

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação em Patologia

DEIVENITA JULIANA ALVES CARVALHO DO CARMO

**EFEITO DO PROPIONATO DE SÓDIO NA RESPOSTA DO TIPO CORPO  
ESTRANHO INDUZIDA POR IMPLANTE SINTÉTICO EM MODELO MURINO**

Belo Horizonte - MG

Agosto 2021

DEIVENITA JULIANA ALVES CARVALHO DO CARMO

**EFEITO DO PROPIONATO DE SÓDIO NA RESPOSTA DO TIPO CORPO  
ESTRANHO INDUZIDA POR IMPLANTE SINTÉTICO EM MODELO MURINO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Patologia Investigativa

Orientadora: Profa. Dra. Paula Peixoto Campos Lopes

Co-orientadora: Profa. Dra. Silvia Passos Andrade

Belo Horizonte - MG

Agosto 2021

- 043 Carmo, Deivenita Juliana Alves Carvalho do.  
Efeito do propionato de sódio na resposta tipo corpo estranho induzida por implante sintético em modelo murino [manuscrito] / Deivenita Juliana Alves Carvalho do Carmo. – 2021.  
65 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Profa. Dra. Paula Peixoto Campos Lopes. Coorientadora: Profa. Dra. Silvia Passos Andrade.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.
1. Patologia. 2. Próteses e Implantantes. 3. Inflamação. 4. Reação a Corpo Estranho. 5. Ácidos Graxos Voláteis. I. Lopes, Paula Peixoto Campos. II. Andrade, Silvia Passos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COLEGIADO DO CURSO DE GRADUAÇÃO / PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

### FOLHA DE APROVAÇÃO

*"EFEITO DO PROPIONATO DE SÓDIO NA RESPOSTA TIPO CORPO ESTRANHO INDUZIDA  
POR IMPLANTE SINTÉTICO EM MODELO MURINO"*

**DEIVENTITA JULIANA ALVES CARVALHO DO CARMO**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 24 de agosto de 2021, pela banca constituída pelos membros:

**Profa. Pollyana Ribeiro Castro - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS/SÃO PAULO**

**Prof. Alfonso Gala Garcia - UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA/BAHIA**

**Profa. Silvia Passos Andrade - ICB/UFMG – COORIENTADORA**

**Profa. Paula Peixoto Campos Lopes - ICB/UFMG - ORIENTADORA**

Belo Horizonte, 24 de agosto de 2021.



Documento assinado eletronicamente por Paula Peixoto Campos Lopes, Professora do Magistério Superior, em 24/08/2021, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Silvia Passos Andrade, Professora do Magistério Superior, em 24/08/2021, às 11:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Alfonso Gala Garcia, Usuário Externo, em 31/08/2021, às 11:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Pollyana Ribeiro Castro, Usuário Externo, em 31/08/2021, às 14:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0916922 e o código CRC 4F0FA9A1.

## AGRADECIMENTOS

A primazia da minha gratidão sempre será para Jesus, meu Amado Senhor, que deste sempre me conduziu para possibilidades que para mim pareciam inalcançáveis. Ele terá sempre o meu amor e o meu “muito obrigada! ”. À minha família, que foram uma cerca de amor e proteção, tendo paciência em todos os momentos que fiquei enclausurada no quarto nesse universo de livros e conhecimento, pelos passeios que não fizemos, por todo o consolo, risadas e alívio que trouxeram a essa jornada. Ao meu gatinho Reginaldo (esposo), por ser tão forte e protetor, e por não me deixar esmorecer. Aos meus terremotinhos, Murilo, Danilo e Nicolas, por alegrarem tudo que tocam. Aos meus sogros, minhas cunhadas e cunhados que cuidaram de mim e dos meus terremotinhos, sempre com excelência e generosidade, amo vocês!

À professora Paula Peixoto Campos Lopes, por ter aberto as portas do Laboratório de Apoptose e me aceitado como aluna de mestrado, por ter ensinado e direcionado em todas as etapas desse processo com generosidade e profissionalismo. À professora Silvia Passos Andrade, por seu brilhantismo e indispensáveis colaborações neste trabalho. À minha querida Marcela Takahashi, amiga de tantos anos, que em tantos momentos me ajudou, dedicando seu tempo, fazendo parte dessa conquista. Ao Celso Vianna por ser tão solícito e gentil, e ter contribuído tanto para o desenvolvimento desse trabalho. Aos amigos e colegas do Laboratório de Apoptose e Angiogênese e do Departamento de Patologia Letícia, Clara, Karina, Juliana, Pedro Augusto, Pedro Costa, Walisson, Santuza e Clarinha que participaram dos experimentos e sufocos. Me sinto honrada pelo privilégio de aprender com vocês.

Aos professores do departamento de patologia que me encantaram com esse universo microscópico e me inspiraram a exercer a enfermagem sob outro prisma. Em especial, ao Professor Ricardo Gonçalves, à Professora Tatiane Alves Paixão e à Professora Milene Alvarenga Rachid, pelo incentivo, conselhos e aulas maravilhosas. E a todos que ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigada!

*“Dificuldades preparam pessoas comuns para destinos extraordinários”*

CS LEWIS

## RESUMO

Dispositivos Médicos Implantáveis (DMI) vêm sendo cada vez mais utilizados na medicina. No entanto, a implantação desses dispositivos no organismo podem induzir uma intensa resposta inflamatória do tipo corpo estranho, comprometendo a funcionalidade e durabilidade dos mesmos. Na literatura estudos mostram que o propionato de sódio (PS), um ácido graxo sintético de cadeia curta (AGCC), é capaz de atenuar a inflamação e modular a angiogênese e a fibrogênese em modelos de doenças inflamatórias. No entanto, ainda não foram descritos seus efeitos na resposta do tipo corpo estranho, um complexo processo de inflamação e reparo que ocorre após a implantação dos DMI/biomateriais no organismo. Neste trabalho, utilizamos um modelo de estudo de implante de disco de esponja de poliéter-poliuretano (implante subcutâneo), que induz uma resposta do tipo corpo estranho, semelhante àquela causada em implantes de biomateriais em humanos, para avaliar os efeitos do tratamento com PS na inflamação, angiogênese e no remodelamento do tecido fibrovascular que se desenvolve em resposta a implantação. Os animais foram tratados diariamente com a administração oral por gavagem de 100 mg/kg de PS (grupo tratado) ou água filtrada (grupo controle), por 14 dias consecutivos, sendo os implantes removidos no 15 dia após a implantação. Os resultados mostraram que o propionato de sódio foi capaz de modular a inflamação (celularidade intra-implante e enzimas inflamatórias, como mieloperoxidase e N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase) e a angiogênese (número dos vasos sanguíneos e níveis de VEGF). Mais importante, o número de células gigantes do tipo corpo estranho e a espessura da cápsula foram reduzidas em 58% e 34% respectivamente, assim como a deposição de colágeno intra-implante. Os efeitos do propionato de sódio descritos aqui ampliam seu leque de ações como um potencial agente capaz de atenuar processos fibroproliferativos patológicos.

**Palavras-chave:** implante sintético, reação do tipo corpo estranho, remodelamento, propionato de sódio.

## **ABSTRACT**

Beyond its actions on the intestine, the short-chain acid (SCFA), propionate has been shown to lower inflammation and modulate angiogenesis and fibrogenesis in pathological conditions in experimental animal models. However, its effects on foreign body reaction (FBR), a complex adverse healing process, after implantation of biomedical/synthetic devices have not been reported. We have evaluated the effects of sodium propionate (SP) on inflammation, neovascularization and remodeling on a murine model of implant induced FBR. Polyether-polyurethane sponge discs were implanted subcutaneously in C57/Bl6 mice to induce this response. The animal were treated daily with oral administration of SP (100 mg/kg) for 14 consecutive days. The treatment started on the day after surgery and the implants were removed after 14 days. SP was able to decrease the inflammatory parameters (cytometry and inflammatory enzyme activities, myeloperoxidase and N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase). Angiogenesis, as evaluated by blood vessel number and VEGF levels downregulated by the treatment. Most importantly, the number of foreign body giant cells (FBGC) and the thickness of the collagenous capsule were reduced by 58% and 34%, respectively, as the collagenous deposition inside the implant. The effects of SP described here expands its range of actions as a potential agente able to attenuate fibroproliferative processes that can impair functionality of implantable devices.

**Key words:** inflammation, angiogenesis, remodeling, sodium propionate.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Representação dos eventos envolvidos na resposta do hospedeiro na interface biomaterial/tecido adjacente ao implante.....	16
<b>Figura 2</b> - Relação entre a angiogênese e a inflamação.....	20
<b>Figura 3</b> - Formação e evolução da matriz provisória.....	21
<b>Figura 4</b> - Ação dos leucócitos e seus produtos sobre fibroblastos.....	22
<b>Figura 5</b> - Papel das enzimas histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs) na regulação epigenética da expressão gênica.....	25
<b>Figura 6</b> - Ação dos AGCC sobre a sinalização celular, o metabolismo celular e a transcrição gênica.....	26
<b>Figura 7</b> – Protocolo experimental.....	32
<b>Figura 8</b> - Efeito do propionato de sódio sobre a celularidade intra-implante e a concentração das enzimas N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) e Mieloperoxidase (MPO) após 14 dias de tratamento.....	37
<b>Figura 9</b> – Visão macroscópica do implante de esponja versus corte histológico do implante em H&E.....	39
<b>Figura 10</b> - O efeito do propionato de sódio sobre a formação do tecido fibroproliferativo no implante de esponja.....	40
<b>Figura 11</b> - O efeito do propionato de sódio sobre o infiltrado de mastócitos.....	41
<b>Figura 12</b> - Efeito do propionato de sódio sobre a angiogênese.....	42
<b>Figura 13</b> - Efeito do propionato de sódio na reação tipo corpo estranho.....	43
<b>Figura 14</b> - Efeito do propionato de sódio sobre a deposição de fibras colágenas.....	44
<b>Figura 15</b> - Efeito do propionato de sódio sobre a formação capsular.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC.....	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
ANVISA.....	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
cAMP.....	Adenosina 3,5-Monofosfato Cíclico
CD11.....	Membrane Cluster Differentiation-11
CD3.....	Membrane Cluster Differentiation-3
CD45.....	Membrane Cluster Differentiation-45
CEBIO.....	Centro de Bioterismo
CEUA.....	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNPq.....	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COX-2.....	Ciclooxigenase-2
DMI.....	Dispositivo médico implantável
DMSO.....	Dimetilsulfóxido
DNA.....	Ácido Desoxirribonucleico,
FFAR2.....	Receptor 2 de Ácido Graxo Livre 2, do inglês Free Fatty Acid Receptor 2
FFAR3.....	Receptor 3 de Ácido Graxo Livre, do inglês Free Fatty Acid Receptor 3
FFARs.....	Receptores de Ácido Graxos Livres, do inglês Free Fatty Acid Receptor
GPR109a....	Receptor 109a Acoplado à Proteína G, do inglês G protein-couple receptor 109a
GPR41.....	Receptor 41 Acoplado à Proteína G, do inglês G protein-couple receptor 41
GPR43.....	Receptor 43 Acoplado à Proteína G, do inglês G protein-couple receptor 43
GPRs.....	Receptores Acoplados à Proteína G, do inglês G protein-couple receptor
H&E.....	Hematoxilina e Eosina

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.....Ácido Sulfúrico  
HATs.....Histona Acetiltransferases  
HDACs.....Histona Desacetilases  
HMGB1.....High Mobility Group Box 1  
ICAM-1.....Molécula de Adesão Intercelular-1  
ICB..... Instituto de Ciências Biológicas  
IL-10..... Interleucina 10  
IL-12.....Interleucina 12  
IL-1 $\beta$ ..... Interleucina 1 beta  
IL-6.....Interleucina 6  
IL-8.....Interleucina 8  
IL-8.....Interleucina 8  
iNOS.....Óxido Nítrico Síntase Induzível, do inglês inducible nitric oxide synthase  
I $\kappa$ B $\alpha$ .....Inibidor do Fator Nuclear Kappa B  
MHC II.....Complexo de Histocompatibilidade Molecular de classe II  
MPO.....Mieloperoxidase  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>...Fosfato de Sódio Dibásico  
NAG.....N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase  
NETs.....armadilhas extra-celulares de neutrófilos, do inglês neutrophil extracellular traps  
NF- $\kappa$ B..... Fator Nuclear kappa-B, do inglês Nuclear factor- $\kappa$ B  
NO.....Óxido nítrico  
OMS..... Organização Mundial de Saúde  
PBS.....Phosphate Buffered Saline  
PUMA-G.....Receptor PUMA-G  
ROS.....Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês Reactive Oxygen Species

TCR-  $\alpha$  .....Receptor de Células T- $\alpha$

TGF- $\beta$ 1.....Fator de crescimento de transformação beta 1, do inglês transforming growth factor beta 1

TNF- $\alpha$ .....Fator de necrose tumoral alfa, do inglês Tumor Necrosis Factor alpha

VCAM-1.....Molécula de Adesão Celular Vascular-1

VEGF.....Fator de crescimento endotelial, do inglês Vascular endothelial growth Factor

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 - Dispositivos médicos implantáveis.....	14
1.2 - Reação tecidual frente ao biomaterial.....	15
1.2.1 - Fase inflamatória.....	16
1.2.2 - Angiogênese e a fase proliferativa.....	18
1.2.3 - Remodelamento.....	20
1.3 - Acido Graxos de Cadeia Curta.....	23
1.3.1 - Mecanismos de ação.....	24
1.3.2 - O uso dos AGCC/ Propionato de sódio em condições inflamatórias.....	27
1.4-Modelo de implante de esponja.....	29
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	29
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	30
3.1– Objetivo geral.....	30
3.2– Objetivos específicos.....	30
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
<b>5 RESULTADOS</b> .....	36
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	52
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	52

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1- Dispositivos médicos implantáveis

Dispositivos médicos implantáveis (DMI) são biomateriais definidos como qualquer produto médico projetado para inserção e permanência no corpo humano. Devido às inúmeras possibilidades terapêuticas proporcionadas pelos biomateriais na atualidade, os DMI constituem um importante recurso para o diagnóstico, tratamento, prevenção ou redução dos danos provocados por determinadas doenças, sendo utilizados para substituir ou reparar tecidos biológicos. Estima-se, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a existência de cerca de oito mil tipos de DMI disponíveis no mercado. Como exemplo cita-se os stents, os marca-passos, as válvulas cardíacas, as próteses, as lentes e dentes, as placas e parafusos, os substitutos ósseos, as telas ou malhas (ANVISA, 2001; PIRES, BIERHALZ, MORAES, 2015; RATNER, 2016).

Os DMI podem ser compostos de metais, cerâmica ou polímeros sintéticos. Os biomateriais poliméricos, porém, são os mais promissores no mercado mundial devido as suas características de maior flexibilidade, elasticidade, biocompatibilidade, longevidade, facilidade de fabricação e melhor custo razoável (ANVISA, 2001; PIRES; BIERHALZ, MORAES, 2015).

Os DMI vêm sendo cada vez mais utilizados na medicina contemporânea devido ao aumento do número de indivíduos que se beneficiam desse recurso à medida que ocorre o envelhecimento da população e consequente aumento de doenças crônicas debilitantes. Outro fator importante, é a melhoria do poder aquisitivo da população, tornando acessível tais tecnologias para a abordagem de doenças anteriormente vistas como não tratáveis (ANVISA, 2018; PIRES; BIERHALZ, MORAES, 2015).

