



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ANA LUÍZA DE CASTRO SANTOS

**AVALIAÇÃO DE PROCESSO INFLAMATÓRIO, FIBRÓTICO E ANGIOGÊNICO EM  
IMPLANTES INTRAPERITONEAIS DE ANIMAIS TRATADOS COM COMPLEXO  
INIBIDOR DA VIA WNT**

BELO HORIZONTE

2022

ANA LUÍZA DE CASTRO SANTOS

**AVALIAÇÃO DE PROCESSO INFLAMATÓRIO, FIBRÓTICO E ANGIOGÊNICO EM  
IMPLANTES INTRAPERITONEAIS DE ANIMAIS TRATADOS COM COMPLEXO  
INIBIDOR DA VIA WNT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Fisiologia.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Pedro Pires Goulart Guimarães

BELO HORIZONTE

2022

043

Santos, Ana Luíza de Castro.

Avaliação de processo inflamatório, fibrótico e angiogênico em implantes intraperitoneais de animais tratados com complexo inibidor da via Wnt [manuscrito] / Ana Luíza de Castro Santos. – 2022.

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

Orientador: Prof. Pedro Pires Goulart Guimarães.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Materiais Biocompatíveis. 3. Poliuretanos. 4. Reação a Corpo Estranho. 5. Fibrose. 6. Via de Sinalização Wnt. I. Guimarães, Pedro Pires Goulart. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO N° 559 DE ANA LUIZA DE CASTRO SANTOS**

**"Avaliação de Processo Inflamatório, Fibrótico e Angiogênico Em Implantes  
Intraperitoneais de Animais Tratados Com Complexo Inibidor da Via Wnt"**

**ANA LUIZA DE CASTRO SANTOS**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **01 de julho de 2022**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

**Profa. Dra. Lucíola da Silva Barcelos**, ICB/UFMG

**Profa. Dra. Vivian Vasconcelos Costa**, ICB/ UFMG

**Prof. Dr. Pedro Pires Goulart Guimarães**, ICB/ UFMG - Orientador

**Belo Horizonte, 01 de julho de 2022.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Pires Goulart Guimaraes**, **Professor do Magistério Superior**, em 04/07/2022, às 08:42, 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 **Vivian Vasconcelos Costa Litwinski**, **Professora do Magistério Superior**, em 20/12/2022, às 11:15, 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 **Luciola da Silva Barcelos**, **Professora do Magistério Superior**, em 10/01/2023, às 12:22, 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?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](#), informando o código verificador **1560205** e o código CRC **5C4D1427**.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biofísica e Sistemas Nanoestruturados (LABNANO) do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG), com a colaboração do Laboratório de Apoptose do Departamento de Patologia, também pertencente ao ICB/UFMG. Recebeu colaboração financeira da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 401390/2020-9 e 442731/2020-5) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG-APQ-00826-21).

*“O Senhor é a minha força e o meu escudo;  
nele o meu coração confia, e dele recebo ajuda.*

*Meu coração exulta de alegria,  
e com o meu cântico lhe darei graças.”*

**Salmos 28:7**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, que me sustentou, nunca me deixou, e me trouxe até este momento de realização do meu sonho.

Aos meus pais, Leila e Jorge, por serem a minha maior inspiração de todos os dias. Por me darem tudo de vocês. Por acreditarem em mim quando eu mesma não consegui. Pelo incentivo, apoio, colo, cuidado e por segurarem a minha mão sempre. Por me mostrarem como é ser forte em um mundo difícil, mas ainda sim ser amor. Eu os amo com todo meu coração.

À minha irmã, Maria Eliza, por ser minha melhor amiga, meu ombro amigo, maior incentivadora, porto seguro e melhor companhia dos meus dias. Você é meu presente, te amo para sempre.

À minha avó, Edite, que me ensina como levar a vida com leveza apesar de toda a dureza do mundo. E ao meu avô, Renato, que me ensinou que as oportunidades da vida passam, e que temos que agarrá-las!

Às minhas almas irmãs neste mundo, aqueles a quem me foi permitido com grande honra compartilhar a jornada nessa vida, meus amigos. Carolina, Yara, Vick, Bolhas, Marcus, Gabriel, Léo, Maurício, Christophe, Camila e Ana. Vocês são os irmãos que a vida me permitiu escolher, são peças-chaves no quebra-cabeça da minha vida, completam e dão cor a minha existência. Muito obrigado por serem e estarem sempre aqui, eu os amo.

Ao meu orientador, Prof. Pedro, que me deu a grande oportunidade de trabalhar com o que eu amo. Por todos os ensinamentos, confiança, paciência, cuidado e orientação. Muito obrigada por tudo!

Ao Prof. Frézárd e toda a equipe do LABNANO, que me fizeram uma cientista melhor, uma pessoa melhor e me ensinaram tanta coisa.

Aos nossos colaboradores do Departamento de Patologia Geral, Prof. Paula Peixoto, Celso Tarso, Letícia, e Cecília, pelos ensinamentos, paciência, conversas, carinho e cuidado com esse projeto.



Ao melhor grupo de pessoas que eu poderia conhecer nesta jornada científica, pessoas tão loucas por ciência como eu. Natália (Márcia), Walison (Walis), Pedro Dias (Rogerinho), Pedro Augusto (Cabrito), Lays (Lêis), Heloísa (Helô), Virgínia, Gabriel (Gabs) e Kevin (Kelvin), vocês são grandes presentes na minha trajetória, tornam a minha vida mais leve e suportável, mais solar e cheia de alegria e café, carinho e cuidado, e me fazem ser uma pessoa melhor todos os dias. Obrigado por todo o aprendizado, amizade e todo o resto, vocês são verdadeiramente as pessoas mais incríveis com quem eu poderia conviver!

À Profa. Paula Bargi e ao Rodrigo, por todo carinho, conversas, conselhos e aprendizados. Vocês são foda!

Aos professores e servidores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pelas aulas, ensinamentos, e toda ajuda nesses dois anos.

À toda equipe de manutenção do ICB, por manterem a ordem e a limpeza do nosso ambiente de trabalho e serem uma fonte de inspiração com sua luta diária.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

À toda a comunidade científica brasileira, por ser fonte de inspiração, força, luta e resistência em meio a tempos tão difíceis, e que ainda sim segue buscando respostas e soluções para problemas que afetam a humanidade. Juntos somos fortes, pois afinal não se faz ciência sozinho!

**A todos, o meu muito obrigado!**

**Gratidão eterna a todos!**

**Go Science!!**

*“Se pude enxergar mais longe, foi porque me apoiei em ombro de gigantes.”*

**Isaac Newton**

## **RESUMO**

A utilização de biomateriais implantáveis para substituir funções fisiológicas e anatômicas têm sido amplamente investigada na clínica. A seleção de biomateriais capazes de interagir com os sistemas biológicos é crucial para a função a longo prazo do implante. A implantação do biomaterial no corpo pode levar ao desenvolvimento de um processo inflamatório e fibrótico que desencadeia uma reação de corpo estranho, levando à perda da função e à sua consequente necessidade de remoção. A sinalização de Wnt é uma das vias envolvidas no processo de reparo do corpo humano, e quando é desregulada, pode contribuir para os processos inflamatórios e fibróticos, tais como na fibrose peritoneal. Aqui, relatamos a utilização de um complexo inibidor da via Wnt (CD:LGK974) para reduzir processos inflamatórios, fibróticos e angiogênicos em implantes intraperitoneais in vivo. Avaliamos os efeitos da administração oral de CD:LGK974 para inibir os processos inflamatórios, fibróticos e angiogênicos em implantes intraperitoneais. CD:LGK974 reduziu significativamente as células imunes e as citocinas inflamatórias na região dos implantes em comparação com os grupos controles. Além disso, o CD:LGK974 inibiu a deposição de colágeno e reduziu a expressão de  $\alpha$ -SMA, e TGF- $\beta$ 1, indicando a redução da fibrose. Finalmente, o CD:LGK974 também diminuiu o número de vasos sanguíneos formados e VEGF, sugerindo uma diminuição da angiogênese. Assim, o nosso trabalho introduz uma aplicação potencialmente nova do complexo inibidor de Wnt para reduzir a fibrose peritoneal e a rejeição de implantes no sítio intraperitoneal.

## **Palavras-chave**

Biomateriais, Poliéter-poliuretano, Reação de corpo estranho, Fibrose, Via Wnt, LGK974

## **ABSTRACT**

The use of implantable biomaterials to replace physiological and anatomical functions has been widely investigated in the clinic. The selection of biomaterials capable of interacting with biological systems is crucial for long term function of the implant. The implantation of the biomaterial in the body can lead to the development of an inflammatory and fibrotic process that triggers a foreign body reaction, leading to loss of function and its consequent need for removal. Wnt signaling is one of the routes involved in the human body's healing process, and when it is dysregulated, it can contribute to the inflammatory and fibrotic processes, such as in the peritoneal fibrosis. Here, we report the use of a Wnt pathway inhibitor complex (CD:LGK974) to reduce inflammatory, fibrotic and angiogenic processes in intraperitoneal implants in vivo. We assessed the effects of oral administration of CD:LGK974 to inhibit the inflammatory, fibrotic and angiogenic processes in intraperitoneal implants. CD:LGK974 significantly reduced immune cells and inflammatory cytokines in the implant region compared to the control groups. Furthermore, CD:LGK974 inhibited the collagen deposition and reduced the expression of  $\alpha$ -SMA, and TGF- $\beta$ 1, indicating the reduction of fibrosis. Finally, CD:LGK974 also decreased the number of blood vessels formed and VEGF, suggesting decreased angiogenesis. Thus, our work introduces a potentially new application of the Wnt inhibitor complex to reduce peritoneal fibrosis and rejection of implants in the intraperitoneal site.

## **Key words**

Biomaterials, Polyether-polyurethane, Foreign body reaction , Fibrosis, Wnt pathway, LGK974

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Biomateriais implantáveis. ....	16
FIGURA 2. Reparo tecidual normal e reparo tecidual na reação de corpo estranho. ....	19
FIGURA 3. Via Wnt. ....	23
FIGURA 4. Ciclodextrina e esquema de complexo de inclusão. ....	25
FIGURA 5. Implantação da matriz sintética e tratamento ....	29
FIGURA 6. Caracterização do complexo CD:LGK974. ....	35
FIGURA 7. Fotografias de implantes intraperitoneal após 14 dias. ....	36
FIGURA 8. Score de inflamação e dosagem de citocina pró-inflamatória (TNF- $\alpha$ ) nos implantes. ....	38
FIGURA 9. Citometria de fluxo de células mielóides. ....	40
FIGURA 10. Contagem de células gigantes -. ....	41
FIGURA 11. Score de fibrose e citocina pró-fibrótica (TGF- $\beta$ 1) no implante ...	43
FIGURA 12. Dosagem de proteínas relacionadas à fibrose por Western Blotting. ....	44
FIGURA 13. Quantificação da deposição de colágeno no implante. ....	45
FIGURA 14. Avaliação de fatores pró-angiogênicos e contagem de vasos .....	47
FIGURA 15. Dosagem de transaminases hepáticas. ....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Anticorpos utilizados na citometria de fluxo.....	65
--	----

## LISTA DE ABREVIATÓES

$\alpha$ -SMA - Alfa actina de músculo liso, *do inglês Alpha Smooth Muscle Actin*

ALT - Alanina Aminotransferase sérica

AST - Aspartato Aminotransferase sérica

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CD - Ciclodextrina

CD:LGK974 - Complexo de inclusão de ciclodextrina e LGK974

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DMSO - Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético, *do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid*

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática, *do inglês Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EROS - Espécies reativas de oxigênio

FC BLOCK - Controle bloqueador de citometria de fluxo, *do inglês Flow Cytometry Blocking*

HCL - Ácido clorídrico

H&E - Hematoxilina-eosina

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

IL-1 - Interleucina 1

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IFN- $\gamma$  - Interferon gama

MEP - Matriz extracelular provisória

NaCl - Cloreto de sódio

NaF - Fluoreto de sódio

PBS - Tampão fosfato salina, *do inglês Phosphate buffered saline*

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas, *do inglês Platelet-derived growth factor*

PE - Polietileno

PGA - Ácido poliglicol

PLGA - Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)

PLA - Poliacido lático

PMMA - Polimetilmetacrilato

RMN-2D - Ressonância magnética nuclear 2D

SEM - Erro padrão da média, *do inglês Standard Error of the Mean*

SBE- $\beta$ CD - Sulfobutil-éter beta ciclodextrina

TBS-T - Tampão salino Tris com Tween 20, *do inglês Tris-buffered saline and Tween 20*

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral - alfa, *do inglês Tumor Necrosis Factor - Alpha*

TGF- $\beta$ 1 - Fator de Crescimento Transformante beta 1, *do inglês Transforming Growth Factor beta 1*

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular, *do inglês vascular endothelial growth factor*

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UI - Unidades Internacionais



UK - Reino Unido, *do inglês United Kingdom*

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Implantes e biomateriais.....	15
1.1.2 Modelo de implante intraperitoneal de poliéter-poliuretano.....	17
1.2 Reação de corpo estranho .....	17
1.2.1 Fase aguda .....	19
1.2.2 Fase Crônica .....	20
1.3 Via Wnt.....	21
1.4 Inibidor da via Wnt.....	23
2 JUSTIFICATIVA .....	25
3 OBJETIVOS .....	26
3.1 OBJETIVO GERAL .....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	27
4.1 Preparação do complexo de inclusão CD:LGK974 .....	27
4.2 RMN-2D .....	27
4.3 Animais e grupos experimentais .....	27
4.4 Preparação dos discos de poliéter-poliuretano, cirurgia, tratamento, e grupo amostral.....	28
4.5 Eutanásia e coleta das amostras .....	29
4.6 Análises histopatológicas .....	30
4.7 Dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$ , VEGF, TGF- $\beta$ 1) nos implantes .....	31
4.8 Citometria de Fluxo .....	32
4.9 Western Blotting .....	33
4.9.1 Dosagem de transaminases hepáticas (AST/ALT).....	34
4.9.2 Análises estatísticas .....	34
5 RESULTADOS .....	35
5.1 Caracterização do complexo de inclusão CD:LGK974.....	35
5.2 Análise macroscópica dos implantes .....	35
5.3 Avaliação do perfil inflamatório nos implantes.....	37
5.4 Avaliação de células gigantes .....	41
5.5 Avaliação do perfil fibrótico nos implantes.....	42
5.6 Avaliação do perfil angiogênico nos implantes.....	46
5.7 Avaliação de função hepática.....	47
6 DISCUSSÃO .....	49

7 CONCLUSÃO.....	56
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57
9 ANEXOS .....	63
ANEXO 1 – Figura Suplementar 1 .....	65
ANEXO 2 – Figura Suplementar 2 .....	66
ANEXO 3 – Artigo Submetido .....	67

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Implantes e biomateriais

O uso de materiais implantáveis para a substituição de funções fisiológicas e anatômicas é conhecido e amplamente utilizado pela humanidade desde a antiguidade. Há relatos de diversas civilizações que utilizavam esses mecanismos para problemas de saúde humana, como é o caso do uso de suturas de linho e ouro no Egito Antigo (cerca de 2000 AC); o uso de dentes artificiais feitos de diversos materiais como conchas, pelos povos maias (600 AC), ferro, ouro e até madeira, pelos povos europeus, chineses e astecas em cerca de 200 AC; e também a substituição de estruturas anatômicas, como ossos utilizando-se próteses de madeira, olhos de vidro, dentre outros, observada na Europa durante o período da Idade Média (RATNER, et al., 1996; PIRES, et al., 2015).

