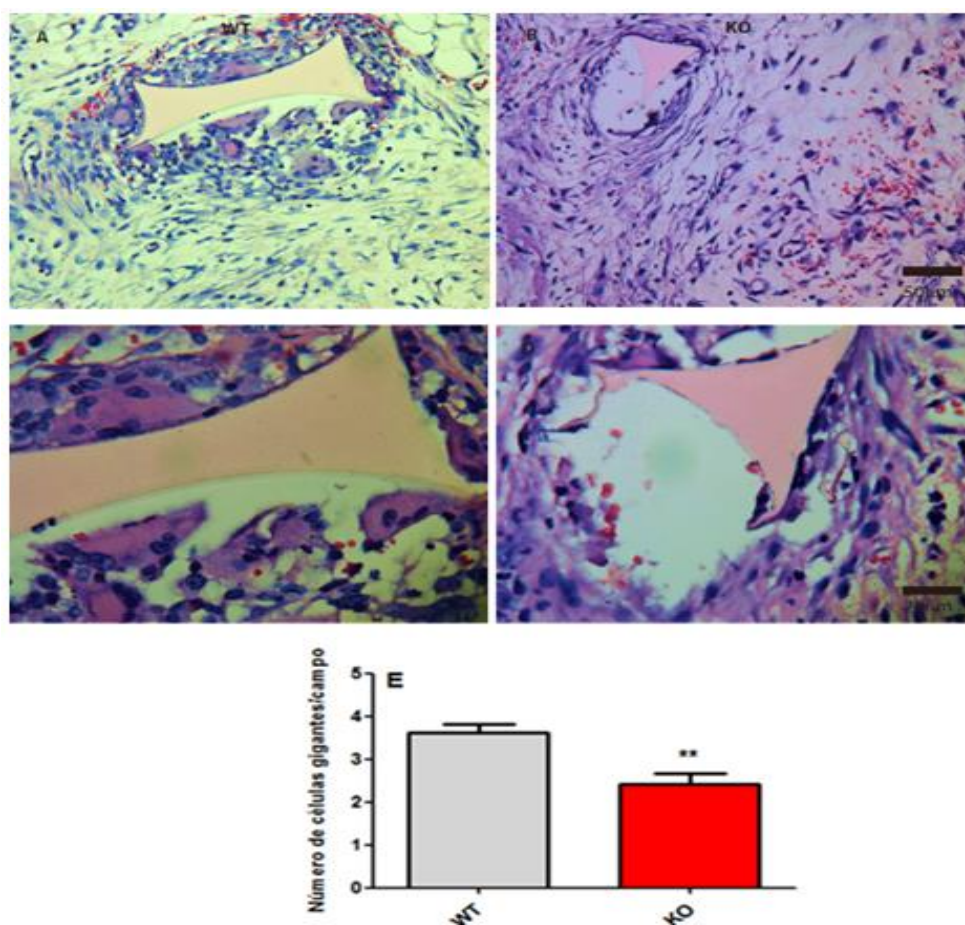


Figura 27. Células gigantes em implantes WT e KO. Em A (WT) e B (KO), cortes histológicos corados com H&E mostram o tecido fibrovascular (cabeça da seta; 5 μ m) em implantes de 14 dias. Os poros da matriz de esponja, formas triangulares (*), são infiltrados por células inflamatórias, os fibroblastos em formas de fuso, células endoteliais e vasos sanguíneos embebidos em uma densa matriz organizada (40x; barra 50 μ m). Menor quantidade de tecido fibrovascular é vista em implantes KO quando comparada aos implantes WT. Em C e D, células gigantes do tipo corpo estranho (setas) podem ser vistas ao redor das formas triangulares em um aumento maior (100x; barra 20 μ m). Em E, o número total de células gigantes em cortes histológicos de implantes WT e KO (14 dias) são mostrados. Valores mostram as médias (\pm SEM) de grupos de 6-8 animais em cada ponto da cinética. ** Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,01$.

5.4. Padronização de protocolos de digestão enzimática em implantes de esponja

Os resultados da leitura para padronização do protocolo de digestão tecidual em citômetro FACScanto II são apresentados na figura 28. Podemos observar uma clara diferença do perfil celular para os parâmetros de tamanho e granulosidade (FSC-A x SSC-A) durante o período estudado. Entretanto, marcações com anticorpos específicos foram necessárias para determinação dos tipos celulares presentes nos implantes. A figura 29 representa a contagem do número de células totais e viáveis em animais WT submetidos aos diferentes protocolos de digestão tecidual propostos. De forma geral, o protocolo 4 apresentou melhores resultados (maior número de células e viabilidade celular) (Figura 29A e C). Desta forma, o protocolo 4 foi utilizado como padrão no preparo de amostras para realização da imunofenotipagem por citometria de fluxo.

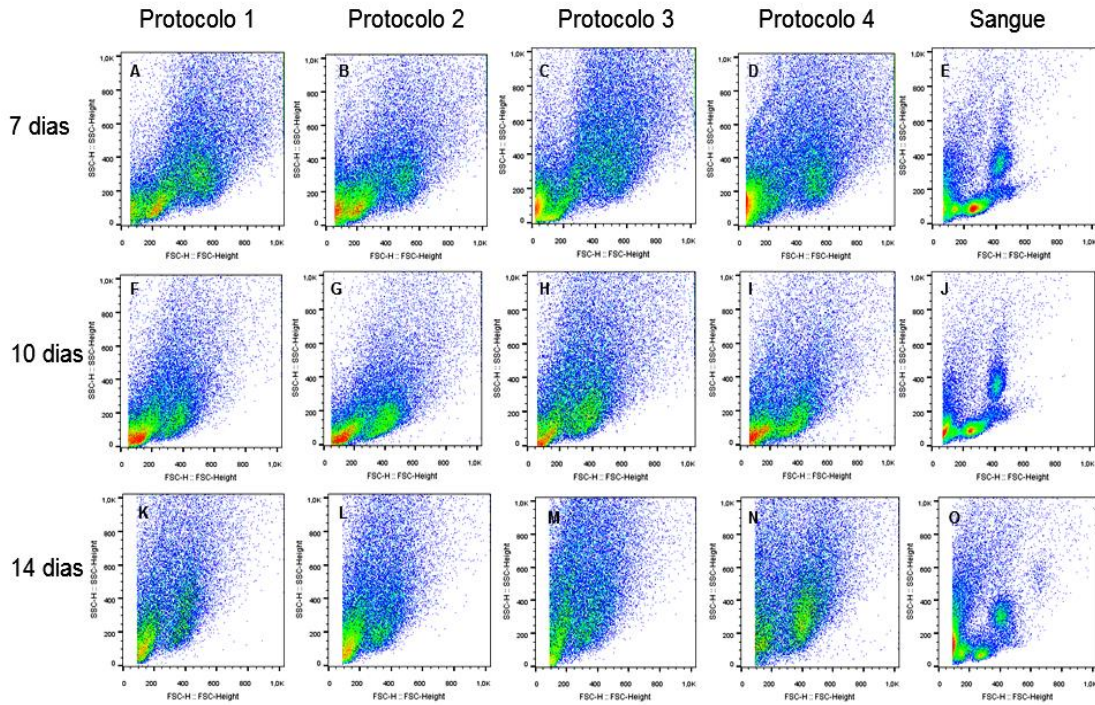


Figura 28. Leitura FSC-A x SSC-A de células isoladas de implantes WT submetidos a diferentes protocolos de digestão enzimática. A, F, K, implantes submetidos ao protocolo de digestão 1 (1 implante, 90 minutos em Accutase à 37°C), 7, 10 e 14 dia pós implante respectivamente. B,G,L , implantes submetidos ao protocolo de digestão 2 (2 implantes, 90 minutos em Accutase à 37°C), 7, 10 e 14 dias pós implante, respectivamente. C,H,M, implantes submetidos ao protocolo de digestão 3 (1 implante, 60 minutos em Accutase à 37°C + 30 minutos em Collagenase I à 37°C), 7, 10 e 14 dia pós implante respectivamente. D,I,N, implantes submetidos ao protocolo de digestão 4 (1 implante, 30 minutos em Collagenase I à 37°C + 5 minutos em tripsina 0,25% em SFB 10% à 37°C), 7, 10 e 14 dia pós implante respectivamente. E,J,O, sangue periférico de camundongo lisado com ACK, utilizado como controle positivo para o experimento.

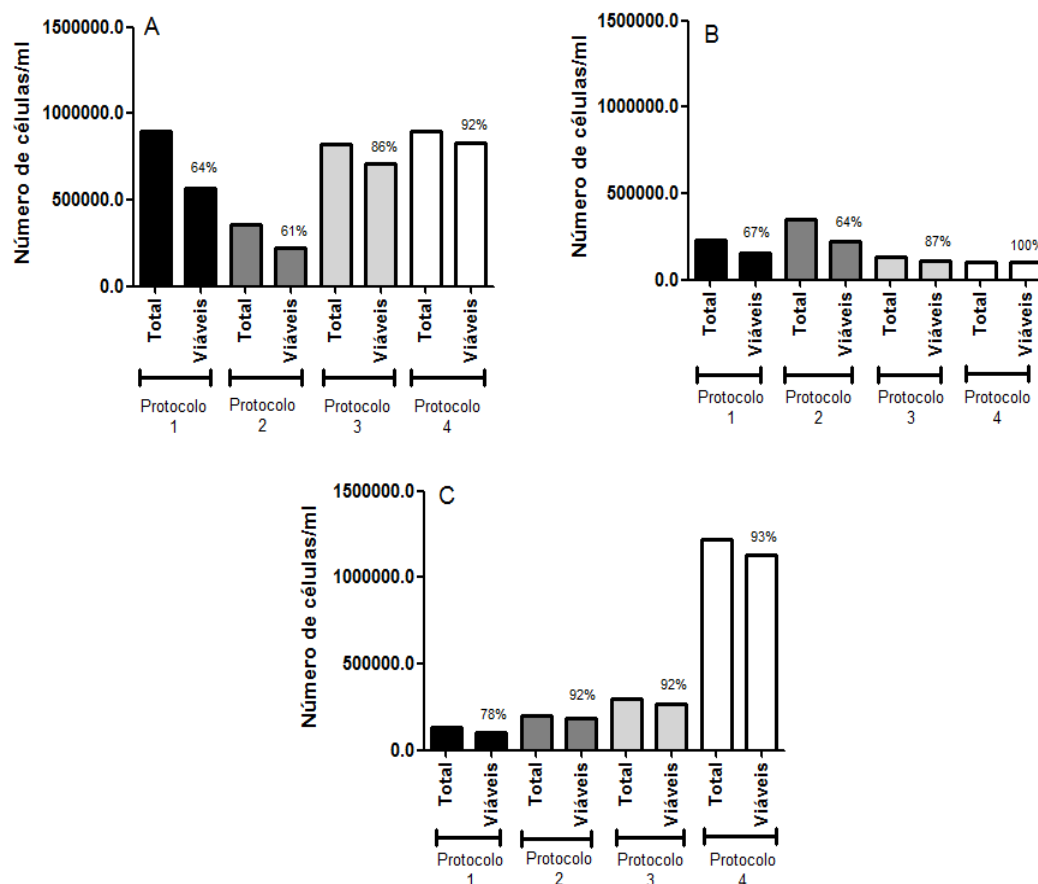


Figura 29. Contagem do número de células totais e viáveis em implantes WT submetidos a diferentes protocolos de digestão enzimática. A, número total e número de células viáveis extraídas de implantes de 7 dias submetidos aos seguintes protocolos de digestão: protocolo 1 (1 implante, 90 minutos em Accutase à 37°C), protocolo 2 (2 implantes, 90 minutos em Accutase à 37°C), protocolo 3 (1 implante, 60 minutos em Accutase à 37°C + 30 minutos em Collagenase I à 37°C) e protocolo 4 (1 implante, 30 minutos em Collagenase I à 37°C + 5 minutos em tripsina 0,25% em SFB 10% à 37°C); B, número total e número de células viáveis extraídas de implantes de 10 dias submetidos aos protocolos de digestão 1, 2, 3 e 4; C, número total e número de células viáveis extraídas de implantes de 14 dias submetidos aos protocolos de digestão 1, 2, 3 e 4. Os percentuais representam o número de células viáveis em relação ao número de células totais em cada protocolo e em cada ponto da cinética em animais WT.

5.5. Imunofenotipagem por citometria de fluxo

5.5.1. Estratégia de análise

Uma área (*gate*) de dispersão frontal (FSC-A) e dispersão lateral (SSC-A) foram utilizadas inicialmente para remover os debris celulares. As figuras 30 e 31 ilustram respectivamente, as estratégias de análises adotadas nas células marcadas com o painel de anticorpos 1 para o sangue periférico e implantes de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO.

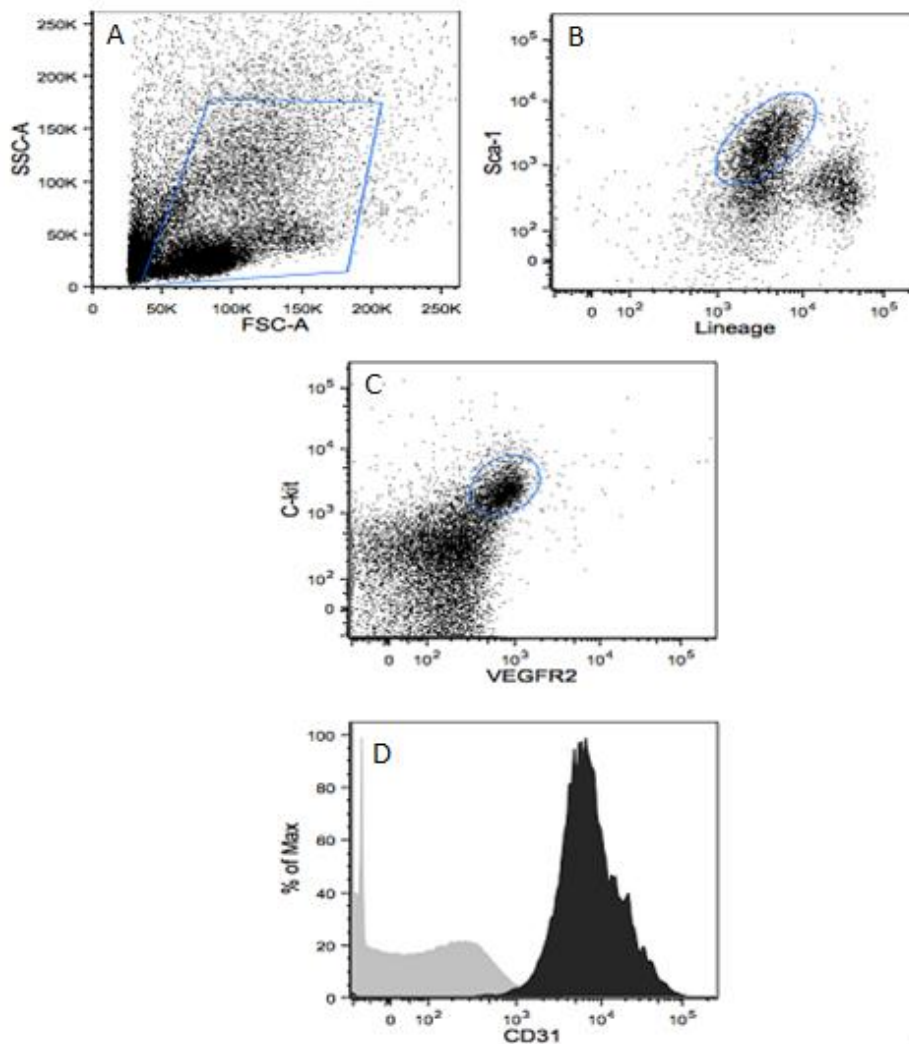


Figura 30. Citometria de fluxo – estratégia de análise para definir a população de células marcadas com anticorpos do painel 1 (anti- Lin, Sca-1, c-Kit, VEGFR2 e CD31) isoladas do sangue periférico de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO implantados. (A) Perfil FSC-A x SSC-A do total de eventos adquiridos. (B) Dot plot mostrando a população de células Lin^{low}/Sca-1⁺. (C) Dot plot representativo mostrando a população de células Lin^{low}/Sca-1⁺/c-Kit⁺/VEGFR2⁺. (D) Dot plot representativo mostrando a população de células Lin^{low}/Sca-1⁺/c-Kit⁺/VEGFR2⁺/CD31⁺.

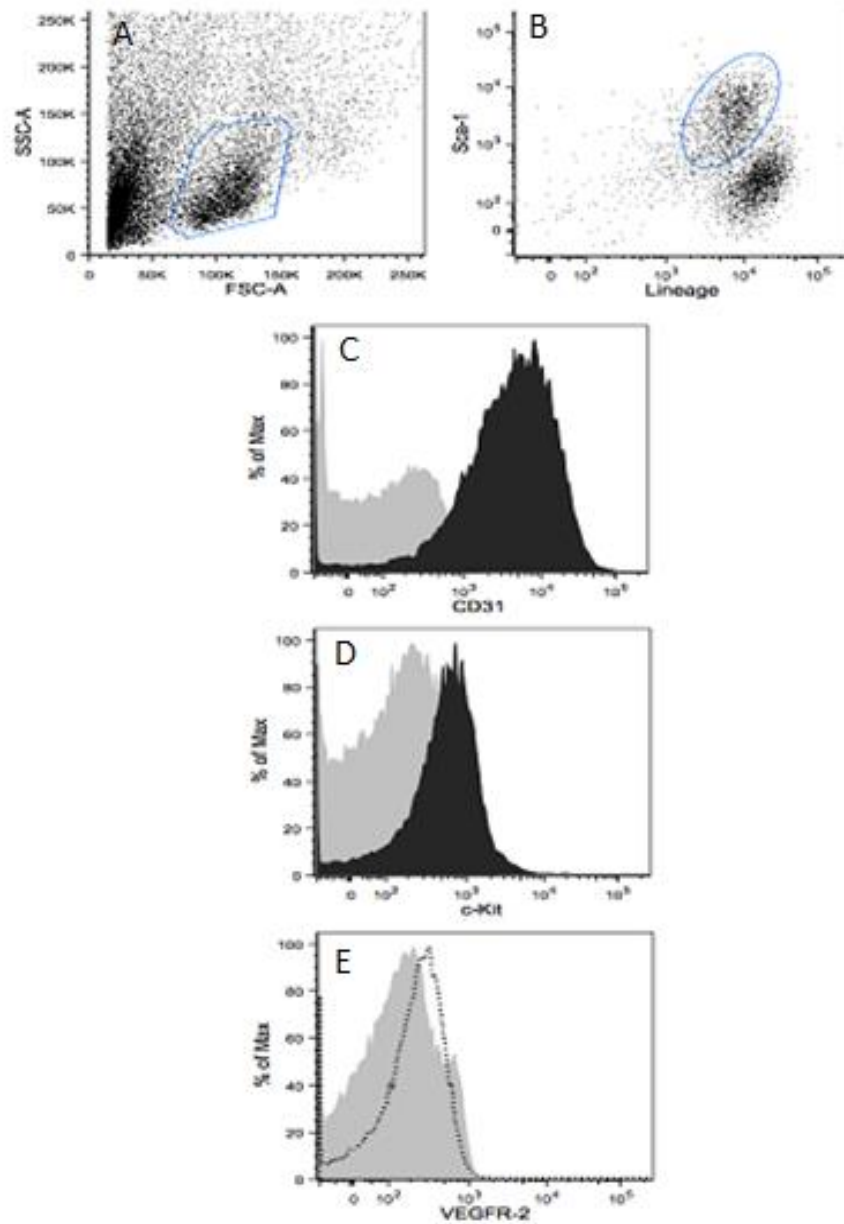


Figura 31. Citometria de fluxo – estratégia de análise para definir a população de células marcadas com anticorpos do painel 1 (anti- Lin, Sca-1, c-Kit, VEGFR2 e CD31) isoladas de implantes de 7 dias de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO. (A) Perfil FSC-A x SSC-A do total de eventos adquiridos. (B) Dot plot mostrando a população de células Lin^{low}/Sca-1⁺. (C) Histograma representativo mostrando a população de células Lin^{low}/Sca-1⁺/CD31⁺. (D) Histograma representativo mostrando a população de células Lin^{low}/Sca-1⁺/CD31⁺/c-Kit⁺. (E) Histograma representativo mostrando que as populações de implantes não expressam VEGFR2.