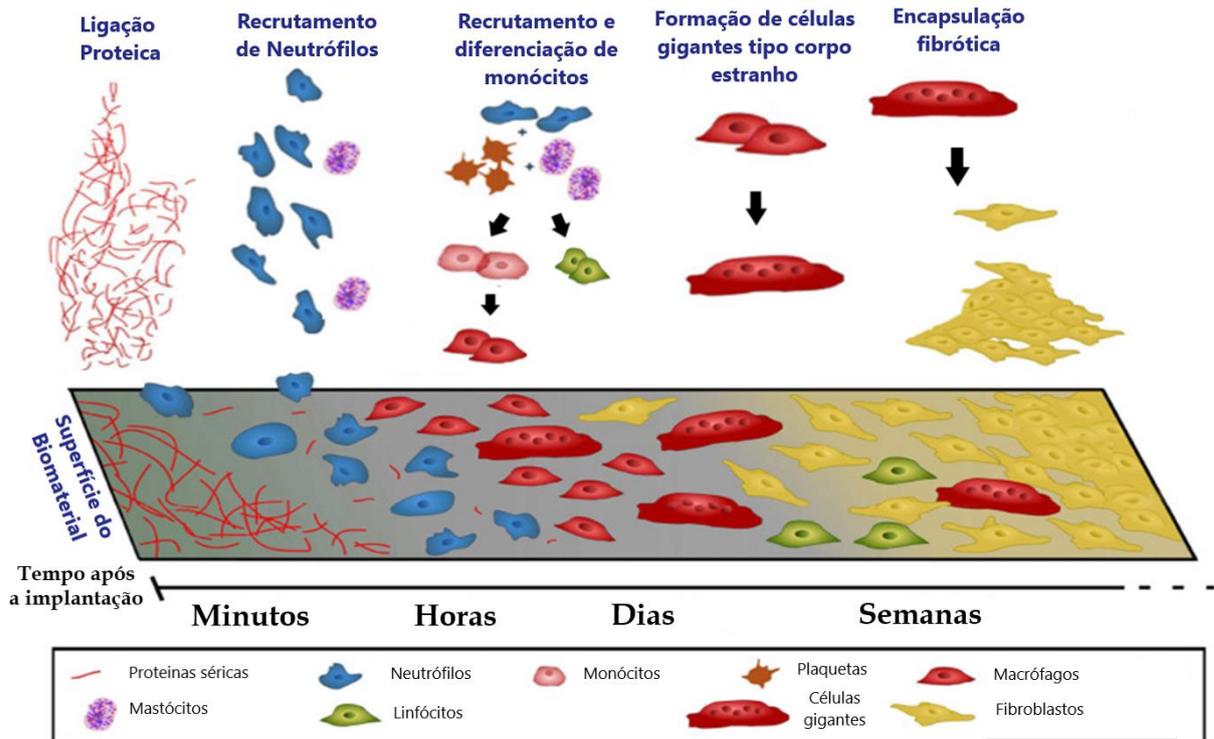
Porém, apesar do crescente uso e dos grandes benefícios apresentados para a melhoria da assistência à saúde, torna-se considerável o número de indivíduos que

apresentam complicações ou resultados adversos inerentes a implantação dos DMI (PIRES; BIERHALZ, MORAES, 2015; RATNER, 2016).

Isso porque, ao serem implantados, os biomateriais podem desencadear uma reação inflamatória que culmina no desenvolvimento de um tecido fibrovascular e de uma cápsula fibrosa que envolve o implante, sendo que a intensidade da resposta inflamatória e os seus resultados podem alterar o desempenho do implante e até provocar a sua rejeição e a falência do tratamento proposto (ANDERSON, 2001; ZDOLSEK, EATON, TANG, 2007; ANDERSON, RODRIGUEZ, CHANG, 2008; THEVENOT et al, 2011; RATNER, 2016; DOLOF et al, 2017; CHU et al, 2019; VEISEH e VEGAS, 2019).

## **1.2-Reação tecidual frente ao biomaterial**

Após a implantação do biomaterial, dá-se início a uma cascata de eventos que se sobrepõem, estimulados pela lesão causada pelo processo de implantação e pelas interações entre a interface tecido/implante. Essa complexa reação envolve eventos inflamatórios, proliferativos e de remodelamento (ANDERSON, RODRIGUEZ, CHANG, 2008; JULIER et al, 2017; VEISEH e VEGAS, 2019).



**Figura 1:** Representação dos eventos envolvidos na resposta do hospedeiro na interface biomaterial/ tecidos adjacentes ao implante. O perfil celular envolvido na resposta do hospedeiro se modifica de acordo com os estímulos no transcorrer do tempo após a implantação inicial. ADAPTADO DE: CARNICER-LOMBARTE et al, 2021.

### 1.2.1-Fase inflamatória

A lesão tecidual e vascular provocada pela implantação do biomaterial ativa os sistemas de coagulação e libera enzimas vasoativas que promovem a hemostasia e alterações vasculares, tais como o aumento do calibre dos vasos, aumento do fluxo e da permeabilidade vascular. Essas alterações favorecem a exsudação de fluidos, proteínas e células sanguíneas para o sítio da lesão (ANDERSON, 2001; FRANCO, 2001; EMING, MARTIN, TOMIC-CANIC, 2014) (Fig. 1).

Ao entrar em contato com o exsudato, a superfície do implante adsorve proteínas séricas e proteínas plaquetárias ativadas, que produzem uma monocamada proteica ao seu entorno. Inicia-se assim a formação da matriz provisória que servirá de arcabouço para a angiogênese e a fibrogênese. A matriz formada interage com moléculas de adesão presentes nas populações de células inflamatórias, estimulando

a adesão e proliferação dessas células na superfície do biomaterial. Tais células, liberam uma gama de quimiocinas, citocinas, interleucinas e mitógenos, criando um gradiente químico que induz e modula a ação de outras populações celulares durante o processo inflamatório (REZENDE et al, 2015; SWARTZLANDERA et al, 2015; BARKER e ENGLER, 2017; ANDERSON, RODRIGUEZ, CHANG, 2008; VEISEH e VEGAS, 2019; CARNICER-OMBARTE et al, 2021).

Quimiotáticos liberados pela matriz provisória e fatores de crescimento secretados por células endoteliais, atraem e ativam os mastócitos. Estes por sua vez, degranulam moléculas efetoras intensificando o recrutamento de fagócitos e, posteriormente atuando no remodelamento, ativando fibroblastos (ANDERSON, RODRIGUEZ, CHANG, 2008; RAMIREZ-GARCIALUNA et al, 2017; JULIER et al, 2017; MUKAI et al, 2019; OZPINAR et al, 2021).

Os neutrófilos são os primeiros fagócitos recrutados para o sítio da lesão logo nas primeiras horas pós-implantação, predominando durante os dois primeiros dias no local da lesão. Estes tipos celulares atuam degranulando enzimas proteolíticas, produzindo agentes quimiotáticos e espécies reativas de oxigênio (ROS) que retroalimentam positivamente o gradiente de agonistas. Esse mediador, por sua vez, tem ação bactericida e promotora do processo inflamatório pois recrutam monócitos e linfócitos, e estimulam a proliferação de células endoteliais e fibroblastos, contribuindo para a angiogênese e o remodelamento. É importante ressaltar que a funcionalidade de implantes de biomateriais suscetíveis a danos em ambientes oxidativos, como o poliuretano, pode ser comprometida já nessa fase (LABOW, MEEK, SANTERRE, 2001; JULIER et al, 2017; VEISEH e VEGAS, 2019; CARNICER-OMBARTE et al ,2021).

Os linfócitos T participam da imunidade inata exercendo um papel semelhante ao dos mastócitos, secretando uma ampla gama de citocinas e fatores de crescimento para o recrutamento e proliferação celular, atuando ora como inibidor, ora como potencializador do processo inflamatório. No entanto a proporção e função exata dos

diferentes tipos de linfócitos T na resposta inata, não estão bem esclarecidos (JULIER et al, 2017, CHUNG et al, 2017; LAROUCHE et al, 2018).

Uma parte dos monócitos que migraram para o sítio inflamatório, se diferenciam em macrófagos que proliferam continuamente através de liberação auto-sustentada de enzimas pró-inflamatórias, como TNF $\alpha$ , interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8. Os macrófagos residentes no tecido também sofrem estímulo proliferativo somando-se aos macrófagos derivados de monócitos mobilizados tornando essa população celular predominante no sítio inflamatório 48-72 horas após a lesão. Os macrófagos têm papel determinante em todas as fases do reparo tecidual, pois sofrem alterações fenotípicas no decorrer desse processo. Eles podem assumir um fenótipo pró-inflamatório, denominado “classicamente ativados” ou M1, que atuam no desbridamento e nos eventos proliferativos, como também podem se diferenciar em um fenótipo pró-resolutivo, denominado “alternativamente ativados” ou M2, atuando na fibrogênese através da secreção de citocinas e fatores de crescimento (OISHI e MANABE, 2014; LAROUCHE et al, 2018; CARNICER-OMBARTE et al, 2021; KIMURA e TSUJI, 2021).

Com o estímulo contínuo da presença do implante, os macrófagos se fundem, formando células gigantes multinucleadas, uma das características da resposta tipo corpo estranho. As células gigantes aderem ao biomaterial numa tentativa de fagocitá-lo e potencializam a produção de enzimas que orquestram o reparo tecidual (ANDERSON, RODRIGUEZ, CHANG, 2008; JULIER et al, 2017; VOLLKOMMER et al, 2019).

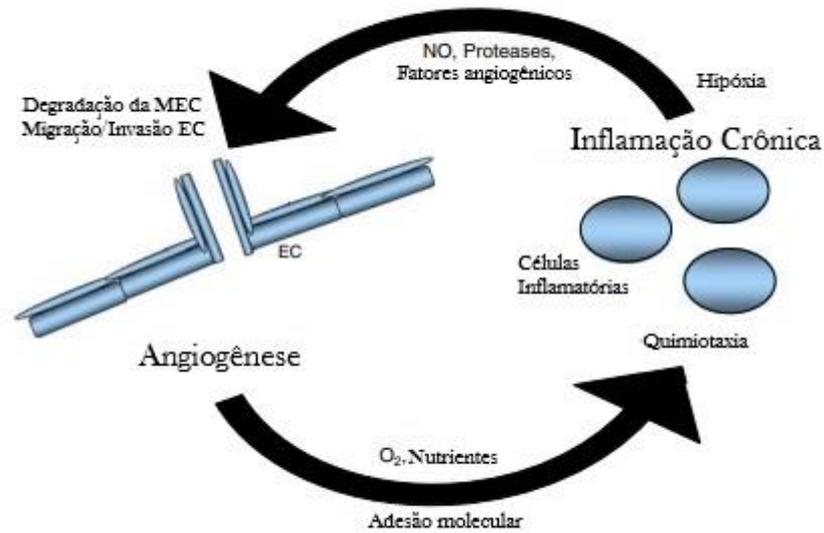
### **1.2.2-Angiogênese e a fase proliferativa**

A angiogênese consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes nas adjacências. Trata-se de um processo complexo, modulado por mediadores pró e anti-angiogênicos que são produzidos pela matriz extracelular, plaquetas, células endoteliais e inflamatórias no decorrer dos eventos inflamatórios

causados pela lesão tecidual gerada no ato de inserção dos implantes, sendo essenciais para a nutrição e oxigenação das células e do tecido formado tanto na fase aguda, quanto fase crônica (CAMELIET, 2004; COSTA, INACIO, SOARES 2007; ANDERSON, RODRIGUEZ, CHANG, 2008).

A lesão tecidual provocada no processo de implantação do biomaterial, ativa plaquetas e mastócitos residentes promovendo a degranulação de mediadores pró-angiogênicos potentes, como VEGF, TGF- $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-8 e histamina, dando início ao processo angiogênico. Esses mediadores causam a dilatação dos vasos adjacentes e a desestabilização das junções das células endoteliais, favorecendo a exsudação. Com o recrutamento de monócitos, macrófagos e linfócitos, que são capazes de contribuir com moléculas moduladoras da angiogênese, os eventos pró-angiogênicos são potencializados. Ainda sob influência dos estímulos pró-inflamatórios, células endoteliais ativadas sofrem migração e proliferam em túbulos vasculares que invadem o tecido. Para isso, os macrófagos, juntamente com as células endoteliais, liberam proteinases que quebram a matriz de colágeno abrindo espaço para o crescimento dos vasos, e orientando o brotamento dos novos vasos. A degradação proteolítica da matriz extracelular, contribui para intensificar os estímulos pró-angiogênicos, uma vez que ativadores angiogênicos ligados à matriz (VEGF, TGF- $\beta$ , TNF  $\alpha$ , IL-1  $\beta$  e outros) são liberados. Os vasos sanguíneos recém-formados amadurecem e se tornam interconectados ao sistema circulatório (NORBBY, 2002; CAMELIET, 2004; NEVE et al, 2014; EMING, MARTIN, TOMIC-CANIC, 2014; CREWE, NA, SCHERER, 2017; FARIA et al, 2020).

Dessa forma, os mediadores produzidos por células inflamatórias mantêm os eventos angiogênicos, ao mesmo tempo que a angiogênese sustenta a inflamação suprindo as necessidades metabólicas das células inflamatórias. Por se tratar de processos co-dependentes, o desequilíbrio entre os estímulos pró e anti-inflamatórios, e a manutenção da inflamação promove a manutenção da angiogênese (JACKSON et al., 1997; COSTA, INACIO, SOARES, 2007) (Fig. 2)



**Figura 2:** Relação entre a angiogênese e a inflamação. ADAPTADO DE: COSTA, INACIO e SOARES, 2007.

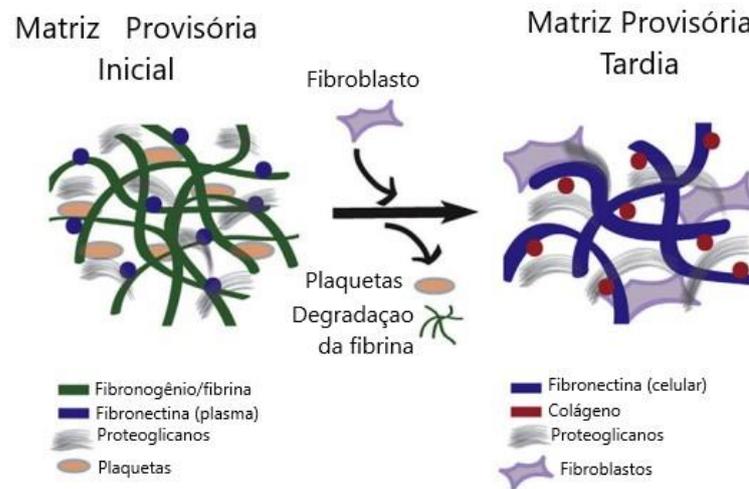
A progressão da angiogênese induzida pela inflamação resulta na formação de um tecido de granulação altamente vascularizado, que sofrerá regressão e deposição de fibras colágenas ao longo do processo de remodelamento. (CARMELIET, 2004; CREWE, AN, SCHERER, 2017)

### 1.2.3-Remodelamento

A matriz provisória formada inicialmente na superfície do implante por uma monocamada proteica, vai sofrendo modificações dos seus componentes pela ação de células inflamatórias e fibroblastos ao longo dos eventos inflamatórios, funcionando assim, como um arcabouço para manter a estrutura do tecido, além de contribuir para a sinalização inflamatória sequestrando vários agonistas que agem ao longo dos eventos do reparo tecidual (CREWE, AN, SCHERER, 2017; BALBINO et al, 2005).

Orientados pelo gradiente de agonistas presente na matriz provisória, os fibrócitos migram, se diferenciando em fibroblastos e miofibroblastos, que são responsáveis por substituir a fibrina que compõe a matriz inicial por fibronectina e proteoglicanos, que

posteriormente são substituídos pela deposição de fibras colágenas, resultando na formação de um tecido mais resistente e elástico (BARKER e ENGLER, 2017; BALBINO et al, 2005) (Fig. 3).

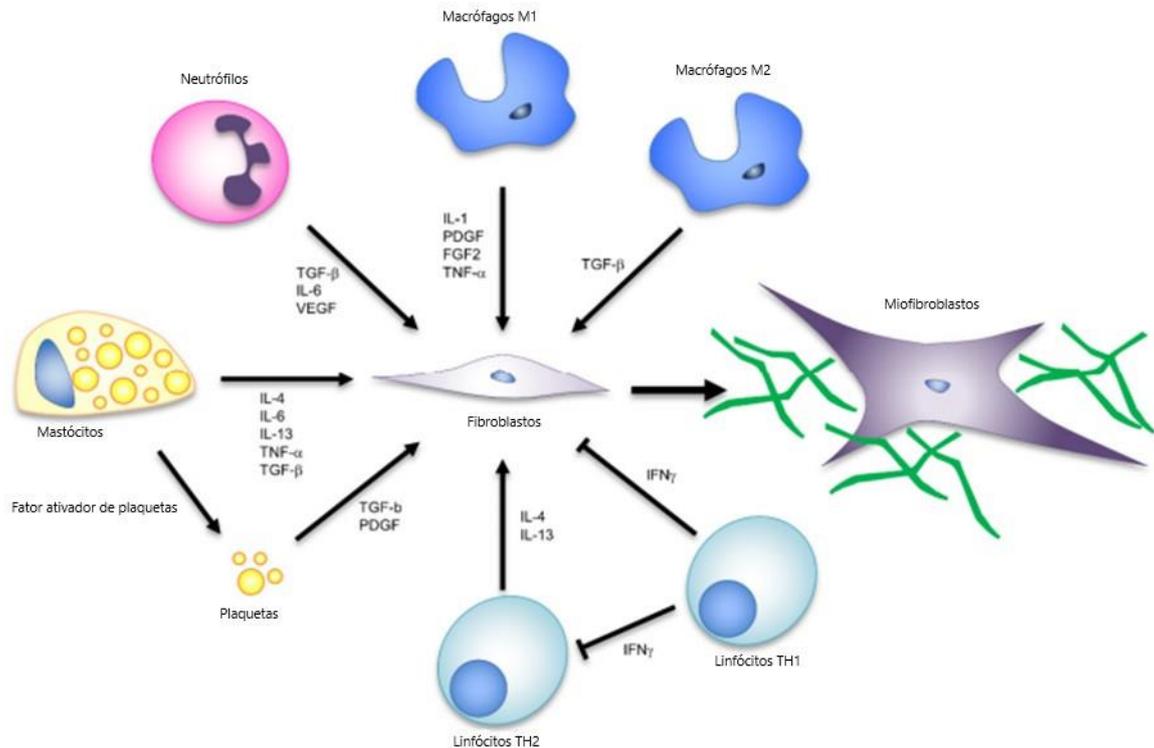


**Figura 3:** Formação e evolução da matriz provisória, que inicialmente forma uma malha de fibrina e fibronectina plasmática, sendo remodelada pela ação de fibroblastos sofrendo a deposição de fibras colágenas e proteoglicanos. ADAPTADO DE: BARKER e ENGLER, 2017.