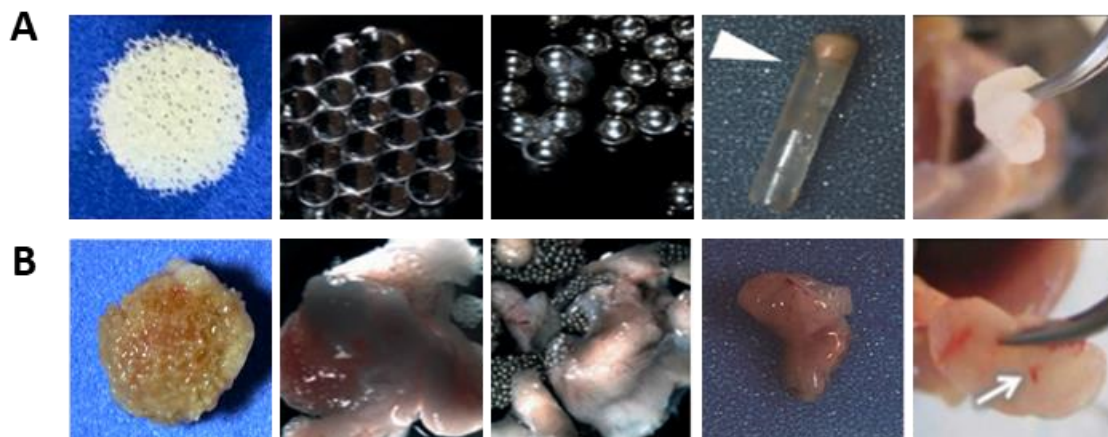
No início do século XX, outros materiais também começaram a ser utilizados, o que levou a elucidar importantes sobre a toxicidade dos materiais e suas possíveis falhas. Com o avanço e a sistematização do uso de implantes, a procura por materiais que fossem biocompatíveis, ou seja, que não desencadeassem reações de rejeição se tornou mais comum. Na década de 60, esses materiais biocompatíveis foram oficialmente denominados biomateriais (RATNER, et al., 1996; PIRES, et al., 2015;).

Os biomateriais são substâncias e/ou materiais que são capazes de interagir com os sistemas biológicos, que podem ser utilizados em procedimentos terapêuticos e diagnósticos, desempenhando um papel importante no tratamento de doenças e melhora na qualidade de vida dos pacientes (LANGER, et al., 2004). Com a expansão da utilização dos biomateriais para tratamentos na área da saúde, a busca por novos materiais que sejam biomiméticos, bioativos e também biodegradáveis têm se intensificado, assim como a diversificação do seu uso na área da saúde. Dentre as diversas utilizações podemos citar a criação de dispositivos biomédicos para detecção e monitoramento de condições fisiológicas (biossensores, sistemas de hemodiálise, cateteres), materiais implantáveis (suturas, placas, substitutos ósseos, tendões, telas

ou malhas, válvulas cardíacas, lentes, dentes), dispositivos para a liberação controlada de medicamentos (adesivos, filmes, implantes intraperitoneais e subdérmicos), engenharia de tecidos (desenvolvimento de órgãos artificiais como coração, rim, fígado, pâncreas, pulmões, pele), estética e curativos, dentre muitos outros (LANGER, et al., 2004; PIRES, et al., 2015).

Os biomateriais utilizados para desenvolver implantes variam de acordo com a função que buscam desempenhar e podem ser desenvolvidos a partir de polímeros sintéticos biocompatíveis, como polietileno (PE), ácido poliglicol (PGA), poliácido láctico (PLA), Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poliéter-poliuretano; polímeros naturais como ácido hialurônico, quitosana; ou ainda silicone, hidrogéis, cerâmica, nanofibras, alginato, e diferentes tipos de metal como prata, platina, dentre outros (PIRES, et al., 2015; YU, X, et al., 2015; KOHANE, et al., 2008;). (Figura 1:A)

Todavia, um dos maiores problemas que afetam os pacientes de implantes, é a rejeição por reação de corpo estranho, levando na maioria das vezes à remoção do implante (VEISEH, et al., 2015; BOSE, et al., 2020; HE, et al., 2022). A implantação de biomateriais, por ser realizada através de procedimentos que provocam injúria ao tecido, levam a uma resposta inflamatória que desencadeia uma reação conhecida como reação de corpo estranho (FRANZ, et al., 2011). (Figura 1:B)



**FIGURA 1. Biomateriais implantáveis.** (A) Imagens representativas de biomateriais implantáveis: matriz de poliéter-poliuretano, esferas de vidro, esferas de aço, cateter de silicone, bead de PMMA, respectivamente. (B) Cápsula fibrótica resultante da reação de corpo estranho ao redor dos implantes. (Adaptado de VEISEH, et al., 2015; HE, et al., 2022; CARNICER-LOMBARTE, et al., 2021)

### **1.1.2 Modelo de implante intraperitoneal de poliéter-poliuretano**

O modelo de matriz sintética de poliéter-poliuretano apresenta a capacidade de mimetizar respostas inflamatórias, fibrogênicas e angiogênicas presentes durante o processo de reparo e na reação de corpo estranho, desencadeado após o implante de um biomaterial (CAMPOS, et al., 2006; CASTRO et al., 2012; PEREIRA, et al., 2017). Estas matrizes esponjosas consistem em uma estrutura polimérica acelular e avascularizada, permitindo a infiltração de células inflamatórias, a formação de tecido fibrótico e a neovascularização no implante (ANDRADE, et al, 1997; CAMPOS, et al, 2006). Nesse sentido, esse modelo de implante pode ser utilizado em diversos sítios, como o intraperitoneal, para a avaliação destes e outros processos que são desencadeados após o implante de um biomaterial no organismo. (ANDRADE, et al., 1997; CAMPOS et al., 2006; MENDES, et al., 2007). Além disso, o poliuretano é um biomaterial de utilização bastante vasta na clínica, estando presente em cateteres, próteses de silicone, sistemas de liberação controlada de drogas, dentre outros (DUXBURY, et al., 2016; ALZHRANI, et al., 2018; LAURANO, et al., 2021; PONTES, et al., 2021). No entanto, a utilização de implantes intraperitoneais apresenta como questão principal o desenvolvimento da fibrose peritoneal tal como observada nas membranas de diálise peritoneal, amplamente utilizadas no tratamento de doenças renais em fase terminal (TERRI, et al., 2021).

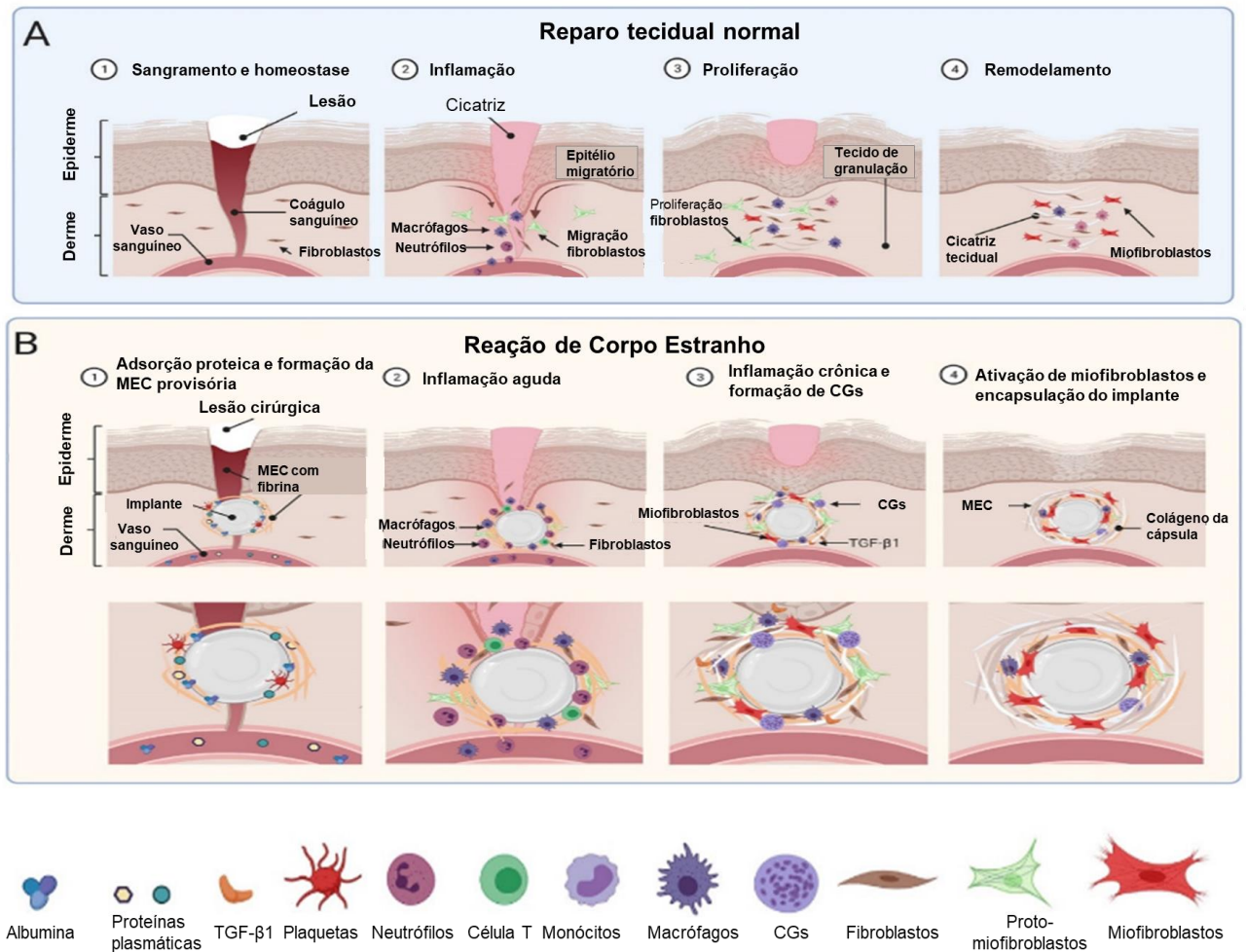
### **1.2 Reação de corpo estranho**

Em situações de dano tecidual o sistema imune age para promover o reparo do local que foi danificado por algum agente (KUMAR, et al., 2016). Quando a lesão é limitada e há pouco ou nenhum dano, é iniciado um processo de inflamação aguda, que é neutralizado rapidamente através da migração de células imunes para o local, para resolução da inflamação (KUMAR, et al., 2016). O processo de regeneração é iniciado através do estímulo de fatores de crescimento e proliferação de fibroblastos que irão secretar colágeno, levando a regeneração da estrutura e função do tecido. No entanto, quando há a persistência da inflamação, a restauração da estrutura e função pode ocorrer normalmente de forma tardia, ou resultar em cicatrização (KUMAR, et al., 2016). A cicatrização é o tipo de reparo que irá ocorrer após um dano substancial ao tecido ou quando a inflamação atinge tecidos que não se regeneram e

são substituídos por tecido conjuntivo, levando a um comprometimento significativo da função pela deposição exacerbada de matriz extracelular, processo denominado fibrose (KUMAR, et al., 2016).

A implantação de biomateriais, biodispositivos ou próteses, podem levar ao desenvolvimento de um processo inflamatório e fibrótico, através do desenvolvimento de uma reação de corpo estranho. A reação de corpo estranho é uma resposta imune relacionada ao implante de materiais estranhos no corpo (CARNICER-LOMBARTE, et al., 2021). Esse processo tem início quando o tecido é lesionado para receber o implante, desencadeando um processo inflamatório contínuo (fase aguda), seguido por um processo de fibrose (fase crônica), que tem como objetivo a encapsulação e isolamento do implante do restante do organismo, na tentativa de promover um reparo do tecido lesionado, o que pode levar à danos na integridade do implante e a necessidade de explante (Figura 2). (CARNICER-LOMBARTE et al., 2021; NOSKOVICOVA et al., 2021).