As estratégias de análises adotadas permitiu avaliar o perfil fenótipo contido nas células isoladas de implantes CCR2 WT e CCR2 KO e também no sangue periférico de camundongos WT e KO. Células do sangue periférico marcadas com o painel 1 de anticorpos (anti- Lin, Sca-1, c-Kit, VEGFR2 e CD31) expressaram todos os marcadores, ao passo que células contidas em implantes não demonstraram expressão do marcador anti-VEGF2 (Figuras 30 e 31).

A figura 32 ilustra a estratégia de análise adotada para a caracterização de marcadores de células inflamatórias presentes nos implantes de 7 dias de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO. Para esta análise inicialmente foi delimitado um *gate* com base na expressão de CD45, garantindo que as células selecionadas fossem realmente leucócitos. Foi observado que a maioria das células expressavam os marcadores F4/80^{high} e CD11b^{high}, perfil fenotípico característico de macrófagos. Também foi possível identificar a presença de células não mieloides através do perfil fenotípico F4/80⁻ e CD11b⁻. Não foi possível identificar a presença de neutrófilos através da expressão de Ly6G em implantes de esponja, neste estudo.

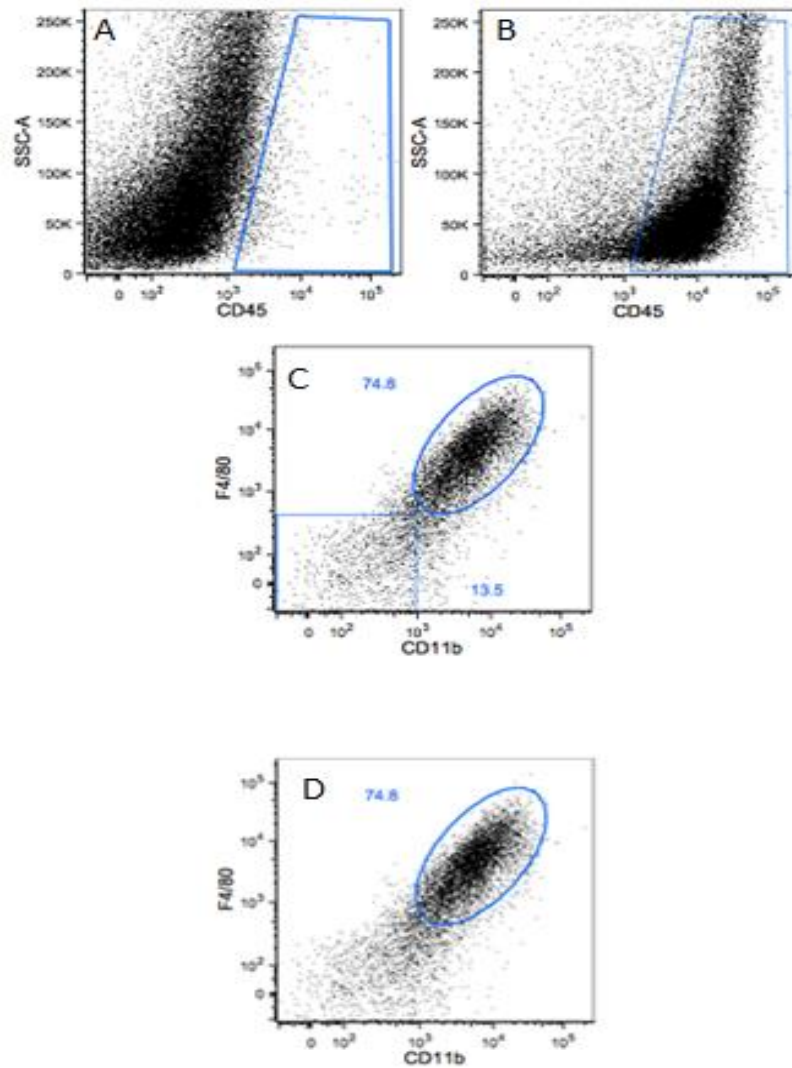


Figura 32. Citometria de fluxo – estratégia de análise para definir a população de células marcadas com anticorpos do painel 2 (anti- CD45, F4/80, CD11b, Ly6C, Ly6G) isoladas de implantes de 7 dias de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO. (A) Perfil FSC-A x SSC-A do total de eventos adquiridos. (B) Dot plot mostrando a população de células CD45⁺. (C) Dot plot representativo mostrando a população de células CD45⁺/ F4/80^{high}. (D) Histograma representativo mostrando a população de células CD45⁺/ F4/80^{high}/CD11b^{high}.

5.5.2. Imunofenotipagem celular de implantes de esponja e sangue periférico de camundongos

A imunofenotipagem por citometria de fluxo nos permitiu avaliar a expressão de marcadores de CTH's e CPE's no sangue periférico e implantes de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO. Além disso, a expressão de marcadores de leucócitos também pôde ser avaliada nos dois grupos de implantes.

Embora tenha sido possível identificar a expressão de alguns marcadores celulares de CTH's e CPE's, a caracterização propriamente dita destes tipos celulares não foi possível de ser realizada. Isto porque não foram encontrados subconjuntos de células negativas para expressão de células comprometidas com linhagens hematopoiéticas (Lin^-). As figuras 33 e 34 apresentam, respectivamente, a caracterização do fenótipo celular do sangue periférico e de células oriundas de implantes de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO.

Foi possível observar que apesar das populações de células presentes no sangue periférico dos dois grupos de camundongos avaliados apresentarem perfis semelhantes (Figura 33 A-D), animais KO apresentaram maior expressão da população $Lin^{low}/Sca-1^+/c-kit^+/VEGFR2^+/CD31^+$ quando comparado aos animais selvagens (Figura 33E). Indicando que CCR2 parece ser importante na expressão desta população de células no sangue periférico de camundongos.

Em relação às células isoladas de implantes de camundongos WT e KO não foram observadas diferenças quanto ao perfil celular (Figura 34 A-D) e ao

fenotípico $\text{Lin}^{\text{low}}/\text{Sca-1}^+/\text{c-kit}^+/\text{CD31}^+$ entre os dois grupos (Figura 34E). Indicando que a falta do CCR2 não afeta a expressão destes marcadores em tecidos neoformados como o presente nos implantes avaliados. Ademais, ao contrário das células isoladas do sangue periférico, as células presentes nos implantes de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO não expressam o marcador VEGFR2.

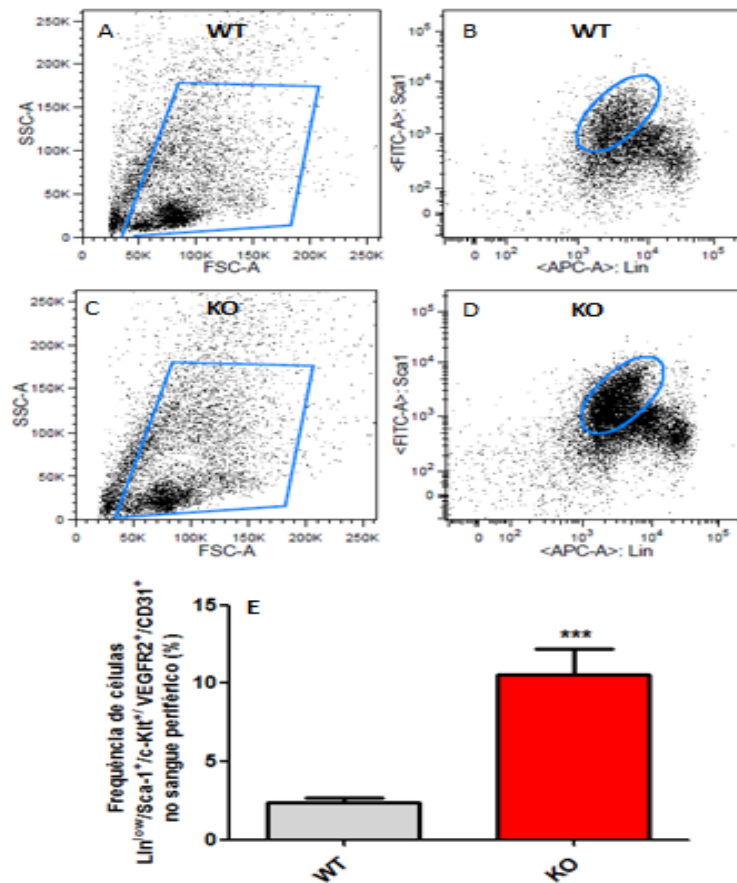


Figura 33. Imunofenotipagem de células do sangue periférico de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO implantados. (A e C) Dot plots representativos do perfil FSC-A x SSC-A do total de eventos adquiridos do sangue periférico de camundongos WT e KO, respectivamente. (B e D) Dot plots representativos das populações de células $\text{Lin}^{\text{low}}/\text{Sca-1}^+$ do sangue periférico de camundongos WT e KO, respectivamente. (E) Frequência da população de células $\text{Lin}^{\text{low}}/\text{Sca-1}^+/\text{c-Kit}^+/\text{VEGFR2}^+/\text{CD31}^+$ no sangue periférico de camundongos (n = 5). ***Diferença significativa entre WT e KO, $P < 0,001$

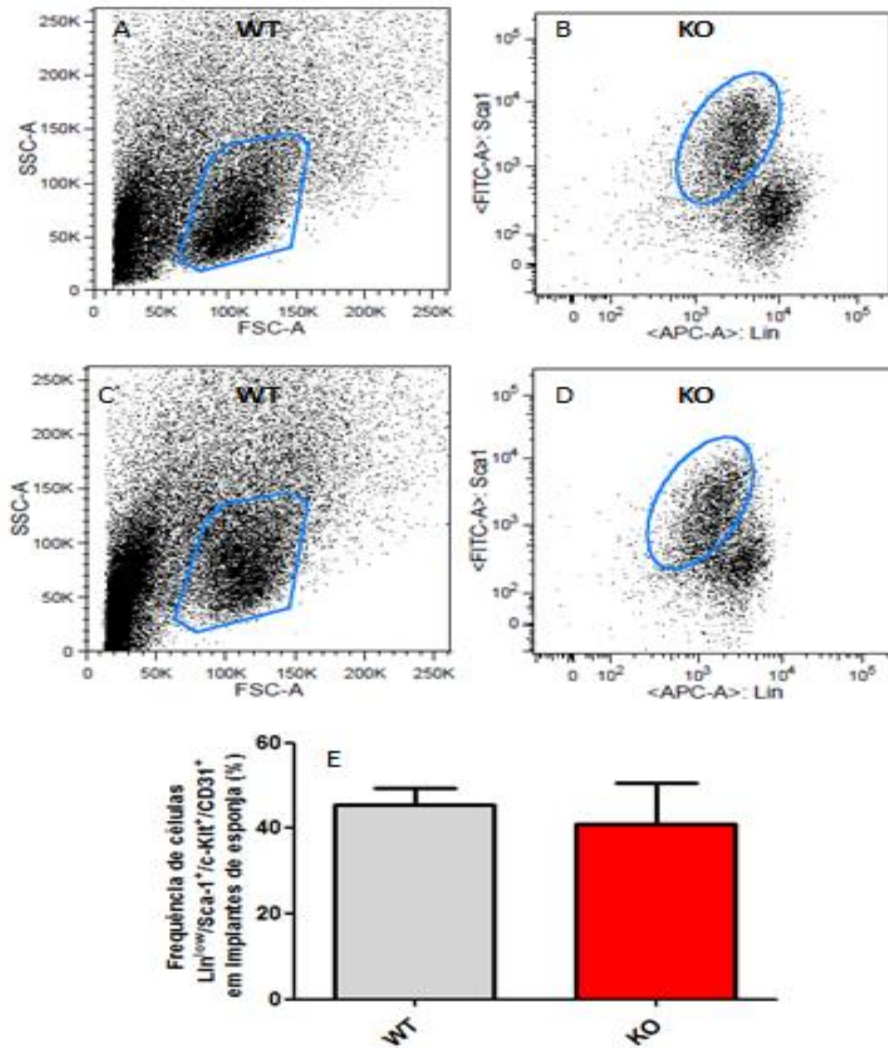


Figura 34. Imunofenotipagem de células isoladas de implantes de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO implantados. (A e C) Dot plots representativos do perfil FSC-A x SSC-A do total de eventos adquiridos de células isoladas de implantes de camundongos WT e KO, respectivamente. (B e D) Dot plots representativos das populações de células Lin^{low}/Sca-1⁺ de células isoladas de implantes de camundongos WT e KO, respectivamente. (E) Frequência da população de células Lin^{low}/Sca-1⁺/c-Kit⁺/CD31⁺ de células isoladas de implantes de camundongos WT e KO, respectivamente (n = 5).

A análise da população leucocitária presente em implantes de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO após 7 dias de implantação é apresentada na Figura 35.

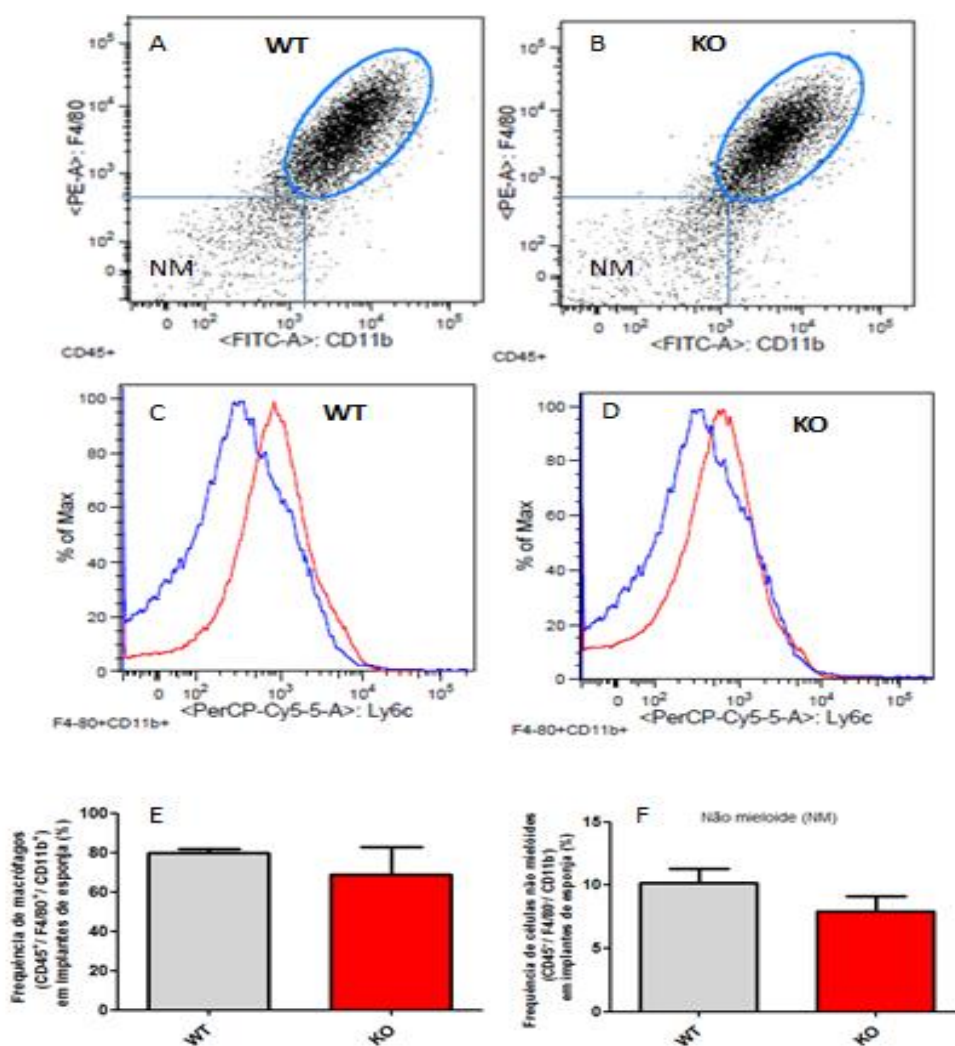


Figura 35. Imunofenotipagem de células isoladas de implantes de camundongos CCR2 WT e CCR2 KO. (A e B) Dot plots representativos da população de macrófagos (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁺) em implantes WT e KO, evidenciando as células não mieloides (NM) (CD45⁺/CD11b⁻/F4/80⁻). (C e D) histogramas representativos de populações de células (CD45⁺/CD11b⁻/F4/80⁻/Ly6C^{low}) isoladas de implantes de camundongos WT e KO, respectivamente. (E, F) Frequência da população de macrófagos e células não mieloides isoladas de implantes de camundongos WT e KO, respectivamente (n = 5).

A população leucocitária presente em implantes de esponja foi caracterizada principalmente pela presença de macrófagos (CD45⁺/F4/80^{high}/CD11b^{high}) (Figura 35A-B) e não houve diferença na expressão de CD45⁺/F4/80^{high}/CD11b^{high} entre implantes WT e KO (7 dias pós-

implante) (Figura 35E). Além disso, foi observada uma baixa expressão do marcador Ly6C entre a população $CD45^+/F4/80^{high}/CD11b^{high}$, possivelmente macrófagos menos diferenciados ou monócitos (Figura 35C-D). Além disso, também pôde ser evidenciada a presença de células não mieloides (NM) ($CD45^+/CD11b^-/F4/80^-$) cuja frequência não diferiu entre os implantes de animais WT e KO.

6. *Discussão*

▪ **6. DISCUSSÃO**

A interação entre um implante e o hospedeiro desencadeia uma resposta inflamatória crônica que inclui etapas como adsorção de proteínas, adesão de monócitos/macrófagos, formação de células gigantes e um processo semelhante ao que ocorre no reparo tecidual (KYRIAKIDES *et al.*, 2004; ANDERSON *et al.*, 2008). O presente trabalho apresenta pela primeira vez um estudo do desenvolvimento sequencial dos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória do hospedeiro frente a implantes sintéticos em camundongos com deleção gênica do CCR2 (CCR2 KO). Esta resposta homeostática desencadeada pelo hospedeiro é comumente denominada resposta do tipo corpo estranho.

A razão crucial para a escolha do modelo de implante de esponja aliado ao uso de animais geneticamente modificados foi devido ao fato de que este receptor é altamente expresso em uma gama de estados inflamatórios (KITAGAWA *et al.*, 2004; QUINONES *et al.*, 2005; PEASE & WILLIAMS, 2006; MITCHELL *et al.*, 2009). Além disso, o CCR2 é altamente expresso em monócitos/ macrófagos, tipos celulares cruciais nas respostas desencadeadas pela implantação de materiais sintéticos. Desta forma, o delineamento deste estudo nos permite avaliar, simultaneamente, a reação do tipo corpo estranho induzida pelo implante e o papel biológico do receptor CCR2 durante esta interação. De forma geral, a metodologia foi eficiente para esclarecer os objetivos propostos por este trabalho sendo possível avaliar as respostas

temporais da interação implante/ hospedeiro bem como o papel do CCR2 sobre eventos da reação ao corpo estranho. Neste estudo os efeitos da deleção do CCR2 durante a interação implante/ hospedeiro foram mais óbvios ao final do período experimental, ou seja, aos 14 dias após a implantação dos discos de esponja.