A permanência da interação tecido/implante mantém o estímulo inflamatório e desencadeia a cronificação da inflamação e a diferenciação de macrófagos para o fenótipo M2. Os macrófagos M2 contribuem para uma secreção excessiva de fatores de crescimento, que conduzem os fibroblastos, a uma produção excessiva de colágeno causando um remodelamento com deposição excessiva de fibras colágenas na matriz formada, numa tentativa do hospedeiro de isolar o biomaterial dos tecidos adjacentes através da formação de uma cápsula fibrosa densa, pouco vascularizada (ANDERSON, RODRIGUEZ, CHANG, 2008; .RATNER, 2016; CHUNG et al, 2017; BARKER e ENGLER, 2017; THEVENOT et al, 2011; KIMURA e TSUJI, 2021).

Outros tipos de células imunológicas também participam ativamente da regulação dos eventos fibrogênicos, tais como os mastócitos, neutrófilos e células T, por sua capacidade de secretar mediadores pró-fibrogênicos e intensificar a ação dos fibroblastos. Os eventos de remodelamento também são co-dependentes da

neovascularização local (BALBINO et al, 2005; ANDERSON, RODRIGUEZ, CHANG, 2008; KIMURA e TSUJI, 2021) (Fig. 4).



**Figura 4:** Ação dos leucócitos e seus produtos sobre fibroblastos. ADAPTADO DE KIMURA e TSUJI, 2021.

Várias abordagens têm sido propostas e avaliadas visando minimizar os efeitos adversos causados pela interação tecido/implante. Dentre essas, estão intervenções baseadas no uso de drogas anti-inflamatórias, anti-angiogênicas, anti-fibróticas ou anti-metabólicas. Outra possibilidade amplamente estudada têm sido a busca pela otimização das propriedades físicas e da formulação do biomaterial utilizado para confeccionar os DMI (PATIL, PAPADMITRAKOPOULOS, BURGESS, 2007; BATISTA et al, 2012; CHUNG et al, 2017; JULIER et al, 2017; BROLY et al, 2019).

No entanto, as intervenções atuais não conseguiram prevenir de maneira satisfatória a resposta inflamatória excessiva, indicando a necessidade de novas abordagens terapêuticas com a finalidade de modular a reação inflamatória do hospedeiro aos DMI a fim de minimizar os efeitos indesejados dessa interação.

Na literatura estudos mostram que ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), são capazes de atenuar a inflamação e modular a angiogênese e fibrogênese em doenças inflamatórias.

### **1.3-Acidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC)**

Os AGCC são ácidos orgânicos compostos por uma cadeia com um a cinco átomos de carbono e um grupo carboxila. São produzidos pela fermentação de fibras solúveis e amido resistente por bactérias anaeróbias residentes no trato gastrointestinal, sendo os mais estudados, o acetato (C2), propionato (C3) e o butirato (C4). São encontrados em altas concentrações no trato gastrointestinal (70-140mmol/l no cólon proximal e 20-70 mmol/l no cólon distal), sendo a proporção entre os principais AGCC de aproximadamente 60% de acetato, 25% de propionato e 15% de butirato (VINOLO et al, 2009; MASLOWSKI et al, 2009; CANANI et al, 2011; ELCE et al, 2018)

Os AGCC são um importante substrato energético para os colonócitos, atendendo de 60-70% da suas necessidades energéticas. São também essenciais para a manutenção da homeostase intestinal devido a sua ação na modulação do fluxo sanguíneo colônico, na motilidade gastrointestinal, na proliferação e diferenciação celular e na modulação da resposta inflamatória, sendo também documentado seus efeitos a nível extra-intestinal (VINOLO et al, 2011; ELCE et al, 2018 FILLIPONE et al, 2020).

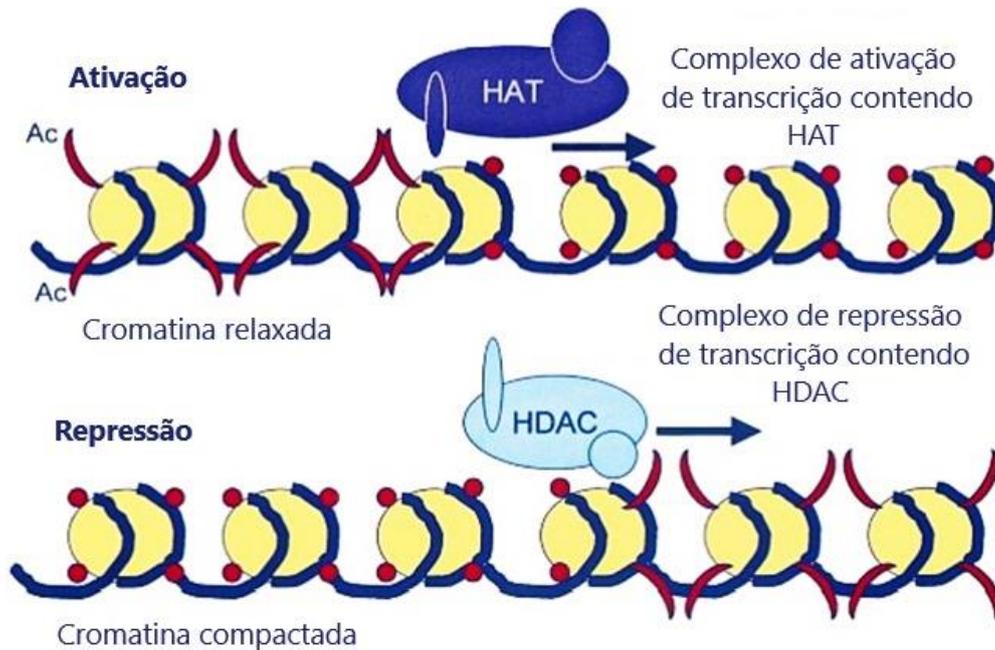
Após produzidos, os AGCC são rapidamente absorvidos pelo epitélio colônico por difusão simples e transporte ativo. Os AGCC não metabolizados pelos colonócitos são transportados pela veia porta até o fígado e distribuídos para outros órgão e tecidos onde são usados como fonte energética e exercem vários outros efeitos sobre o metabolismo celular. Foi observado que entre os AGCC, o butirato é o mais utilizado pelos colonócitos como fonte de energia (70–90%), enquanto o acetato e o propionato

são em maior porcentagem transportados para outros tecidos e órgãos. Estima-se que a disponibilidade sistêmica seja de 36% de acetato, 9% de propionato e 2% de butirato em indivíduos saudáveis, podendo essa disponibilidade variar de acordo com hábitos alimentares (PARK et al, 2015; BOETS et al, 2017; GILL et al, 2018; ELCE et al, 2018; RATAJCZAK et al, 2019)

### **1.3.1- Mecanismos de ação**

Os AGCC apresentam múltiplos efeitos em células de diferentes tecidos e órgãos através da modulação da expressão de genes, afetando a síntese proteica, a proliferação celular e a apoptose. Isso acontece por dois mecanismos: pela inibição das atividades das histonas desacetilases (HDACs) e pela ligação com receptores transmembrana que interagem com vias de sinalização intracelular (VINOLO et al, 2011; ELCE et al, 2018; RATAJCZAK et al, 2019)

As enzimas histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs) estão envolvidas na regulação epigenética da expressão gênica, através da adição ou remoção do grupo acetil da cauda N-terminal das proteínas histonas, respectivamente. A acetilação das histonas causa o relaxamento da cromatina, permitindo a acessibilidade ao DNA e consequente expressão gênica (DE RUIJTER et al, 2003; SILVA, 2018) (Fig. 5).



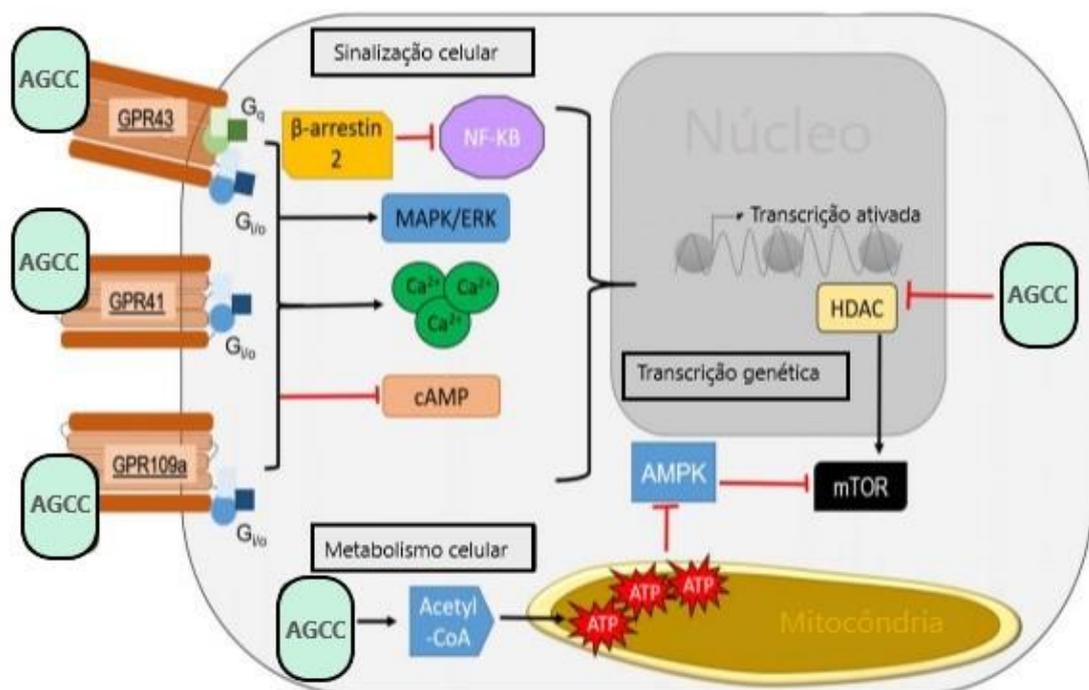
**Figura 5:** Papel das enzimas histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs) na regulação epigenética da expressão gênica. ADAPTADO DE: DE RUIJTER, 2003

Os AGCCs inibem a ação das HDACs, causando um estado de hiperacetilação que resulta na transcrição de agentes anti-inflamatórios. Esse potente efeito inibitório, principalmente do butirato e do propionato, foi descrito em vários modelos de inflamação (VINOLO et al, 2011; KOH et al, 2016; BUTMAN, 2017; ANG et al, 2017; GILL et al, 2018; SILVA, 2018; DE LAZARI et al, 2020).

Outro mecanismo de ação dos AGCCs sobre o metabolismo celular se dá pela atuação em cascatas de sinalização intracelular via ativação de proteínas transmembrana denominados receptores de ácido graxos livres (FFARs), que pertencem a família de receptores acoplados à proteína G (GPRs). Os GPRs são expressos na superfície de diversos tipos celulares, tais como células epiteliais do intestino, adipócitos, células imunes inatas e neurônios (COX et al, 2009; ANG et al, 2017; GILL et al, 2018; RATAJCZAK et al, 2019; VENEGAS et al, 2019).

Os AGCCs ativam três diferentes receptores de superfície celular acoplados à proteína G: GPR41 (também conhecido como FFAR3), GPR43 (FFAR2) e GPR109a

(PUMA-G). O GPR41 e o GPR43 são ativados por acetato e propionato, tendo maior afinidade pelo propionato. Brown e seus colaboradores observaram que GPR41 foi expresso principalmente no tecido adiposo, enquanto os níveis mais elevados de GPR43 foram encontrados nas células do sistema imunológico. O GPR109a tem como principal ligante o butirato (BROWN et al, 2003; LE POUL et al, 2003; THANGARAJU et al, 2009; SINGH et al, 2014; KOH et al, 2016; BOETS et al, 2017).



**Figura 6:** Ação dos AGCC sobre a sinalização celular, o metabolismo celular e a transcrição genica. ADAPTADO DE: GILL et al, 2018.

Os GPRs medeiam o efeito anti-inflamatório dos AGCCs, ao inibir a fosforilação das vias de sinalização de inflamação, como a via do NF-κB e a via do MAPK. Em estado inativado, essas proteínas quinases encontram-se ligadas a uma proteína inibitória, que ao ser degradada pela fosforilação permite a translocação para o núcleo e consequente transcrição gênica (HANKS e HUNTER, 1995; GLEZER et al, 2000; CANANI et al, 2011; CHEN et al, 2018) (Fig. 7).

Segundo Canani e colaboradores, o NF- $\kappa$ B regula muitos genes celulares envolvidos na síntese de produtos da resposta imune inflamatória inicial, incluindo IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ciclooxigenase-2 (COX-2), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), receptor de células T- $\alpha$  (TCR- $\alpha$ ) e moléculas de MHC de classe II. Estudos indicam que os AGCC inibem significativamente a ativação do NF- $\kappa$ B reduzindo a expressão de mediadores pró-inflamatórios. (CANANI et al, 2011; AGUILAR et al, 2014; CHEN et al, 2018; VENEGAS et al, 2019; DE LAZARI et al, 2020)

Dentro desse contexto, o AMP cíclico (cAMP) e o cálcio (Ca<sup>2+</sup>) também atuam como mensageiros secundários intracelulares dos sinais ativado pela ligação AGCC/GRPs, alterando a transcrição de um grande número de genes. Foi constatado que a inibição da via cAMP, e a elevação da sinalização de Ca<sup>2+</sup> em macrófagos e monócitos que tiveram GPR41 e GPR43 estimulados por acetato ou propionato, exerceu efeito anti-inflamatório (BROWN et al, 2003; YOSHIMOTO et al, 2002; ANG e DING, 2016) (Fig. 7).

No entanto, não está totalmente compreendido quais são os fatores que direcionam a ação preferencial do AGCC ou para inibição de HDAC, ou para a ativação de GPR em diferentes células, causando efeitos mediadores específicos em cada tecido (GILL et al, 2018).

### **1.3.2 -O uso dos AGCC/ Propionato de sódio em condições inflamatórias**

Os AGCCs têm sido alvo de estudos em diferentes modelos humanos e animais devido aos seus múltiplos efeitos na modulação da inflamação. Segundo Vinolo (2011), esses ácidos graxos não afetam apenas a função dos leucócitos, mas também podem induzir a apoptose em linfócitos, macrófagos e neutrófilos. Foi comprovado também que os AGCC podem apresentar efeitos divergentes dependendo do tipo de célula e da concentração no meio, demonstrando ter efeitos pró-inflamatórios em

baixas concentrações, e efeitos anti-inflamatórios em altas concentrações (LIU et al, 2016; GILL et al, 2018).

Em um modelo de sepse induzida, a administração de butirato de sódio afetou as atividades de monócitos ativados, macrófagos e neutrófilos, resultando na redução dos danos ao fígado, rins e pulmões e melhorando a taxa de sobrevivência (ZHANG et al, 2007). Em pacientes com Doença de Chron, o butirato diminuiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias por meio da inibição da ativação do NF- $\kappa$ B (SEGAIN et al, 2000). Outros estudos apontaram uma melhora de condições inflamatórias crônicas de vias aéreas através da ativação de GPR41 e GPR43 por AGCCs, reduzindo a expressão de citocinas e reduzindo a fibrogênese (HALNES et al, 2017; IMOTO et al, 2018).

Do mesmo modo, estudos com o ácido propiônico, e o seu derivado sintético o propionato de sódio, demonstraram que ele também apresenta uma ação moduladora na inflamação, na angiogênese e na fibrogênese em diversos modelos de doença. Como por exemplo, a supressão da inflamação em modelo murino de mastite e colite induzida, a modulação da angiogênese patológica na displasia broncopulmonar em modelo murino, e a redução da fibrose cardíaca em camundongos hipertensos (TONG et al, 2016; WANG et al, 2017; BARTOLOMAEUS et al, 2019; CHEN et al, 2021).