Além disso, outros fatores relacionados ao implante, como o biomaterial utilizado, formato e tamanho podem contribuir para o desenvolvimento da reação de corpo estranho (VEISEH, et al., 2015). Todos esses fatores influenciam em um processo muito importante, chamado efeito de Vroman. O efeito de Vroman está relacionado a adsorção de proteínas plasmáticas, como albumina, que progressivamente são substituídas por outras proteínas maiores, à superfície do implante. A adsorção dessas proteínas à superfície do implante é importante para a formação da matriz extracelular provisional, que irá promover estrutura para células imunes, fatores de crescimento, diferentes citocinas, influenciando diretamente no desenvolvimento da reação de corpo estranho. Além disso, diferentes biomateriais podem levar a uma diferença na composição de proteínas depositadas na matriz extracelular provisional, levando a diferenças entre as reações de corpo estranho desencadeadas por eles (NOSKOVICOVA et al., 2021; CARNICER-LOMBARTE et al., 2021).



**FIGURA 2. Reparo tecidual normal e reparo tecidual na reação de corpo estranho.** (A) Reparo tecidual em situação de normalidade (B) Reparo tecidual em uma reação de corpo estranho, onde ocorre a formação de fibrose. (Adaptado de NOSKOVICOVA et al., 2021)

### 1.2.1 Fase aguda

A fase aguda da reação de corpo estranho tem início imediatamente após o implante. Devido ao dano tecidual e o extravasamento de sangue, algumas proteínas plasmáticas, como albumina e fibrinogênio, dão início ao processo inflamatório através da sua adsorção na superfície do implante (CARNICER-LOMBARTE et al., 2021). A ligação dessas proteínas ao implante leva à formação de uma matriz extracelular provisória (MEP) que fornece estrutura para as células imunes que irão migrar para o local (NOSKOVICOVA et al., 2021). Após esse processo, em questão de poucos minutos, acontece a migração de células da imunidade inata, sendo os neutrófilos, as primeiras células a chegar ao local (CARNICER-LOMBARTE et al., 2021). Os



neutrófilos se aderem à matriz extracelular provisória ao redor do implante, e promovem a liberação de fatores que irão promover a progressão da inflamação, como espécies reativas de oxigênio (EROS), e algumas enzimas proteolíticas. A liberação desses fatores irá promover a quimiotaxia, o aumento da permeabilidade vascular e o recrutamento de células como mastócitos e monócitos, que ao chegar ao sítio de inflamação, passarão pelo processo de diferenciação para as células efetoras, que são os macrófagos (CARNICER-LOMBARTE et al., 2021; NOSKOVICOVA et al., 2021).

Aproximadamente dois dias depois, a população predominante de células no sítio de inflamação passa a ser de macrófagos, que ao chegar ao local liberam fatores pró-inflamatórios, como TNF-  $\alpha$ , algumas interleucinas como IL-1, IL-6 e IL-8, que irão promover o recrutamento de mais macrófagos para o local. Esses macrófagos começam o processo de adesão na superfície do implante, sendo esse um componente crítico para o desenvolvimento da reação de corpo estranho. Os macrófagos aderidos ao implante começam o processo de fagocitose e também a secreção de quimiocinas para o recrutamento de novos macrófagos para o sítio de inflamação, entretanto, como o processo de fagocitose não ocorre adequadamente, os macrófagos começam a recrutar cada vez mais macrófagos na tentativa de conseguir destruir o corpo estranho (CARNICER-LOMBARTE et al., 2021; NOSKOVICOVA et al., 2021). Além disso, há também o recrutamento de células dendríticas que possuem grande capacidade de endocitar partículas quando imaturas. Essas células quando ativadas tornam-se um importante elo entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa, migrando para tecidos linfóides, produzindo citocinas pró-inflamatórias e promovendo uma apresentação específica de antígenos para as células T (GEISSMANN, et al., 2010; VATNER, et al., 2019).

### **1.2.2 Fase Crônica**

A transição da fase aguda para a fase crônica da inflamação, ocorre aproximadamente sete dias após o implante do biomaterial. Durante a transição para a fase crônica, os macrófagos que na fase aguda apresentavam um fenótipo predominante pró-inflamatório (M1), agora começam a apresentar uma mudança de fenótipo, para macrófagos com perfil pró-fibrótico (M2). Os macrófagos M2, têm um

papel central no início do processo de fibrose e da encapsulação do implante, pois ao chegarem ao sítio de inflamação propiciam a diminuição da inflamação através da liberação de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, e começam a liberação de TGF- $\beta$ 1, citocina pró-fibrótica, que irá promover o recrutamento e a ativação de fibroblastos para o local. Os fibroblastos ativados, são aqueles que sofrem diferenciação para miofibroblastos, aderem-se à superfície do implante e promovem a deposição de camadas de matriz extracelular, levando a formação de tecido fibrótico sobre o implante. (CARNICER-LOMBARTE et al., 2021; ANDERSON et al., 2008).

Além disso, os macrófagos residentes no sítio de inflamação, começam a se fundir, formando células gigantes multinucleadas capazes de fagocitar partículas maiores que 10 $\mu$ m, o dobro de fagócitos comuns. Essas células promovem tanto a liberação de fatores de degradação, como também participam na formação da cápsula fibrótica, que envelopa o implante, ao se aderirem à camada de matriz extracelular depositada pelos fibroblastos ativados. Com a formação da cápsula, esse tecido promove a liberação de fatores pró-angiogênicos como VEGF e PDGF, para o desenvolvimento de novos vasos, para que haja a regularização da homeostasia e nutrição do tecido adjacente ao implante (CARNICER-LOMBARTE et al., 2021; ANDERSON et al., 2008). Algumas vias de sinalização, como a via Wnt, apresentam um papel crucial no reparo tecidual, e quando estão desreguladas podem levar à processos de fibrose dentre outras doenças (BURGY, et al., 2018).

### 1.3 Via Wnt

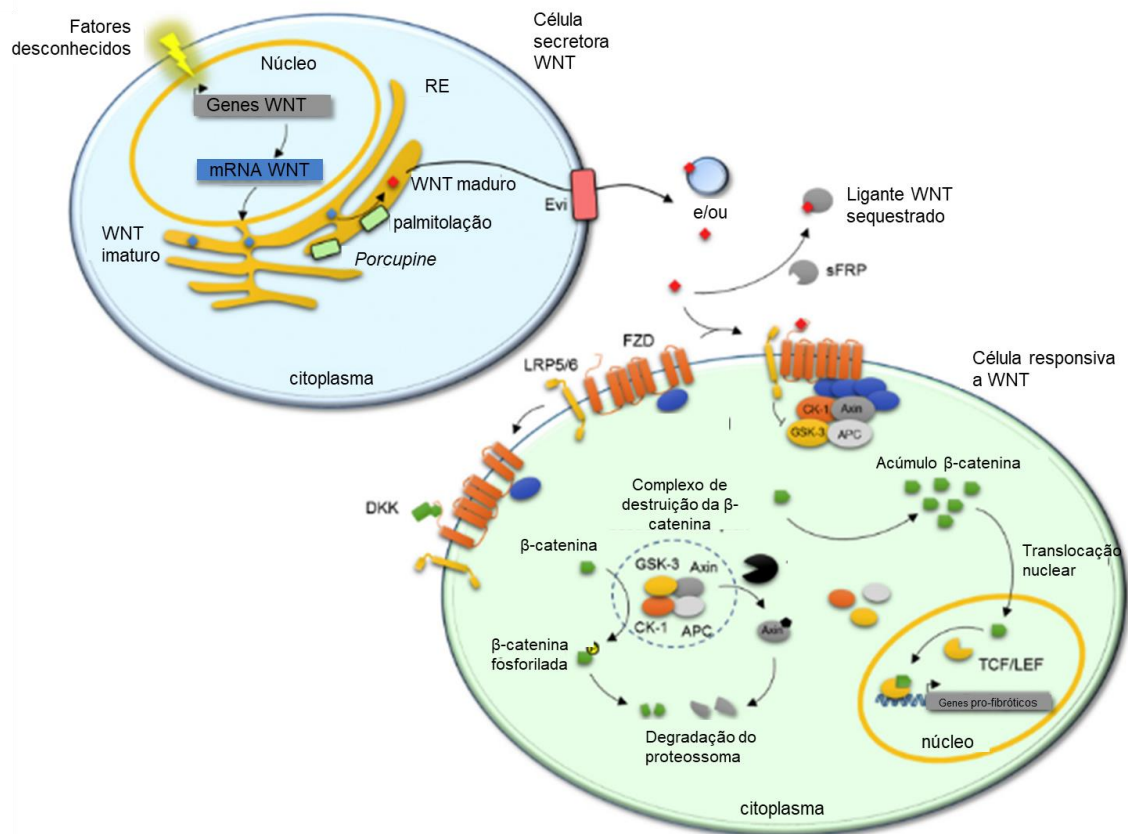
As vias de sinalização Wnt apresentam um papel essencial no desenvolvimento de órgãos e tecidos na fase embrionária, além de atuar nos processos de proliferação, diferenciação, reparo tecidual e ainda tumorigênese (BURGY, et al., 2018; JUNG, et al., 2020). Essas vias foram bem conservadas durante o processo de evolução, e estão presentes desde os mamíferos aos *Drosophila*, e até mesmo nas anêmonas do mar. A via Wnt é dividida entre: canônica ( $\beta$ -catenina-dependente) que regula principalmente a proliferação celular, portanto o reparo tecidual de forma direta, e a parte não-canônica ( $\beta$ -catenina-independente e cálcio dependente) promove a regulação da polaridade e movimento celular (BURGY, et al., 2018; JUNG, et al., 2020). A sinalização dessas vias consiste na produção de ligantes Wnt, fatores

estimulatórios de crescimentos, que levam ao processo de proliferação celular, por isso essas vias apresentam impacto sobre o ciclo celular em vários pontos diferentes. Esses ligantes Wnt têm a capacidade de moldar o crescimento de tecidos quando induzem células à proliferação, agindo como direcionadores dos demais fatores de crescimento (NUSSE, et al., 2017).

A sinalização envolvida no reparo tecidual é feita pela  $\beta$ -catenina, que é um co-ativador de transcrição nuclear muito importante presente no citoplasma. A sinalização tem início a partir de estímulos diversos, como de dano tecidual por exemplo, que levam as células secretoras do ligante Wnt, a produzirem este ligante. Então, os genes Wnt serão transcritos e traduzidos para produção da proteína imatura de Wnt. Essa molécula para ser secretada deverá passar por um processo de palmitoilação que é feito pela proteína *porcupine*, presente no retículo endoplasmático da célula secretora. Após isso, o Wnt maduro pode ser secretado para fora da célula, através da proteína de membrana Evi (BURGY, et al., 2018). Ao ser secretado da célula, o ligante Wnt é direcionado para a célula em que irá interagir, ligando-se ao principal receptor Wnt, a proteína transmembrana *frizzled* (FZD), que está envolvida em ambas as sinalizações da via (canônica e não-canônica). Ao ligar-se ao receptor FZD, o ligante Wnt promove a sinalização para que o complexo de destruição da  $\beta$ -catenina se desligue, e possa haver a formação e o acúmulo de  $\beta$ -catenina no citoplasma. O complexo destruidor de  $\beta$ -catenina é composto por proteínas sendo elas: *Axin*, APC, CK-1 e GSK-3, que promovem a fosforilação da  $\beta$ -catenina e posteriormente sua ubiquitinação e degradação pelo proteassoma da célula. O acúmulo de  $\beta$ -catenina no citoplasma leva ao processo de translocação nuclear da mesma juntamente com o fator de transcrição nuclear TCF/LEF, levando então a indução da expressão de genes pró-fibróticos, que irão desencadear reações de reparo tecidual (Figura 3) (BURGY, et al., 2018; JUNG, et al., 2020).

A inibição dessa via é feita por diversos mecanismos, sendo o principal por inibidores extracelulares como a proteína dickkopf (DKK), que compete pelo sítio de ligação do receptor FZD. Quando o DKK se liga à FZD, ele promove a sinalização para que o complexo destruidor de  $\beta$ -catenina se una novamente, e então promovam a fosforilação, ubiquitinação da  $\beta$ -catenina e posteriormente sua degradação pelo proteassoma (BURGY, et al., 2018).

Entretanto, a desregulação de alguns fatores como ligantes, receptores ou proteínas envolvidas na via Wnt pode levar ao desenvolvimento e progressão de fibrose em diversos tecidos, como pulmão, rins, pele, fígado, coração e também na cavidade intraperitoneal (BURGY, et al., 2018). Isso tem levado à busca por fármacos com potencial inibição da via, que possam tratar as patologias causadas pela desregulação da via Wnt, como o câncer e a fibrose. Algumas substâncias inibidoras de ligantes Wnt ou de receptores têm sido descritas na literatura e utilizadas para o tratamento dessas patologias, dentre elas as substâncias inibidoras da proteína *porcupine*, que promove a maturação do ligante Wnt, como o LGK974 (JUNG, et al., 2020) (Figura 3).