À análise macroscópica, dos implantes, não foram observados sinais de infecção ou rejeição aos implantes, nos permitindo inferir que os implantes utilizados sejam biocompatíveis. Por outro lado, a adesão dos implantes aos tecidos biológicos (pele ou músculo) indica que apesar da biocompatibilidade, o implante não foi considerado inerte pelo organismo, desencadeando uma resposta do tipo corpo estranho. O exame microscópico, *in situ*, evidenciou importantes alterações morfológicas na neovasculatura do tecido de granulação proveniente de animais CCR2 KO sugerindo um importante papel deste receptor na formação e estabilização de vasos. Acredita-se que as alterações morfológicas observadas possam ser devido à perda da função biológica da quimiocina CCL2, principal ligante do CCR2, uma vez que esta quimiocina participa do recrutamento de células musculares lisas para o entorno das células endoteliais, facilitando a formação e promovendo a estabilização dos microvasos neoformados (ARDERIU *et al.*, 2011; ARDERIU *et al.*, 2012).

As alterações estruturais e morfológicas ocasionaram alterações funcionais refletidas pelas modificações no fluxo sanguíneo da vasculatura pré-existente (pele) e do tecido de granulação intrainplante. O papel do CCR2

sobre o fluxo sanguíneo não é bem estabelecido e este trabalho demonstra pela primeira vez a importância do CCR2 sobre a microvasculatura cutânea, o que indica um papel importante deste receptor na manutenção do tônus vascular da pele em condições fisiológicas. Tem sido demonstrada uma correlação positiva entre número de macrófagos recrutados para sítios inflamatórios e o aumento do fluxo sanguíneo e, adicionalmente, a perda da atividade do eixo CCL2/ CCR2 poderia levar às alterações relatadas (TANG *et al.*, 2004).

Os parâmetros utilizados neste estudo para determinar o fluxo sanguíneo têm sido extensivamente utilizados para avaliar a neovascularização em vários tecidos e modelos animais (HU *et al.*, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 2006; MARQUES *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2014). Sabe-se que vasodilatação e/ou aumento da permeabilidade ocorre em condições inflamatórias e poderiam interferir na acurácia das medidas de fluxo sanguíneo avaliadas pelas técnicas utilizadas. Desta forma, optou-se por analisar, adicionalmente, outro parâmetro vascular, o conteúdo de hemoglobina, no intuito de esclarecer se as alterações vasculares observadas foram decorrentes de aumento da permeabilidade vascular ou devido a formação de novos vasos sanguíneos intrainplante.

Dentre os fatores que estimulam a neovascularização em tecidos, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é um dos mais estudados e foi também avaliado neste estudo. Menores níveis de VEGF observados em implantes CCR2 KO logo após a implantação são compatíveis com indícios de redução do processo angiogênico. De fato, alguns autores demonstraram que a

deleção do CCR2 refletiu em menores níveis de VEGF em músculos esqueléticos lesionados (OCHOA *et al.*, 2007). Acredita-se que a deleção do CCR2, por comprometer o recrutamento de monócitos/ macrófagos, acarrete a redução dos níveis de VEGF por estas células levando também a uma formação deficiente dos vasos sanguíneos em implantes de animais KO.

O processo inflamatório influencia benéfica ou prejudicialmente a função de biomateriais implantados e o direcionamento dos eventos dependerão da magnitude da resposta do organismo frente ao implante, da especificidade do tecido em contato com o material, do tempo de contato e das características físico-químicas do material (MORAIS *et al.*, 2010). Neste trabalho, a participação do processo inflamatório nas alterações encontradas na interação implante/hospedeiro em camundongos CCR2 KO foi avaliada quanto à atividade de enzimas e citocinas inflamatórias. Estes parâmetros têm sido aceitos como marcadores deste processo em diversos estudos (ASSI *et al.*, 2011; ECKERMANN *et al.*, 2011; GALLET *et al.*, 2011).

A atividade da mieloperoxidase, uma enzima presente em grânulos azurofílicos de neutrófilos, tem sido utilizada como evidência do recrutamento de neutrófilos em vários modelos experimentais (CAMPOS *et al.*, 2008; ARAÚJO, *et al.*, 2011; MOURA *et al.*, 2011). Os neutrófilos representam a linha primária de defesa do organismo e são atraídos para o local da lesão por citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e CXCL1/KC, produzidas por plaquetas ativadas, células endoteliais e por produtos de degradação de patógenos (DIEGELMANN & EVANS, 2004; NUNES *et al.*, 2011). No componente

inflamatório relacionado às interações existentes entre implante e hospedeiro, os “corpos estranhos” são reconhecidos por receptores de membranas de neutrófilos e são, então, fagocitados. Os neutrófilos entram em apoptose rapidamente, liberando citocinas que são importantes para o recrutamento de macrófagos (WRIGHT *et al.*, 2010).

As investigações do papel do CCR2 sobre componente inflamatório da reação do tipo corpo estranho revelaram que o acúmulo de neutrófilos, mensurado pela atividade da MPO, foi maior em implantes provenientes de animais CCR2 KO, com um pico da atividade desta enzima ao final do período experimental. De forma semelhante, Shireman (2007) demonstrou uma elevação da atividade da MPO 3 dias após isquemia de músculos de cabra. Embora o perfil temporal do recrutamento e atividade de neutrófilos seja diferente entre os dois modelos, provavelmente devido à variabilidade intrínseca do tecido e tipo de lesão estudada, um aumento no acúmulo de neutrófilos em camundongos CCL2 KO tem sido também consistentemente reportado por outros autores (KUZIEL *et al.*, 1997; JINNOUCHI *et al.*, 2003).

Os níveis da quimiocina CXCL1/ KC, o principal fator responsável pela quimiotaxia de neutrófilos, foram maiores em implantes de animais CCR2 KO. Estes dados são coerentes com o fato de que o infiltrado de neutrófilos, mensurado pela atividade da MPO foram também maiores em implantes CCR2 KO, indicando que CXCL1/KC é o mediador responsável pelo recrutamento de células polimorfonucleares na reação do tipo corpo estranho e na ausência do CCR2.

A enzima NAG está presente em macrófagos ativados e está associada a uma fase inflamatória crônica (BARCELOS *et al.*, 2004). Os macrófagos são células mieloides maduras, derivadas da diferenciação de monócitos/macrófagos circulantes e que possuem inúmeros papéis fisiológicos e patológicos dependendo da estimulação de certas citocinas. Os macrófagos participam da reação do tipo corpo estranho e são importantes durante e reparo e deposição de matriz em modelos de implantação de biomateriais (WRIGHT *et al.*, 2010). A atividade da NAG, como uma medida indireta do acúmulo de macrófagos foi menor no tecido de granulação proveniente de implantes KO e isto ocorreu, muito provavelmente, devido à falta do receptor quimiotático de monócitos (CCR2). O acúmulo de macrófagos ao final do período experimental foi semelhante nos dois grupos o que sugere o uso de vias alternativas de quimiotaxia para monócitos/macrófagos na ausência do CCR2 (CHARO & RANSOHOFF, 2006).

A produção de CCL2/JE, um clássico agente quimiotático e principal ligante do CCR2 (SHIREMAN *et al.*, 2007; PAGE *et al.* 2011) foi maior no tecido fibrovascular formado em implantes de animais KO indicando que os níveis aumentados de CCL2/JE sejam uma resposta compensatória cujo objetivo é estimular o receptor aumentando a produção do ligante. Em concordância com estes dados, outros grupos de pesquisa também demonstraram níveis aumentados de CCL2/ JE em camundongos CCR2 KO em modelos de granuloma pulmonar e trombose (WARMINGTON *et al.*, 1999; HENKE *et al.*, 2006).

Outro fator importante no processo inflamatório durante a reação do tipo corpo estranho é o óxido nítrico (NO). O NO é um gás solúvel, inorgânico e incolor que apresenta um papel dual, muitas vezes sendo benéfico outras vezes prejudicial à resolução da resposta inflamatória. Esta molécula está envolvida no relaxamento vascular e constitui um importante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; KOBAYASHI, 2010). Além disso, possui um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos, podendo atuar como agente angiogênico por estimular a proliferação de células endoteliais (PANG *et al.*, 2015).

No presente trabalho, o óxido nítrico (NO) foi avaliado indiretamente pela produção de nitrito e revelou que o tecido de granulação proveniente de implantes de animais KO apresentam níveis elevados de nitrito comparado aos camundongos íntegros. Entretanto, estes animais não conseguem sustentar a produção de nitrito ao longo do período experimental. Sabe-se que durante processos inflamatórios, macrófagos expressam óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que é a enzima responsável pela produção de NO em estados inflamatórios (KOBAYASHI, 2010). Os níveis não sustentados de NO durante o período experimental poderia ser em decorrência da dificuldade que animais CCR2 KO apresentam em recrutar macrófagos/monócitos, alterando a produção de NO no tecido intrainplante.

Outro mediador que desempenha um importante papel durante estados inflamatórios é a citocina TNF- α . Esta citocina pró-inflamatória promove o

reparo tecidual por induzir componentes da membrana basal e de proteases para a degradação do colágeno, participando ativamente da reconstrução da matriz extracelular. Alguns autores também demonstraram que TNF- α é capaz de induzir a neoformação vascular por estimular produção de VEGF e de fator de crescimento fibroblástico (FGF) em células endoteliais (YOSHIDA *et al.*, 1997; BANNO *et al.*, 2004). Os níveis de TNF- α em implantes CCR2 KO não se sustentaram ao longo do período experimental estudado, indicando que o CCR2 seja importante para a produção adequada deste mediador inflamatório. Adicionalmente têm sido observada uma relação direta entre aumento da produção de TNF- α e redução da expressão de CCR2 e Weber *et al.* (1999) demonstraram que monócitos em cultura tratados com TNF- α apresentaram expressão de CCR2. Isto sugere a existência de um processo modulatório entre os dois mediadores e que a ausência do CCR2 pode levar a alterações no padrão de produção de TNF- α .

Outra citocina importante nas respostas induzidas por implantes é o TGF- β 1 que desempenha um papel biológico na fibrogênese de tecidos por induzir a diferenciação de fibroblastos e deposição de colágeno nos sítios de implantação (LEASK & ABRAHAM, 2004; BONNIAUD *et al.*, 2005). As dosagens de TGF- β 1, neste trabalho, demonstraram que o CCR2 apresenta importante papel na produção sustentada desta quimiocina e sua ausência leva à alterações no processo de deposição de matriz e formação de células gigantes intrainplante. Esta hipótese é reforçada por achados de outros

autores que demonstraram que a deleção do CCR2 reduz a fibrose em órgãos como pulmão, fígado, coração e pele (KIM *et al.*, 2005; SAKAI *et al.*, 2006).

A formação de células gigantes durante a reação do tipo corpo estranho visa promover a fagocitose de partículas dos implantes, produção de citocinas inflamatórias e o reparo tecidual pelos macrófagos fusionados (KHAN *et al.*, 2016; KLUEH *et al.*, 2016). A análise histológica dos implantes revelou que, implantes células gigantes eram menos prevalentes no tecido fibrovascular desenvolvido em implantes provenientes de animais KO. Acredita-se que alterações no recrutamento de monócitos/ macrófagos bem como a falta do CCR2 *per si* comprometam a fusão de macrófagos e conseqüentemente atenuam a resposta do tipo corpo estranho induzida por implantes em animais KO. Esta ideia é suportada por autores como Kyriakides *et al.* (2004) e Khan *et al.* (2016) que demonstraram menor formação de células em gigantes em implantes de esjoja e filtros Millipore e em culturas de células mononucleares provenientes de camundongos CCL2 KO e CCR2 KO, respectivamente.

A identificação dos tipos e populações celulares envolvidas durante a resposta biológica do organismo aos implantes é um aspecto chave para compreensão das respostas de integração ou falha dos dispositivos implantados. Esta caracterização celular permite prever se o implante apresentará função estrutural e de sustentação dos tecidos biológicos ou se haverá integração do biomaterial permitindo a comunicação entre o tecido do hospedeiro e o implante (ANDERSON, 2001; SHEIKH *et al.*, 2015; KLOPFLEISCH, 2016).

A técnica de citometria de fluxo tem sido amplamente utilizada para a identificação das populações de células contidas em tecidos através da expressão de marcadores de superfície celular. Para imunofenotipagem de tecidos sólidos e de células contidas em implantes, é necessária padronização do preparo da amostra, do painel de anticorpos a serem utilizados e da calibração de sistemas de aquisição e análise (DONNENBERG & DONNENBERG; ZIMMERLIN *et al.*, 2011; SPADA *et al.*, 2016).

Os métodos enzimáticos têm sido reportados como sendo eficientes para a dissociação de tecidos sólidos como tumores, estômago e cólon e as enzimas mais comumente utilizadas neste processo são a tripsina e a Collagenase. Além disso, esses métodos liberam grande número de células do tecido e preservam a integridade e viabilidade celular comparado a métodos de dissociação mecânica (NOVELLI *et al.*, 2000). Por esta razão, neste trabalho, optou-se por utilizar o método de digestão enzimática para desagregar as células contidas em implantes. De forma geral, todas as enzimas utilizadas forneceram resultados satisfatórios no que tange à extração de células do implante e viabilidade. Entretanto, a associação entre Collagenase e tripsina (protocolo 4) foi a que forneceu o maior número de células e melhor viabilidade celular, sendo, portanto, consideradas as enzimas de escolha para a extração de células intrainplante.

Alguns autores têm sugerido benefícios da associação de dois agentes enzimáticos durante a incubação de tecidos para a desagregação celular (HAEFFNER *et al.*, 1997; ADAMS *et al.*, 1997). Em nossos achados, a

combinação de Collagenase e tripsina, bem como de Accutase e Collagenase também foram mais eficientes na desagregação celular do que os protocolos que utilizavam apenas um agente enzimático no processo de digestão tecidual. Li *et al.* (2015) demonstraram, ainda, que tripsina parece ser mais efetiva que Accutase no processo de desagregação celular e em reduzir apoptose de células neurais durante a pré incubação de tecido cerebral humano com enzimas. Desta forma, acreditamos que tripsina tenha potencializado os efeitos da Collagenase I durante o processo de digestão enzimática do implante, apresentando, portanto, melhores resultados que a combinação Collagenase/Accutase.

Em relação ao número de células totais obtidas em relação ao número de dias em que o implante permaneceu no animal, observamos que aos 7 dias houve maior número de células comparado aos implantes que permaneceram 10 e 14 dias. Isto, pode refletir a máxima que aos 7 dias pós-implantação haja ainda, maior infiltrado de células inflamatórias, fibroblastos e outros tipos celulares, ao passo que após 7 dias o processo de deposição de matriz e colágeno já estão mais estabelecidos, sendo esperado, portanto, menor número de células (CASTRO *et al.*, 2012). Devido a este fato, e considerando que as respostas biológicas associadas à interação implante/ hospedeiro foram mais significativas 7 dias após implantação, optamos por caracterizar o perfil imunofenotípico das células contidas no implante neste ponto da cinética.

Padronização, calibração e controles (negativos e positivos) são essenciais para garantir a qualidade e reprodutibilidade dos dados obtidos pela

técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo. Logo, cuidado especial deve ser tomado com as etapas pré-analíticas, calibrando tanto citômetros quanto softwares responsáveis pela aquisição dos eventos (MITTAG & TÁRNOK, 2009; MAECKER *et al.*, 2012). Neste trabalho práticas recomendadas na literatura foram adotadas com o intuito de garantir o controle da qualidade do experimento de imunofenotipagem realizado. Foram utilizados reagentes indicados pelo fabricante do citômetro, realização prévia de calibração do equipamento e softwares de aquisição de dados e realização de compensação durante a aquisição e análise dos eventos obtidos, garantindo, assim, a confiabilidade e acurácia dos dados aqui apresentados.

A análise dos eventos obtidos em um ensaio de imunofenotipagem é de grande complexidade e envolve etapas que devem ser seguidas para garantir uma análise confiável e assegurar a identificação correta da população celular de interesse. Desta forma, cuidado especial deve ser direcionado à estratégia de *gating*, uma vez que o uso criterioso desta estratégia pode contribuir para a mais rápida identificação de subpopulações de células dentro dos dados globais (TUNG *et al.*, 2007; MITTAG & TÁRNOK, 2009; ADAN *et al.*, 2016; AGHAEPOUR *et al.*, 2013).

As análises dos dados de imunofenotipagem utilizaram-se da estratégia de *gating* sendo que inicialmente foram removidos os debris celulares, com base no tamanho e granulosidade das células e, posteriormente, selecionadas *dot plots* e histogramas de acordo com o padrão de expressão dos anticorpos. Este tipo de estratégia tem sido bem aceito e adotado por outros

pesquisadores na identificação de células inflamatórias e de populações raras, como células tronco hematopoiéticas (CTH's) e células progenitoras endoteliais (CPE's) em diversos tipos de tecidos (SI *et al.*, 2010; NILSSON *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014; VIANA *et al.*, 2015; SCHMUTZ *et al.*, 2016; SPADA *et al.*, 2016).

Uma análise citométrica envolve a determinação da intensidade de fluorescência global de um grande número de células individuais marcadas por fluorocromos em uma suspensão de células. Desta forma, a intensidade de fluorescência total das células é proporcional à quantidade de moléculas de fluorocromos por célula (MITTAG & TÁRNOK, 2009). Os fluorocromos e anticorpos que compunham os painéis utilizados neste estudo foram selecionados com base em dados da literatura, de forma, que os dados obtidos pudessem ser comparados com outros trabalhos já publicados.

Existe uma grande heterogeneidade nos marcadores de superfície celular utilizados para identificar as CTH's e CPE's em camundongos. Esta variedade de marcadores reflete os diferentes estágios de desenvolvimento destas células que ocorre durante o processo de maturação na medula óssea para células maduras da parede vascular (ZHU *et al.*, 2007; ZHANG & SHE, 2007). Para a identificação de CTH's, com mínimo grau de diferenciação, normalmente se utiliza o perfil fenotípico em que as células são separadas com base no status de negatividade para marcadores de células comprometidas com linhagens hematopoiéticas e presença dos epítomos de superfície c-Kit e Sca-1, compondo o perfil denominado SKL (LAI *et al.*, 1998; ZHU *et al.*, 2007;

LIU *et al.*, 2012). Por outro lado, CPE's são células comprometidas com a diferenciação para a linhagem endotelial e expressam outros marcadores de superfície como o CD133, CD34, VE-caderina, CXCR4, CD31 e VEGFR2, estes dois últimos, também expressos em células endoteliais maduras (LAI *et al.*, 1998; URBICH & DIMMELER, 2004; BAILEY *et al.*, 2006; ZHANG & SHE, 2007; TONGERS *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2014).

Populações de células negativas para marcadores de superfície de células comprometidas com linhagens hematopoiéticas (anti- Lin) não puderam ser identificadas no sangue periférico e nas células obtidas de implantes de animais WT e KO. Deve-se considerar que o anticorpo utilizado para tal fim é um coquetel com diversos anticorpos podendo induzir marcações em células de linhagem hematopoiética com diferentes graus de maturação. Associado ao uso de altas concentrações deste anticorpo, resultados falso- positivos podem ser obtidos. Embora, a identificação de células Lin⁻ não tenha sido confirmada, constatou-se que células do sangue periférico e isoladas de implantes de animais WT e KO apresentaram marcação positiva para diversos marcadores de CTH's (Sca-1 e c-Kit) e de CPE's (CD31 e VEGFR2). Estes achados reforçam a ideia de que células maduras do sangue periférico e de tecidos de granulação apresentam precursores embrionários comuns às CTH's e CPE's e que possam haver células com diferentes graus de maturação nestes tecidos (GARLANDA & DEJANA, 1997; HOLMES & STANFORD, 2007).