Neste contexto, propomos que a administração por via oral, uma via de extrema relevância na prática clínica, de PS poderia modular as fases da resposta tipo corpo estranho (inflamação, angiogênese, fibrogênese). Para testar esta hipótese utilizamos o modelo de implante de disco de esponja, que é amplamente utilizado por nosso grupo de pesquisa (ANDRADE *et al.*, 1997; DA ROCHA E SILVA *et al.*, 1998; DE MOURA *et al.*, 2011; CASTRO *et al.*, 2012; ORELLANO *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2015; LAZARI et al, 2020).

#### **1.4-Modelo de implante de esponja**

No modelo de implante de disco de esponja, é utilizado um disco de matriz porosa de poliéter-poliuretano de 8mm de diâmetro por 5 mm de altura, estéril, acelular e avascularizada. A caracterização estrutural do implante de esponja foi realizada previamente por nosso grupo de pesquisa através de microtomografia computadorizada, que demonstrou que a maioria dos poros apresenta diâmetro entre 400 e 600  $\mu\text{m}$ . A porcentagem de porosidade e a média dos diâmetros dos poros calculados pelo software de análise do micro-CT demonstrou que 96,05% da matriz sintética é formada por poros livres (PEREIRA et al., 2015). Ao ser implantado subcutaneamente na região dorsal de camundongos, induz uma interação entre o organismo hospedeiro e o corpo estranho. A matriz esponjosa desencadeia a resposta imune inata, com migração de células inflamatórias para o interior da esponja, e posterior formação de um tecido fibrovascular proliferativo e uma cápsula fibrosa ao entorno da matriz esponjosa. Isso permite a análise não só da resposta imune inata e dos seus componentes inflamatórios, angiogênicos e fibrogênicos, como também dos possíveis efeitos da administração de fármacos e compostos sobre os complexos eventos dessa interação, possibilitando o estudo e proposição de novas indicações terapêuticas (ANDRADE et al., 1997; CAMPOS et al., 2006; DE MOURA et al., 2011; CASTRO et al., 2012; ORELLANO et al., 2015; LAZARI et al, 2020).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Muitas terapias com ações anti-inflamatórias têm sido empregadas para reduzir os efeitos adversos à implantação de biomateriais, e assim minimizar o custo do tratamento e os riscos para o paciente. Entretanto as intervenções terapêuticas não têm sido capazes de atenuar de forma eficaz a resposta exacerbada, havendo a necessidade de busca por novos agentes como novas alternativas terapêuticas.

Apesar de existir grande variedade de estudos que comprovam a modulação da inflamação com a utilização dos AGCC, não há descrição na literatura do efeito do propionato de sódio na reação tipo corpo estranho. Sendo assim, a proposta deste trabalho foi utilizar a administração oral do propionato de sódio e avaliar seus efeitos

na resposta tipo corpo estranho em um modelo murino de implante de esponja sintética. Os resultados poderão gerar novas informações dos efeitos do composto em componentes específicos do processo de reparo, que poderão nortear futuramente alternativas para a melhora da resposta a implantes de biomateriais.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1-Objetivo geral**

Avaliar os efeitos do propionato de sódio na reação do tipo corpo estranho ao implante de matriz sintética de poliéter-poliuretano por parâmetros angiogênicos, inflamatórios e fibrogênicos.

#### **3.2- Objetivos específicos**

- Induzir a reação tipo corpo estranho em camundongos C57BL/6 através da implantação subcutânea de uma matriz sintética de poliéter-poliuretano por um período de 14 dias.
- Avaliar o perfil celular intra-implante através da técnica de citometria de fluxo, da análise histológica do tecido fibroproliferativo (quantificação dos mastócitos intra-implante (Dominicci), quantificação de células gigantes (H&E), e através de dosagens bioquímicas da concentração das enzimas Mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG).
- Quantificar a angiogênese morfometricamente através da contagem de vasos na matriz (H&E) e bioquimicamente pela dosagem da concentração do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) intra-implante.

- Determinar a deposição do colágeno utilizando-se técnicas histológicas para a quantificação de colágeno total, colágeno tipo I e colágeno tipo III (Picrosirius Red) e mensuração da cápsula fibrosa (H&E).

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

##### ***Animais***

Foram utilizados 50 camundongos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO), da linhagem C57BL/6, machos com idade de 8 semanas, peso 20-25g, sendo n=25 animais por grupo (Controle, Propionato). Desses 25 animais de cada grupo, 10 animais foram utilizados para citometria, 10 animais foram utilizados para dosagens bioquímicas e 5 foram utilizados para análises histológicas. Os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração padrão (NUVILAB CR-1 Brasil) e acomodados no biotério do Departamento de Patologia Geral, sob um ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos mantiveram os padrões estabelecidos nas diretrizes para o cuidado e uso de animais experimentais pela Comitê Institucional de Bem-Estar Animal e em conformidade com a Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da UFMG (CEUA protocolo 282/2018).

##### ***Preparação e implantação dos discos de esponja sintética e tratamento com os AGCCs***

Os implantes de esponjas sintéticas de poliéter-poliuretano (Vitafoam Ltda., Manchester, U.K.) foram cortados em discos de 5 mm de espessura e 8 mm de diâmetro, embebidos em álcool a 70% (overnight). Antes da implantação, os discos foram esterilizados por ebulição em água destilada durante trinta minutos (ANDRADE, FERREIRA, 2016)

Os animais foram anestesiados com uma mistura de 150 mg/kg de ketamina e 10 mg/kg de xilazina (LAZARI et al, 2020). O local da inserção foi tricotomizado e realizada a antissepsia da pele com álcool a 70%. As matrizes sintéticas acelulares

foram implantadas na região dorsal subcutâneo para observação de resposta local. Durante o pós-operatório imediato foram monitorados a ocorrência de sinais de infecção no sítio cirúrgico ou sofrimento do animal.

No dia posterior ao implante da esponja foi iniciado a administração via oral por gavagem de 100mg/kg/dia do propionato de sódio (Sigma; 96,06 g / mol) diluído em 100 microlitros de água filtrada para cada animal do grupo propionato e de 100 microlitros de água filtrada ao grupo controle durante 14 dias (FILLIPONE et al,2020; LAZARI et al, 2020). Em seguida os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os implantes foram removidos, fotografados, pesados e processados para as análises bioquímicas, histológicas e citometria de fluxo. (Fig. 7)

As imagens dos implantes foram capturadas com um microscópio estereoscópio (Nikon SMZ745T), equipados com software QCapture Pro 7, na magnificação de 6,5x e de 50x para avaliar o aspecto do implante pós-retirada e a formação de vasos na superfície do implante.



**Figura 7:** Protocolo experimental. Foi utilizada a técnica de gavagem para as administrações diárias de 100 µl de água filtrada para os animais do grupo controle e de 100 miligramas/kg de propionato de sódio diluído em 100 µl água filtrada para os animais do grupo propionato de sódio. A administração do propionato de sódio foi iniciada 1 dia após a inserção dos implantes prosseguindo até o 14º dia. No 15º dia os animais foram eutanasiados para realizar a coleta e processamento das amostras.

### **Análises histológicas**

Os implantes de 5 animais por grupo foram fixados em 10% de formol por 24h. Após a inclusão de parafina, procedeu-se às secções com espessura de 5 mm. Cinco lâminas por grupo foram coradas para a avaliação do tecido intra-implante com a coloração de hematoxilina e eosina (H.&E.), Dominici e Picrosirius Red.

As imagens das lâminas coradas com hematoxilina e eosina foram utilizadas para quantificação do número de vasos sanguíneos (todos os campos contendo vasos sanguíneos das lâminas foram analisados), quantificação das células gigantes (todos os campos contendo células gigantes por lâmina foram analisados), mensuração da espessura da cápsula fibrosa, em 15 campos por grupo. Nas lâminas coradas com Dominici foram analisados todos os campos contendo mastócitos. As imagens foram capturadas com uma câmera digital (CoolSnap-Pro) conectado a um microscópio Olympus BX51 equipado com software Image-Pro Express 7.0 (Media Cybernetics, EUA) com resolução de 2560x1920 pixels, com uma magnificação de 400x e de 1000x para analisar os parâmetros descritos acima.

As imagens das lâminas coradas com Picrosirius em média 50 campos por lâmina foram capturados com uma câmera com luz polarizada (Spot Insight) conectado a um microscópio Olympus BX41 equipado com software Spot 3.4, com resolução de 2560 x 1920 pixels, com uma magnificação de 200x para analisar os parâmetros descritos acima.

Todos os parâmetros foram analisados pelo software Image Pro Plus 7.0.

### **Dosagem dos níveis de Mieloperoxidase e N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase**

A infiltração de neutrófilos nos implantes foi avaliada indiretamente por análise da atividade da mieloperoxidase (MPO) (PEREIRA *et al*, 2017). Os implantes foram pesados, homogeneizados em tampão NaPO<sub>4</sub> 0,05 M (pH 6,0) e centrifugados a 5000rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida foram adicionados tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3 mM) à amostra para reação da enzima MPO com o substrato,

sendo a reação interrompida pela adição de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4M). A atividade de MPO nas amostras foi determinada medindo a alteração na absorbância a 450 nm. Os resultados foram expressos como alteração na densidade óptica (DO) por grama (g) de tecido úmido.

A infiltração de macrófagos nos implantes, foi avaliada indiretamente pelos níveis da enzima lisossômica N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG) (SASAMOTO, 1991; MARQUES, 2011; ORELLANO). As amostras foram homogeneizadas em solução de NaCl (0,9% v / v) contendo 0,1% v / v de Triton X-100 (Promega, Madison, WI, EUA) e centrifugadas a 3.000rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi incubado por 30 minutos a 37°C com 100 µl de p-nitrofenil-N-acetil-beta-D-glucosaminidase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), preparados em tampão citrato/ fosfato (Ácido cítrico 0,1 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M, pH 4,5) para produzir uma concentração final de 2,24 mM. A reação foi interrompida pela adição de 100 µl de tampão de glicina a 0,2 M (pH 10,6). A hidrólise do substrato foi determinada medindo a absorção a 405 nm. Os resultados foram expressos em nmol / mg de tecido úmido.

### ***Conteúdo intra-implantes de VEGF***

Os implantes foram homogeneizados em PBS a pH 7,4 contendo 0,05% de Tween e centrifugados a 12.000 durante 30 minutos a 4°C. O nível de citocinas foi medido em 100 µl do sobrenadante utilizando kits de imunoensaio (R e D Systems, EUA) e seguindo o protocolo do fabricante. As diluições de sobrenadantes sem células foram adicionados à placas ELISA revestidas com um anticorpo monoclonal murino específico contra as citocinas, seguindo-se da adição de um segundo anticorpo policlonal conjugado com peroxidase de rábano, contra as citocinas. Após a lavagem para remoção de qualquer reagente de anticorpo-enzima não ligado, foram adicionadas aos poços uma solução de substrato (50 µL de uma solução 1:1 de peróxido de hidrogênio e 10mg/ml de tetrametilbenzidina em DMSO). A reação foi interrompida após 20 minutos de incubação com ácido sulfúrico 2N (50 µL) e a intensidade de cor medida a 540 nm em um espectrofotômetro (Varisokan Flash). Os padrões de diluições foram de 0,5 log<sub>10</sub> de citocinas murinas recombinantes de 7,5

pg/ml a 1000 pg/ml (100 µl). Os resultados expressos como pg de citocina/mg de tecido úmido.

### ***Citometria de fluxo***

Os leucócitos intra-implante foram quantificados após 14 dias de implantação, por citometria de fluxo. Foi utilizado um painel monoclonal de anticorpos fluorescentes já determinado anteriormente (VIANA et al, 2015) sendo os seguintes anticorpos: anticorpo monoclonal de rato anti-mouse CD45 (clone 30-F11)-FITC, anticorpo monoclonal de rato anti-mouse CD11c (clone N418)-eFluor 450, anticorpo monoclonal de rato anti-mouse CD3e (clone 145-2C11)-Percp-Cy5.5, anticorpo monoclonal de rato anti-mouse F4/80(BM8)-PE e o anticorpo monoclonal de rato anti-mouse GR-1 (Ly6-G/Ly-6C ), Biotin (clone: RB6-8C5)- APC adquiridos da eBioscience™ .

Foram utilizados 10 implantes de esponja de cada grupo. Os implantes foram picados com tesoura em 1 ml de HBSS, em seguida 2,5 ml de colagenase tipo 1 filtrada e esterilizada (Sigma Chemicals, St Louis, MO, EUA) e tripsina foram adicionados aos fragmentos. Após incubação durante 30 min a 37 ° C, as células foram lavadas e centrifugadas (500 g durante 10 min a 4 ° C). As células isoladas de esponjas foram ressuspensas em solução de 0,1% BSA em PBS. Subsequentemente, as células foram lavadas com tampão FACS, coradas para moléculas de superfície durante 20 minutos a 4 ° C. Pelo menos 50.000 eventos foram adquiridos para análise usando FACSCanto-II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

Os dados foram analisados usando FlowJo Versão 9.7.5 (TreeStar, Carrum Downs, Austrália). A dispersão direta (FSC-A) e a dispersão lateral (SSC-A) foram usadas para remover inicialmente os detritos e capturar os leucócitos. Os leucócitos foram quantificados com base na expressão de CD45, e em seguida foram quantificados linfócitos T com base na expressão de CD45 + CD3. A partir das células CD45+, foi avaliado a expressão de GR1 versus F4 / 80 para selecionar monócitos (GR1 + e GR1Low) e neutrófilos (GR1 + F4 / 80Neg). Uma análise mais detalhada das

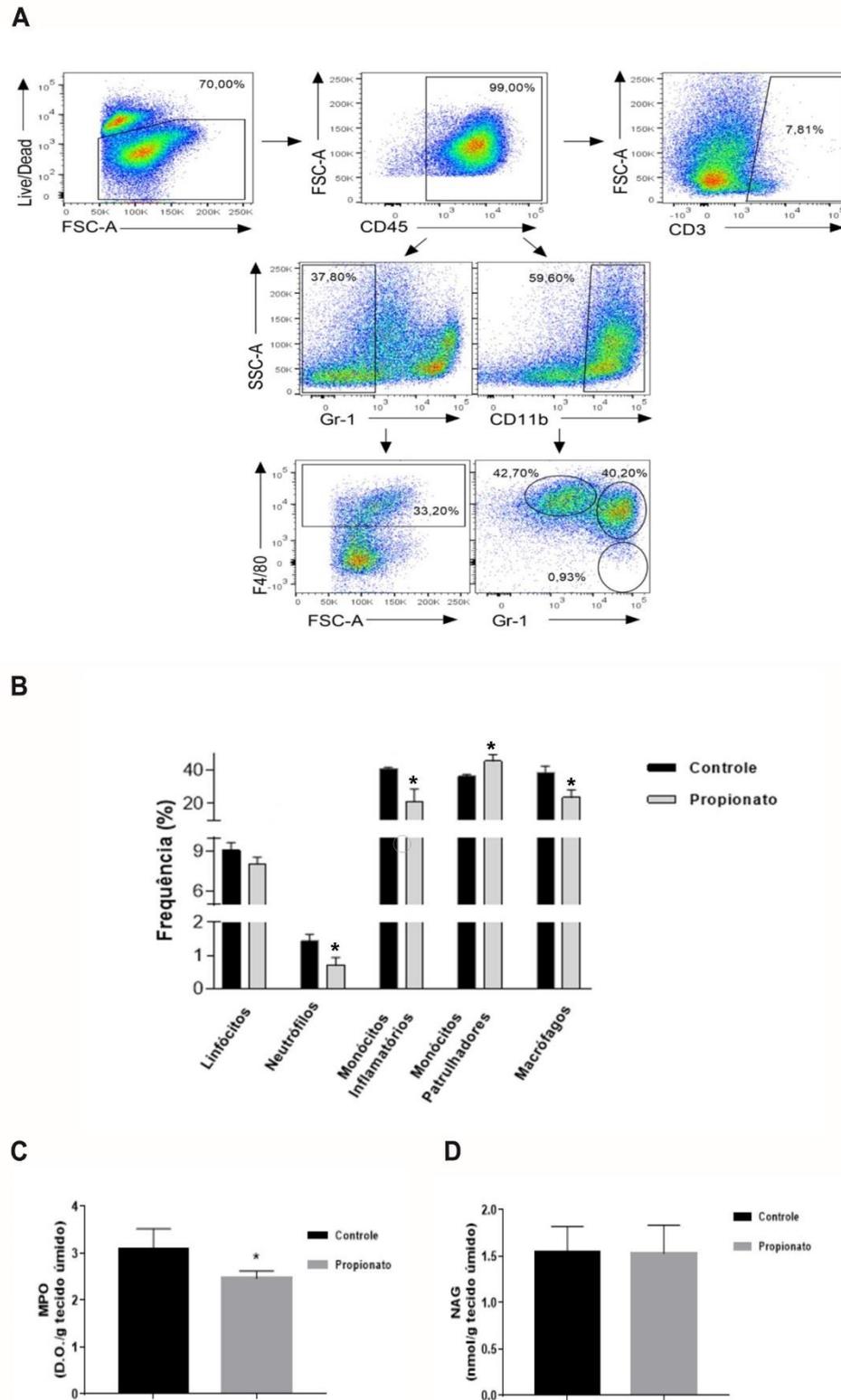
subpopulações de monócitos foi feita com base na expressão de GR1 e aqui designados como: monócitos inflamatórios (F4 / 80 + CD11b + GR1-High) e monócitos de patrulhamento (F4 / 80 + CD11b + GR1-Low). A porta F4 / 80 High GR1Low / Neg foi usada para caracterizar macrófagos (VIANA et al, 2015)

### **Análises Estatísticas**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM ou mediana. A normalidade e homoscedasticidade foram determinadas para posterior análise estatística. A análise estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prisma 7.0, e foi considerado estatisticamente significativo um valor de  $p < 0,05$ . As comparações entre os dois grupos (CT e PS) foram feitas através do teste t de Student ou Mann Whitney para dados não paramétricos.