**FIGURA 3. Via Wnt.** Sinalização canônica (β-catenina-dependente) da via Wnt. (Adaptado de BURGY, et al., 2018).

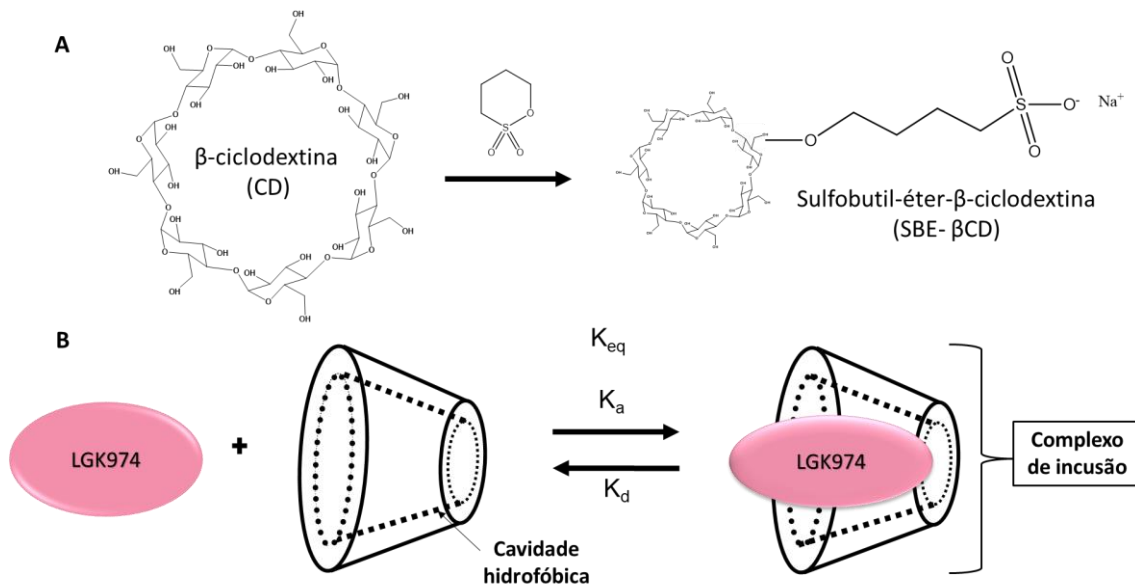
#### 1.4 Inibidor da via Wnt

O LGK974 é uma molécula pequena recentemente descoberta, que está em fase II de testes clínicos (NCT01351103) pela empresa Novartis, e tem se mostrado

eficaz em modelos *in vitro* e *in vivo* em diversos tipos de câncer, como pâncreas, pulmão, colorretal entre outros. Este fármaco promove uma potente inibição da proteína *porcupine*. A proteína *porcupine* é de extrema importância para a via Wnt e consiste em uma O-aciltransferase que promove a palmitoilação do ligante Wnt, tornando-o uma molécula madura que pode ser secretada pela célula. (LIU, et al., 2013; JUNG, et al., 2020).

Apesar disso, o LGK974 é um fármaco com baixa solubilidade, instável e que apresenta toxicidade intestinal. Como é administrado por via oral, sua baixa solubilidade dificulta o desenvolvimento de formulações para administração oral e limita a biodisponibilidade. Entretanto, recentemente, foi mostrado que a complexação de LGK974 com ciclodextrinas podem aumentar a solubilidade, estabilidade, biodisponibilidade e reduzir a toxicidade no trato gastrointestinal (GUIMARÃES, et al., 2018).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos naturais que podem variar de tamanho de acordo com o número de monômeros de glicoses, variando entre 6 ( $\alpha$ -ciclodextrinas) (6), 7 ( $\beta$ -ciclodextrinas) e 8  $\gamma$ -(ciclodextrinas). Apresentam formato cônico, com uma cavidade hidrofóbica, e uma parte externa hidrofílica. Por causa dessas características, as ciclodextrinas podem se ligar a uma infinidade de substâncias, formando, por exemplo, complexos de inclusão tipo receptor-substrato, através de interações fracas do tipo Van der Waals entre fármaco e a cavidade hidrofóbica, além de outros tipos de interações na sua parte exterior. Nesse sentido, podem ser usadas para melhorar a solubilidade de substâncias pouco solúveis, biodisponibilidade, e também auxiliar na redução da toxicidade de alguns fármacos. Além disso, as ciclodextrinas podem sofrer modificações em seu exterior, como a adição de um grupo funcional como o sulfobutil-éter, hidroxipropil, dentre outros, que irão potencializar a interação com fármacos, melhorando aspectos como solubilidade e biodisponibilidade por exemplo (STELLA, et al., 1997; SZEJTLI, et al., 1994; GUEDES, et al., 2008).



**FIGURA 4. Ciclodextrina e esquema de complexo de inclusão.** (A) Estrutura química da  $\beta$ -ciclodextrina e do grupo sulfobutil-éter. (B) Esquema de complexo de inclusão em um sistema em equilíbrio químico e termodinâmico.

Diante do exposto, o presente trabalho consiste na investigação do processo inflamatório e fibrótico em implantes intraperitoneais de animais tratados com complexo de inibição da via Wnt, a fim de reduzir o processo de rejeição. O complexo de inibição da via Wnt é formado pela ciclodextrina modificada sulfobutil-éter- $\beta$ -ciclodextrina (SBE- $\beta$ CD) e o fármaco insolúvel LGK974 (CD:LGK974). Nossa hipótese é que o complexo CD:LGK974, administrado por via oral, seja capaz de reduzir a reação de corpo estranho e evitar a formação de fibrose em implantes intraperitoneais através da inibição da via Wnt (Figura 4).

## 2 JUSTIFICATIVA

O uso de implantes para a substituição de funções anatômicas e/ou fisiológicas, ou ainda o tratamento de diversas patologias com dispositivos de liberação controlada, são excelentes recursos para melhorar a qualidade de vida dos pacientes. O uso desses recursos tem sido amplamente utilizado na clínica principalmente no sítio intraperitoneal, para tratar condições como diabetes, dentre outras. No entanto, um dos maiores problemas que afetam os pacientes com implantes, é a rejeição por reação de corpo estranho levando, na maioria das vezes, à remoção do implante. (VEISEH, et al., 2015; BOSE, et al., 2020; HE, et al., 2022). Nesse sentido, o uso do complexo CD:LGK974 é uma estratégia potencial para mitigar ou reduzir a rejeição aos implantes, modulando a migração de células imunes e citocinas inflamatórias na região, assim como a redução da deposição de matriz extracelular e vasos formados.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o perfil inflamatório, fibrótico e angiogênico em implantes intraperitoneais de animais tratados com complexo de inibição da via Wnt (CD:LGK974).

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Preparar e caracterizar complexos de inclusão formados entre a SBE- $\beta$ -ciclodextrina e fármaco inibidor da via Wnt (CD:LGK974).
- Avaliar o processo inflamatório e migração de células imunes da linhagem mielóide para a matriz do implante.
- Realizar a dosagem de fatores e citocinas relacionadas à formação de fibrose nos implantes intraperitoneais após tratamento com CD:LGK974.
- Avaliar a deposição de fibras de colágeno do tipo I e III nos implantes intraperitoneais após tratamento com CD:LGK974.
- Avaliar a liberação de citocina pró-angiogênica e formação de novos vasos nos implantes intraperitoneais após tratamento com CD:LGK974.
- Avaliar a hepatotoxicidade do complexo de inclusão CD:LGK974 através da dosagem de transaminases (AST e ALT) após tratamento com CD:LGK974.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Preparação do complexo de inclusão CD:LGK974

Complexos de inclusão entre o LGK974 e  $\beta$ SBE-ciclodextrina foram obtidos pela técnica de liofilização considerando a proporção molar de 10:1. LGK974 e SBE- $\beta$ -ciclodextrina foram dispersos em água Mili-Q e a suspensão foi agitada à temperatura ambiente em agitador magnético (IKA- CMAGHS7), seguido de ajuste de pH para ~4-5 utilizando uma solução de HCL 0,1N, ou até a solubilização completa da mistura. Esta mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 2-4 horas. Posteriormente a solução foi congelada, submetida à liofilização e o pó obtido armazenado em freezer à -20 C° (GUIMARAES *et al.*, 2018).

### 4.2 RMN-2D

A formação do complexo de inclusão CD:LGK974 foi avaliada através da ressonância magnética nuclear 2D (RMN-2D), mediante a correlação 2D entre prótons da SBE- $\beta$ -ciclodextrina e de LGK974. Para isso, o complexo CD:LGK974 foi dissolvido em D<sub>2</sub>O (concentração: ~15mg/mL) e depois foi realizada a espectroscopia de efeito de revisão nuclear 2D 'H' (NOESY, com tempo de mistura de 400 ou 650 ms, 250 FID). Em seguida, a complexação e a estrutura do complexo foram determinadas através dos picos cruzados de prótons observados entre CD (-CH-, 3-4,2 ppm) e LGK974 (aromático -CH-, 7,7-9,2 ppm) (GUIMARAES *et al.*, 2018).

### 4.3 Animais e grupos experimentais

Os protocolos para experimentação animal foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) (Protocolo N° 282/2018). Foram utilizados (N total=68) camundongos machos C57BL/6 de 8 a 12 semanas (25-30g), obtidos do Biotério Central da UFMG. Os animais foram mantidos por todo o período do tratamento no Biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG), em gaiolas unitárias, em racks ventiladas com microisoladores, sob um ciclo claro/escuro de 12 horas, com ração (NUVILAB CR-1 Brasil) e água *ad libitum* por um período de 14 dias. Todos os procedimentos realizados estavam de acordo com os padrões estabelecidos nas diretrizes para o cuidado e uso de animais experimentais.

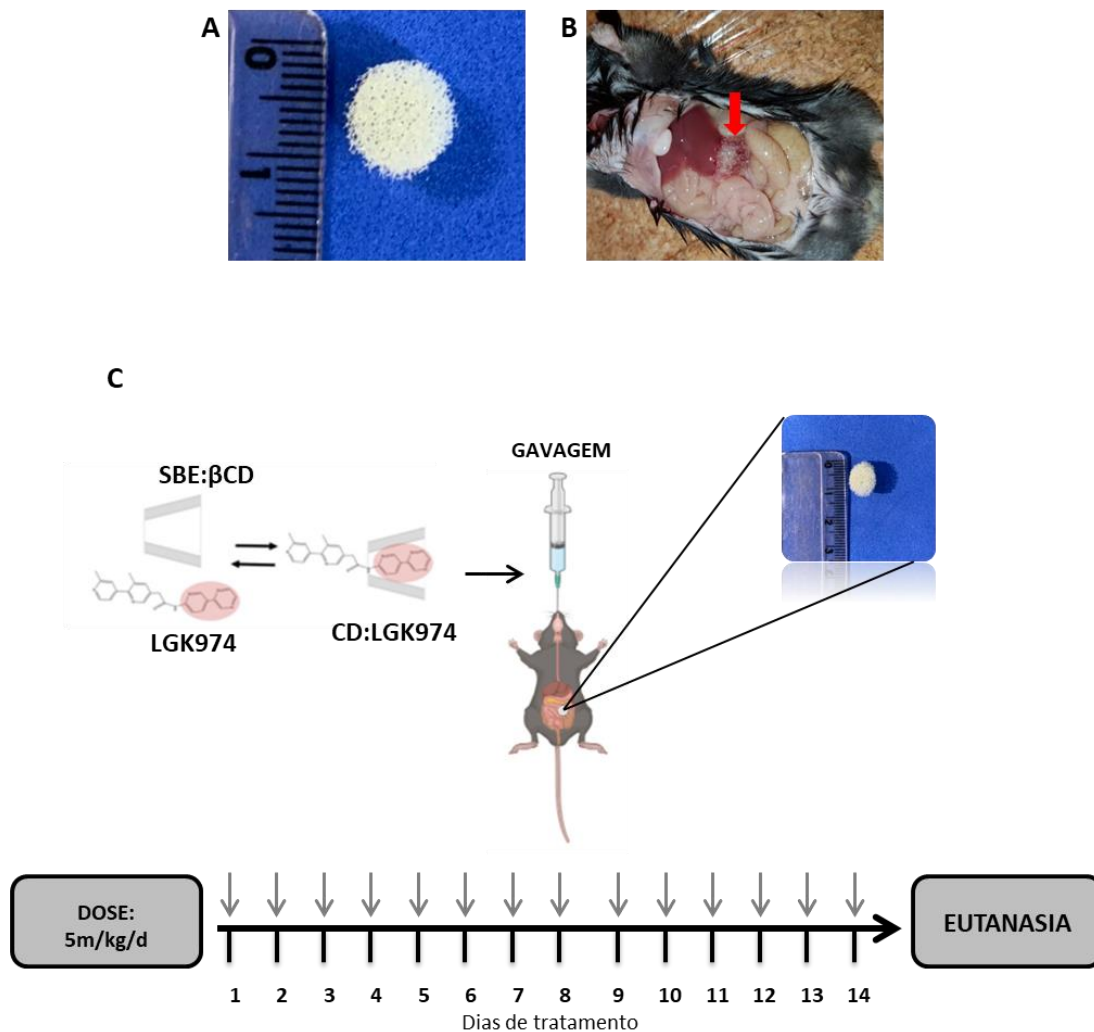


#### **4.4 Preparação dos discos de poliéter-poliuretano, cirurgia, tratamento, e grupo amostral**

Como implantes, foram utilizadas matrizes sintéticas de poliéter-poliuretano em formato de discos, contendo 5mm de espessura por 8mm de diâmetro (Vitafoam Ltd., Manchester, UK) (Fig 5:A). Esses implantes foram submersos em álcool 70% (v/v) no dia anterior à cirurgia até a esterilização em água destilada fervente por 30 min antes do implante. (ANDRADE; FAN; LEWIS, 1987).

Os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de Ketamina (60mg/kg) e Xilazina (10mg/kg), após isso, tiveram seus pelos tricotomizados ventralmente, e subsequentemente foi realizada a assepsia com álcool 70% (v/v) na pele do animal para o recebimento dos implantes intraperitoneais. No procedimento cirúrgico, foi feita uma incisão de 1 cm na linha média alba do abdômen do animal para a implantação da matriz sintética no sítio intraperitoneal (Fig 5B). Os animais foram suturados com fio de nylon não absorvível e colocados em caixas individuais após a cirurgia. O pós-operatório foi monitorado diariamente para sinais de desconforto, estresse ou de infecções oportunistas nos sítios dos implantes. O tratamento dos animais foi iniciado 24 horas após o implante, através da administração oral diária de CD:LGK974 (dose: 5mg/kg/dia), durante 14 dias (Fig 5C).

Os animais foram divididos em 3 grupos após o procedimento cirúrgico de implante de matriz de poliéter-poliuretano de forma aleatória, sendo: Controle, CD, CD:LGK974. Para o tratamento, a dose diária administrada aos animais foi de 5mg/kg/dia, de forma que o grupo Controle, recebeu salina, o grupo CD, recebeu uma solução de SBE- $\beta$ CD em H<sub>2</sub>O Milli-Q; e grupo CD:LGK974, recebeu o complexo solubilizado em H<sub>2</sub>O Milli-Q.