Adicionalmente, a presença de marcadores de células indiferenciadas em células Lin⁺ reacende a discussão de que células Lin⁺ poderiam apresentar

alguma atividade de CTH's e CPE's. Nishi *et al.* (1995) demonstraram que células $\text{Lin}^+/\text{Sca-1}^+/\text{c-Kit}^+$ foram mais eficientes no repovoamento da medula óssea de camundongos quando comparado à células de fenótipo $\text{Lin}^-/\text{Sca-1}^+/\text{c-Kit}^+$. Após isto, outros trabalhos não foram publicados refutando ou reforçando os achados desses autores. Mais recentemente, Goldberg *et al.* (2015) trouxeram esta discussão à tona ao publicarem uma nota comunicando a identificação de subconjuntos de células Lin^+ contribuindo de forma significativa no repovoamento da medula óssea de camundongos. Estes autores destacaram ainda, a possibilidade da existência de um fenótipo cíclico existente em células CTH's e CPE's dentro da fração de células Lin^+ enfatizando a necessidade de estudos que avaliem o potencial destas células na medula óssea e em outros tecidos (GOLDBERG *et al.*, 2015; QUESENBERRY *et al.*, 2015).

Em adição, as células encontradas no sangue periférico e implantes de camundongos WT e KO apresentam marcadores comuns aos expressos em células endoteliais circulantes com diversos graus de diferenciação, como CD31 e VEGFR2 (GARLANDA & DEJANA, 1997). Além disso, diversos trabalhos têm demonstrado que Sca-1 e c-Kit, apesar de serem utilizados como marcadores de células indiferenciadas, são expressos em células endoteliais de capilares em diversos órgãos e sob diferentes condições fisiológicas (LUNA *et al.*, 2004; MATSUI *et al.*, 2004; BAILEY *et al.*, 2006; WONG *et al.*, 2007; TSUCHIYA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2010). De posse destas informações, sugere-se a possibilidade de que células com fenótipo $\text{Lin}^{\text{low}}/\text{Sca-1}^+/\text{c-}$

Kit⁺/VEGFR2⁺/CD31⁺ e Lin^{low}/Sca-1⁺/c-Kit⁺/CD31⁺, encontradas no sangue periférico e em implantes de camundongos WT e KO, respectivamente, possam representar populações de células endoteliais com diferentes graus de diferenciação e ativação. Análises mais detalhadas que englobem o isolamento destas populações de células por *sorting* aliado a análises morfológicas e histológicas poderiam auxiliar na identificação destas células. Ademais, cultura celular *in vivo* e terapia celular poderiam ser metodologias úteis para estabelecer o potencial de diferenciação e autorrenovação destas células.

A falta do CCR2 não afetou a frequência com que a população de células Lin^{low}/Sca-1⁺/c-Kit⁺/CD31⁺ se acumulam no compartimento intraimplante, sugerindo que outros fatores possam estar envolvidos no acúmulo dessas células em sítios de implantação. Por outro lado, a falta do CCR2 afetou significativamente a expressão dos marcadores Lin^{low}/Sca-1⁺/c-Kit⁺/VEGFR2⁺/CD31⁺ no sangue periférico de camundongos KO que receberam implantes por 7 dias. Os resultados corroboram com achados de outros autores que evidenciaram que camundongos CCR2 KO tendem a acumular populações de células que expressam marcadores de CTH's e CPE's na medula óssea e no sangue periférico durante processos inflamatórios (SI *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2014).

A escolha do painel de anticorpos para identificação de células inflamatórias contidas nos implantes foi realizada baseando-se na extensa literatura existente. A maioria dos trabalhos têm utilizados os anticorpos Ly6C, Ly6G, CD11b, F4/80 e CD45 para caracterização fenotípica de células

inflamatórias (JUTILA *et al.*, 1988; LAI *et al.*, 1998; SAEDERUP *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2014; VIANA *et al.*, 2015). Neste trabalho, a expressão de CD45 foi utilizada na seleção inicial da população leucocitária presente em implantes de esponja. Além disso, o perfil fenotípico CD45⁺/F4/80^{high}/CD11b^{high} foi utilizado para caracterizar a presença de macrófagos. Diversos autores têm utilizado estes marcadores na identificação de macrófagos peritoneais, alveolares, derivados da medula óssea, músculo cardíaco e de tumores mamários, consistindo, portanto, uma estratégia eficiente para a identificação de células mononucleares (ZHANG *et al.*, 2008; MADERA *et al.*, 2015; SHIRAISHI *et al.*, 2016).

A predominância de macrófagos em relação a outros tipos celulares coincide com o fato de que em uma fase crônica do processo inflamatório haja predominância de células mononucleares em detrimento de células de fase inflamatórias de fase aguda (TSIROGIANNI, *et al.*, 2006; VIANA *et al.*, 2015). Além disso, a falta do CCR2 não afeta totalmente o recrutamento de macrófagos 7 dias após implantação, muito provavelmente devido a mecanismos compensatórios existentes no sistema quimiocina/ ligante. Estes dados são discrepantes da maioria dos trabalhos em que o CCR2 foi responsável pelo recrutamento de monócitos/ macrófagos em diversos modelos de inflamação (WANG *et al.*, 2013; KURIHARA *et al.*, 1997; TACKE *et al.*, 2007; WILLENBORG *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2015; GURCZYNSKY *et al.*, 2016). Deve-se considerar, entretanto, que o modelo utilizado neste estudo apresenta um microambiente próprio em que devem ser consideradas tanto as

características do tecido como as do implante, o que poderia levar a alterações no recrutamento de células mononucleares.

Em suma, embora os estágios iniciais da reação do hospedeiro ao implante sejam semelhantes em camundongos CCR2 WT e CCR2 KO, fases iniciais são dominadas por eventos inflamatórios dirigidos particularmente por neutrófilos e alterações em citocinas pró-inflamatórias, achados também compartilhados por Gurczynsky *et al.* (2016). Os macrófagos, por sua vez, aparecem mais tardiamente durante a fase resolutive do processo inflamatório, promovendo o *clearance* de neutrófilos e secretando citocinas como o VEGF, que induz a neoformação vascular, e TGF- β 1 que induz a fibrogênese. Adicionalmente, o presente trabalho apresenta, pela primeira vez, informações sobre os aspectos vasculares, presença de marcadores de CTH's e CPE's, cinética do processo inflamatório e aspectos fibrogênicos da resposta do tipo corpo estranho desencadeada pela implantação de matrizes sintéticas em camundongos com deficiência de um importante receptor quimiotático.

O trabalho oferece, portanto, subsídios e informações para estudos futuros que proponham investigar vias e fatores quimiotáticos que possam controlar o recrutamento de leucócitos e células, como fibroblastos e células endoteliais durante as interações existentes entre implante/ hospedeiro. Ademais, o estudo pode contribuir para a identificação de novos alvos farmacológicos que atuem como agonistas ou antagonistas específicos no controle da reação tecidual a implantes e biomateriais.

7. Conclusões

▪ **7. CONCLUSÕES**

- A utilização dos animais *knockout* para o receptor CCR2 possibilitou investigar o papel endógeno deste mediador demonstrando seu efeito modulador em componentes presentes na interação implante-hospedeiro;
- A deleção do CCR2 alterou parâmetros morfológicos, fisiológicos e funcionais da vasculatura pré-existente (pele) e da neovasculatura (implante de esponja), além de comprometer a formação de novos vasos sanguíneos;
- Animais CCR2 KO apresentaram um perfil inflamatório distinto de animais CCR2 WT, com um pico de neutrófilos numa fase mais tardia do processo inflamatório (14 dias) e menor quantidade de células gigantes do tipo corpo estranho, características da reação inflamatória induzida pelo implante;
- O tecido de granulação intrainplante de animais KO apresentaram uma atenuação do processo fibrogênico, evidenciado pela menor deposição de colágeno;

- O protocolo de digestão tecidual foi eficaz em desagregar as células contidas em implantes de camundongos;
- A técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo foi eficiente na identificação de marcadores presentes nas células do sangue periférico e implantes de camundongos WT e KO;
- A deleção do CCR2 alterou a frequência de expressão de marcadores característicos de CTH's e CPE's no sangue periférico de camundongos KO implantados;
- A deleção do CCR2 não altera a expressão de marcadores característicos de CTH's e CPE's em células isoladas de implantes de camundongos KO;
- Este estudo contribuiu para uma melhor compreensão do papel do CCR2 sobre aspectos vasculares, inflamação, fibrogênese e expressão de marcadores de superfície celular durante a interação implante/hospedeiro. Além disso, apresenta potencial valor na investigação de estratégias farmacológicas e intervenções que possam modular processos em que a reação do tipo corpo estranho esteja presente.

8. Referências Bibliográficas

▪ **8 .REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADAMS, D.M.; YANNELLI, J.R.; NEWMAN, W.; Adhesion of tumour infiltrating lymphocytes endothelium a phenotypic and functional analysis. *British Journal of Cancer*, v. 75, p. 1421- 1431, 1997.

ADAN, A.; ALIZADA, G.; KIRAZ, Y. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews Biotechnology*, v. 14, p. 1- 14, 2016.

AGHAEPOUR, N.; FINAIL, G.; HOOS, H.; *et al.* Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. *Nature Methods*, v. 10, n. 3, p. 228- 238, 2013.

ALLEN, J.; CROWN, S.E.; HANDEL, T.M. Chemokine: receptor, structure, interactions, and antagonism. *Annual Review of Immunology*, v. 25, p. 787- 820, 2007.

ALMEIDA, S.A.; CARDOSO, C.C.; ORELLANO, L.A.; *et al.* Natriuretic peptide clearance receptor ligand (C-ANP4-23) attenuates angiogenesis in a murine sponge implant. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 41, n. 9, p. 691- 700, 2014.

ANDERSON, J.M. Biological responses to materials. *Annual Review of Material Research A*, v. 31, p. 81- 110, 2001.

ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D.T. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars of Immunology*, v. 20, p. 86- 100, 2008.

ANDRADE, S.P.; FAN, T.P.D.; LEWIS, G.P. Quantitative in vivo studies on angiogenesis in rats sponge model. *British Journal of Experimental Pathology*, v. 68, p. 755- 766, 1987.

ANDRADE, S.P.; MACHADO, R.D.P.; TEIXEIRA, A.S.; *et al.* Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. *Microvascular Research*, v. 54, p. 253- 261, 1997.

ARAI, M.; IKAWA, Y.; CHUJO, S. Chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 regulate skin fibrosis in the mouse model of cytokine- induced systemic sclerosis. *Journal of Dermatological Science*, v. 69, n. 3, p. 250- 258, 2013.

ARAUJO, F.A.; ROCHA, A.A.; FERREIRA, M.A.N.D.; *et al.* Implant-induced intraperitoneal inflammatory angiogenesis is attenuated by fluvastatin. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 38, n. 4, p. 262- 268, 2011.

ARDERIU, G.; PEÑA, E.; ALEDO, R.; *et al.* Tissue factor regulates microvessel formation and stabilization by induction of chemokines (C-C motif) ligand 2 expression. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 31, p. 2607-2615, 2011.

ARDERIU, G.; PEÑA, E.; ALEDO, R.; *et al.* Ets-1 transcription is required in tissue factor-driven microvessel formation and stabilization. *Angiogenesis*, v. 15, p. 657- 669, 2012.

ASSI, K.; PATTERSON, S.; DEDHAR, S.; *et al.* Role of epithelial integrin-linked kinase in promoting intestinal inflammation: effects on CCL2, fibronectina and the T cell repertorie. *BMC Immunology*, v.1, p. 12- 42, 2011.

AUSTIN, C.P.; BATTEY, J.F.; BRADLEY, A.; *et al.* The knockout mouse project. *Nature Genetics*, v. 36, n. 9, p. 921- 924, 2004.

BANNO, T.; GAZEL, A.; BLUMENBERG, M. Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 31, p. 32633- 32642, 2004.

BARCELOS, L.S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A.S.; *et al.* Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/ KC e CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflammation Research*, v. 53, p. 576- 584, 2004.

BARCELOS, L.S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A.S.; *et al.* Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *The Journal of Leukocyte Biology*, v. 78, n. 2, p. 352- 358, 2005.

BAILEY, A.S.; WILLENBRING, H.; JIANG, S.; *et al.* Myeloid lineage progenitors give rise to vascular endothelium. *PNAS*, v. 103, n. 3, p. 13156- 12161, 2006.

BELO, A.V.; LELES, F.; BARCELOS, L.S.; *et al.* Murine chemokine CXCL2/KC is a surrogate marker for angiogenic activity in the inflammatory granulation tissue. *Microcirculation*, v. 12, p. 597- 606, 2005.

BERNARDINI, G.; RIBATTI, D.; SPINETTI, G.; *et al.* Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *Journal of Immunology*, v. 273, p. 83-101, 2003.

BLANCHET, X.; LANGER, M.; WEBER, C.; *et al.* Touch of chemokines. *Frontiers in Immunology*, v. 3, n. 175, p. 1- 18, 2012.

BONNIAUD, P.; MARGETTS, P.J.; ASK, K.; *et al.* TGF- β and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *Journal of Immunology*, v. 175, n.8, p. 5390- 5395, 2005.

BORING, L.; GOSLING, J.; CHENSUE, S.W.; *et al.* Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 100, p. 2552-61, 1997.

CAMPOS, P.P.; ANDRADE, S.P.; MORO, L.; *et al.* Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. *Histology Histopathology*, v. 21, p. 1263- 70, 2006.

CAMPOS, P.P.; BAAKHLE, Y.S.; ANDRADE, S.P. Mechanisms of wound healing responses in lupus-prone New Zealand White mouse strain. *Wound Repair and Regeneration*, v. 16, n. 3, p. 416- 424, 2008.

CANTU, D.A.; HEMATTI, P.; KAO, W.J. Cell encapsulating biomaterial regulates mesenchymal stromal/ stem cell differentiation and macrophage immunophenotype. *Stem Cells Translational Medicine*, v. 1, p. 740- 749, 2012.

CASTRO, P.R.; MARQUES, S.M.; CAMPOS, P.P.; *et al.* Kinetics of implant-induced inflammatory angiogenesis in abdominal muscle wall in mice. *Microvascular Research*, v. 84, n. 1, p. 9- 15, 2012.

CASTRO, P.R.; MARQUES, S.M.; VIANA, C.T.; *et al.* Deletion of the chemokine receptor CCR2 attenuates foreign body reaction to implants in mice. *Microvascular Research*, v. 95, p. 37- 45, 2014.

CHARO, I.F.; RANSOHOFF, R.M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *The New England Journal of Medicine*, v. 354, p. 610- 621, 2006.

CROSBY, J.R.; WOLFANG, E.K.; SCHATTEMAN, G.; *et al.* Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult vessel formation. *Circulation Research*, v. 87, p. 728- 730, 2000.

DAROUICHE, R.O. Treatment of infections associated with surgical implants. *The New England Journal of Medicine*, v. 350, p. 1422- 1429, 2004.

DAVID, J. Chemokine receptors: a brief overview. *Clinical Applied Immunology Reviews*, v. 1, p. 105- 125, 2000.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, v. 9, p. 283- 289, 2004.

DIEGIDIO, P.; FRIEDMAN, H.I.; GOURDIE, R.G.; *et al.* Biomedical implant capsule formation lessons learned and the road ahead. *Annals of Plastic Surgery*, v. 73, n. 4, p. 451- 460, 2014.

DONNENBERG, V.S.; DONNENBERG, A.D. Flow cytometry on disaggregated solid tissues. *Drug Discovery International*, v. 6, p. 14- 18, 2011.

DRABKIN, D.L.; AUSTIN, J.H. Spectrophotometric constants common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 98, p. 719– 733, 1932.

ECKERMANN, J.M.; CHEN, W.; JADHAV, V.; *et al.* Hydrogen is neuroprotective against surgically induced brain injury. *Medical Gastroenterology Research*, v. 1, n. 1, p. 1- 7, 2011.

EKERT, J.E.; MURRAY, L.A.; DAS, A.M.; *et al.* Chemokine (C- C motif) ligand 2 mediates direct and indirect fibrotic responses in human and murine cultured fibrocytes. *Fibrogenesis Tissue Repair*, v. 19, p. 4- 23, 2011.

FERREIRA, M.A.N.D.; BARCELOS, L.S.; CAMPOS, P.P.; *et al.* Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFK-KO). *British Journal of Pharmacology*, v. 141, n. 7, p. 1185- 1192, 2004.

FUCHS, S.; MOTTA, A.; MIGLIARESI, C.; *et al.* Outgrowth endothelial cells isolated and expanded from human peripheral blood progenitor cells as a potential source of autologous cells for endothelization of silk fibroin biomaterials. *Biomaterials*, v. 27, p. 5399- 5408, 2006.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v. 27, n. 288, p. 373- 376, 1980.

GALLET, P.; PHULPIN, B.; MERLIN, J.L.; *et al.* Long-term alterations of cytokines and growth factors expression in irradiated tissue and relation with histological severity scoring. *PLoS One*, v. 6, n. 12, p. 1- 10, 2011.

GARLANDA, C.; DEJANA, E. Heterogeneity of endothelial cells: specific markers. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 17, p. 1193- 1202, 1997.

GOLDBERG, L.R.; DOONER, M.; PAPA, E.; *et al.* Hematopoietics stem cell purification leads to loss of a stem cell population within the lineage positive cellular fraction. *Blood*, v. 126, p. 4756, 2015.

GRAINGER, D.W. All charged up about implanted biomaterials. *Nature Biotechnology*, v. 31, p. 507- 509, 2013.

GRATAMA, J.W.; KRAAN, J.; VAN DEN BEEMD, R.; *et al.* Analysis of variation in results of flow cytometric lymphocyte immunophenotyping in a multicentre study. *Cytometry*, v. 15, n. 30(4), p. 166- 177, 1997.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological samples. *Analytical Biochemistry*, v. 126, p. 131- 138, 1982.

GRINDLAY, J.H.; WAUGH, J.M. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue: experimental studies and preliminary report of use to reinforce abdominal aneurysms. *AMA Archives of Surgery*, v. 63, n. 3, p. 288- 297, 1951.

GURCZYNSKI, S.J.; PROCARIO, M.C.; O'DWYER, D.N. Loss of CCR2 signaling alters leukocyte recruitment and exacerbates Y-herpesvirus induced pneumonitis and fibrosis following bone marrow transplantation. *Lung Cellular and Molecular Physiology*, doi: 10.1152/ajplung.00193.2016, 2016.

HAEFFNER, A.C.; ZEPTER, K.; ELMETS, C.A.; *et al.* Analysis of tumor infiltrating lymphocytes in cutaneous squamous cell carcinoma. *Archives of Dermatology*, v. 133, p. 585- 590, 1997.

HOLMES, C.; STANFORD, W.L. Concise review: stem cell antigen 1: expression, function and origin. *Stem Cells*, v 25, n. 6, p. 1339- 1347, 2007.

HU, D.E.; HILEY, C.R.; SMITHER, R.L.; *et al.* Correlation of ¹³³Xe clearance, blood flow and histology in the rat sponge model for angiogenesis. *Laboratory Investigation*, v. 72, n. 3, p. 601- 610, 1995.

HUI, D.Y. Utility and importance of gene knockout animals for nutritional and metabolic research. *Journal of Nutrition*, v. 128, p. 2052- 2057, 1998.

HEIL, M.; ZIEGELHOLFFER, T.; PIPP, F.; *et al.* Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, v. 283, p. H2911- H2919, 2002.

HENKE, P.K.; PEARCE, C.G.; MOAVENI, D.M.; *et al.* Targeted deletion of CCR2 impairs deep vein thrombosis resolution in a mouse model. *Journal of Immunology*, v. 177, p. 3388- 3397, 2006.

HOLLISTER. S.J. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*, v.4, n.7, p.518-24. Review. *Erratum in: Nature Materials*. v.5, n.7, p. 590, 2005.

HUEBSCH, N.; MOONEY, D.J. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature*, v. 26, n. 462, p. 426- 432, 2009.