## **5- RESULTADOS**

***Perfil celular inflamatório e as concentrações das enzimas de Mieloperoxidase e N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase intra-implante.***



**Figura 8:** Efeito do propionato de sódio sobre a população de leucócitos intra-implante e a concentração das enzimas Mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) após 14 dias de tratamento. Representado em A, está a estratégia de análise em dot plots identificando a infiltração de linfócitos T, neutrófilos, monócitos inflamatórios, monócitos patrulhadores e macrófagos no interior do implante. Em B, foi comparada a frequência dessas células em ambos os grupos. Em C e D, estão representados os resultados da quantificação de Mieloperoxidase e N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase em ambos os grupos. Os resultados são expressos com a média  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , teste T de student,  $n=10$  animais por grupo.

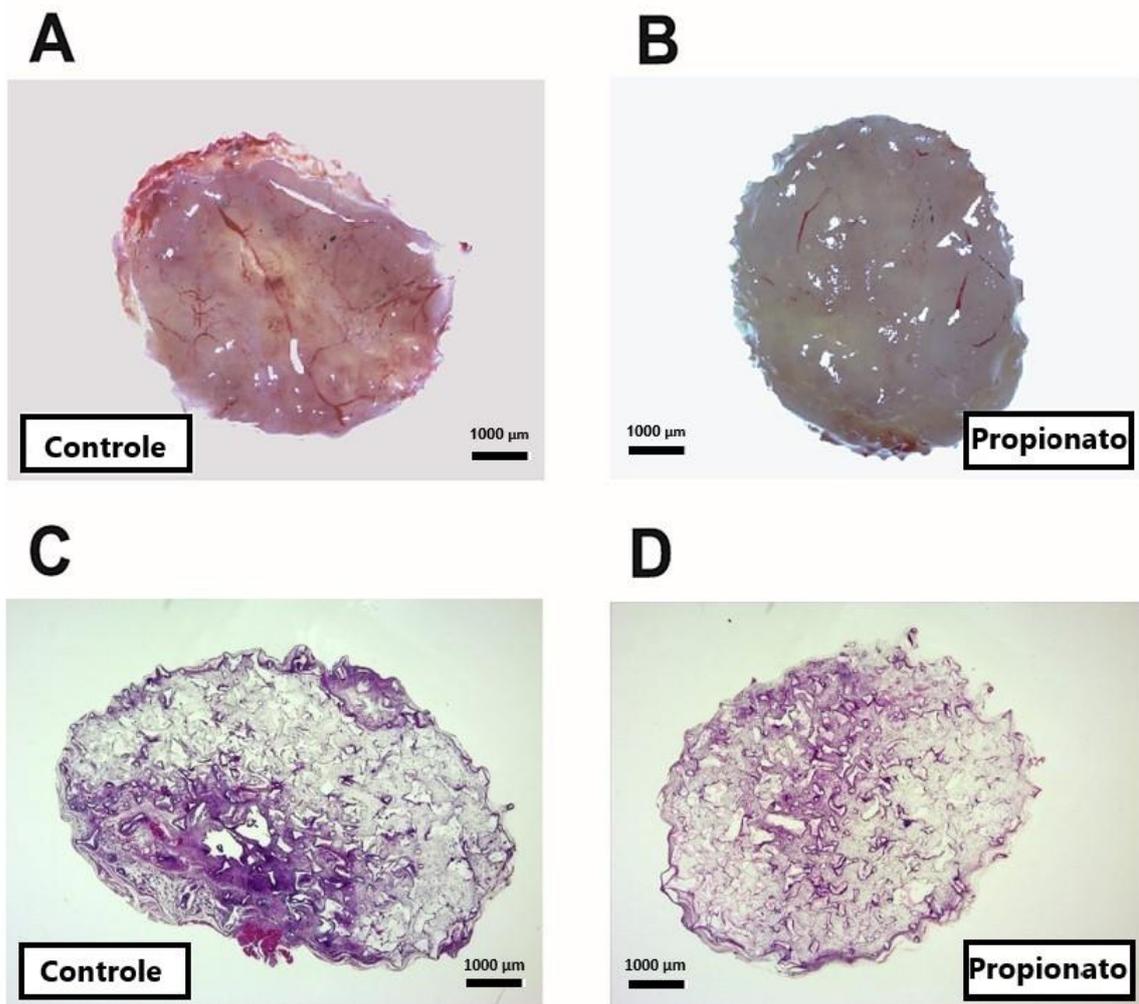
Os leucócitos foram identificados pelas análises do painel monoclonal utilizado (Fig.8 A). Foram quantificadas a presença de tipos celulares como: linfócitos, neutrófilos, monócitos inflamatórios, monócitos patrulhadores e macrófagos, sendo que há um claro predomínio de monócitos e macrófagos em ambos os grupos. A maioria dos tipos celulares identificados tiveram redução da frequência no grupo tratado, à exceção dos monócitos patrulhadores CT ( $36,28 \pm 1,23$ ) versus PS ( $45,51 \pm 3,9$ ); sendo que os neutrófilos CT ( $1,44 \pm 0,19$ ) versus PS ( $0,7 \pm 0,24$ ); monócitos inflamatórios CT ( $41,16 \pm 0,68$ ) versus PS ( $21,18 \pm 7,6$ ); e os macrófagos CT ( $38,8 \pm 3,81$ ) versus PS ( $23,6 \pm 4,56$ ) mostraram uma redução significativa (Fig.8 B).

A dosagem de mieloperoxidase (MPO), está concordante com os achados da citometria, uma vez que assim como os neutrófilos se mostrou reduzida no grupo tratado, CT ( $3,1 \pm 0,42$ ) versus PS ( $2,46 \pm 0,15$ ), (Fig.8C).

Não houve diferença entre os grupos avaliados quanto a concentração de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) intra-implante, CT ( $1,54 \pm 0,28$ ) versus PS ( $1,53 \pm 0,30$ ) (Fig.8 D).

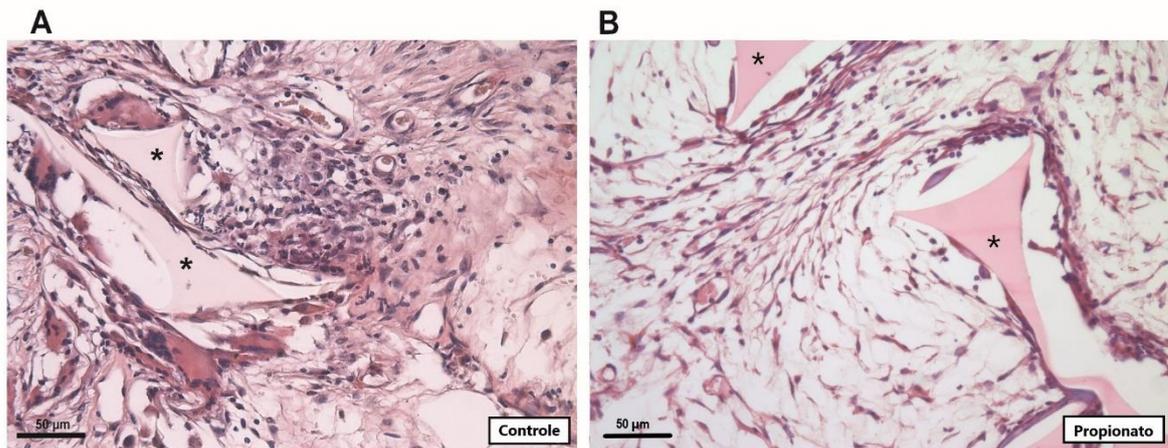
### ***Análises macroscópicas e microscópicas do implante após retirada***

O implante de esponja foi bem tolerado por todos os animais. Durante o período de 15 dias do experimento, não houveram sinais visíveis de infecção ou rejeição no local do implante, nem sinais de toxicidade tais como alteração nas atividades motoras, alteração no nível de consciência ou perda de peso dos animais.



**Figura 9:** Visão macroscópica do implante versus corte histológico do implante em H&E. Fotomicrografia em lupa do implante de esponja após 14 dias de tratamento em A e B, do grupo controle e tratado respectivamente. Em C e D, foram fotografados em lupa os cortes histológicos dos implantes corados em H&E na magnificação de 6.5x, do grupo controle e tratado respectivamente. Os implantes mostraram diferenças de tonalidades entre os grupos.

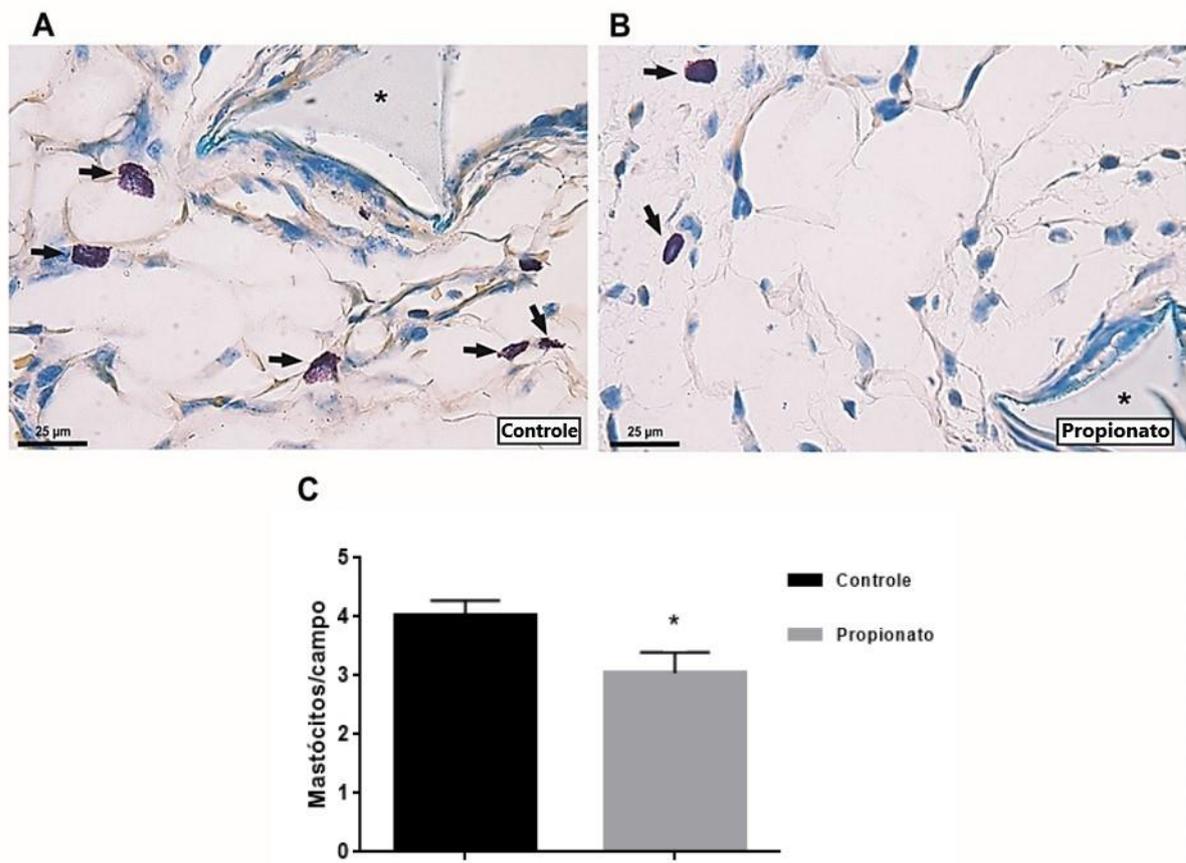
Quanto aos aspectos macroscópicos dos implantes, foi visualizado a formação de um envoltório vascularizado entorno dos implantes de ambos os grupos, sendo que no grupo controle esse envoltório apresentou tonalidades avermelhadas, enquanto que no grupo tratado, o envoltório apresentou tonalidades de branco a amarelada. Na fotomicrografia da esponja inteira, observa-se no grupo controle um aspecto mais eosinofílico, sugerindo uma maior infiltração tecidual nesse grupo.



**Figura 10:** Efeito do propionato de sódio sobre a formação do tecido fibroproliferativo no implante de esponja. Fotomicrografia representativa do grupo controle e do grupo propionato corados em H&E, em A e B, respectivamente. A esponja de poliéter poliuretano apresenta aspecto triangular e está marcada em asterisco na imagem.

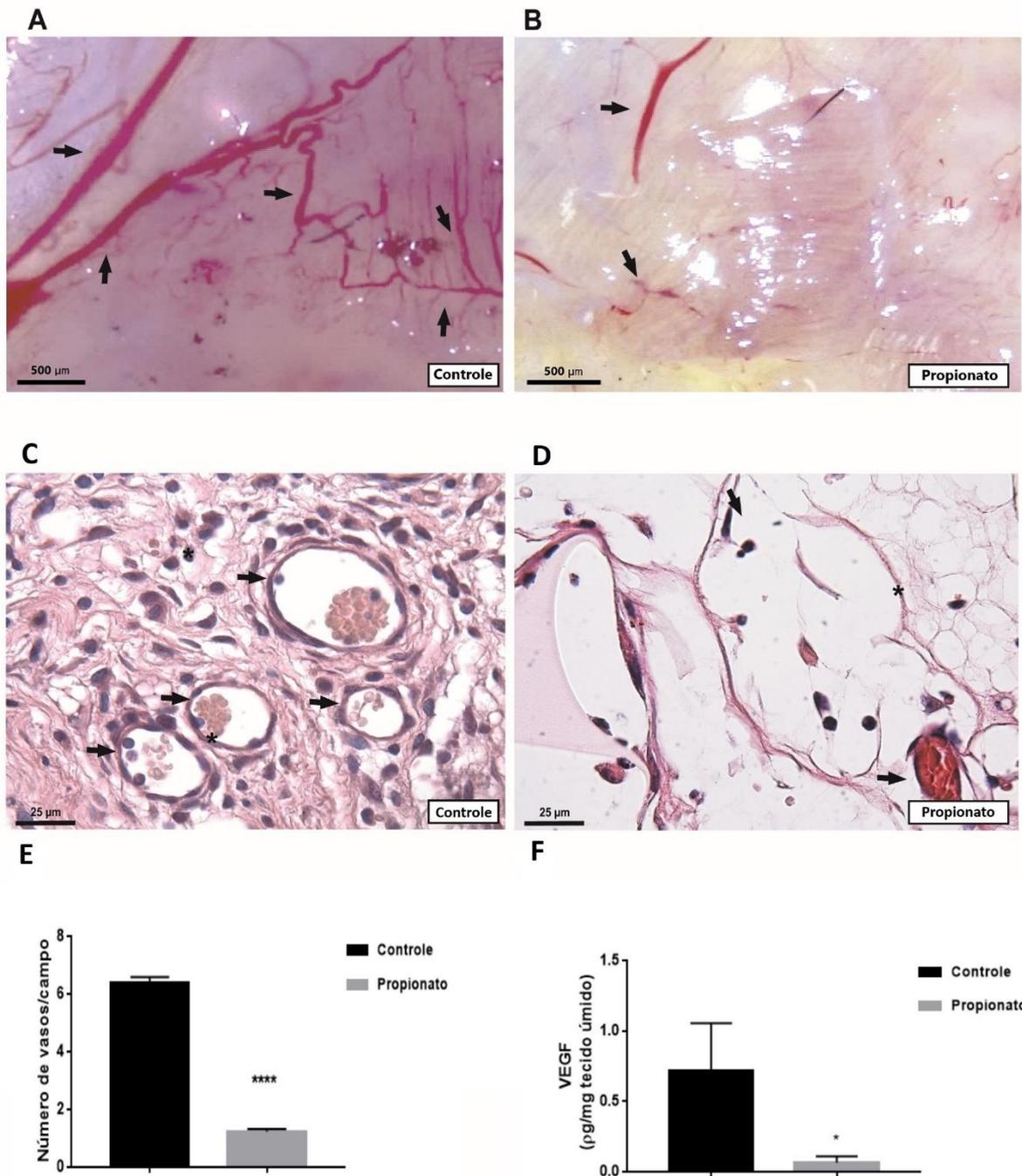
Quanto aos aspectos microscópicos, cortes histológicos (coloração H&E) mostraram a indução da resposta inflamatória tipo corpo estranho, com formação de tecido fibrovascular infiltrando os poros da esponja, composto por vasos neoformados congestionados e intensa celularidade com vários tipos de células inflamatórias, também fibroblastos (Fig.10 A e B).