**FIGURA 5 Implantação da matriz sintética e tratamento** (A) Imagem macroscópica da matriz sintética de poliéter-poliuretano antes da implantação. (B) Matriz implantada e aderida na cavidade intraperitoneal de camundongos C57BL/6. (C) Tratamento por gavagem durante 14 dias.

#### 4.5 Eutanásia e coleta das amostras

Após os 14 dias de tratamento, os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de Ketamina (150mg/kg) e Xilazina (10mg/kg), e então foi realizado o deslocamento cervical. Após a eutanásia o sangue foi retirado através de punção atrial cardíaca com seringa de 1 mL, e colocado em tubos de 1,5 mL, seguido de centrifugação por 10 min a 3.200 rpm a 4 C°, para a retirada do soro. O soro do tubo foi acondicionado em freezer a -20 C°, para posteriores análises bioquímicas (AST e ALT). Os implantes intraperitoneais foram retirados, pesados, fotografados em lupa (Estereomicroscópio com Base LED SMZ 445 Nikon) nos aumentos de 0,67x e 5x, e posteriormente divididos com um bisturi e coletados em tubos de 2,0 mL para as

análises bioquímicas (ELISA) e armazenados a -20 C°. Outra porção das amostras foi coletada em cassetes identificados para análises histológicas, e acondicionadas em solução de formalina 10%, por 48 horas. Após 48 horas, as amostras foram retiradas e colocadas em álcool 70%, até o início do processamento das amostras. Também foram retirados uma porção do fígado para análises bioquímicas.

#### **4.6 Análises histopatológicas**

As amostras destinadas às análises histológicas (implantes), foram fixadas em formalina 10% por 48h e, em seguida, processadas para inclusão em parafina. Após a inclusão, os cortes foram feitos com espessura de 5 µm, e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para análise morfométrica das estruturas contidas no implante (células inflamatórias, células gigantes, fibroblastos e vasos). Para a avaliação de score inflamatório, a comparação e quantificação do infiltrado inflamatório foi feita através da análise dos campos das lâminas de H&E seguindo o seguinte score: 0 - Ausente; 1- Discreta quantidade de células presentes; 2 - Quantidade normal de células presentes; 3 - Predominância de neutrófilos presentes; 4 - Predominantemente células mononucleares presentes. Para avaliação do score fibrótico, a comparação de deposição de fibrose nas matrizes sintéticas entre os grupos, foi feita através da análise dos campos das lâminas de H&E seguindo o seguinte score: 0: Ausente; 1: Presença discreta de fibras delgadas; 2: Presença mais acentuada de fibras delgadas; 3: Presença acentuada de fibras delgadas e discreta de fibras espessas; 4: Predominância de fibras espessas de colágeno (THOMPSON *et al.*, 1998). A contagem de células gigantes e número de vasos por campo (15 campos por lâmina), foi realizada através de microscopia convencional (Olympus BX51).

Para a avaliação da deposição do colágeno na matriz do implante, as amostras (implantes) foram fixadas em formalina 10% por 48h e, em seguida, processadas para inclusão em parafina. Após a inclusão, os cortes foram feitos com espessura de 5 µm, e as lâminas foram coradas com a coloração de Picrosirius, que consiste em uma solução de ácido pícrico e o corante Sirius Red (Sigma), e a análise realizada através de microscopia de luz polarizada (Olympus BX51). Todas as imagens de colágeno foram analisadas utilizando um algoritmo desenvolvido internamente e escrito na

linguagem de programação Python (VAN ROSSUM, 1995). O algoritmo foi escrito com o objetivo de quantificar a percentagem de colágeno na imagem polarizada e comparado com a quantidade total de tecido dentro da imagem do campo claro. Para quantificar cada área de tipo de colágeno, foi utilizado um algoritmo de limiar para determinar o vermelho ( $\text{vermelho} > \text{verde} + \text{azul} * 1,2$ ) e verde ( $\text{verde} > \text{vermelho} + \text{azul} * 0,7$ ) pixels (o fator de multiplicação nas fórmulas foi determinado empiricamente para o conjunto de imagem atual). Depois, foram contados os números de pixels vermelhos e verdes a fim de obter a área de colágeno espesso e fino, respectivamente. Para obter a área de tecido, a imagem do campo claro foi transformada numa imagem em escala de cinza e binarizada pelo método de Otsu (OTSU, 1979). Numa tentativa de segmentar o tecido de interesse e evitar artefatos e segmentações fora da região de interesse (ROI), foi utilizada uma combinação do detector de borda Canny (CANNY, 1986) com as operações morfológicas, dilatação e erosão. A área total do tecido foi quantificada através da contagem do número de pixels brancos no interior do ROI da imagem binarizada. Uma vez obtida a área de pixels de cada tipo de colágeno e tecido, o conteúdo de colágeno foi obtido como uma percentagem do tecido da área.

#### **4.7 Dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$ , VEGF, TGF- $\beta$ 1) nos implantes**

Para dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , VEGF e TGF- $\beta$ 1, foi realizado um imunoenensaio de ELISA. Para isso, os implantes foram homogeneizados em 2 mL de PBS (pH 7,4), e centrifugados a 10.000 x g por 30 min a 4 °C. As citocinas de interesse foram medidas em 100  $\mu$ L do sobrenadante utilizando kits de imunoenensaio (R & D Systems, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. O sobrenadante foi então adicionado à placa de ELISA, que foi previamente sensibilizada com anticorpo monoclonal murino específico para a citocina de interesse, seguido da adição de um segundo anticorpo policlonal conjugado com *horseradish peroxidase* (HRP). Após essa etapa, a placa foi lavada para remoção de reagentes de anticorpo-enzima não ligados, e foi adicionado uma solução de substrato colorimétrico (50  $\mu$ L de uma solução 1:1 de peróxido de hidrogênio e 10mg/mL de tetrametilbenzidina em DMSO) aos poços. Após 20 min de incubação, a reação colorimétrica foi interrompida através da adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (50  $\mu$ L), e a intensidade de cor foi medida a 540 nm em um espectrofotômetro (Thermoplate Tekmar). Os padrões utilizados para a curva de

calibração (citocinas murinas recombinantes nas diluições de  $0,5^{-\log_{10}}$ ) foram de 7,5 pg/mL a 1000 pg/mL (100  $\mu$ L). Os resultados foram expressos como pg de citocina/mg de tecido molhado.

#### 4.8 Citometria de Fluxo

A migração de células da linhagem mielóide foi realizada pela imunofenotipagem através de citometria de fluxo. Após a retirada dos implantes, estes foram colocados e macerados em tubos de 2 mL contendo 500  $\mu$ L de colagenase 0,2% e então incubados a 37 °C por 30 min. Após os 30 min de incubação, as amostras foram centrifugadas a 400x g por 8 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado, e em seguida, foram adicionados 500  $\mu$ L de tripsina 0,25% e incubação por 5 min a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 500  $\mu$ L de PBS-SBF 10% para a inativação da tripsina. Após isso, as amostras foram filtradas por *cell strainer* (40  $\mu$ m), para obter uma suspensão de células. As células foram centrifugadas a 400g por 8 min a 4° C. Para promover a lise de hemácias, foram adicionados 1 mL de PBS (10X) e 9 mL de água Milli-Q, e em seguida as amostras foram centrifugadas a 400g por 8 min a 4 °C, e o sobrenadante descartado. As amostras foram então ressuspensas em 1 mL de tampão de FACS (PBS 1X, 0,1% de BSA 2mM de azida). Foi realizada uma contagem de células para cada amostra em câmara de Neubauer, e a suspensão foi ajustada para  $1 \times 10^6$  células/mL. Após a contagem, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de aproximadamente  $1 \times 10^5$ . Em seguida, para a avaliação da viabilidade celular e bloqueio de ligações inespecíficas, as células foram incubadas com Live/Dead (Invitrogen) contendo FcBlock (Invitrogen) por 15 min a temperatura ambiente e centrifugadas a 2500 rpm por 3 min a 4 °C. Em seguida, para realizar a marcação extracelular para a linhagem mielóide, as células foram incubadas com um mix de anticorpos (Tabela 1) para leucócitos granulócitos (CD45+/CD11b+), macrófagos (CD11b+F4/80+Gr-1+), neutrófilos (CD11b+F4/80-Gr-1+), monócitos (CD11b+F4/80highGr-1-), células dendríticas (CD11c+), células dendríticas ativadas (CD11c+,IA-IE+), e para células que apresentavam o receptor de manose (CD206+), por 20 min a temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 2500 rpm por 3 min a 4 °C, e logo após foram incubadas com estreptavidina (Tabela 1), por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 3 min a 4

°C, e descartado o sobrenadante. A seguir, as células foram ressuspensas em 200 µL de tampão de FACS, e transferidas para tubos de citometria.

A aquisição das amostras foi realizada na Faculdade de Farmácia da UFMG em um citômetro LSR Fortessa (BD), e os resultados foram analisados utilizando o software *FlowJo* V10.4.11 (TreeStar).

#### 4.9 Western Blotting

A avaliação da expressão de proteínas  $\beta$ -catenina,  $\alpha$ -SMA e TGF- $\beta$ 1 nos implantes foi realizada através de Western Blotting. Para isso, os implantes foram homogeneizados no gelo por 20 min em tampão de lise (em mM: NaCl, 100; Tris-base, 50; EDTA-2Na, 5;  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ , 50;  $\text{MgCl}_2$ , 1; pH 8,0) com detergentes (Nonidet P40 1%, Triton x-100 0,3% e deoxicolato de sódio 0,5%), contendo inibidores de protease (PMSF 200 mM; benzamidina 15,7 mg/mL; pepstatina 10 mM; aprotinina 10 mg/mL) e inibidores de fosfatase (NaF 20 mM;  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM). Após esse procedimento, as amostras foram centrifugadas por 12 min a 8000 rpm e 4 C°, e logo após foi realizada a coleta do sobrenadante e acondicionamento em freezer -80 C° para posterior uso. As proteínas foram quantificadas de acordo com o método de Bradford. Em seguida, as proteínas (40µg) foram separadas SDS-PAGE de 10% concentração, seguido por Western blotting. As corridas foram realizadas com voltagem fixa em 120V e amperagem variante por 1h e 40 min. A transferência para a membrana de PVDF, foi realizada utilizando-se o aparato de transferência semi-dry (BioRad), com voltagem fixa em 20V e amperagem variante por 45 min. Logo após, as membranas foram lavadas em solução de TBS-T (em mmol/L: NaCl, 150; Tris, 25 e 0,05% de Tween 20, pH 8,0). O bloqueio foi realizado em solução de TBS-T com leite a 5% por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram incubadas overnight, a 4 C°, com anticorpo primário diluído em solução de leite 1% em TBS-T. Os seguintes anticorpos foram utilizados:  $\beta$ -catenina (1:1000, BD-Biosciences)  $\alpha$ -SMA (1:1000, ABCAM) e TGF- $\beta$ 1 (1:1000, ABCAM). Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBS-T por 30 min sob agitação (3 vezes, 10 min) e incubadas com o anticorpo secundário HRP por 1 hora. Foram utilizados os seguintes anticorpos secundários: anti-camundongo (1:15000, Sigma-Aldrich) e anti-cabra (1:15000, Sigma-Aldrich). Após este período, as membranas foram novamente

lavadas com TBS-T por 30 min (3 vezes de 10 minutos). A imunodeteção foi realizada usando quimioluminescência aprimorada detectada com equipamento LAS 4000 (GE HealthCare Life Science). Os níveis de proteína foram expressos como uma razão de densidades ópticas através da análise no Image Quant TL®. O HSP90 (1:3000, Santa Cruz Biotechnology) foi usado como normalizador da expressão proteica.

#### **4.9.1 Dosagem de transaminases hepáticas (AST/ALT)**

Para avaliar a função hepática dos animais, foram realizadas análises bioquímicas do soro e nas amostras de fígado. As amostras de fígado foram homogeneizadas em 2 mL de PBS (pH 7,4). As enzimas Aspartato Aminotransferase Sérica (AST/TGO) e Alanina Aminotransferase (ALT/TGP), foram dosadas nas amostras de fígado e soro, utilizado um Kit Bioclin (Copyright © 2012 Bioclin/Quibasa), seguindo as informações do protocolo do fabricante, adaptada para placa de 96 poços (MELLO, S.C.S, 2016).

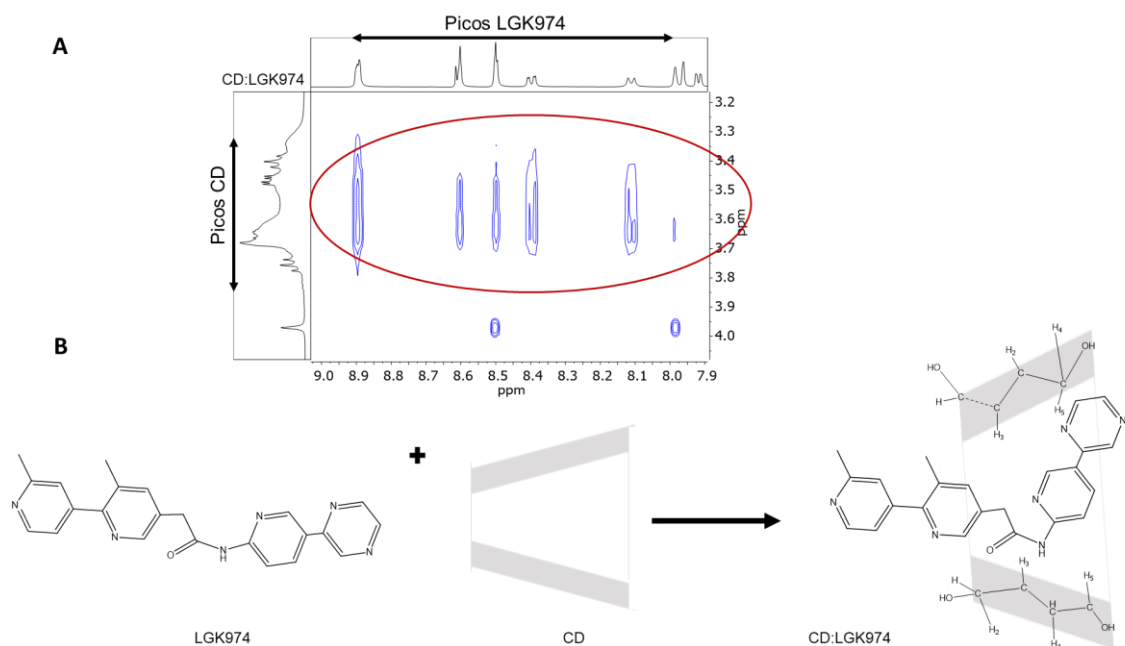
#### **4.9.2 Análises estatísticas**

Os resultados do trabalho são apresentados como média  $\pm$  S.E.M. A análise de normalidade estatística dos dados foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism 8.0, através dos testes One-Way ANOVA e comparação múltipla pós-teste de Tukey. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e comparação múltipla pós-teste de Dunn. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização do complexo de inclusão CD:LGK974

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear 2D (RMN-2D - NOESY) foi utilizada com objetivo de confirmar a formação do complexo de inclusão através da observação de manchas de correlação espacial entre SBE- $\beta$ CD e a molécula de LGK974. Os métodos 2D proporcionam mais efetiva interpretação e caracterização da complexação tendo em vista que as interações são fracas e acompanhadas de pequena variação de deslocamento químico (SCHNEIDER, et al., 1998). A partir do espectro 2D podemos observar uma correlação espacial no mapa 2D NOESY indicando a interação dos hidrogênios H3 e H5 da cavidade interna da ciclodextrina (eixo Y) com picos de H da molécula de LGK974 (eixo X). As manchas de correlação, presentes no espectro, demonstram a interação de parte da molécula de LGK974 na cavidade da ciclodextrina, e a formação do complexo de inclusão (Figura 6).