HU, D.E.; HILEY, C.R.; SMITHER, R.L.; *et al.* Correlation of ¹³³Xe clearance, blood flow and histology in the rat sponge model for angiogenesis. *Laboratory Investigation*, v. 72, n. 3, p. 601- 610, 1995.

HU, W.J.; EATON, J.W.; UGAROVA, T.P.; *et al.* Molecular basis of biomaterials mediated foreign body reactions. *Blood*, v. 98, n. 4, p. 1231- 1238, 2001.

JIN, T.; XU, X.; HERELD, D. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine*, v. 44, p. 1- 8, 2008.

JINNOUCHI, K.; TERASAKI, Y.; FUJIYAMA S.; *et al.* Impaired hepatic granuloma formation in mice deficient in C-C chemokine receptor. *Journal of Pathology*, v. 200, p. 406- 416, 2003.

JUTILA, M.A.; KROESE, F.G.; JUTILA, K.L.; *et al.* Ly-6C is a monocyte/macrophage and endothelial cell differentiation antigen regulated by interferon-gamma. *European Journal of Immunology*, v. 18, p. 1819- 1826, 1988.

KHAN, U.A.; HASHIMI, S.M.; BAKR, M.M.; *et al.* CCL2 and CCR2 are essential for the formation of osteoclasts and foreign body giant cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 117, p. 382- 389, 2016.

KHEIR, E.; STAPLETON, T.; SHAW, D.; *et al.* Development and characterization of an acellular porcine cartilage bone matrix for use in tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 99, n. 2, p. 283-294, 2011.

KHOUW, I.M.; VAN-WACHEM, P.B.; PLANTINGA, J.A. Foreign-body reaction to dermal sheep collagen in interferon-gamma receptor knock-out mice. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 50, n. 2, p. 259- 266, 2000.

KIM, I.S.; JANG, S.W.; SUNG, H.J.; *et al.* Differential CCR1-mediated chemotaxis signaling induced by human CC chemokine HCC-4/CCL16 in HOS cells. *FEBS Letters*, v. 579, p. 1597- 1601, 2005.

KIM, J.; KIM, W.; LE, H.T.; *et al.* IL-33-induced hematopoietic stem and progenitor cell mobilization depends upon CCR2. *Journal of Immunology*, v. 193, n. 7, p. 3792- 3802, 2014.

KIRKPATRICK, C.J.; KRUMP-KONVALINKOVA, V.; UNGER, R.E.; *et al.* Tissue response and biomaterial integration: the efficacy of in vitro methods. *Biomolecular Engineering*, v. 19, p. 211- 217, 2002.

KITAGAWA, K.; WADA, T.; FURUICHI, K.; *et al.* Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. *American Journal of Pathology*, v. 165, p. 237-246, 2004.

KLOPFLEISCH, R. Macrophage reaction against biomaterial in the mouse model – phenotypes, functions, markers. *Acta Biomaterialia*, v. 16, p. 1- 9, 2016.

KLUEH, U.; CZAJKOWSKI, C.; LUDZINSKA, I.; *et al.* Impact of CCL2 and CCR2 chemokine/ receptor deficiencies on macrophage recruitment and continuous glucose monitoring *in vivo*. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 86, p. 262- 269, 2016.

KOBAYASHI, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 88, n. 6, p. 1157- 1162, 2010.

KOHANE, D.S.; LANGER, R. Polymeric biomaterials in tissue engineering. *Pediatric Research*, v. 63, n. 5, p. 487- 491, 2008.

KURIHARA, T.; WARR, G.; LOY, J.; *et al.* Defects in macrophages recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *Journal of Experimental Medicine*, v. 186, n. 10, p. 1757- 1762, 1997.

KUZIEL, W.A.; MORGAN, S.J.; DAWSON, T.C. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, p. 12053- 12058, 1997.

KYRIAKIDES, T.R.; BORNSTEIN, P. Matricellular proteins as modulator of wound healing and the foreign body response. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 90, p. 986- 992, 2003.

KYRIAKIDES, T.R.; FOSTER, M.J.; KEENEY, G.E.; *et al.* The CC chemokine ligand, CCL2/ MCP1, participates in macrophage fusion and foreign body giant cell formation. *American Journal of Pathology*, v. 165, p. 2157- 2166, 2004.

LAI, L.; ALAVERDI, N.; MALTAIS, L.; *et al.* Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. *Journal of Immunology*, v. 160, p. 3861- 3868, 1998.

LASCHKE, M.W.; HÄUFEL, J.M.; THORLACIUS, H.; *et al.* New experimental approach to study host tissue response to surgical mesh materials *in vivo*. *Journal of Biomedical Material Research Part A*, v. 74, n. 4, p. 696- 704, 2005.

LEASK, A.; ABRAHAM, D.V. TGF- β signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal*, v. 18, n. 7, p. 816- 827, 2004.

LI, B.; BAILEY, A.S.; JIANG, S.; *et al.* Endothelial cells mediate the regeneration of hematopoietic stem cells. *Stem Cell Research*, v. 4, n. 1, p. 17- 24, 2010.

LI, T.; LI, C.; ZHANG, C.Y. Effect of Accutase or trypsin dissociation on the apoptosis of human striatum derived neural stem cells. *Zhongguo Ye Xue Yuan Xue Bal*, v. 37, n. 2, p. 185- 194, 2015.

LI, X.; YAO, W.; YUAN, Y.; *et al.* Targeting of tumour infiltrating macrophages via CCL2/ CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma. *Gut*, n. 310514, p. 1- 11, 2015.

LINGEN, M.W. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 125, n. 1, p. 67- 71, 2001.

LIU, L.; PAPA, E.; DOONER, M.S.; *et al.* Homing and long-term engraftment of long- and- short term renewal hematopoietic stem cells. *PLoS One*, v. 7, n. 2, p. 1- 12, 2012.

LUNA, G.; PAEZ, J.; CARDIER, J.E. Expression of the hematopoietic stem cell antigen Sca-1 (LY-6A/E) in liver sinusoidal endothelial cells: possible function of Sca-1 in endothelial cells. *Stem Cells and Development*, v. 13, p. 528- 535, 2004.

MACKAY, C.R. Chemokines: Immunology's high impact factors. *Nature Immunology*, v. 2, p. 95- 101, 2001.

MADERA, L.; GREENSHIELDS, A.; COOMBS, M.R.P.; *et al.* 4T1 murine mammary carcinoma cells enhance macrophage- mediated innate inflammatory responses. *PLoS One*, v. 10, n. 7, p. 1- 25, 2015.

MAECKER, H.T.; RINFRET, A.; D'SOUZA, P.; *et al.* Standardization of cytokine flow cytometry assays. *BMC Immunology*, v. 24, p. 6- 13, 2005.

MAECKER, H.T.; McCOY, J.P.; NUSSENBLATT R. Standardizing in immunophenotyping for the human immunology project. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, p. 191- 200, 2012.

MANZONI, M.; COMOLLI, G.; TORCHIO, M.; *et al.* Circulating endothelial cells and their subpopulations role as predictive biomarkers in antiangiogenic therapy for colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, v. 14, n. 1, p. 11- 17, 2015.

MARQUES, S.M.; CAMPOS, P.P.; CASTRO, P.R.; *et al.* Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. *Microvascular Research*, v. 82, p. 246- 252, 2011.

MATSUI, J.; WAKABAYASHI, T.; MAKOTO, A.; *et al.* Stem cell factor/ c-kit signalling promotes the survival, migration, and capillary tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 18, p. 18600- 18607, 2004.

MCDONALD, B.; PITTMAN, K.; MENEZES, G.B.; *et al.* Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, v. 330, n. 6024, p. 362- 366, 2010.

MENDES, J.B.; ROCHA, M.A.; ARAÚJO, F.A.; *et al.* Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. *Microvascular Research*, v. 78, n. 3, p. 265- 271, 2009.

MITCHELL, R.N.; COTRAN, R.S. Acute and chronic inflammation. *In. Robbins Basic Pathology*, Philadelphia: Saunders, p. 33- 60, 2002.

MITCHELL, C.; COUTON, D.; COUTY, J.P.; *et al.* Dual role of CCR2 in the constitution and the resolution of liver fibrosis in mice. *American Journal of Pathology*, v. 174, p. 1766- 1775, 2009.

MITTAG, A.; TARNOK, A. Basics of standardization and calibration in cytometry- a review. *Journal of Biophotonics*, v.2, n. 8- 9, p. 470- 481, 2009.

MOONEY, J.E.; ROLFE, B.E.; OSBORNE, G.W.; *et al.* Cellular plasticity of inflammatory myeloid cells in the peritoneal foreign body response. *American Journal of Pathology*, v. 176, p. 369- 380, 2010.

MORAIS, J.M.; PAPADIMITRAKOPOULOS, F.; BURGESS, D.J. Biomaterials/tissue interactions: Possible solutions to overcome foreign body response. *The AAPS Journal*, v. 12, n. 2, p. 188- 196, 2010.

MOSER, B.; WOLF, M.; WALZ, A.; *et al.* Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *TRENDS in Immunology*, v. 25, n. 2, p. 75- 84, 2004.

MOURA S.A.; LIMA, L.D.; ANDRADE, S.P.; *et al.* Local drug delivery system: inhibition of inflammatory angiogenesis in a murine sponge model by

dexamethasone-loaded polyurethane implants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 100, n. 7, p. 2886- 2895, 2011.

MUNNIK, S. M.; SMIT, M.J.; LEURS, R.; VISCHER, H.F. Modulation of cellular signaling by herpesvirus- encoded G protein-coupled receptors. *Frontiers in Immunology*, v. 6, p. 1- 27, 2015.

NATIELLA, J.R. The use of animals models in research on dental implants. *Journal of Dental Education*, v. 52, n. 12, p. 792- 797, 1988.

NAYAK, B.S.; SANDIFORD, S.; MAXWELL, A. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, v. 6, n. 3, p. 351- 356, 2009.

NEREM, R.M. Stem cell engineering. *Tissue Engineering: Part A*, v. 20, n. 5- 6, p. 893- 895, 2014.

NILSSON, A.R.; BRYDER, D.; PRONK, C.J.H. Frequency determination of rare populations by flow cytometry: a hematopoietic stem cell perspective. *Cytometry Part A*, v. 83A, p. 721- 727, 2013.

NISHI, N.; OSAWA, M.; ISHIKAWA, R.; *et al.* Hematopoietic stem cells found in lineage- positive subsets in the bone marrow of 5-fluorouracil- treated mice. *Stem Cell*, v. 13, n. 5, p. 517- 523, 1995.

NISSEN, N.N.; POLYERINI, P.J.; KOCH, A.E.; *et al.* Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *American Journal of Pathology*, v. 152, n.6, p. 1445- 1452, 1998.

NOVAK, M.L.; KOH, T.J.; Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. *American Journal of Pathology*, v. 183, n. 5, p. 1352- 1363, 2013.

NOVELLI, M.; SAVOIA, P.; CAMBIERI, R.P.; *et al.* Collagenase digestion and mechanical disaggregation as a method to extract and immunophenotype tumour lymphocytes in cutaneous T-cell lymphomas. *Experimental Dermatology*, v. 25, p. 423- 431, 2000.

NUNES, P.S.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R.L.C.; CAVALCANTE, D.R.R.; *et al.* Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Epub, jan, 2011.

OCHOA, O.; SUN, D.; REYES-REYNA, S.M.; *et al.* Delayed angiogenesis and VEGF production in CCR2 ^{-/-} mice during impaired skeletal muscle regeneration. *American Journal of Physiology*, v. 293, p. 651- 661, 2007.

OPPERMANN, M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cellular Signaling*, v. 16, p. 1201- 1210, 2004.

OVIEDO-SOCARRÁS, T.; VASCONCELOS, A.C.; BARBOSA I.X.; *et al.* Diabetes alters inflammation, angiogenesis, and fibrogenesis in intraperitoneal implants in rats. *Microvascular Research*, v. 93, p. 23- 29, 2014.

PAGE, S.H.; WRIGHT, E.K.; GAMA, L.; *et al.* Regulation of CCL-2 expression by an upstream TALE homeodomain protein-binding site that synergizes with the site created by the A-25786 SNP. *PLoS One*, v.6, n.6, p. 1- 8, 2011.

PANG, J.H.; FARHATNIA, Y.; GODARZI, F.; *et al.* In situ endothelization: bioengineering considerations to translation. *Small Journal*, v. 11, n. 47, p. 6248- 6264, 2015.

PAPPAS, N. An introduction to materials in medicine. *Biomaterials Science*, p. 60- 64, 1996.

PEASE, J.E.; WILLIAMS, T.J. The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy. *British Journal of Pharmacology*, v. 146 (Suppl.1), p. S212- S221, 2006.

PROUDFOOT, A.E.I.; SEVERIN, I.; HAMEL, D.; *et al.* In. *Chemokine receptor as drug targets*, Weinheim: Wiley-VCH, p. 3- 32, 2011.

PROUDFOOT, A.E.I.; UGUCCIONI, M. Modulation of chemokine responses: synergy and cooperativity. *Frontiers in Immunology*, v. 7, p. 1- 6, 2016.

QUESENBERRY, P.J.; GOLDBERG, L.R.; DOONER, M.S.; Concise reviews: a stem cell apoptosis: a tale of four H words. *Stem Cells*, v. 33, n. 1, p. 15- 20, 2015.

QUINONES, M.P.; ESTRADA, C.A.; KALKONDE, Y. The complex role of chemokine receptor CCR2 in collagen induced arthritis: implications for therapeutic targeting of CCR2 in rheumatoid arthritis. *Journal Molecular Medicine*, v. 83, p. 672- 681, 2005.

REES, P.A.; GREAVES, N.S.; BAGUNEID, M.; *et al.* Chemokines in wound healing and as potential therapeutic targets for reducing cutaneous scarring. *Advances in Wound Care*, v. 4, n. 11, p. 687- 703, 2015.

REZAIE, H.R. Applications of biomaterials. In: REZAIE, H.R.; BAKHTIARI, L.; ÖCHSNER, A. *Biomaterials and their applications*. Springer International Publishing, p. 19- 25, 2015.

RICKERT, D.; MOSES, M.A.; KELCH, L.S.; *et al.* The importance of angiogenesis in the interactions between polymeric biomaterials and surrounding tissue. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, v. 28, p. 175-181, 2003.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. *Annual Reviews of Immunology*, v. 18, p. 217- 242, 2000.

ROT, A.; VON ANDRIAN, U.H. Chemokines in innate and adaptative host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annual Reviews of Immunology*, v. 22, p. 891- 928, 2004.

SAEDERUP, N.; CARDONA, A. E.; CROFT, K. Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-Red fluorescent protein knock-in mice. *PLoS One*, v. 5, n. 10, p. 1- 12, 2010.

SAITO, Y.; HASEGAWA, M.; FUJIMOTO, M.; *et al.* The loss of MCP-1 attenuates cutaneous ischemia-reperfusion injury in a mouse model of pressure ulcer. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 128, n. 7, p. 1838- 1851, 2008.

SAKAI, N.; WADA, T.; FURUICHI, K.; *et al.* MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD14-positive monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 79, p. 555- 563, 2006.

SCHMUTZ, S.; VALENTE, M.; CUMANO, A.; *et al.* Spectral cytometry has unique properties allowing multicolor analysis of cell suspensions isolated from solid tissues. *PLoS One*, v. 11, n. 8, p. 1- 9, 2016.

SCOTT, J.R.; TAMURA, R.N.; MUANGMAN, P.; *et al.* Topical substance P increases inflammatory cell density in genetically diabetic murine wounds. *Wound Repair and Regeneration*, v. 16, p. 529- 533, 2008.

SEMENOVA, E.; KOEGEL, H.; HASSE, S.; *et al.* Overexpression of mIGF-1 in keratinocytes improves wound healing and accelerates hair follicle formation and cycling mice. *American Journal of Pathology*, v. 173, p. 1295- 1310, 2008.

SHEIKH, Z.; BROOKS, P.J.; BARZILAY, O.; *et al.* Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials. *Materials*, v. 8, p. 5671- 5701, 2015.

SHIREMAN, P.K. The chemokine system in arteriogenesis and hind limb ischemia. *Journal of Vascular Surgery*, v.45, (Suppl. A), p. A48- A56, 2007.

SHIRAISHI, M.; SHINTANI, Y.; SHINTANI, Y.; *et al.* Alternatively activated macrophages determine repair of the infarcted adult murine heart. *Journal of Clinical Investigation*, v. 1, n. 126(6), p. 2151- 2166, 2016.

SI, Y.; TSOU, C.L.; CROFT, K.; *et al.* CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 4, p. 1192- 1203, 2010.

SIEMINSKI, A.L.; GOOCH, K.L. Biomaterial-microvasculature interactions. *Biomaterials*, v. 21, n. 22, p. 2232- 2241, 2000.

SOLDEVILA, G.; GARCÍA-ZEPEDA, E.A. The role of the Jak-Stat pathway in chemokine-mediated signaling in T lymphocytes. *Signal Transduction*, v. 7, p. 427- 438, 2007.

SPADA, F.; FUOCO, C.; PIRRÒ, S.; *et al.* Characterization by mass cytometry of diferente methods for the preparation of muscle mononuclear cells. *New Biotechnology*, v. 33, n. 5, p. 514- 523, 2016.

STAMATOVIC, S.M.; KEEP, R.F.; MOSTARICA-STOJKOVIC, M.; *et al.* CCL2 regulates angiogenesis via activation of Ets-1 transcription factor. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 4, p. 2651- 2661, 2006.

TACKE, F.; ALVAREZ, D.; KAPLAN, T.J.; *et al.* Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 117, n. 1, p. 185- 194, 2007.

TAKAHASHI, M.; WANG, Y.; GRANGER, D.W. Device-based local delivery of siRNA against mammalian target of rapamycin (mTOR) in a murine subcutaneous implant model to inhibit fibrous encapsulation. *Journal of Controlled Release*, v. 147, p. 400- 407, 2010.

TANG, G.; CHARO, D.N.; WANG, R.; *et al.* CCR2^{-/-} knockout mice revascularize normally in response to severe hindlimb ischemia. *Journal of Vascular Surgery*, v. 40, n. 4, p. 786 – 795, 2004.

TATHE, A.; GHODKE, M.; NIKALJE, A.P. A brief review: Biomaterials and their application. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 2, suppl. 4, p. 19- 23, 2010.

TEIXEIRA, A.S.; ARAÚJO, F.A.; FERREIRA, M.A.N.D.; *et al.* Angiogenesis and inflammation in skeletal muscle in response to ascites tumor in mice. *Life Sciences*, v.78, p. 1637- 1645, 2006.

THELEN, M. Dancing to the tune of chemokines. *Nature Immunology*, v. 2, p. 129- 134, 2001.

THURASINGAM, T.; XU, Y.Z.; EADIE, K.; *et al.* MAPKAPK-2 signaling is critical for cutaneous wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 130, p. 278- 286, 2010.

TONGERS, J.; RONCALLI, J.G.; LOSORDO, D.W. Role of endothelial progenitor cells during ischemia- induced vasculogenesis and collateral formation. *Microvascular Research*, v. 79, n. 3, p. 200- 206, 2010.

TSIROGIANNI, A.K.; MOUTSOPOULOS, N.M.; MOUTSOPOULOS, M.M. Wound healing: Immunological aspects. *Injury*, v. 1, p. S5- S12, 2006

TSUCHIYA, A.; HEIKE, T.; BABA, S.; *et al.* Sca-1+ endothelial cells (SPECs) reside in the portal area of the liver and contribute to rapid recovery from acute liver disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 365, n. 3, p. 595- 601, 2008.

TSUJI, J.M.; WHITNEY, J.D.; TOLENTINO, E.J.; *et al.* Evaluation of cellular wound healing using flow cytometry and expanded polytetrafluoroethylene implants. *Wound Repair and Regeneration*, v. 18, n. 3, p. 335- 340, 2010.