No grupo tratado com propionato percebe-se uma clara redução da celularidade intra-implante, com a presença de um transudato claro, eosinofílico somado a poucas células dispersas no interior do implante (Fig.10 A e B).



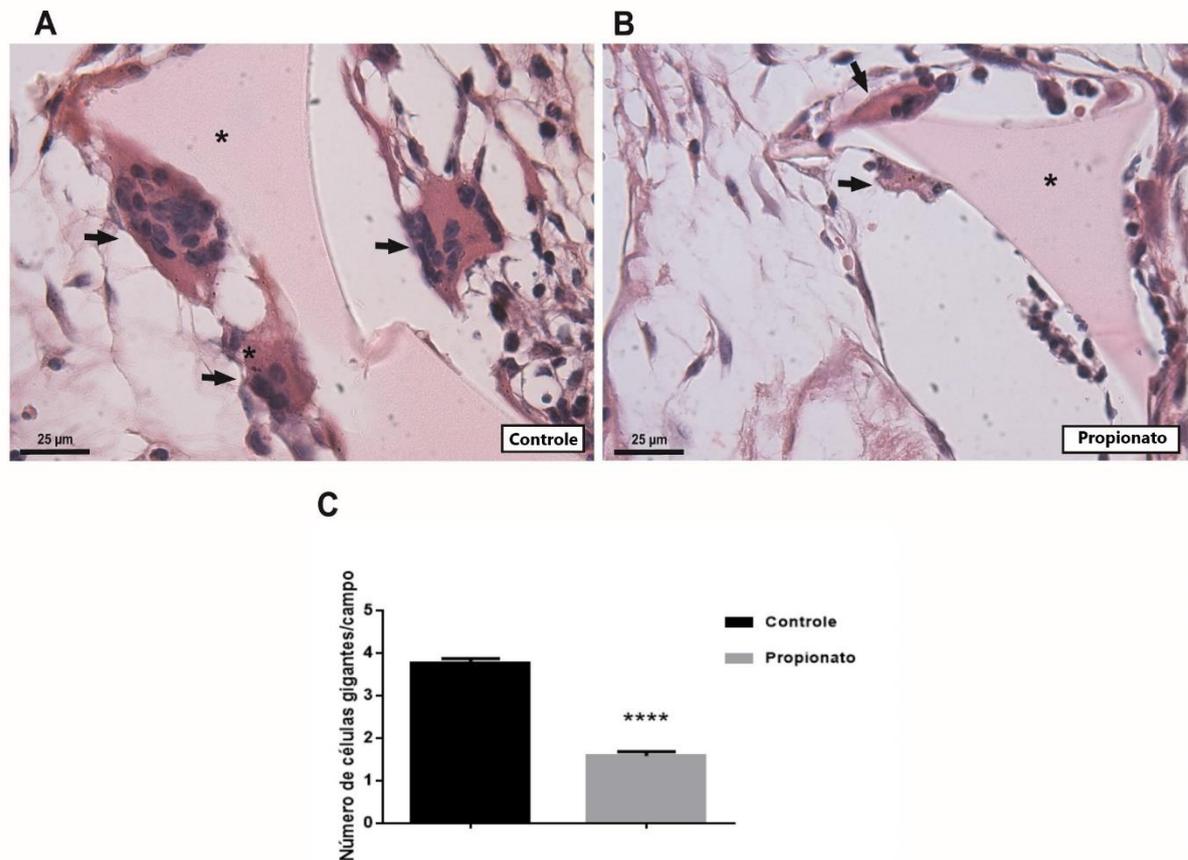
**Figura 11:** Efeito do propionato de sódio sobre o infiltrado de mastócitos. Fotomicrografia das seções histológicas corados com Dominici. Os mastócitos estão apontados pelas setas, sendo o grupo controle representado em A, e o grupo propionato representado em B. Os mastócitos foram quantificados, e os resultados foram expressos em C, com a média expresso com a média  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; teste T de student,  $n=5$  animais por grupo

Através da coloração de secções de implante com Dominici, observou-se a infiltração mastocitária no tecido fibrovascular formado (Fig.11 A e B). O tratamento com propionato de sódio promoveu a redução no número de mastócitos/campo, CT ( $4,01 \pm 0,27$ ) versus PS ( $3,04 \pm 0,35$ ) (Fig.11 C).



**Figura 12:** Efeito do propionato de sódio sobre a angiogênese. *Em A e B.* Fotomicrografia representativa, numa magnificação de 50x, mostrando a formação de um tecido vascularizado, com vários vasos dispersos pela superfície do implante do grupo controle em A, e raros vasos focalmente na superfície do implante do grupo tratado com propionato em B. *C e D* Fotomicrografia das seções histológicas do implante de esponja (5µm) corados em H&E, numa magnificação de 1000x, representando o quantitativo de vasos por campo nos grupos controle em C, e no grupo propionato em D. Setas: vasos intra-implante. O resultado da quantificação do número de vasos intra-implante foi expresso em E, e a concentração de VEGF intra-implante foi expresso em F, ambos com a média  $\pm$  SEM. \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; \* $p < 0.05$ , teste T de student,  $n=5$  animais por grupo. O tratamento com propionato de sódio reduziu significativamente o número de vasos por campo.

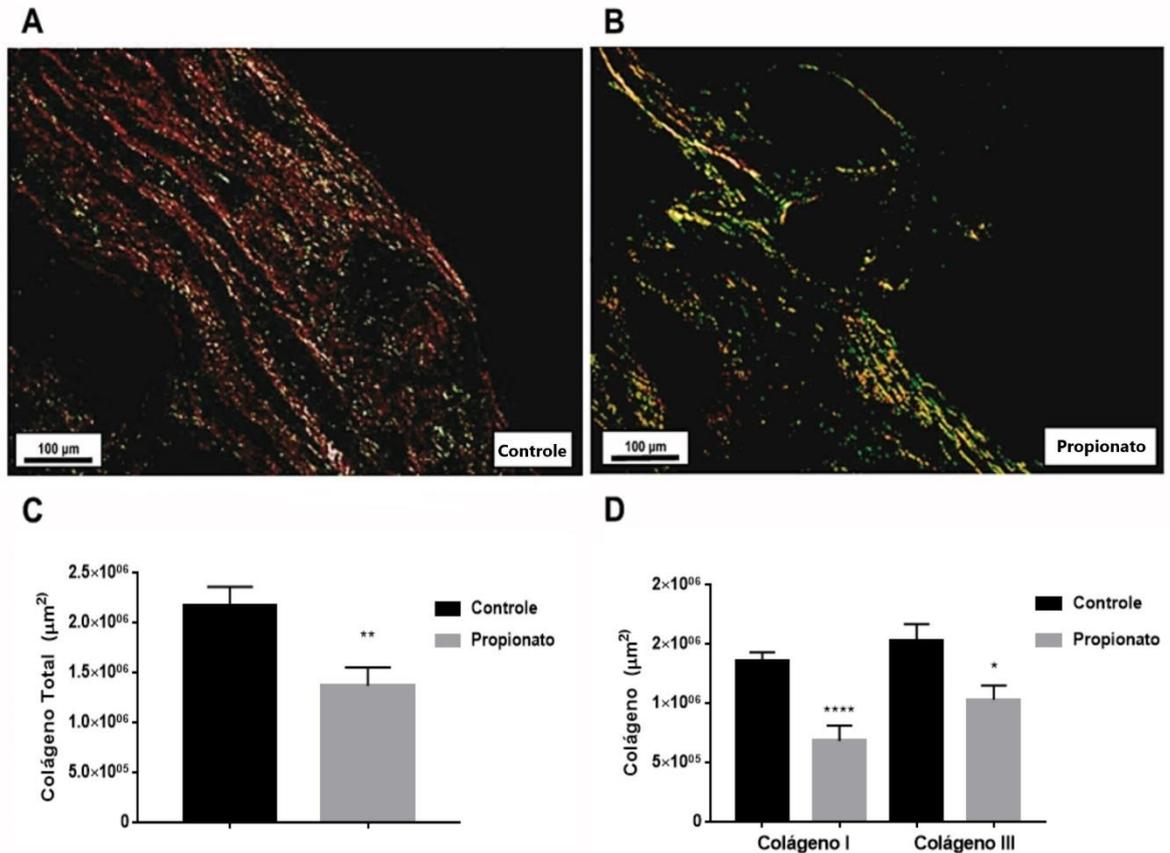
O efeito anti-angiogênico do AGCC é visualizado pela redução quantitativa dos vasos em 81% no grupo tratado, representado pelas imagens dos implantes (Fig. 12 A-D). Semelhantemente, a concentração de VEGF intra-implante se apresenta reduzida no grupo tratado (Fig.12 C) CT ( $0,71 \pm 0,34$ ) versus PS ( $0,06 \pm 0,045$ ).



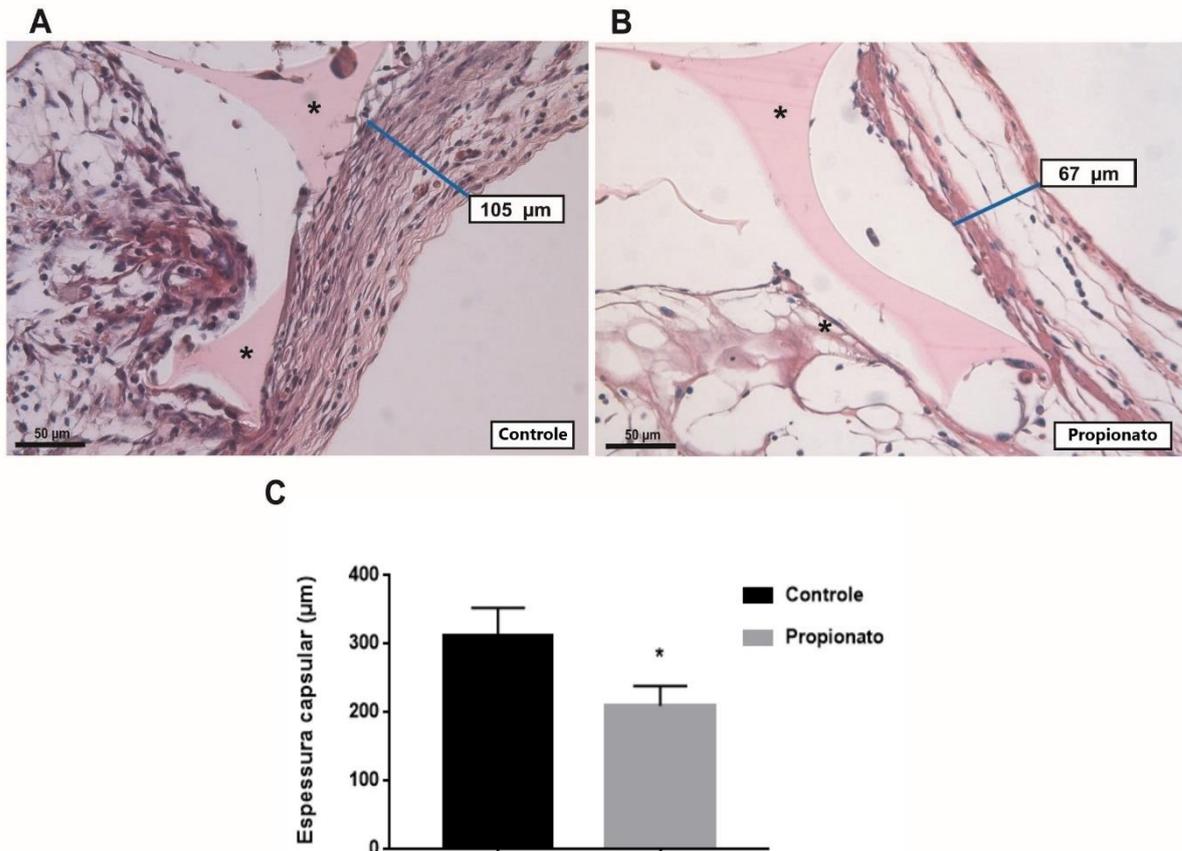
**Figura 13:** Efeito do propionato de sódio na reação tipo corpo estranho. Fotomicrografia representativa da reação tipo corpo estranho corado em H&E em A no grupo controle, e em B no grupo propionato. Observa-se a presença de células gigantes multinucleadas aderidas ao biomaterial (apontado em asterisco) em ambos os grupos; havendo uma redução da celularidade intra-implante e do quantitativo de células gigante/campo, representado em C. A morfologia das células gigantes no grupo tratado apresentou-se alterada, com redução do número de núcleos e do citoplasma. Os resultados são expressos com a média  $\pm$  SEM. \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; teste T de student,  $n=5$  animais por grupo.

Foi confirmada a reação tipo corpo estranho pela presença marcante de células gigantes com numerosos núcleos dispersos em citoplasma abundante, aderidos ao biomaterial (Fig. 13 A e B). No entanto observou-se que no grupo tratado houve uma significativa redução da celularidade intra-implante e do quantitativo de células

gigantes por campo, CT ( $3,757 \pm 0,1118$ ) versus PS ( $1,581 \pm 0,1036$ ) (Fig. 14 C)., sendo ainda observadas alterações morfológicas nas células gigantes, com redução do conteúdo citoplasmático e do número de núcleos no seu interior.



**Figura 14:** Efeito do propionato de sódio sobre a deposição de fibras colágenas. Fotomicrografia representativa das fibras colágenas intra-implante evidenciadas pela coloração Picrosirius red, o grupo controle em A, e o grupo propionato em B. Nessa coloração à luz polarizada, as fibras de colágeno tipo I, adquirem birrefringência aumentada em matizes amarela viva, laranja ou vermelho, e as fibras colágenas tipo III adquirem birrefringência aumentada em matizes de verde. O quantitativo de fibras colágenas total está expresso em C. O quantitativo de fibras colágenas tipo I e tipo III está expresso em D. Os resultados são expressos com a mediana, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  Mann Whitney teste,  $n=5$  animais por grupo.



**Figura 15:** Efeito do propionato de sódio sobre a formação da capsula na superfície do disco de esponja. Fotomicrografia representativa da cápsula fibrosa que envolve o implante, corado em H&E, em A o grupo controle, e em B o grupo propionato. A mensuração da espessura da cápsula foi expressa em C. Os resultados são expressos com a média  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , teste T de student,  $n=5$  animais por grupo.

Quanto ao remodelamento, o propionato de sódio apresentou efeito antifibrogênico. Houve a diminuição da produção total de colágeno, CT (mediana= 676277) versus PS (mediana= 512105  $\mu\text{m}^2$ ); de colágeno tipo I, CT (mediana= 886970  $\mu\text{m}^2$ ) versus PS (mediana= 248220  $\mu\text{m}^2$ ) e colágeno tipo III CT (mediana= 382167  $\mu\text{m}^2$ ) versus PS (mediana= 253226  $\mu\text{m}^2$ ) no grupo tratado (coloração Picrosirius red). Sendo observado ainda que há maior redução das fibras colágenas tipo I (mais espessas) que fibras colágenas tipo III (reticulares) no grupo tratado, apontando um atraso no remodelamento da matriz (Fig.14 A - D). Houve também redução quantitativa da espessura da cápsula, CT (311,5  $\pm$  40,12) versus PS (208,5  $\pm$  28,87), que adquiriu um aspecto fragmentado com espaçamento entre as fibras colágenas (Fig.15 A-C).

Nossos resultados demonstraram que o propionato de sódio exerceu efeito anti-inflamatório, anti-angiogênico e anti-fibrogênico sobre a reação tipo corpo estranho.