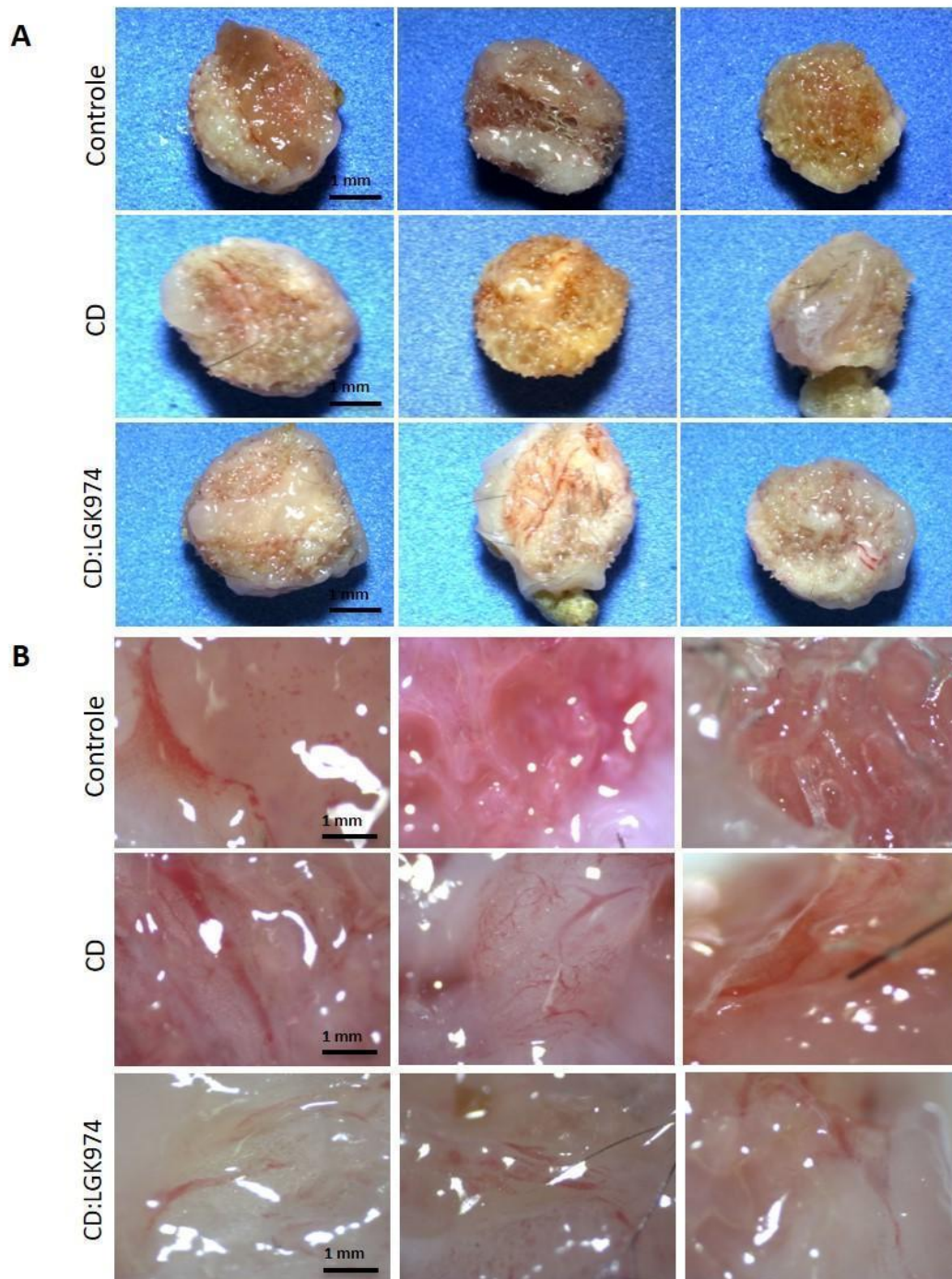
**FIGURA 6. Caracterização do complexo CD:LGK974.** (A) Espectro 2D NOESY-RMN do complexo CD:LGK974. (B) Arranjo geométrico proposto de LGK974 na cavidade de SBE- $\beta$ CD com espectro 2D.

### 5.2 Análise macroscópica dos implantes

Os animais foram tratados com salina, CD e CD:LGK974 por 14 dias. Em seguida, os animais foram eutanasiados, e os implantes foram coletados. Inicialmente,



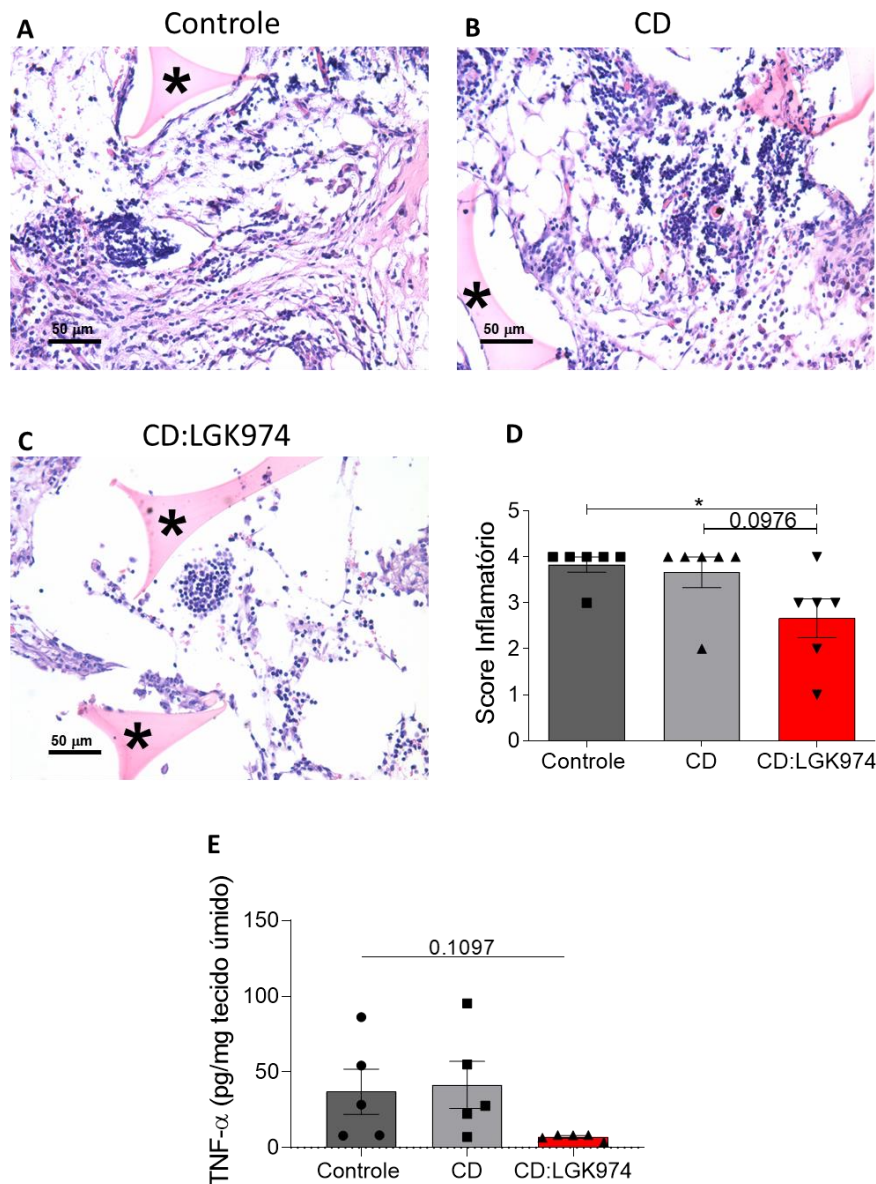
foi feita a análise macroscópica dos implantes para avaliação do tecido fibrótico recém-formado ao redor dos implantes. O grupo tratado com o CD:LGK974 apresentou menor quantidade tanto de tecido fibrótico, como de microvasos em comparação com os grupos controle e tratados com CD (Figura 7).



**FIGURA 7. Fotografias de implantes intraperitoneal após 14 dias.** (A) Imagens representativas dos implantes após 14 dias de tratamento lupa: aumento de 0,67x. (B) Lupa: aumento de 5x.

### 5.3 Avaliação do perfil inflamatório nos implantes

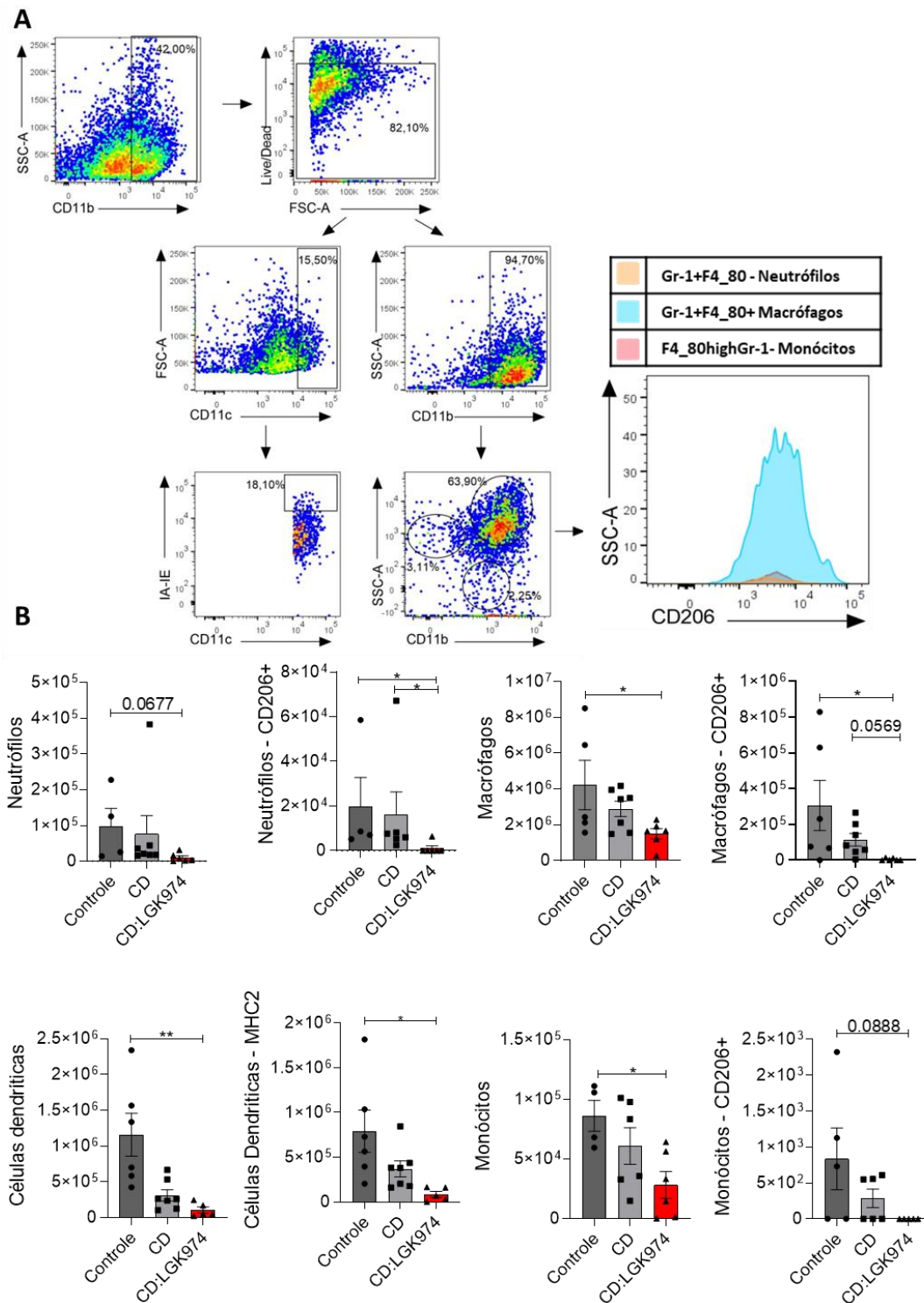
O perfil inflamatório foi avaliado através do score de inflamação histológico, produção de citocina pró-inflamatória (TNF- $\alpha$ ) e migração de células mielóides da imunidade inata no implante. O score foi feito através da avaliação qualitativa das imagens histológicas, onde foi possível observar o infiltrado inflamatório no implante, e a diferença quantitativa do número de células entre os grupos Controle, CD e CD:LGK974. Os animais tratados com CD:LGK974 demonstraram uma redução no infiltrado inflamatório que resultou em uma diminuição significativa no score inflamatório quando comparado aos grupos Controle e CD (Figura 8 A-D; Figura S1). Corroborando com os achados histológicos, os dados de ELISA mostraram que o grupo tratado com CD:LGK974 também apresentou uma redução na produção e liberação da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , em comparação com os grupos Controle e CD (Figura 8: E).