TUNG, J.W.; HEYDARI, K.; TIROUVANZIAM, R.; *et al.* Modern flow cytometry: a practical approach. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 27, n. 3, p. 453- 468, 2007.

URBICH, C.; DIMMELER, S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circulation Research*, v. 95, p. 343- 353, 2004.

VIANA, C.T.R.; CASTRO, P.R.; MARQUES, S.M.; *et al.* Differential contribution of acute and chronic inflammation to the development of murine mammary 4T1 tumors. *PLoS One*, v. 9, p. 1- 17, 2015.

WANCKET, L.M. Animal models for evaluation of bone implant and devices: comparative bone structure and common model uses. *Veterinary Pathology*, v. 25, n. 5, p. 842- 850, 2015.

WANG, C.; YU, X.; CAO, Q.; *et al.* Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunology*, v. 14, n. 6, p. 1- 10, 2013.

WANG, H.; ZHOU, Y.; HUANG, B.; *et al.* Utilization of stem cells in alginate for nucleous pulposus tissue engineering. *Tissue Engineering: Part A*, v. 20, n. 5-6, p. 908- 921, 2014.

WARMINGTON, K.S.; BORING, L.; RUTH, J.M.; *et al.* Effect of C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout on type 2 (schistosomal antigen- elicited) pulmonary granuloma formation. *American Journal of Pathology*, v. 154, p. 1407- 1416, 1999.

WEBER, C.; DRAUDE, G.; KIM, S.C.; *et al.* Downregulation by tumor necrosis factor- α of monocyte CCR2 expression and monocyte chemotactic protein-1-induced transendothelial migration is antagonized by oxidized low-density lipoprotein A potential mechanism of monocyte retention in atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, v. 145, p. 115- 123, 1999.

WILLIAMS, D.F. Tissue-biomaterial interactions. *Journal of Materials Science*, v. 22, p. 3421- 3445, 1987.

WILLENBORG, S.; LUCAS, T.; LOO, G.; *et al.* CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood*, v. 120, p. 613- 625, 2012.

WLODKOWIC, D.; SKOMMER, J.; AKAGI, J.; *et al.* Multiparameter analysis of apoptosis using lab- on- a- chip flow cytometry. *Current Protocols in Cytometry*, v. 66, p. 9.42.1- 9.42.15, 2013.

WONG S.H.A.; LOWES, K.N.; BERTONCELLO, I.; *et al.* Evaluation of Sca-1 and c-kit as selective markers for muscle remodelling by nonhemopoietic bone marrow cells. *Stem Cells*, v. 25, n. 6, p. 1364- 1374, 2007.

WRIGHT, H.L.; MOOTS, R.T.; BUCKNALL, R.C.; *et al.* Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*, v. 49, p. 1618- 1630, 2010.

XAVIER, D.O.; AMARAL, L.S.; GOMES, M.A.; *et al.* Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 64, n. 3, p. 220- 225, 2010.

YANG, J.; ZHANG, L.; YU, C.; *et al.* Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research*, v. 2, n.1, p. 1- 9, 2014.

YOSHIDA, S.; ONO, M.; SHONO, T.; *et al.* Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblastic growth factor in tumor necrosis

fator alpha-dependent angiogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, v. 17, n.7, p. 4015- 4023, 1997.

ZHANG, Q.; SHE, M. Biological behaviour and role of endothelial progenitor cells in vascular diseases. *Chinese Medical Journal*, v. 120, n. 24, p. 2297-2303, 2007.

ZHANG, X.; GONÇALVES, R.; MOSSER, D.M. The isolation and characterization of murine macrophages. In. *Current Protocols of Immunology*, chapter 14, unit 14.1, 2008.

ZHU, S.; LUI, X.; LI, Y. *et al.* Aging in the atherosclerosis milieu may accelerate the consumption of bone marrow endothelial progenitor cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and vascular Biology*, v. 27, p. 113- 119, 2007.

ZIMMERLI, W.; SENDI, P. Pathogenesis of implant-associated infection: the role of the host. *Seminars in Immunopathology*. v. 33, p. 295- 306, 2011.

ZIMMERLIN, L.; DONNENBERG, V.S.; DONNENBERG, A.D. Rare event detection and analysis in flow cytometry: bone marrow mesenchymal stem cells, breast cancer stem/ progenitor cells in malignant effusions, and pericytes in disaggregated adipose tissue. In. *Flow Cytometry Protocols*, Humana Press, New York, 2011.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, v. 12, p. 121- 127, 2000.

9. Anexos



9.3. Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CETEA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 43 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Avaliação da angiogênese inflamatória induzida por implante de esponja em camundongos com deleção gênica do receptor para a CCL2 (CCR2-KO)", que tem como responsável Silvia Passos Andrade está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 25/03/2014. Este certificado espira-se em 25/03/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 43 / 2014, related to the Project entitled "Evaluation of inflammatory angiogenesis induced by sponge implant in mice with gene deletion of CCL2 receptor (CCR2-KO)", under the supervision of Silvia Passos Andrade, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 25/03/2014. This certificates expires in 25/03/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite

Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 25/03/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br



Deletion of the chemokine receptor CCR2 attenuates foreign body reaction to implants in mice



Pollyana R. Castro^{a,1}, Suzane M. Marques^{a,1}, Celso T.R. Viana^{a,1}, Paula P. Campos^{b,1}, Mônica A.N.D. Ferreira^{b,1}, Lucíola S. Barcelos^{a,1}, Silvia P. Andrade^{a,*}

^a Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Campus Pampulha, Cx Post 468, CEP 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Campus Pampulha, Cx Post 468, CEP 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 3 July 2014

Available online 12 July 2014

Keywords:

Angiogenesis
Inflammation
Wound healing
Fibrogenesis
Chemokine
Giant Cells
Foreign body reaction
CCL2
CCR2
Sponge implants

ABSTRACT

Subcutaneous implantation of synthetic materials and biomedical devices often induces abnormal tissue healing – the foreign body reaction – which impairs their function. Here we investigated the role of the chemokine receptor CCR2 in this reaction to subcutaneous implants in mice. We measured angiogenesis, inflammation and fibrogenesis induced by implantation, for 1, 4, 7 and 14 days, of polyether–polyurethane sponges in mice with genetic deletion of CCR2 (KO) and WT mice. Blood flow was determined by dye diffusion and laser Doppler perfusion techniques. Cytokines (VEGF, TNF- α , CCL2, TGF- β 1) were measured by ELISA. Histochemical methods were used to assess collagen deposition and macrophage-derived giant cells in the implants. Skin and implant blood flow was lower in CCR2 KO than in WT mice, as were other aspects of neo-vascularization of the implants. Neutrophil accumulation was increased in KO implants but macrophage accumulation was decreased. Implant content of CCL2 was higher in KO implants, but TGF- β 1, collagen deposition and the number of foreign body giant cells were lower than in WT implants. Deletion of CCR2 decreased blood flow in normal skin and inhibited neo-vascularization, chronic inflammation and fibrogenesis in subcutaneous implants. The chemokine receptor CCR2 plays an important role in both normal skin and in the reaction elicited by subcutaneous implantation of a foreign body.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Healing of damaged tissue consists of a series of overlapping phases that includes inflammation, proliferation, migration, and remodeling (Li et al., 2007). Analyses of these processes have disclosed that many different endogenous mediators (eicosanoids, cytokines, growth factors and chemokines) produced by three major cell types (endothelial and inflammatory cells, and fibroblasts) dictate the outcome of the injury (Arai et al., 2013; Tsirogiani et al., 2006). In normal wound healing, the recruitment of neutrophils and macrophages is transient and gives

way to proliferative and remodeling phases that complete the wound repair (Singer and Clark, 1999).

The implantation of an exogenous, non-toxic, non-biological, synthetic object (so-called “biomaterials”), such as a cardiac pacemaker, orthopaedic implants, catheters, meshes, sutures, or glucose sensors, induces a persistent inflammatory process – the foreign body reaction – at the site of the implantation (Morais et al., 2010). This reaction is characterized by the formation of foreign body giant cells (fused multinucleated macrophages) and deposition of fibrous collagen, indicating a chronic inflammatory response, distinct from normal wound healing (Anderson et al., 2008; Morais et al., 2010; Skokos et al., 2011).

Macrophages, in normal wound healing, are pivotal in promoting, not only the endogenous debridement of wounds and phagocytosis of invading bacteria, but also the secretion, within the wound, of a variety of cytokines (such as VEGF) that recruit additional types of cells and to induce their proliferation (Szekanecz and Koch, 2007). In contrast, in the foreign body reaction, isolated or fused multinucleated macrophages are responsible for the production of a dense collagen capsule that isolates the biomaterial from surrounding tissues (Kyriakides and Bornstein, 2003).

Abbreviations: CCL2, Chemokine (C-C motif) Ligand 2; CCR2, C-C Chemokine Receptor Type 2; CETEA, Institutional Animal Welfare Committee; ELISA, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay; HTAB, Hexadecyltrimethylammonium Bromide; I.P., Intraperitoneal; KO, Knockout Mice; MPO, Myeloperoxidase; NAG, N-acetylglucosaminidase; NO, Nitric Oxide; OD, Optic Density; PU, Perfusion Units; S.C., Subcutaneous; SEM, Standard Error of the Mean; TGF- β 1, Transforming Growth Factor- β 1; TNF- α , Tumor Necrosis Factor- α ; VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor; WT, Wild Type Mice.

* Corresponding author. Fax: +55 31 34992924.

E-mail address: andrades@icb.ufmg.br (S.P. Andrade).

¹ Fax: +55 31 34992924.

The recruitment and activation of monocytes/macrophages to the site of injuries are regulated mainly by the chemokine CCL2 and the functions of this chemokine are mediated through its corresponding receptor CCR2, expressed at a high level in macrophages (Sakai et al., 2006). There are many reports of the positive actions of CCL2 on tissue repair and vascularization (Shireman, 2007; Stamatovic et al., 2006) and impaired function of this chemokine or receptor with consequently dysfunctional macrophages contributes to failure of healing or fibrosis in a range of pathological situations (Novak and Koh, 2013). Mice with genetic deletion of CCR2 (CCR2 KO) presented a marked decrease in leukocyte adhesion (Kuziel et al., 1997) and in the recruitment of monocytes to sites of injury (Boring et al., 1997).

Moreover, in several experimental studies, inhibition of this chemokine ligand/receptor (CCL2/CCR2) pathway has been shown to reduce fibrosis in models of pressure ulcer (Saito et al., 2008), lung fibrosis (Ekert et al., 2011) and skin wound healing (Willenborg et al., 2012). Kyriakides et al., 2004 implanted polyvinyl sponges and Millipore filters subcutaneously in CCL2 KO mice and found that the implants had fewer giant cells but encapsulation (collagen content) and, surprisingly, macrophage numbers were equal to those in the WT mice. Thus, there is good evidence that the CCL2/CCR2 signaling pathway is involved in the progression of fibrosis and wound healing in a range of tissues, including skin, lung, heart, kidney diseases and chronic fibrosis (Kim et al., 2005; Kyriakides et al., 2004; Sakai et al., 2006). However, we found no study of the role of CCR2 in the foreign body reaction to a subcutaneous implant of biomaterials.

Here we have investigated the effects of the deletion of CCR2 on different features of the foreign body response induced by the implants, in terms of neovascularization, inflammation and fibrogenesis, in and around the implant (Campos et al., 2008; Ferreira et al., 2004; Mendes et al., 2007). By elucidating the role of CCR2 during the foreign body reaction to implants, it should be possible to suggest interventions and pharmacological strategies to overcome the adverse effects of this reaction to implantation of biomedical devices (Anderson et al., 2008; Morais et al., 2010).

Material and methods

Animals

All animal care and experimental procedures complied with the guidelines established by our local Institutional Animal Welfare Committee (CETEA). Efforts were made to avoid all unnecessary distress to animals. Female C57BL/6 mice 7–8 weeks (25–30 g body weight) with genetic deletion of CCR2 (CCR2 KO) ($n = 8$) and wild type mice without genetic deletion (CCR2 WT) ($n = 8$), were provided by Dr. F. Cunha (Souto et al., 2011) (Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, USP). The animals were housed individually and provided with chow pellets and water *ad libitum*. The light/dark cycle was 12:12 h with lights on at 7:00 am and lights off at 7:00 pm. A total of 74 animals were used in the experiments described here.

Preparation of sponge discs and implantation

Polyether–polyurethane sponge (Vitafoam Ltd, Manchester, UK) was used as the implanted material. The implants were discs, 5 mm thick \times 8 mm diameter and were soaked overnight in 70% v/v ethanol and sterilized by boiling in distilled water for 15 min before implantation. For that, the animals were anesthetized with 2,2,2-tribromoethanol (1 mg kg⁻¹; i.p.; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), the dorsal hair shaved and the skin wiped with 70% ethanol. The sponge discs were aseptically implanted into a subcutaneous pouch, which had been made with curved artery forceps through a 1 cm long dorsal midline incision. Post-operatively, the animals were monitored for any signs of infection at the operative site, discomfort or distress; any showing such signs were immediately humanely killed. On the day of the

sacrifice, the animals were anesthetized for blood flow measurement (dye diffusion and laser Doppler imaging). The animals were, then killed by overdose of the anesthetic on days 1, 4, 7 and 14 post implantation and the implants were immediately removed, for the assessment of vascularization markers (hemoglobin content, VEGF levels and histological analysis), inflammation (myeloperoxidase (MPO) and *N*-acetylglucosaminidase (NAG) activities, NO production, TNF- α and CCL2) and fibrogenesis (TGF- β 1, collagen deposition and histology).

Assessment of blood flow by dye diffusion

We used the dye washout method in which the diffusion rate of an s.c injection of sodium fluorescein (determined by fluorimetry) indicates local blood flow (Andrade, 1997; Castro et al., 2012; Teixeira et al., 2005). Briefly, a sterile solution (10 μ L) of sodium fluorescein (Sigma, USA; 1%) was injected intradermally. Blood samples (15 μ L) were taken from the tail vein at 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 and 30 min after the dye injection. The blood samples were mixed in 1 mL of isotonic saline, centrifuged for 5 min and supernatant was kept for fluorescence determination in a Jeway Fluorimeter (model 6200) at an excitation/emission of 485/520. The results were expressed as the time (min) to the peak of fluorescence signal in the systemic circulation.

Assessment of blood flow by laser Doppler perfusion image analysis

This was carried out in anesthetized mice (ketamine 150 mg kg and xylazine 10 mg kg⁻¹), just before removal of the sponge implants at 1, 4, 7 and 14 days post implantation, using a laser Doppler perfusion image (LDPI) analyzer (Moor Instruments, Devon, U.K.) In order to direct the light beam and to avoid interference from cutaneous blood flow in the measurements, a dark plastic ring was positioned around the sponge implant compartment. During the capturing of perfusion images, the ambient light level was kept at a minimum in order to avoid any influence on the laser light and the recorded signals. To control for temperature variability, animals were kept at a constant temperature of 37 °C for 5 min before and during measurements. The mean pixel value of each scanned image was calculated using the software MoorLDI V5.3 and the calculated mean flux was expressed as perfusion units (PU) which represent the average blood flow in the implants. The calculated mean flux was expressed as perfusion units (PU).

Hemoglobin (Hb) assay

The extent of the vascularization of the sponge implants was assessed by the amount of Hb detected in the tissue using the Drabkin method (Castro et al., 2012; Mendes et al., 2009). The animals were killed and the sponge implants carefully removed, dissected free from adherent tissue and weighed. Each implant was homogenized using an Ultra-Turrax, (Schlappmuhler, Usingen, Germany) in 2 mL of Drabkin reagent (Labtest, São Paulo, Brazil) and centrifuged at 12,000 \times g for 20 min. The supernatants were filtered through a 0.22- μ m Millipore filter (Danvers, MA, USA). The Hb concentration in the samples was determined spectrophotometrically by measuring absorbance at 540 nm using an ELISA plate reader and compared against a standard curve of Hb. The content of Hb in the implant was expressed as mg Hb (mg wet tissue)⁻¹.

Determination of MPO and NAG activities

The number of neutrophils in the implants was measured by assaying MPO activity as previously described (Castro et al., 2012; Marques et al., 2011; Mendes et al., 2009). The implants were weighed, homogenized in pH 4.7 buffer (0.1 M NaCl, 0.02 M NaPO₄, 0.015 M NaEDTA), centrifuged at 12,000 \times g for 10 min. The pellets were then re-suspended in 0.05 M NaPO₄ buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) followed by three

freeze–thaw cycles using liquid nitrogen. MPO activity in the supernatant samples was assayed by measuring the change in absorbance (optical density; OD) at 450 nm using tetramethylbenzidine (1.6 mM) and H₂O₂ (0.3 mM). The reaction was terminated by the addition of 50 µL of H₂SO₄ (4 M). Results were expressed as change in OD (g wet tissue)⁻¹. The infiltration of mononuclear cells into the implant was quantified by measuring the levels of the lysosomal enzyme NAG, present in high levels in activated macrophages (Castro et al., 2012; Marques et al., 2011; Mendes et al., 2009). The implants were homogenized in NaCl solution (0.9% v/v) containing 0.1% v/v Triton X-100 (Promega) and centrifuged (3000 ×g; 10 min at 4 °C). Samples (100 µL) of the resulting supernatant were incubated for 10 min with 100 µL of *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl-beta-D-glucosaminide (Sigma) prepared in citrate/phosphate buffer (0.1 M citric acid, 0.1 M Na₂HPO₄; pH 4.5) to yield a final concentration of 2.24 mM. The reaction was stopped by the addition of 100 µL of 0.2 M glycine buffer (pH 10.6). Activity of NAG was determined by measuring the absorption at 400 nm and results were expressed as nmol substrate hydrolysed (mg wet tissue)⁻¹.

Measurement of VEGF, TNF-α, CCL2 and TGF-β1

Implants removed on days 1, 4, 7 and 14 post implantation were homogenized in PBS pH 7.4 containing 0.05% Tween and centrifuged at 10,000 ×g for 30 min. The cytokines VEGF, TNF-α, CCL2 and TGF-β1, in the supernatant from each implant sample were measured in 50 µL of the supernatant using Immunoassay Kits (R & D Systems, USA) and following the manufacturer's protocol. Briefly, dilutions of cell-free supernatants were added in duplicate to ELISA plates coated with a specific murine monoclonal antibody against the cytokine, followed by the addition of a second horseradish peroxidase-conjugated polyclonal antibody against the cytokine. After washing to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution (50 µL of a 1:1 solution of hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine (10 mg mL⁻¹ in DMSO) was added to the wells. The color development was stopped, after 20 min incubation, with 2 M H₂SO₄ (50 µL) and the intensity of the color was measured at 540 nm on a spectrophotometer (E max, Molecular Devices). Standards were 0.5-log₁₀ dilutions of recombinant murine cytokines from 7.5 to 1000 pg mL⁻¹ (100 µL). The results were expressed as pg cytokine (mg wet tissue)⁻¹.

Measurement of nitric oxide (NO) production

NO synthesis was evaluated by measuring nitrite levels according to the method described by Green et al., 1982. Sponge implants were incubated for 15 min at 37 °C with PBS (500 µL). The incubation medium (100 µL) was mixed with 10 µL of Griess reagent (0.1% *N*-1-naphthylethylenediamine, 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄) and optical density was measured at 540 nm. The amount of nitrite in the incubation media was calculated using sodium nitrite (Sigma, USA) as a standard.