## 6. DISCUSSÃO

O êxito no implante de um biomaterial está relacionado a intensidade da reação inflamatória gerada e seus produtos. Após a inserção, os implantes desencadeiam uma cascata de sinalização pró-inflamatória que pode evocar uma intensa resposta inflamatória do tipo corpo estranho com formação de tecido fibrovascular que adere a interface do implante e infiltra nos seus compartimentos, podendo levar ao comprometimento da funcionalidade e durabilidade do implante e do tratamento proposto (SOCARRÁS et al, 2014; PEREIRA et al, 2018; CHU et al, 2019; VOLLKEMER et al, 2019; DE LAZARI et al, 2020).

Estudos envolvendo compostos naturais mostraram que os AGCC podem atuar na migração de leucócitos para sítios inflamatórios, inibindo a expressão de moléculas de adesão (LI et al, 2018; VESTWEBER, 2015). Porém não encontramos estudos na literatura que avaliassem o efeito de um AGCC, o propionato de sódio, na resposta inflamatória do tipo corpo estranho.

Para avaliar a hipótese de que este composto também poderia modular a reação do tipo corpo estranho utilizamos o modelo de implante de poliéter poliuretano (modelo de implante de esponja em camundongo) que é o modelo experimental utilizado por nosso grupo de pesquisa. O processo inflamatório que se desenvolve dentro e ao redor de implantes de discos de esponja de 14 dias, exibe características compatíveis com uma inflamação do tipo corpo estranho, como a presença de neutrófilos, mastócitos, monócitos, linfócitos, fibroblastos, macrófagos e células gigantes do tipo corpo estranho, produzindo um tecido fibrovascular com intensa neovascularização que infiltra os poros da esponja, como também a formação de uma cápsula fibrosa. O que tem sido observado em trabalhos já publicados por nosso

grupo de pesquisa (CASTRO et al., 2014; PEREIRA et al., 2018; CASSINI-VIEIRA et al., 2018).

Neste trabalho, o propionato de sódio administrado por via oral, reduziu a infiltração de células inflamatórias na esponja do grupo tratado, avaliada através da frequência de algumas populações de leucócitos. Os linfócitos são leucócitos importantes na resposta do tipo corpo estranho devido ao seu papel na produção de citocinas pró-inflamatórias que sustentam e orquestram eventos inflamatórios e promovem a adesão e fusão de macrófagos em células gigantes (WAJNER, 1999; BRODBECK et al, 2005; CHANG, COLTON e ANDERSON, 2009; MARIANI et al, 2019). Em nosso modelo de estudo, os linfócitos apresentaram uma tendência a redução intra-implante. Este resultado é coerente com a literatura, onde já foi reportado que os AGCC podem alterar a diferenciação fenotípica e a função dos linfócitos, sendo que o propionato mais especificamente, inibe a ativação e a formação de colônias de linfócitos T em altas concentrações *in vitro* (BROWN et al, 2003; VINOLO et al, 2011; PARK et al, 2015). Porém em nosso modelo, possivelmente devido ao tempo de estudo avaliado, 14 dias, não foi observada diminuição do quantitativo de linfócitos intra-implante no grupo tratado.

Os neutrófilos e os níveis da enzima MPO, produto da sua ativação, tiveram significativa redução do seu quantitativo intra-implante no grupo tratado, o que pode ter contribuído para atenuar a resposta inflamatória tipo corpo estranho e o remodelamento do tecido fibrovascular nesse grupo. Os neutrófilos, são células importantes na coordenação e intensificação das reações inflamatórias tanto na fase aguda, quanto na fase crônica da resposta do hospedeiro ao biomaterial, devido a sua ação através da liberação de proteínas granulares, espécies reativas de oxigênio e quimiocinas, e da formação de armadilhas extracelulares (NETs) (SOEHNLEIN et al., 2017; SELDERS et al, 2017; WANG, PAN e LIU, 2019). Estudos observaram que ao inibir a migração de neutrófilos na fase aguda da inflamação e consequentemente reduzir a concentração de seus produtos no sítio inflamatório, o recrutamento de outros leucócitos é comprometido, como observado em nosso modelo (MASLOWSKI et al, 2009; VINOLO et al, 2011; CORRÊA et al, 2017). Atualmente na literatura, têm

sido discutido a importância dos neutrófilos na coordenação dessa resposta imune a biomateriais, não só pela sua manutenção no sítio de implantação por períodos mais longos devido ao recrutamento contínuo e a inibição da apoptose espontânea do processo normal destas células, como também pela sua atuação na interface tecido/implante com formação de NETs nas superfícies dos implantes. Os neutrófilos liberam NETs quando são incapazes de fagocitar um estímulo nocivo, sendo essa ação considerada um análogo da formação de células gigantes tipo corpo estranho. A liberação de NETs aumenta a resposta fibrogênica, contribuindo para uma produção excessiva de uma matriz fibrótica densa, promovendo o encapsulamento fibrótico e prejudicando a regeneração tecidual (JHUNJHUNWALA et al, 2015; SELDERS, 2017; MARIANI, 2019; ODE BONI et al, 2019).

O estímulo continuado provocado pela permanência da interação tecido/implante, evoca uma inflamação crônica, com predomínio de monócitos e macrófagos e seus diferentes fenótipos no sítio inflamatório (ANDERSON, RODRIGUEZ e CHANG, 2008; FILIPPONE et al, 2020). Esse predomínio está bem caracterizado em nosso modelo de estudo, tanto pela citometria de fluxo, quanto pelas análises histopatológicas. Segundo alguns estudos existem duas populações descritas de monócitos em camundongos, caracterizada pela expressão de receptores transmembrana de glicocorticóide: os GR1<sup>High</sup> e os GR1<sup>Low / Neg</sup>. Os monócitos com alta expressão de GR1, conhecidos como monócitos inflamatórios são aqueles que migram dos vasos para o tecido, se tornando uma fonte de citocinas inflamatórias, podendo também se diferenciar em macrófagos que contribuem na defesa e no reparo tecidual. Já os monócitos GR1<sup>Low/Neg</sup>, conhecidos como monócitos patrulhadores, são aqueles que estão relacionados a produção de quimiocinas e ao recrutamento de células para o local da inflamação (SERBINA et al., 2008; AUFFRAY, SIEWEKE, GEISSMANN, 2009; ZIEGLER-HEITBROCK et al, 2010; INGERSOLL et al, 2010). O tratamento com o propionato de sódio foi capaz de diminuir esta população celular intrainplante em nosso modelo.

Estudos demonstram que o propionato de sódio inibe as ações pró-inflamatórias de monócitos e células derivadas através da ligação com o receptor GPR41, que tem maior afinidade por este AGCC (BROWN et al, 2003; COX et al, 2009; VENEGAS et

al, 2019). Phillipone e seus colaboradores demonstraram a inibição das atividades de macrófagos murinos pelo propionato de sódio *in vitro* e atenuação da inflamação *in vivo* num modelo de inflamação da pata de rato induzida por carragenina onde os ratos receberam 10, 30 e 100 mg / kg de propionato de sódio por via oral ( FILLIPONE et al, 2020). No nosso modelo de estudo foi observado que os macrófagos tiveram uma redução em sua população intrainplante no grupo tratado juntamente com os monócitos GR1<sup>High</sup>, mas diferentemente dos monócitos GR1<sup>Low/Neg</sup>, que tiveram um aumento em sua população celular intrainplante. Ao dosarmos a enzima N-acetil-β-D-glucosaminidase, que é uma enzima produzida principalmente por monócitos e macrófagos ativados, foi observado que não houve diferença nas concentrações entre os grupos. Consideramos que, os monócitos patrulhadores, que tiveram um aumento no grupo tratado tenham contribuído para contrabalancear a manutenção das atividades dessa enzima nesse grupo.

Os macrófagos são estimulados a se diferenciar no fenótipo “alternativamente ativados” (M2) e, pela presença continuada do implante, a formar células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho (GARG et al. 2013). Essas células podem produzir uma reação exacerbada e um remodelamento patológico, devido a formação de um ambiente hostil para regeneração e reparo tecidual causado pela secreção excessiva de fatores de crescimento, que conduzem os fibroblastos, a uma produção e deposição excessiva de fibras colágenas tipo I e III na matriz formada. O resultado é a formação de uma cápsula fibrosa, numa tentativa do hospedeiro de resolução da lesão (ANDERSON, RODRIGUEZ, CHANG, 2008; BROWNE et al, 2015; RATNER,2016; CHUNG et al, 2017; BARKER e ENGLER, 2017; THEVENOT et al, 2011). O propionato de sódio se mostrou capaz de atenuar a reação do tipo corpo estranho, sendo observado uma redução muito expressiva do quantitativo de células gigantes no grupo tratado, bem como da alteração da sua morfologia. Fármacos e compostos que atenuem a reação do tipo corpo estranho são importantes para melhoria da adaptação do organismo ao implante e para estender a vida útil do dispositivo (KASTELLORIZIOS, PAPADIMITRAKOPOULOS, BURGESS, 2015; CHANDORKAR et al, 2015; BROLY et al, 2019).

Os mastócitos são outro tipo celular considerados uma das principais células na reação do tipo corpo estranho, por sua relevância na promoção da quimiotaxia de

células inflamatórias e no estímulo aos eventos fibrogênicos. (ZDOLSEK, EATON, TANG, 2007; TCACENCU e WENDEL, 2008; WEISKIRCHEN et al, 2019; OZPINAR et al, 2021). Estudos comprovam que a inibição da ação dos mastócitos e seus produtos têm efeito sobre a intensidade da resposta inflamatória e do remodelamento tecidual. Em um modelo murino deficiente em mastócitos, foi observado uma expressiva redução da presença de fagócitos e do tecido fibrótico no sítio de implantes subcutâneos após duas semanas da implantação do biomaterial, sugerindo que a deficiência de mastócitos interfere no recrutamento de macrófagos e neutrófilos e nos seus efeitos sobre a fibrogênese (THEVENOT et al, 2011). Zdolsek e seus colaboradores também observaram um resultado semelhante, em humanos e em camundongos, ao inibirem a ação da histamina com antagonistas dos receptores de histamina H1 e H2 (ZDOLSEK, EATON, TANG, 2007). Outros estudos apontam que a permanência de mastócitos no sítio do implante pode estar relacionada ao grau de encapsulação fibrótica, devido a secreção de TGF- $\beta$ 1 e de proteases que estimulam os fibroblastos e a formação de fibras de colágeno. (TCACENCU, WENDEL, 2008; LAROUCHE et al, 2018). Nesse contexto, uma resposta imunológica atenuada seria interessante, uma vez que resulta em uma resposta de remodelamento tecidual atenuada, e numa melhor interação hospedeiro/implante (CHUNG et al, 2017; LOVE e JONES, 2009). Esses dados da literatura corroboram com os resultados desse estudo, em que houve uma redução significativa do infiltrado inflamatório e mastocitário intra-implante pela ação do propionato de sódio, o que pode ter interferido na ação dos mastócitos e seus produtos sobre os eventos subsequentes, causando a redução da celularidade intra-implante, da angiogênese, da espessura capsular e da deposição de fibras colágenas na matriz.

Outro componente importante do processo de interação tecido/implante é a vascularização. Sabemos que a angiogênese estabelece uma relação de co-dependência com os eventos inflamatórios e fibrogênicos, promovendo suporte de oxigênio e metabólitos para as células e tecidos envolvidos em ambos os processos. Ao mesmo tempo, recebe estímulo dos produtos desses eventos, de modo que a inibição da inflamação e seus mediadores pode suprimir também a angiogênese (CARMELIET, 2003; CREWE, AN, SCHERER, 2017; KASTELLORIZIOS, PAPANIMITRAKOPOULOS, BURGESS, 2015). A angiogênese é estimulada por

diversas substâncias, sendo regulada principalmente pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (WU et al, 2018). Estudos publicados demonstraram que a ação dos AGCC sobre a produção de VEGF e sobre a angiogênese, varia de acordo com a dose administrada e o modelo experimental (SAWA, H. et al., 2002; BELAKAVADI et al, 2005; LUI et al, 2016). Em um modelo murino de displasia broncopulmonar, a administração intraperitoneal de 1,2 mg / g de propionato de sódio promoveu a angiogênese (CHEN et al, 2018). No entanto a descrição do efeito do propionato de sódio sobre a produção de VEGF e sobre a angiogênese na reação tipo corpo estranho não está documentada. A administração de 100mg/kg/dia de propionato de sódio durante 14 dias em nosso modelo de estudo, apresentou ação anti-angiogênica, com uma diminuição da concentração de VEGF intra-implante e do quantitativo de vasos neoformados, o que possivelmente influenciou na formação e remodelamento do tecido fibrovascular intra-implante e na formação da cápsula ao redor do implante.

Ao avaliarmos o remodelamento no tecido fibrovascular e a cápsula formada observamos que as médias das mensurações da espessura da cápsula fibrovascular e da produção de colágeno total, colágeno tipo I, colágeno tipo III, tiveram redução. Inferimos que tais achados podem ser associados também a modulação das populações de fagócitos exercida pelo propionato de sódio. Dados da literatura corroboram estes achados, demonstrando que na inflamação crônica, a proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno são fortemente influenciadas por produtos de fagócitos, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (THEVENOT et al, 2011; CHUNG et al, 2017). Tais estudos concordam com nossos resultados, uma vez que nos animais tratados com propionato de sódio houve diminuição da população de neutrófilos, monócitos inflamatórios, macrófagos e células gigantes.

Observamos ainda, uma imaturidade e fragilidade no remodelamento e na composição da cápsula formada no grupo tratado, uma vez que no grupo tratado as fibras tipo I tiveram maior redução que as fibras tipo III, e as fibras que compõem a cápsula fibrótica encontraram-se fragmentadas, com espaços vazios entre elas. Relatos da literatura afirmam que a diminuição da intensidade do remodelamento é

favorável para melhor adaptação do implante ao hospedeiro (CHANDORKAR et al, 2015; VEISEH e VEGAS, 2019).

## 7. CONCLUSÃO

A administração oral do propionato de sódio modulou negativamente a fase inflamatória, a angiogênese e a reação do tipo corpo estranho com consequente diminuição do remodelamento patológico em modelo murino de implante de esponja de poliéter-poliuretano.

O propionato de sódio é um composto com pouca toxicidade, que apresenta potencial para o uso como uma inovação terapêutica no tratamento das complicações inerentes ao implante de dispositivos médicos implantáveis. Porém mais estudos se fazem necessários para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nesses processos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, E.C. *et al.* Butyrate impairs atherogenesis by reducing plaque inflammation and vulnerability and decreasing NFκB activation. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.**, v.24, n.6, p.606-13, Jun 2014.

ANDERSON J. M. Biological Responses to Materials. **Annu. Rev. Mater. Res.**, v.31, p.81–110, 2001.

ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**, v.20, n.2, p.86–100, april 2008.

ANDRADE SP, FAN TP, LEWIS GP. Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. **Br J Exp Pathol.**, v.68, n.6, p.755-66, Dec 1987.

ANDRADE SP, FERREIRA MA. The Sponge Implant Model of Angiogenesis. **Methods Mol Biol.**, v.1430, p.333-43. May 2016.

ANG Z, DING JL. GPR41 and GPR43 in Obesity and Inflammation - Protective or Causative? **Front Immunol.**, v.1, n. 28, Feb 2016.

ANG, Z. *et al.* FFAR2-FFAR3 receptor heteromerization modulates short-chain fatty acid sensing. **FASEB J.**, v.32, n.1, p.289-303, jan 2018.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Relatório de Experiências Internacionais sobre Regulação de Dispositivos Médicos. Brasília, junho 2018.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 185, de 22 de outubro de 2001. Disponível em:< [www.anvisa.gov.br/legis](http://www.anvisa.gov.br/legis)> Acessado em: 10 setembro 2020.

AUFFRAY C, SIEWEKE MH, GEISSMANN F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annu Rev Immunol.**, v.27, p.669-92, Jan 2009.

BALBINO, CARLOS & PEREIRA, LEONARDO & CURI, RUI. (2005). Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira De Ciências Farmaceuticas**, vol. 41, n. 1, jan./mar., 2005.

BARKER TH, ENGLER AJ. The provisional matrix: setting the stage for tissue repair outcomes. **Matrix Biol.**, v. 60-61, p.1-4, jul. 2017.

BARTOLOMAEUS, H. *et al.* Short-Chain Fatty Acid Propionate Protects From Hypertensive Cardiovascular Damage. **Circulation.**, v.139, n.11, p.1407-1421, Mar 2019.

BATISTA, V. A. *et al.* Efeito do tratamento com nimesulida sobre a inflamação granulomatosa em camundongos. **Rev. Ciênc. Saúde**, v.14, n. 1, p. 21-29, jan-jun, 2012.

BELAKAVADI, M. *et al.* Butyrate-induced proapoptotic and antiangiogenic pathways in EAT cells require activation of CAD and downregulation of VEGF. **Biochemical and biophysical research Communications**, v.335, n.4, p.993–1001, oct. 2005.