**FIGURA 8. Score de inflamação e dosagem de citocina pró-inflamatória (TNF- $\alpha$ ) nos implantes.** Seções histológicas representativas. (A-C) Implantes corados por H&E de infiltrado inflamatório após 14 dias de tratamento via oral (porções da matriz do implante indicado por \*). (A) Controle: Salina; (B) SBE- $\beta$ CD; (C) CD:LGK974 (dose: 5mg/kg/d). (D) O grupo tratado com CD:LGK974 apresentou diminuição na infiltração inflamatória induzida pelos implantes em comparação com os grupos controle e CD. (E) A dosagem de citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , mostrou que houve uma diminuição no grupo CD:LGK974, em comparação com os outros grupos. Os dados são expressos como média  $\pm$  S.E.M.; One-way ANOVA; \*  $P < 0.05$ .

Além disso, foi avaliado a migração celular de células da linhagem mielóide para o implante via citometria de fluxo. Essas células, como macrófagos, neutrófilos, monócitos, células dendríticas, e ainda as células expressando o receptor de manose CD206, característico do fenótipo M2, estão diretamente envolvidas na fase crônica/persistente do processo inflamatório da reação de corpo-estranho. Para determinar o *boolean gate*, os *doublets* foram removidos por combinação de área de

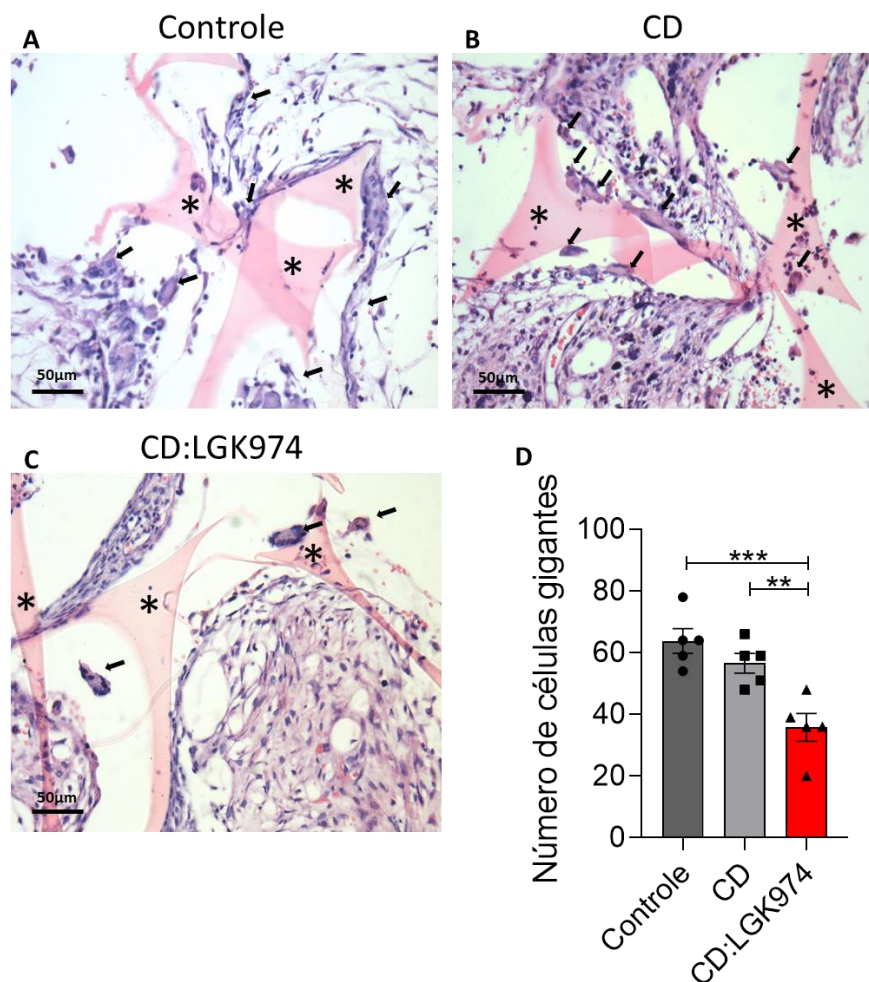
dispersão frontal (FSC-A) versus altura de dispersão frontal (FSC-H), detritos debris de fluorocromos foram excluídos através das combinações, e depois as células foram gateadas definidas em função do tempo versus FSC-A para evitar uma possível interferência de interrupções de fluxo. Foram utilizadas células vivas CD45+ para análise do painel mielóide, e dentro disso foi realizado um gate para a análise das células CD11b+ (células mielóides), CD11c+ (células dendríticas), CD206+ (células mielóides que apresentavam o receptor de manose), e ainda IA-IE+ (células dendríticas ativadas). Os macrófagos foram caracterizados como CD11b+F4/80+Gr-1+, macrófagos CD206+ como F4/80+Gr-1+CD206+, neutrófilos como CD11b+F4/80-Gr-1+, neutrófilos CD206+ como F4/80-Gr-1+CD206+, monócitos como CD11b+F4/80highGr-1-, monócitos CD206+ como F4/80highGr-1-CD206+, células dendríticas como CD11c+, e células dendríticas ativadas como CD11c+,IA-IE+. Em conjunto, os dados sugerem que o grupo tratado com CD:LGK974 demonstra uma diminuição significativa na migração dessas células imunes para o implante em comparação com os grupos controle e CD, sugerindo uma atividade promissora na redução do processo inflamatório e redução na reação de corpo-estranho (Figura 9).



**FIGURA 9. Citometria de fluxo de células mielóides. Migração de células mielóides da imunidade inata. (A)** Imagem representativa em *large dot* de estratégia de *gates* realizada para a obtenção dos registros de células mielóides. **(B)** Quantificação do número de células mielóides que migraram para o implante (Neutrófilos (CD11b+,F4/80-,Gr-1+), Neutrófilos CD206+ (F4/80-,Gr-1+,CD206+), Macrófagos (CD11b+,F4/80+,Gr-1+), Macrófagos CD206+ (F4/80+,Gr-1+,CD206+), Células dendríticas (CD11c+), Células dendríticas ativadas MHC2 (CD11c+,IA-IE+), Monócitos (CD11b+,F4/80high,Gr-1-), Monócitos CD206+ (F4/80high,Gr-1-,CD206+). CD:LGK974 mostra uma significativa diminuição de migração de células para o implante em comparação com os grupos controle e CD. Os dados são média ± S.E.M.; One-way ANOVA; \* P < 0.05; \*\*P < 0.01.

## 5.4 Avaliação de células gigantes

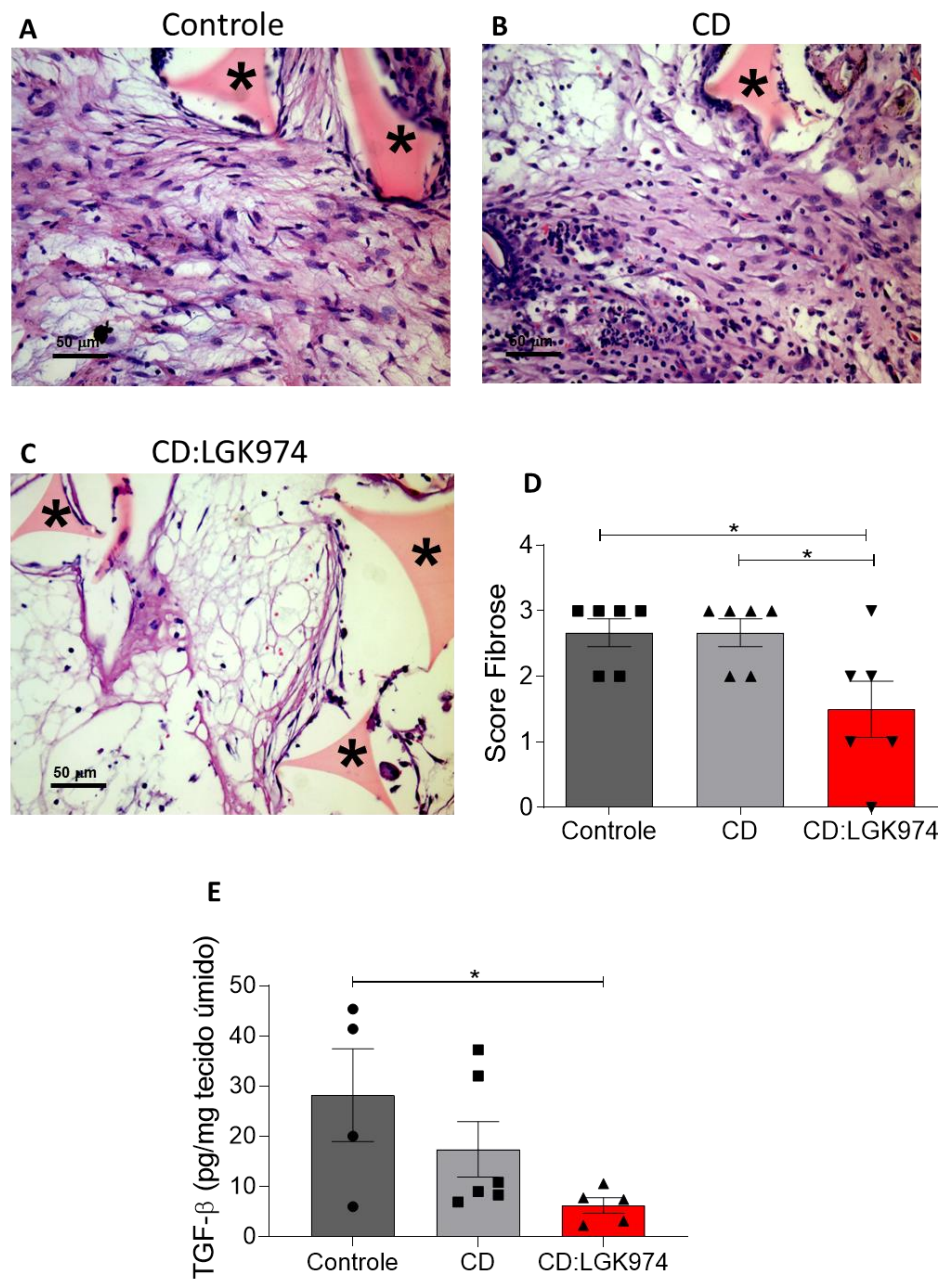
As células gigantes são componentes importantes na reação de corpo-estranho, que surgem através do agrupamento de macrófagos levando à formação de uma célula multinucleada (a partir de 3 núcleos) e com maior capacidade de fagocitose, desencadeada pelos implantes no sítio intraperitoneal. Os animais tratados com CD:LGK974 demonstraram diminuição significativa na contagem dessas células quando comparados com os grupos Controle e CD (Figura 10). Esse achado demonstra que o uso de CD:LGK974 leva à uma redução do recrutamento e fusão de macrófagos para o sítio do implante.



**FIGURA 10 Contagem de células gigantes** - (A-C): Seções histológicas representativas de implantes após 14 dias de tratamento via oral (porções da matriz do implante indicado por \*). (A) Controle: Salina; (B) SBE- $\beta$ CD; (C) CD:LGK974 (dose: 5mg/kg/d). (D) A análise morfométrica de células gigantes/campo (indicadas pelas setas) mostra que o CD:LGK974 diminui o número de células gigantes em implantes em comparação com o grupo controle e o grupo CD. Os dados são média  $\pm$  S.E.M.; One-way ANOVA; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

## 5.5 Avaliação do perfil fibrótico nos implantes

A formação de fibrose no implante foi avaliada através de score fibrose, produção de citocinas pró-fibróticas, expressão de proteínas relacionadas à fibrose e deposição de colágeno após tratamento com CD:LGK974 ou grupos Controle e CD. O score fibrótico foi realizado através da avaliação das imagens histológicas dos implantes, onde foi possível observar e comparar a deposição de tecido fibrótico na matriz do implante dos grupos Controle, CD e CD:LGK974. O grupo tratado com CD:LGK974 demonstrou redução significativa na deposição de tecido fibrótico associado ao implante quando comparado aos grupos Controle e CD (Figura 11 A-D). Além disso, a produção e liberação da citocina pró-fibrótica TGF- $\beta$ 1, avaliada por ELISA, foi reduzida de modo significativo, no grupo CD:LGK974 em relação aos demais grupos (Figura 11E).