Histological analysis and staining

Sponge implants were excised carefully, dissected free of adherent tissue and fixed in formalin (10% v/v in isotonic saline). Sections (5 µm) were stained with hematoxylin and eosin (H&E), processed for light microscopy to determine the number of giant cells. A giant cell was defined as a cellular structure containing more than four nuclei. Other sections (5 µm) were stained with Picrosirius Red followed by polarized-light microscopy to visualize and determine collagen fibers (Castro et al., 2012; Moura et al., 2009). The morphometric analysis was carried out on images of cross sections obtained from 15 fields (8533 µm²), captured with a planochromatic objective (40× for H&E) or (20× for Picrosirius Red) using light microscopy (final magnification, 400×). The images were digitalized through a JVCTK-1270/

JBC microcamera and transferred to an analyzer (Kontron Electronics, Carl Zeiss- KS300 version 2). Blind assessments of the histological sections were performed by two observers (Castro PR, Campos PP).

Data analysis

All data are expressed as means ± SEM. Comparisons between the two groups (WT versus KO) were performed using Student's *t*-test for unpaired groups. Differences between means was considered significant when *P*<0.05.

Results

The sponge matrix was well tolerated by all animals. No signs of infection or rejection were observed in the implant location during the 14-day period of the experiment as the implants became progressively infiltrated by a fibrovascular tissue. There was no difference between the weights of the implants from the WT or KO mice, but *in situ* examination of the implants showed well-defined vessels in the WT implants, in contrast to KO implants which showed only diffuse areas of bleeding (Figs. 1A and B).

Angiogenesis in WT and KO mice

In preliminary experiments we measured the diffusion of sodium fluorescein applied intradermally in WT and KO mice, to determine if the deletion of CCR2 had altered the basal function of normal skin vasculature, i.e., before implantation. A much slower diffusion rate was observed in the skin of KO mice (time to peak, 20 ± 1 min), double that in WT skin (time to peak, 9 ± 1 min, *n* = 5). This basal level of blood flow is shown in Fig. 2A, as the broken lines across the graph. This technique was then applied to study the development of blood flow intra-implant in both groups of mice. Although the diffusion rates on day 1 were equally slow in both sets of implants, at later times, the WT implants showed a consistently greater blood flow (shorter times to peak) than those from KO mice. Note, however, that in both sets of mice, the blood flow in the implant was back to basal values by 14 days (Fig. 2A).

The assessment of blood flow by the laser Doppler perfusion technique showed essentially similar blood flows in the early stages of the implantation with significantly less flow in the implants from KO mice at 14 days (Fig. 2B, C and D). The Hb content of implants was an additional measure of vascularity in the implant and these values also showed an almost two-fold difference between WT and KO implants at 14 days (Fig. 3A). The cytokine VEGF is a potent mediator of angiogenesis and the implant content of VEGF was similar in both groups with the peak at day 4 and falling thereafter. However, by 14 days VEGF in the WT implants continued to fall whereas those in the KO implants remained at a higher level (Fig. 3B).

Inflammation in implants

The kinetics of implant-induced inflammation in the WT and KO implants were assessed, using several markers (MPO and NAG activities, nitrite content and TNF-α, CCL2 levels). The time course of MPO and NAG activities served as indicators of leukocyte accumulation in the implants. As shown in Fig. 4A, neutrophil accumulation was not decreased in the KO implants but showed a biphasic response with peaks at 4 and 14 days. Neutrophil accumulation in WT implants, as expected, showed an early peak at 4 days, with a subsequent fall to near basal levels by 14 days. Also as expected, macrophage accumulation (NAG activity) was decreased in KO implants on days 4 and 7, but by 14 days there was no difference between the two sets of implants (Fig. 4B).

Production of NO, assayed as nitrite content of the implants, slowly increased in the WT mice to a plateau maintained from 7 to 14 days. In the KO implants, there was a marked early peak of NO from 1 to

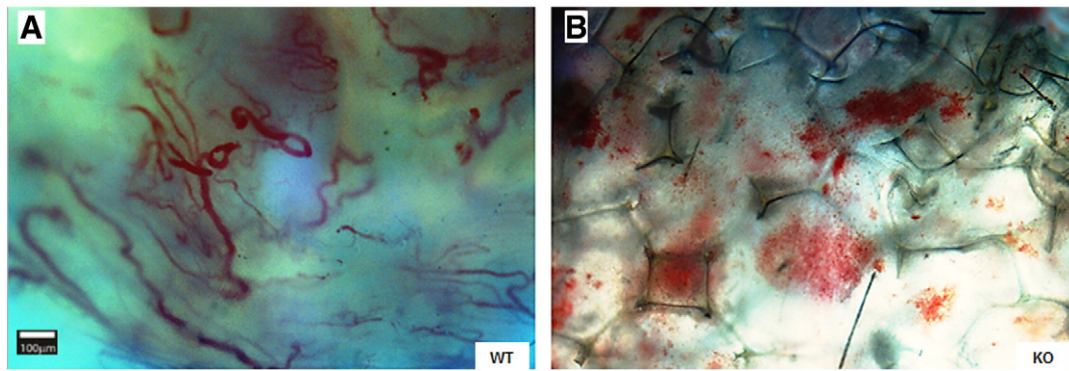


Fig. 1. Photomicrograph of the vascular pattern of trans-illuminated sponge implants (day 14). A, WT implant. The tortuous, newly formed, blood vessels are clearly defined and have invaded the matrix of the sponge. In B, the KO implant shows no well-formed new vessels, only patches of diffuse bleeding. Bar 100 µm; magnification 20×.

4 days with an equally clear fall at 7 days. At the end of the experiment, levels of nitrite in the KO implants were still lower than those in the WT implants (Fig. 4C).

Levels of the pro-inflammatory cytokine TNF- α peaked early at day 1 and remained high for the 14 days in the WT implants (Fig. 5A). In the KO implants, TNF- α increased more slowly, but reached a peak value about 50% higher than in the WT implants, by 7 days with a subsequent fall at 14 days. The time course of CCL2 in the implants (Fig. 5B)

was remarkably similar in WT and KO mice with an early peak at 4 days and another at 14 days. However, at both peaks, there was more CCL2 in the KO implants.

Fibrogenesis and foreign body giant cells in implants

We measured TGF- β 1 levels in the implants because this cytokine is a major mediator of healing in inflammation and an early stimulus for

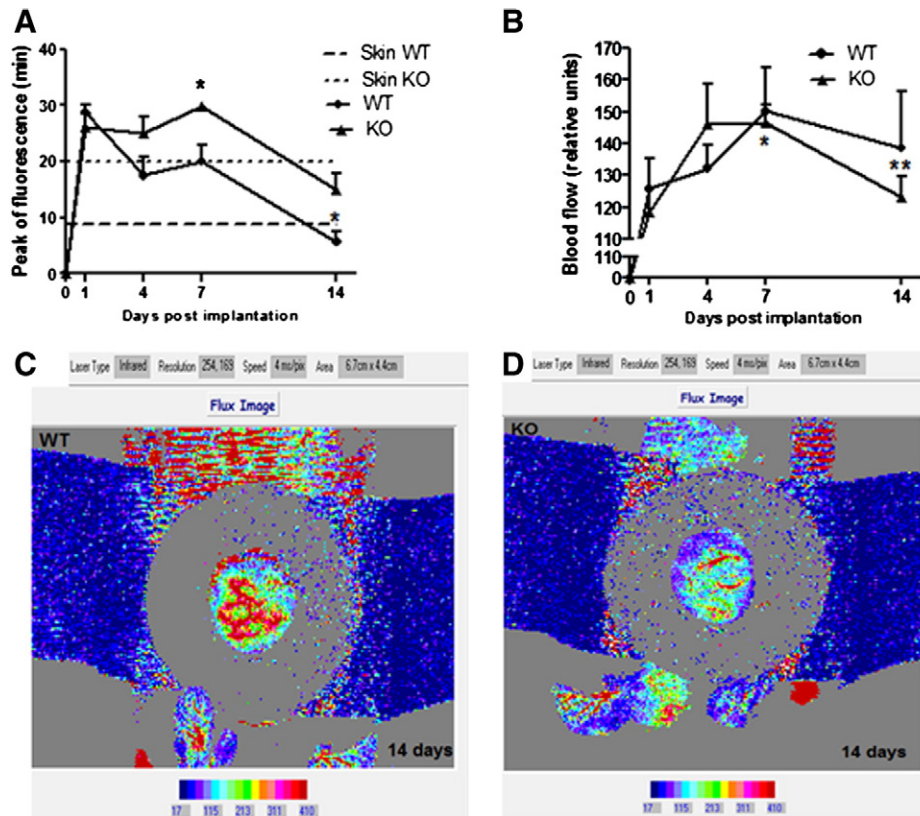


Fig. 2. Blood flow in WT and KO implants. A, Blood flow as determined by washout of sodium fluorescein. The washout (diffusion) of intradermally injected dye is shown as the time to peak fluorescence appearing in peripheral blood, sampled from the tail vein. The broken lines across the graph denote the values in skin before implantation (basal values). In the implant, the times to peak were long, i.e., little blood flow, on day 1 after implantation but fell steadily over the next 13 days. However, the times to peak fell more sharply in the WT implants, implying a faster and more complete restoration of blood flow. B, Blood flow as determined by laser Doppler perfusion. In this summary graph, the time courses of changes in blood flow are similar for the two sets of implants except at 14 days, when the flow in the KO implants was lower than that in the WT implants. Values shown in A and B are the means (\pm SEM) from groups of 6–8 animals at each point. *Significant difference between WT and KO, $P < 0.05$; **Significant difference between WT and KO, $P < 0.01$. C, Blood flow in WT implants. A typical image from the laser Doppler perfusion technique is shown. The blue bands are the low flow area in undisturbed skin and the gray torus is the shield to separate the implant which is imaged by the circular area, central to the torus. The red colors indicate high blood flows within the implant with other high flow signals outside the torus. D, Blood flow in KO implant. This typical image from the laser Doppler perfusion technique, in KO mice, shows less red signal in the central circular area (implant) and in the area outside the torus.

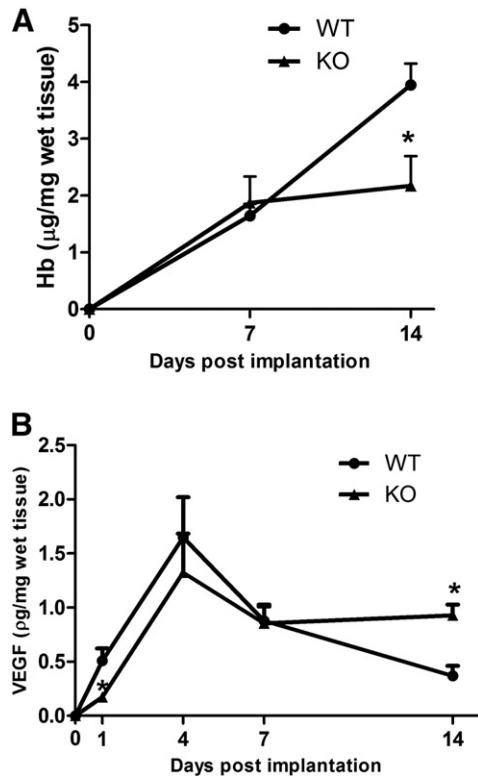


Fig. 3. Time course of angiogenesis in WT and KO implants. A, Hemoglobin (Hb) content. There was clearly less Hb in the implants from KO mice, at 14 days. B, VEGF levels in implants. The difference is clearly shown at day 14 but here VEGF is higher in the KO implants. Values shown are the means (\pm SEM) from groups of 6–8 animals at each point. *Significant difference between WT and KO, $P < 0.05$.

fibrogenesis. In the WT implants, the time course of TGF- β 1 was similar to that of TNF- α , with an early (day 1) increase to a plateau maintained for the 14 days of the experiment. For the KO implants, TGF- β 1 content was biphasic with an early increase on day 1, followed by a fall at day 4 and another peak at day 7 (Fig. 5C).

Fibrogenesis was measured as collagen deposition, in histological sections, using densitometric analysis of implants stained with Picrosirius Red. As shown in Fig. 6A and B, staining for collagen (Picrosirius Red) in the absence of polarization total collagen was visualized. In polarized-light microscopy determination of collagen fibers showed more immature collagen (greenish colour) in KO implants compared with more mature (yellow/reddish color) collagen in WT implants (Fig. 6C and D). The summary data (Fig. 6E) show the marked decrease in collagen in the KO implants, down to about 30% of the WT values.

Because the macrophage-derived, foreign body giant cells are characteristic of the foreign body reaction generated by the implant, we evaluated this cell population in histological sections of the implants, using H&E staining (Fig. 7A–D). The numbers of foreign body giant cells in the implant sections are summarized in Fig. 7E, which shows significantly fewer giant cells in the 14-day implants from the KO mice, about 25% of the numbers in the WT implants.

Discussion

We have studied the sequential development of angiogenesis, inflammation and fibrogenesis in the foreign body reaction induced by subcutaneous implantation of a synthetic matrix in mice lacking the chemokine receptor CCR2 (CCR2 KO) and the corresponding WT strain. The foreign body reaction is an inflammatory response and includes processes such as protein adsorption, monocyte/macrophage adhesion,

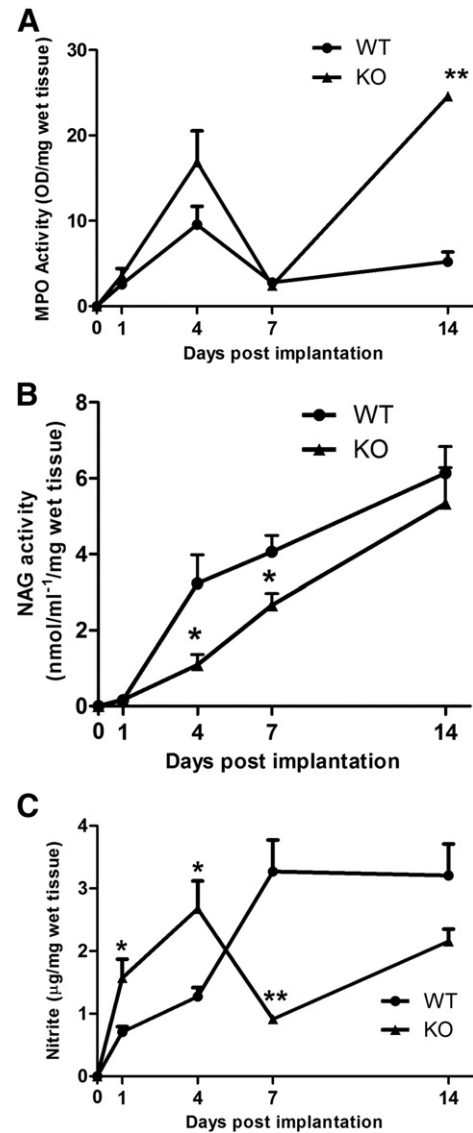


Fig. 4. Time course of inflammation in WT and KO implants. A, Myeloperoxidase (MPO) activity, as a measure of neutrophil accumulation. The early peak with a rapid fall to basal levels in the WT implants contrasts with the two peak profile in the implants from KO mice. B, *N*-acetylglucosaminidase (NAG) activity as a measure of macrophage accumulation. There were fewer macrophages in KO implants at 4 and 7 days, but by 14 days, there was no difference between the two sets of implants. C, Nitrite levels, as a measure of NO production. The more gradual but maintained increase in NO in the WT implants contrasted with the more variable (peak and trough) profile in implants from the KO mice. Values shown are the means (\pm SEM) from groups of 6–8 animals at each point. *Significant difference between WT and KO, $P < 0.05$; **Significant difference between WT and KO, $P < 0.01$.

macrophage fusion to form foreign body giant cells and cross-talk between macrophages/foreign body giant cells and inflammatory/wound healing (Anderson et al., 2008; Kyriakides et al., 2004).

A crucial reason for choosing this particular KO model was that CCR2 is the only receptor for the chemokine CCL2 (Pease and Williams, 2006) and there is already a considerable body of data on the phenotype of CCL2 KO mice in a wide range of inflammatory states (Kitagawa et al., 2004; Mitchell et al., 2009; Quinones et al., 2005). Another important aspect of the CCR2/CCL2 axis is that CCR2 is abundantly expressed in monocytes/macrophages and this leukocyte subset is a critical component of the foreign body reaction.

In our experiments, the effects of CCR2 deletion on the host's reaction to the implants were most obvious on gross examination at

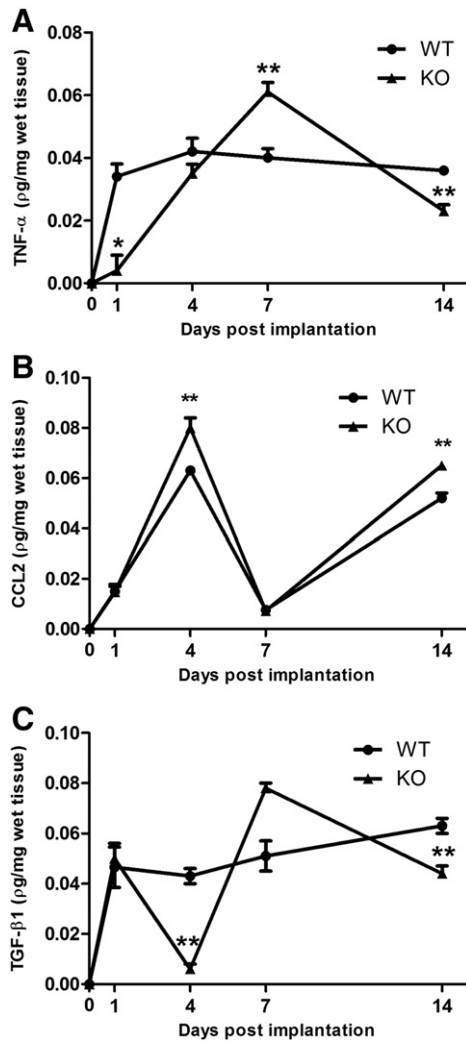


Fig. 5. Time course of TNF- α , CCL2 and TGF- β 1 production in WT and KO implants. A, TNF- α level of implants was slower to rise in the KO mice although it exceeded the WT values at 7 days. B, CCL2 levels. Although both sets of implants showed a biphasic profile, the KO implants had a higher content on 4 and 14 days. C, TGF- β 1 levels. The early high levels of this cytokine were sustained in WT implants whereas, in the KO implants, TGF- β 1 levels fell markedly at 4 days and again at 14 days. Values shown are the means (\pm SEM) from groups of 6–8 animals at each point. *Significant difference between WT and KO, $P < 0.05$; **Significant difference between WT and KO, $P < 0.01$.

14 days when the clearly defined and well-formed neovasculature in the implants from the WT mice contrasted sharply with the diffuse bleeding patches in the KO implants. More detailed analysis revealed a functional consequence of CCR2 deletion on the normal functions of the cutaneous vasculature, even before implantation, as the blood flow, measured by dye diffusion, in WT animals was higher than that in the KO mice. This effect has not been described earlier and would imply a considerable level of CCR2-dependent “tone” in the WT skin blood vessels under normal, physiological conditions.

In the implants, the lack of CCR2 altered the formation and stabilization of new blood vessels, implying an important role for this chemokine receptor in angiogenesis. This effect of CCR2 deletion is most likely to be related to the consequent loss of the effects of CCL2, its chemokine agonist, which is known to recruit smooth muscle cells toward endothelial cells and to facilitate maturation of newly formed microvessels (Arderiu et al., 2011, 2012).

Analysis of another vascular index, Hb content, revealed that, while in WT implants there was a progressive increase in vascularization during the 14-day period of the experiment, in KO implants Hb content

increased from day 1 to day 7 but did not reach the levels of WT implants by day 14. This is in agreement with the functional analysis that showed a consistent decrease in intra-implant blood flow in KO implants, as measured by dye diffusion and by the laser Doppler perfusion technique. The lower levels of VEGF in KO implants soon after implantation (days 1 and 4) were also compatible with the other signs of decreased angiogenesis in KO implants. Our results match those of Ochoa et al., 2007, from a different tissue, showing delayed VEGF production during skeletal muscle regeneration in CCR2 KO mice. It was interesting to observe divergent VEGF production at day 14 post implantation. In WT implants, VEGF decreased whereas in KO implants it was increased. There is evidence that CCR2 signaling is critical for recruitment of circulating monocytes into skin wounds and, once in the tissue, the monocytes become highly pro-angiogenic, VEGF-secreting macrophages (Willenborg et al., 2012). Thus, although our implant-healing model differs in several important aspects from healing of cutaneous wounds, the lack of a functional CCR2/CCL2 signaling system may affect vascularization of the implants similarly.