BOETS, E. *et al.* Systemic availability and metabolism of colonic-derived short-chain fatty acids in healthy subjects: a stable isotope study. **J Physiol.**, v.15, n.2, p.541-555, jan 2017.

BRODBECK, W.G. *et al.* Lymphocytes and the foreign body response: lymphocyte enhancement of macrophage adhesion and fusion. **J Biomed Mater Res A.**, v.74, n.2, p.222-9, aug. 2005.

BROLY, M. *et al.* Management of granulomatous foreign body reaction to fillers with methotrexate. **J Eur Acad Dermatol Venereol.**, v.34, n.4, p.817-820, april 2020.

BROWN, A. J. *et al.* The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. **J Biol Chem.**, v.278, n.13, p.11312-9, mar 2003.

BULTMAN SJ. Interplay between diet, gut microbiota, epigenetic events, and colorectal cancer. **Mol Nutr Food Res.**, v.61, n.11, jan 2017.

CAMPOS, P.P. *et al.* Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. **Histol Histopathol.**, v.21, n.12, p.1263-70, Dec 2006.

CANANI, R.B. *et al.* Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. **World J Gastroenterol.**, v.28, n.12, p.1519-28, mar. 2011.

CARMELIET P. Manipulating angiogenesis in medicine. **J Intern Med.**, v.255, n.5, p. 538-61, may 2004.

CARNICER-LOMBARTE, A. *et al.* Foreign Body Reaction to Implanted Biomaterials and Its Impact in Nerve Neuroprosthetics. **Front Bioeng Biotechnol.**, v. 15, n.9, apr. 2021

CASSINI-VIEIRA, P. *et al.* Lack of interferon-gamma attenuates foreign body reaction to subcutaneous implants in mice. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 106, n. 8, p. 2243–2250, 2018

CASTRO, P. R. *et al.* Deletion of the chemokine receptor CCR2 attenuates foreign body reaction to implants in mice. **Microvascular Research**, v. 95, n. 1, p. 37–45, 2014.

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

CHANDORKAR, Y. *et al.* Long-term sustained release of salicylic acid from cross-linked biodegradable polyester induces a reduced foreign body response in mice. **Biomacromolecules.**, v.16, n.2, p. 636-49, feb. 2015.

CHANG DT, COLTON E, ANDERSON JM. Paracrine and juxtacrine lymphocyte enhancement of adherent macrophage and foreign body giant cell activation. **J Biomed Mater Res A**, v.89, n.2, p. 490-8, may 2009.

CHEN, D. *et al.* Sodium Propionate Enhances Nrf2-Mediated Protective Defense Against Oxidative Stress and Inflammation in Lipopolysaccharide-Induced Neonatal Mice. **J Inflamm Res.**, v.10, n.14, p.803-816, Mar 2021.

CHEN, G. *et al.* Sodium Butyrate Inhibits Inflammation and Maintains Epithelium Barrier Integrity in a TNBS-induced Inflammatory Bowel Disease Mice Model. **EBioMedicine.**, v.30, p.317-325, april 2018.

CHU C *et al.* Modulation of foreign body reaction and macrophage phenotypes concerning microenvironment. **J Biomed Mater Res.**, v.108<sup>a</sup>, p.127–135, sept 2019.

CHUNG, L. *et al.* Key players in the immune response to biomaterial scaffolds for regenerative medicine. **Adv Drug Deliv Rev.**, v.15, n.114, p.184-192, may 2017.

CORRÊA, R.O. *et al.* Bacterial short-chain fatty acid metabolites modulate the inflammatory response against infectious bacteria. **Cell Microbiol.**, v.19, n.7, jul 2017.

COSTA C, INACIO J, SOARES R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? **Angiogenesis.**, v.10, n.3, p.149-66, Apr 2007

COX, M.A. *et al.* Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E (2) and cytokines. **World J Gastroenterol.**, v.28, n.44, p.5549-57, nov 2009.

CREWE C, AN YA, SCHERER PE. A sinistra tríade de disfunção do tecido adiposo: inflamação, fibrose e angiogênese prejudicada. **J Clin Invest.**, v. 127, n.1, p. 74-82, jan. 2017.

DE LAZARI, M.G.T. *et al.* Sodium Butyrate Downregulates Implant-Induced Inflammation in Mice. **Inflammation.**, v.43, n.4, p.1259-1268, Aug 2020.

DE MOURA, S. A. L. *et al.* Aqueous extract of brazilian green propolis: primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges. Evidence-based complementary and alternative medicine: Ecam. **Hindawi**, v. 2011, jun 2011.

DE RUIJTER, A. J. *et al.* Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **Biochem J.**, v.15, n.370, p.737-49, mar 2003.

DOLOFF, JC *et al.* Colony stimulating factor-1 receptor is a central component of the foreign body response to biomaterial implants in rodents and non-human primates. **Nature Materials**, v.16, p.671–680, mar 2017.

ELCE, A. *et al.* Anti-inflammatory activity of butyrate: therapeutic effects, educative strategies and potential implications for an athlete's health. **Journal of Physical Education and Sport**, v.18, n.2, p. 654 - 662, jun. 2018.

EMING SA, MARTIN P, TOMIC-CANIC M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Sci Transl Med.**, v.3, n.6, dec. 2014.

FARIA, A.R. *et al.* Vias de sinalização da angiogênese e sua relação na progressão tumoral: Uma revisão sistemática. **Braz. J. Hea. Rev.**, Curitiba, v. 3, n. 6, p. 16579-16595 nov./dez. 2020.

FILIPPONE, A. *et al.* The Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Sodium Propionate. **Int J Mol Sci.**, v.24, n.8, apr. 2020.

FRANCO, RF. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina, Ribeirão Preto*, v.34, p.229-237, jul./dez. 2001.

GILL, P.A. *et al.* Review article: short chain fatty acids as potential therapeutic agents in human gastrointestinal and inflammatory disorders. ***Aliment Pharmacol Ther.***, v.48, n.1, p.15-34, jul 2018

GLEZER, I. *et al.* The role of the transcription factor NF-kB in the molecular mechanisms of action of psychoactive drugs. ***Rev. bras. Psiquiatr.***, v.22, n.1, p.26-30, mar. 2000.

HALNES, I. *et al.* Soluble Fibre Meal Challenge Reduces Airway Inflammation and Expression of GPR43 and GPR41 in Asthma. *Nutrients.*, v.10, n.1, jan 2017.

HANKS SK, HUNTER T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. ***FASEB J.***, v.9, n.8, p.576-96, may 1995.

IMOTO, Y. *et al.* Short-chain fatty acids induce tissue plasminogen activator in airway epithelial cells via GPR41&43. ***Clin Exp Allergy.***, v.48, n.5, p.544-554, May 2018.

INGERSOLL, M.A. *et al.* Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. ***Blood***, v.115, n.3, p.10-9. Jan 2010.

JACKSON, SM *et al.* dally, a Drosophila glypican, controls cellular responses to the TGF-beta-related morphogen, Dpp. ***Development.***, v.124, n.20, p.4113-20, Oct. 1997.

JHUNJHUNWALA, S. *et al.* Neutrophil Responses to Sterile Implant Materials. ***PLoS One.***, v.10, n.9, sep. 2015.

JULIER, Z. *et al.* Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. ***Acta Biomater.***, v.15, n.53, p.13-28 april 2017.

KASTELLORIZIOS M, PAPADIMITRAKOPOULOS F, BURGESS DJ. Prevention of foreign body reaction in a pre-clinical large animal model. ***J Control Release.***, v.28, p. 101-7, mar.2015.

KIMURA S, TSUJI T. Mechanical and Immunological Regulation in Wound Healing and Skin Reconstruction. ***Int J Mol Sci.***, v.22, n.11, may 2018.

KOH, A. *et al.* From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. ***Cell.*** v.165, n.6, p.1332-1345, jun 2016.

LABOW RS, MEEK E, SANTERRE JP. Neutrophil-mediated biodegradation of medical implant materials. ***J Cell Physiol.***, v.186, n.1, p.95-103, jan. 2001.

LAROUCHE, J. *et al.* Regulação imunológica da cicatrização de feridas cutâneas: mecanismos e novos alvos terapêuticos. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v.7, n.7, p.209-231, jul. 2018.

LE POUL, E. *et al.* Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. **J Biol Chem.**, v.11; n.28, p.25481-9, Jul 2003.

LI, M. *et al.* Time and Concentration Dependent Effects of Short Chain Fatty Acids on Lipopolysaccharide- or Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -Induced Endothelial Activation. **Front Pharmacol.**, v.19, n.9, Mar 2018.

LIU, D. *et al.* Low Concentration of Sodium Butyrate from Ultrabraid+NaBu suture, Promotes Angiogenesis and Tissue Remodelling in Tendon-bones Injury. **Sci Rep.**, v.3, n.6, Oct 2016.

MARIANI, E. *et al.* Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response? **Int J Mol Sci.**, v.20, n.3, feb 2019.

MASLOWSKI, K.M. *et al.* Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Nature.**, v.29, n.461, p.1282-6, oct 2009.

MUKAI, K. *et al.* Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. **Immunol Rev.**, v.282, n.1, p. 121-150, mar. 2018.

NEVE, A. *et al.* A matriz extracelular modula a angiogênese em condições fisiológicas e patológicas. **Biomed Res Int.**, may 2014.

NORRBY K. Mast cells and angiogenesis. **APMIS.**, v.110, n.5, p.355-71, may 2002.

ODE BONI, B. O. *et al.* Immunomodulation and Cellular Response to Biomaterials: The Overriding Role of Neutrophils in Healing. **Materials Horizons.**, p. 1-23, jan.2019.

OISHI Y, MANABE I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. **Int Immunol.**, v. 29;30, n.11, p.511-528, oct. 2018.

ORELLANO, L.A. *et al.* Angiopreventive versus angiopromoting effects of allopurinol in the murine sponge model. **Microvasc Res.**, v.101, p.118-26, Sep 2015.

OZPINAR, EW *et al.* Mast Cell-Biomaterial Interactions and Tissue Repair. **Tissue Eng Part B Rev.**, jan 2021.

PARK, J. *et al.* Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR-S6K pathway. **Mucosal Immunol.**, v.8, n.1, p.80-93, jan 2015.

PARK, J. *et al.* Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR-S6K pathway. **Mucosal Immunol.**, v.8, n.1, p.80-93, Jan 2015.

PATIL SD, PAPADMITRAKOPOULOS F, BURGESS DJ. Concurrent delivery of dexamethasone and VEGF for localized inflammation control and angiogenesis. **J Control Release.**, v. 22, n.117, p.68-79, jan 2007.

PEREIRA, B. G. *et al.* Development of thalidomide-loaded biodegradable devices and evaluation of the effect on inhibition of inflammation and angiogenesis after subcutaneous application. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 71, p. 21–28, 2015.

PEREIRA, L. X. *et al.* Kinetics of pancreatic tissue proliferation in a polymeric platform in mice. **Pancreatology**, v. 18, n. 2, p. 221–229, 2018.

PIRES ALR, BIERHALZ ACK, MORAES AM. Biomaterials: types, applications, and market. **Quim. Nova.**, v.38, n.7, p.957-971, 2015.

RAMIREZ-GARCIALUNA, JL *et al.* Defective bone repair in mast cell-deficient Cpa3Cre/+ mice. **PLoS One.**, v.12, n.3, mar. 2017.

RATAJCZAK, E. *et al.* Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived short-chain fatty acid (SCFAs). **Biochimica**, v.66, n.1, 2019.

RATNER BD. A pore way to heal and regenerate: 21st century thinking on biocompatibility. **Regen Biomater.**, v.3, n.2, p.107-10, jun 2016.

REZENDE, M. C. R. R. A. *et al.* O papel da adsorção de proteínas na osseointegração. **Archives Of Health Investigation**, v. 4, n. 3, 19 out. 2015.

SASAMOTO K., YOSHIFUMI W., OHKURA Y. Colorimetric assay of N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase in urine and sérum using phenolindophenyl-N- Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase. **Analytical Sciences**, v.7, p. 333-335, april 1991.

SAWA, H. *et al.* Histone deacetylase inhibitors such as sodium butyrate and trichostatin A inhibit vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human glioblastoma cells. **Brain tumor pathology**, v. 19, n.2, p.77-81, 2002.

SEGAIN, J.P. *et al.* Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. **Gut.**, v.47, n.3, p. 397-403, Sept 2000.

SELDERS, G.S. *et al.* An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. **Regen Biomater**, v.4, n.1, p. 55-68, feb. 2017.

SERBINA, N.V. *et al.* Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annu Rev Immunol.**, v.26, p.421–452, aug. 2008.

SILVA G. Sodium propionate and sodium butyrate effects on histone deacetylase (HDAC) activity, histone acetylation, and inflammatory gene expression in bovine mammary epithelial cells. **J. Anim. Sci.**, v.96, p.5244–5252, sept 2018

SINGH, N. *et al.* Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. **Immunity.**, v.40, n. 1, p.128-39, jan. 2014.

SOEHNLEIN, O. *et al.* Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v.17, n. 4, p.248-261, april 2017.

SWARTZLANDER, MD *et al.* Linking the foreign body response and protein adsorption to PEG-based hydrogels using proteomics. **Biomaterials**, v.41, p. 26-36, feb. 2015.

TCACENCU I, WENDEL M. Collagen-hydroxyapatite composite enhances regeneration of calvaria bone defects in young rats but postpones the regeneration of calvaria bone in aged rats. **J Mater Sci: Mater Med.**, v.19, p.2015–2021, sep 2008.

THANGARAJU, M. *et al.* GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. **Cancer Res.**, v. 1, n.7, p.2826-32. Apr 2009.

THEVENOT, PT *et al.* The pivotal role of fibrocytes and mast cells in mediating fibrotic reactions to biomaterials. **Biomaterials**, v.32, n.33, p. 8394–8403, nov 2011.

TONG, L.C.*et al.* Propionate Ameliorates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis by Improving Intestinal Barrier Function and Reducing Inflammation and Oxidative Stress. **Front Pharmacol.**, v.15, n.7, aug 2016.

VEISEH O, VEGAS AJ. Domesticating the foreign body response: Recent advances and applications. **Adv Drug Deliv Rev.**, v.144, p.148-161, Apr. 2019.

VENEGAS, D. P., *et al.* Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. **Front Immunol.**, v.11, n.277, Mar 2019.

VESTWEBER D. How leukocytes cross the vascular endothelium. **Nat Rev Immunol.**, v.15, n.11, p.692-704. Nov 2015.

VIANA, V.C.T. *et al.* Differential Contribution of Acute and Chronic Inflammation to the Development of Murine Mammary 4T1 Tumors. **PLoS ONE**, v.10, n.7, july 2015.

VINOLO, M.A. *et al.* Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites. **Clin Sci (Lond).**, v.1, n.9, p.331-8, set 2009.

VINOLO, M.A. *et al.* SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor. **PLoS One**, v.6, n.6, jun 2011.

VINOLO, M.A. *et al.* Regulation of inflammation by short chain fatty acids. **Nutrients**, v.3, n.10, p.858-76, oct. 2011.

VINOLO, M.A. *et al.* Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites. **Clin Sci (Lond)**., v.117, n.9, p. 331-8, sep. 2009.

VOLLKEMER, T *et al.* Extent of Inflammation and Foreign Body Reaction to Porous Polyethylene. **In Vitro and In Vivo in vivo**, v. 33, p. 337-347, 2019.

WAJNER, M.*et al.* Inhibition of mitogen-activated proliferation of human peripheral lymphocytes in vitro by propionic acid. **Clin Sci (Lond)**, v.96, n.1, p.99-103, jan 1999.

WANG H, PAN L, LIU Z. Neutrophils as a Protagonist and Target in Chronic Rhinosinusitis. **Clin Exp Otorhinolaryngol.**, v.12, n.4, p.337-347, nov. 2019.

WANG, J. *et al.* Propionate Protects against Lipopolysaccharide-Induced Mastitis in Mice by Restoring Blood-Milk Barrier Disruption and Suppressing Inflammatory Response. **Front Immunol.**, v.15, n.8, Sept 2017.

WEISKIRCHEN, R. *et al.* Mast Cells in Liver Fibrogenesis. **Cells.**, v.13, n.11, nov 2019.

YOSHIMOTO, H. *et al.* Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem.**, v.23, n.34, p.31079-88, aug 2002.

ZDOLSEK J, EATON JW, TANG L. Histamine release and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans. **Journal of Translational Medicine**, v.5, n.31, jul. 2007.

ZHANG, L.T. *et al.* Sodium butyrate prevents lethality of severe sepsis in rats. **Shock.**, v.27, n.6,p.672-7, Jun 2007.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v.116, n.16, p.74-80, Oct 2010.