The investigations of the role of CCR2 in the inflammatory component of the foreign body reaction induced by the implants, revealed that accumulation of neutrophils, as measured by MPO activity was, overall, higher in KO implants compared with WT implants, with a 5-fold increase in the enzyme activity at the last sampling time (day 14). In a related model, using CCL2 KO mice, there was a comparable elevation of MPO activity at day 3 in ischemic calf muscle (Shireman, 2007). Although the temporal profile of neutrophil recruitment and activity differed between different models, probably due to intrinsic variability in tissue and injury studied, an increased neutrophil accumulation in CCL2 KO mice, relative to WT, has been consistently reported (Jinnouchi et al., 2003; Kuziel et al., 1997). By contrast, NAG activity, as a measure of macrophage accumulation, was lower during the middle of the experimental period (4–7 days) in KO implants compared with WT implants, probably reflecting the lack of a major chemotactic receptor in the monocytes. By 14 days, macrophage levels were equal in KO and WT implants, a finding that could be explained by compensation, through the other chemotactic receptors, other than CCR2, that are expressed on the macrophage (Charo and Ransohoff, 2006).

An interesting finding was the increase of the ligand CCL2 in KO implants, suggesting that there might be, in WT mice, a negative feedback between receptor and ligand. Other groups have shown an increase in the release of CCL2 in CCR2 KO mice in pulmonary granulomas and thrombosis models (Henke et al., 2006; Warmington et al., 1999), reinforcing the possibility that lack of the receptor (CCR2) induced an increase in the release of its ligand (CCL2).

Assays for TGF- β 1, a major fibrogenic cytokine, showed clearly that, although this cytokine increased early in the implants from both sets of animals, the KO mice did not sustain this high level for the full 14 days, as did the WT mice. This is consistent with our finding greater amounts of collagen in implants from the WT mice and in accordance with earlier work in which deletion of CCR2 decreased fibrosis in a number of other tissues (lung, liver, heart, skin) (Kim et al., 2005; Sakai et al., 2006). In a close analogue of our model, Kyriakides et al. (2004) used polyvinyl sponges and Millipore filters implanted subcutaneously in WT and CCL2 KO mice. Here, the implants from the KO mice had fewer giant cells but encapsulation (collagen content) and macrophage numbers were equal to the WT implants.

Overall, our results were as expected in a model with dysfunction of macrophages. Although the early stages of the foreign body reaction to the implants were fairly similar in WT and KO mice, these early stages are dominated by inflammatory events driven particularly by neutrophils and pro-inflammatory changes. The macrophages appear later during the resolution of the inflammation, clearing the neutrophils and secreting cytokines such as VEGF to induce the formation of new blood vessels, and TGF- β 1 to induce fibrogenesis.

Our results obtained in the CCR2 KO mouse are compatible with those from CCL2 KO mice but do not mirror them exactly. An exact

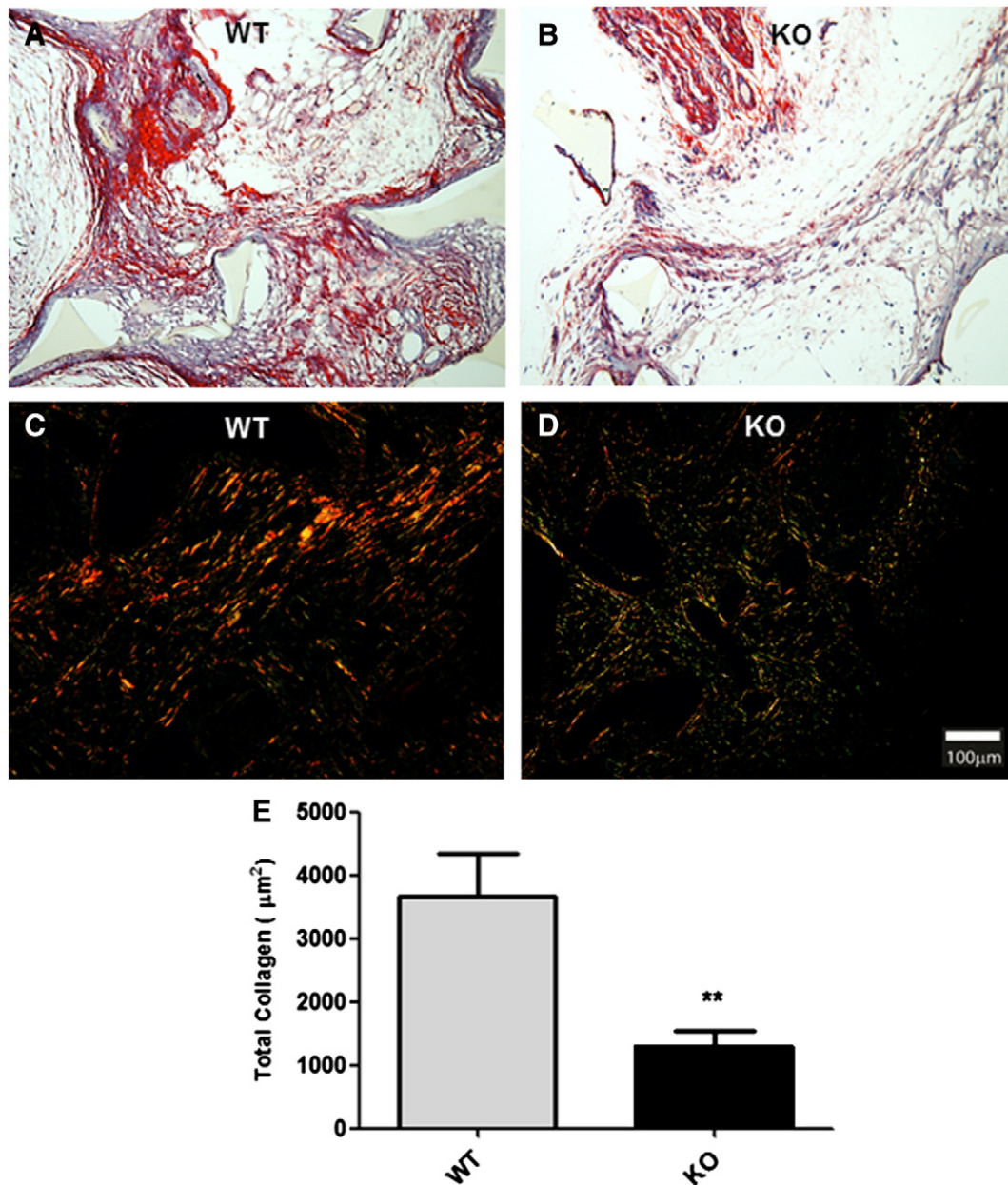


Fig. 6. Fibrogenesis in WT and KO implants. Representative histological sections of WT (A) and KO (B) implants (day 14), stained with Picrosirius Red (5 μm). In C (WT) and (D) representative Picrosirius Red images. Type I collagen (yellowish image) was clearly more prevalent and more intense in WT implants. More immature collagen-Type III (greenish image) is predominant in KO implants. In E, the densitometric analysis of total collagen in WT and KO implants (day 14). Values shown are the means (\pm SEM) from groups of 6–8 animals at each point. **Significant difference between WT and KO, $P < 0.01$. Bar 100 μm; magnification 20 \times .

correlation is unlikely because of the well-known pharmacological promiscuity of the chemokines. Although CCL2 is the main agonist at CCR2 receptors, those receptors are activated by several other chemokines with a wide range of potencies (Pease and Williams, 2006). Thus, deletion of CCR2 would block not only the actions of CCL2 but also those of CCL7, CCL8, CCL13 and CCL16 but, because the non-CCL2 agonists activate other chemokine receptors, the block of these other agonists is less complete than that of CCL2. In addition to this complication, monocytes/macrophages express other chemotactic receptors that may provide a mechanistic “bypass” of the block created by CCR2 deletion. Such pharmacological redundancy may have physiological significance in terms of ensuring some level of chemotactic effects for all leukocytes available, under a wide range of conditions, but it does add considerably to the difficulty of interpreting unambiguously data collected from KO models in this signaling system.

Conclusions

Our experiments have shown that, in CCR2 KO mice, there were clear functional differences in the skin vasculature before implantation and, after the stimulus of an implant, equally clear difference in the newly formed vascular bed and also in the foreign body response. This indicates an important role of the chemokine receptor CCR2 in the vascularization of the subdermal tissue in normal conditions and in mediating key components of the chronic inflammatory processes responsible for this clinically important host response, the foreign body reaction.

Acknowledgments

The study was supported by Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (Capes); National Council for Scientific

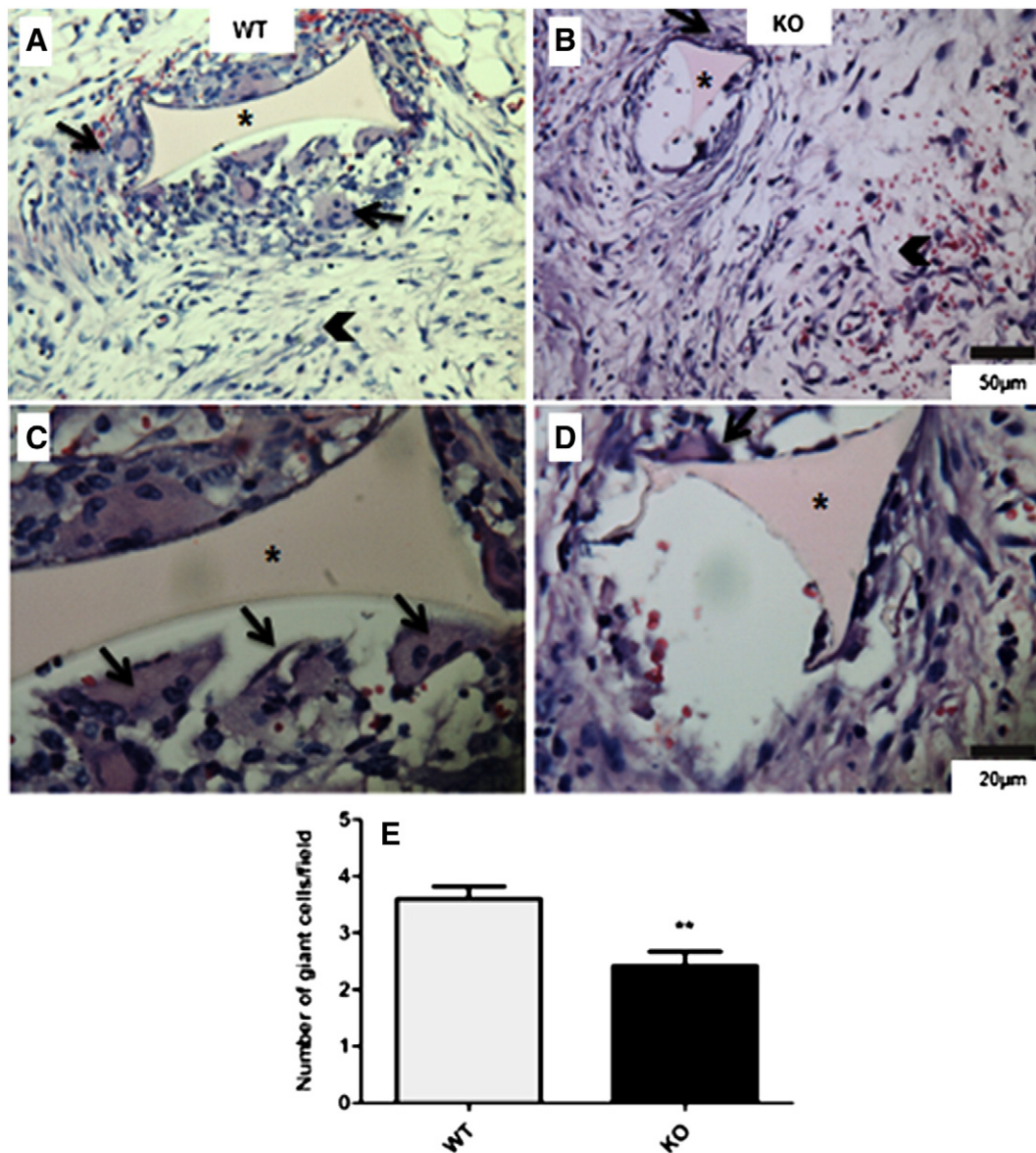


Fig. 7. In A (WT) and B (KO), sections stained with H&E show the fibrovascular tissue (arrow head; 5 μ m) in the implants (day 14). The pores of the sponge matrix, seen as triangular shapes (*), are infiltrated by inflammatory cells, spindle-shaped-like fibroblasts, endothelial cells and blood vessels embedded in a dense organized matrix (40 \times ; bar 50 μ m). Less fibrovascular tissue is seen in KO implants compared with WT implants. In C and D, a number of foreign body giant cells (arrows) can be seen around the triangle shapes in higher magnification (100 \times ; bar 20 μ m). In E, the total number of giant cells in such sections of WT and KO implants, sampled at day 14 is shown. Values shown are the means (\pm SEM) from groups of 6–8 animals. **Significant difference between WT and KO, $P < 0.01$.

and Technological development (CNPq). LSB holds a CNPq Research Fellowship. The authors would like to thank the National Institute of Science and Technology in Nanobiopharmaceutics (INCT-NanoBiofar). We thank Dr. Fernando Cunha (Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, USP) for providing the CCR2 KO mice.

References

- Anderson, J.M., Rodriguez, A., Chang, D.T., 2008. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin. Immunol.* 20, 86–100.
- Andrade, S.P., 1997. Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. *Microvasc. Res.* 54, 253–261.
- Arai, M., et al., 2013. Chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 regulate skin fibrosis in the mouse model of cytokine-induced systemic sclerosis. *J. Dermatol. Sci.* 69, 250–258.
- Arderiu, G., et al., 2011. Tissue factor regulates microvessel formation and stabilization by induction of chemokines (C-C motif) ligand 2 expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2607–2615.
- Arderiu, G., et al., 2012. Ets-1 transcription is required in tissue factor-driven microvessel formation and stabilization. *Angiogenesis* 15, 657–669.
- Boring, L., et al., 1997. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J. Clin. Invest.* 100, 2552–2561.
- Campos, P.P., Bakhle, Y.S., Andrade, S.P., 2008. Mechanism of wound healing responses in lupus-prone New Zealand white mouse strain. *Wound Repair Regen.* 16, 416–424.
- Castro, P.R., et al., 2012. Kinetics of implant-induced inflammatory angiogenesis in abdominal muscle wall in mice. *Microvasc. Res.* 84, 9–15.
- Charo, I.F., Ransohoff, R.M., 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* 354, 610–621.
- Ekert, J.E., et al., 2011. Chemokine (C-C motif) ligand 2 mediates direct and indirect fibrotic responses in human and murine cultured fibrocytes. *Fibrogenesis Tissue Repair* 1, 4–23.
- Ferreira, M.A., et al., 2004. Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFK-KO). *Br. J. Pharmacol.* 141, 1185–1192.
- Green, L.C., et al., 1982. Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131–138.
- Henke, P.K., et al., 2006. Targeted deletion of CCR2 impairs deep vein thrombosis resolution in a mouse model. *J. Immunol.* 177, 3388–3397.
- Jinnouchi, K., et al., 2003. Impaired hepatic granuloma formation in mice deficient in C-C chemokine receptor 2. *J. Pathol.* 200, 406–416.

- Kim, I.S., et al., 2005. Differential CCR1-mediated chemotaxis signaling induced by human HCC-4/CCL16 in HOS cells. *FEBS Lett.* 579, 6044–6048.
- Kitagawa, K., et al., 2004. Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. *Am. J. Pathol.* 165, 237–246.
- Kyriakides, W.A., et al., 1997. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12053–12058.
- Kyriakides, T.R., Bornstein, P., 2003. Matricellular proteins as modulators of wound healing and the foreign body response. *Thromb. Haemost.* 90, 986–992.
- Kyriakides, T.R., et al., 2004. The CC chemokine ligand, CCL2/MCP1, participates in macrophage fusion and foreign body giant cell formation. *Am. J. Pathol.* 165, 2157–2166.
- Li, J., Chen, J., Kirsner, R., 2007. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin. Dermatol.* 25, 9–18.
- Marques, S.M., et al., 2011. Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. *Microvasc. Res.* 82, 246–252.
- Mendes, J.B., et al., 2007. Host response to sponge implants differs between subcutaneous and intraperitoneal sites in mice. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 82, 408–415.
- Mendes, J.B., et al., 2009. Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. *Microvasc. Res.* 78, 265–271.
- Mitchell, C., et al., 2009. Dual role of CCR2 in the constitution and the resolution of liver fibrosis in mice. *Am. J. Pathol.* 174, 1766–1775.
- Morais, J.M., Papadimitrakopoulos, F., Burgess, D.J., 2010. Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response. *AAPS J.* 12, 188–196.
- Moura, S.A.L., et al., 2009. Aqueous extract of Brazilian green propolis primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2011, 1–11.
- Novak, M.L., Koh, T.J., 2013. Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. *Am. J. Pathol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.06.034> (pii: S0002-9440(13)00619-6, Epub ahead of print).
- Ochoa, O., et al., 2007. Delayed angiogenesis and VEGF production in CCR2 $-/-$ mice during impaired skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol.* 293, 651–661.
- Pease, J.E., Williams, T.J., 2006. The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy. *Br. J. Pharmacol.* 147 (Suppl. 1), S212–S221.
- Quinones, M.P., et al., 2005. The complex role of chemokine receptor CCR2 in collagen-induced arthritis: implications for therapeutic targeting of CCR2 in rheumatoid arthritis. *J. Mol. Med.* 83, 672–681.
- Saito, Y., et al., 2008. The loss of MCP-1 attenuates ischemia–reperfusion injury in a mouse model of pressure ulcer. *J. Invest. Dermatol.* 128, 1838–1851.
- Sakai, N., et al., 2006. MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD14-positive monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 79, 555–563.
- Shireman, P.K., 2007. The chemokine system in arteriogenesis and hind limb ischemia. *J. Vasc. Surg.* 45 (Suppl. A), A48–A56.
- Singer, A.J., Clark, R.A.F., 1999. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 2, 738–746.
- Skokos, E.A., et al., 2011. Lack of TNF- α -induced MMP-9 production and abnormal E-cadherin redistribution associated with compromised fusion in MCP-1 null macrophages. *Am. J. Pathol.* 718, 2311–2321.
- Souto, F.O., et al., 2011. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 234–242.
- Stamatovic, S.M., et al., 2006. CCL2 regulates angiogenesis via activation of Ets-1 transcription factor. *J. Immunol.* 177, 2651–2661.
- Szekanecz, Z., Koch, A.E., 2007. Mechanisms of disease: angiogenesis in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 3, 635–643.
- Teixeira, A.S., et al., 2005. Angiogenesis and inflammation in skeletal muscle in response to ascites tumor in mice. *Life Sci.* 78, 1637–1645.
- Tsirogianni, A.K., Moutsopoulos, N.M., Moutsopoulos, M.M., 2006. Wound healing: immunological aspects. *Injury* 1, S5–S12.
- Warmington, K.S., et al., 1999. Effect of C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout on type 2 (schistosomal antigen-elicited) pulmonary granuloma formation. *Am. J. Pathol.* 154, 1407–1416.
- Willenborg, S., et al., 2012. CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood* 120, 613–625.