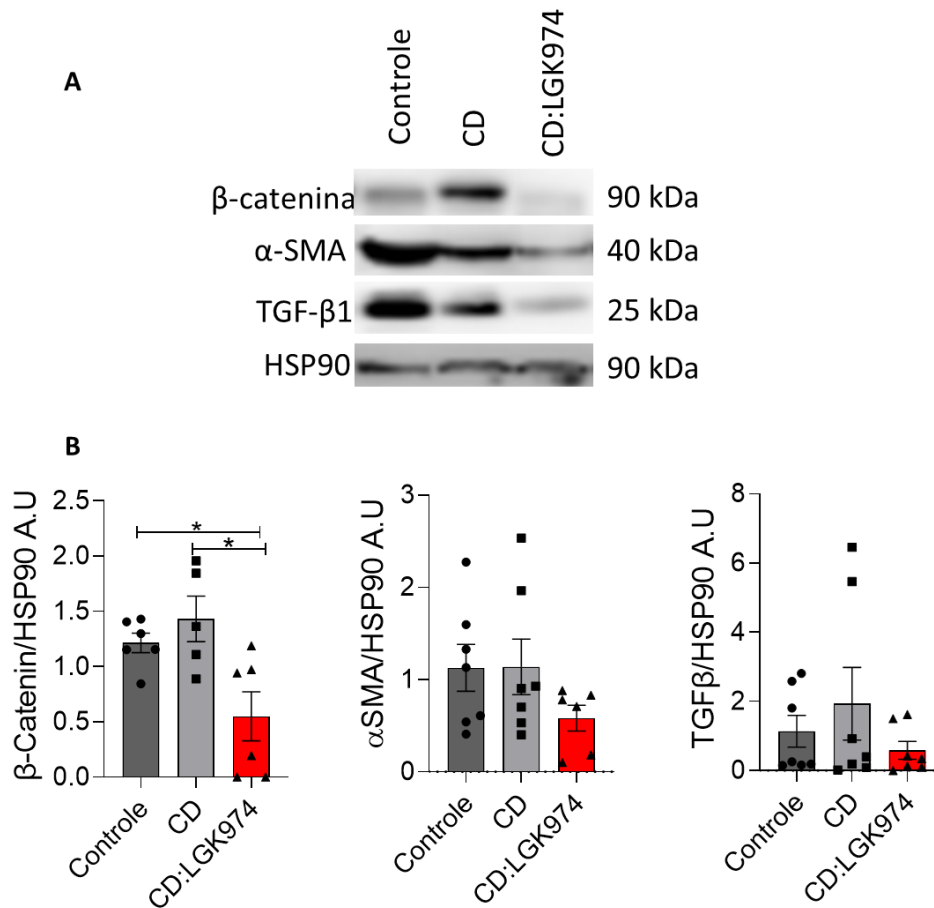


**FIGURA 11. Score de fibrose e citocina pró-fibrótica (TGF-β1) no implante** - (A-C): Seções histológicas representativas de implantes após 14 dias de tratamento via oral, corados por H&E (porções da matriz do implante indicado por \*). (A) Controle: Salina; (B) CD: SBE-βCD; (C) CD:LGK974 (dose: 5mg/kg/d). (D) O tratamento com CD:LGK974 diminui significativamente a fibrose nos implantes em comparação com os grupos controle e CD. (E) A dosagem de citocina pró-fibrótica TGF-β1, também mostrou uma redução significativa no grupo CD:LGK974, em comparação com os outros grupos. Os dados são expressos como média ± S.E.M.; One-way ANOVA; \* P < 0.05.

A expressão de proteínas relacionadas à via Wnt (β-catenina) e formação de fibrose (α-SMA e TGF-β1) nos implantes foi avaliada por Western Blotting. A expressão da proteína β-catenina, co-fator de transcrição nuclear da via Wnt, foi reduzida significativamente no grupo tratado pelo complexo CD:LGK974, quando comparado aos grupos Controle e CD (Figura 12). Também foi observado uma



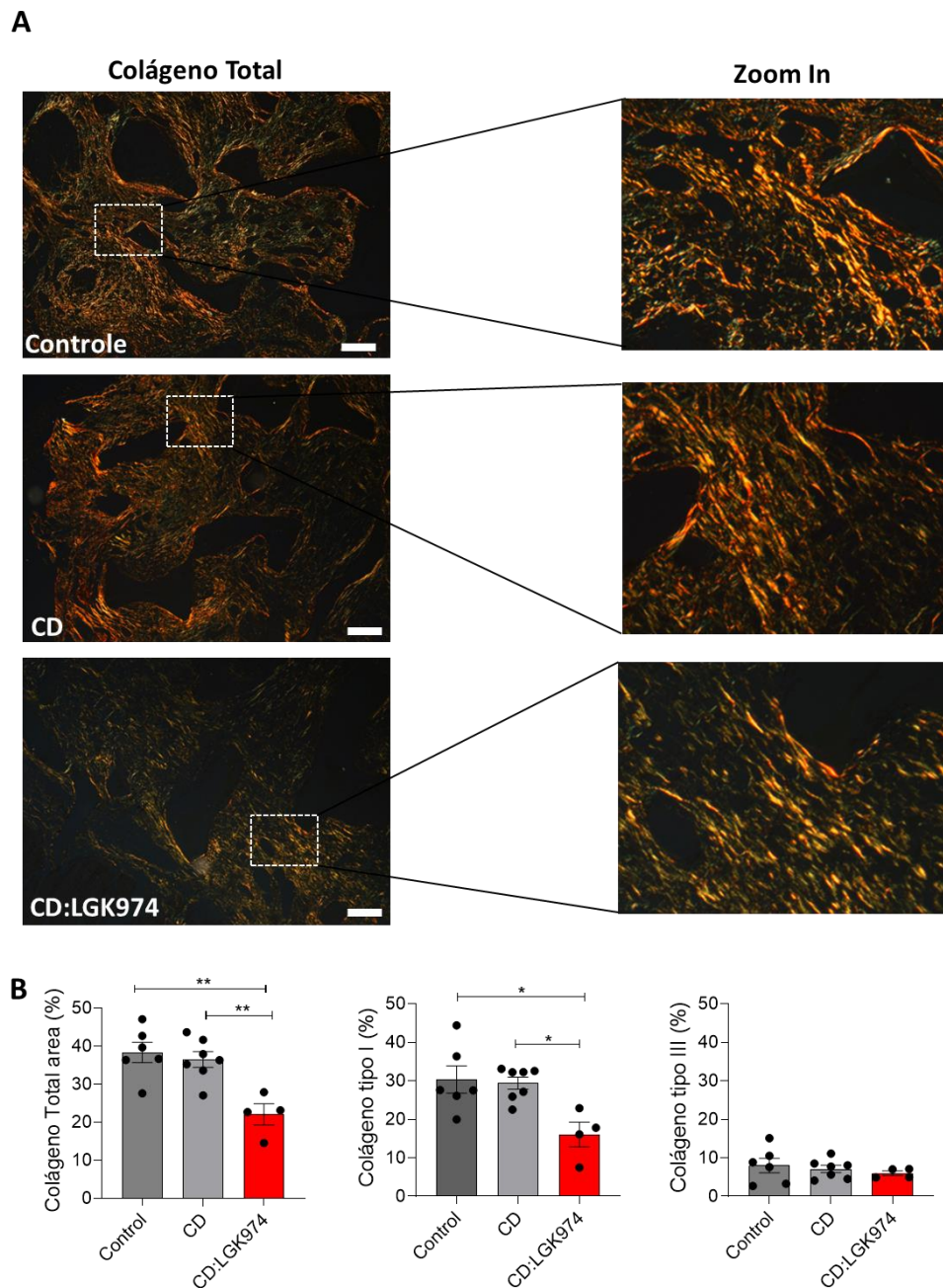
redução da expressão de  $\alpha$ -SMA e TGF- $\beta$ 1 no grupo tratado com CD:LGK974 quando comparado ao grupo CD (Figura 12). Esses resultados mostram que a inibição da via Wnt pelo complexo CD:LGK974 foi efetiva e indicam uma diminuição dos fatores pró-fibróticos, levando à diminuição da deposição de matriz extracelular nos implantes.



**FIGURA 12** Dosagem de proteínas relacionadas à fibrose por Western Blotting - (A) Imagens representativas da análise semiquantitativa por Western Blotting de  $\beta$ -catenina,  $\alpha$ -SMA e TGF- $\beta$ 1 em implantes intraperitoneais normalizados por HSP90. (B) Intensidades de bandas analisadas por Western Blot mostradas em (A), que revelam uma diminuição significativa de  $\beta$ -catenina e uma redução de  $\alpha$ -SMA e TGF- $\beta$ 1 em implantes intraperitoneais. Os dados são média  $\pm$  S.E.M.; One-way ANOVA; \* P < 0,05.

Quando o processo inflamatório é persistente, o processo de reparo do tecido pode ocorrer de forma tardia, ou através da cicatrização, que consiste na substituição do tecido normal por tecido conjuntivo, através da deposição exacerbada de matriz extracelular, como o colágeno. Esse processo é denominado fibrose. O colágeno depositado no processo de fibrose divide-se entre colágeno do tipo III, que é o primeiro colágeno que se deposita, sendo este mais frouxo, e o colágeno do tipo I que é o colágeno mais espesso. Através da análise das lâminas coradas pela técnica de

Picrosirius, foi possível avaliar e quantificar a deposição de colágeno do tipo I (vermelho/alaranjado) e tipo III (verde), que são birrefringentes à luz polarizada. Foi observado uma diminuição significativa da deposição de colágeno total e colágeno tipo I no grupo CD:LGK974 em comparação com os grupos Controle e CD, indicando uma redução considerável da formação de fibrose na matriz do implante. Além disso, observamos que não houve diferença na deposição de colágeno tipo III entre os grupos (Figura 13).

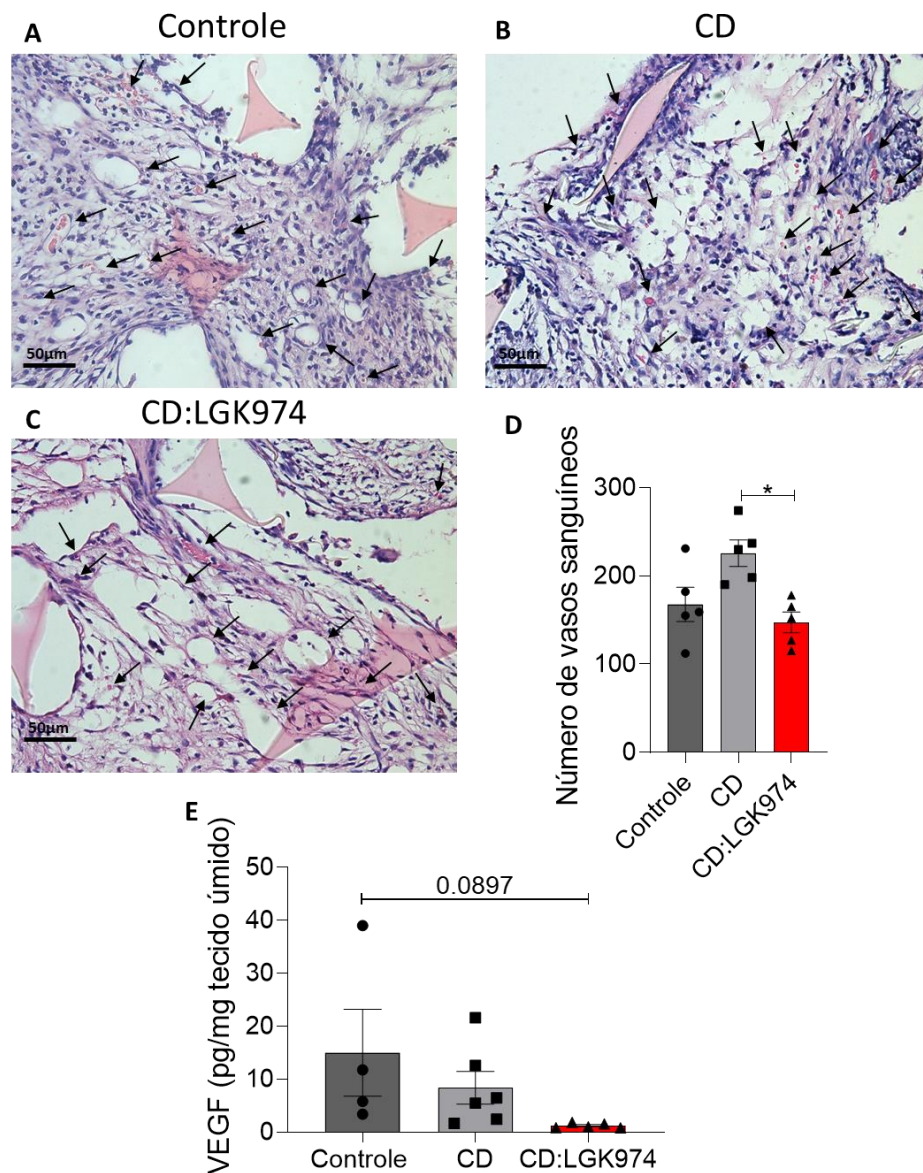


**FIGURA 13** Quantificação da deposição de colágeno no implante - (A) Imagens representativas de colágeno total em zoom, demonstrando as fibras de colágeno tipo I (vermelho/laranja) e as fibras de colágeno tipo III (verde),

em cada grupo. (B) A análise morfométrica da deposição de colágeno mostra uma diminuição significativa da deposição de colágeno total e colágeno do tipo I no grupo CD:LGK974 em comparação com os grupos controle e CD. Os dados são média  $\pm$  S.E.M.; One-way ANOVA; \*  $P < 0.05$ .

## 5.6 Avaliação do perfil angiogênico nos implantes

O processo inflamatório persistente e os estímulos de reparo tecidual levam ao aumento da angiogênese, para o suprimento e nutrição do tecido fibrovascular neoformado (CASTRO, et al., 2012; ANDRADE, et al., 1997). O perfil angiogênico no implante foi investigado através da formação e número de vasos e produção de fatores pró-angiogênicos. Através da análise morfométrica das lâminas coradas por H&E, foi possível avaliar a formação de novos vasos, decorrida após o processo de reparo e a formação de fibrose nos implantes. A análise foi feita através da contagem do número de vasos por campo (15 campos por lâmina), na objetiva de 40X. Através dessa análise foi possível observar uma tendência de redução do número de vasos no grupo CD:LGK974, em comparação com o grupo CD (Figura 14 A-D). Além disso, também foi realizada a dosagem da citocina pró-angiogênica VEGF, uma das mais importantes e críticas no processo de angiogênese, pela técnica de ELISA. O grupo tratado com CD:LGK974 apresentou uma redução na produção da citocina pró-angiogênica VEGF em comparação com os demais grupos, indicando uma redução da formação de novos vasos relacionada à reação de corpo estranho (Figura 14E).

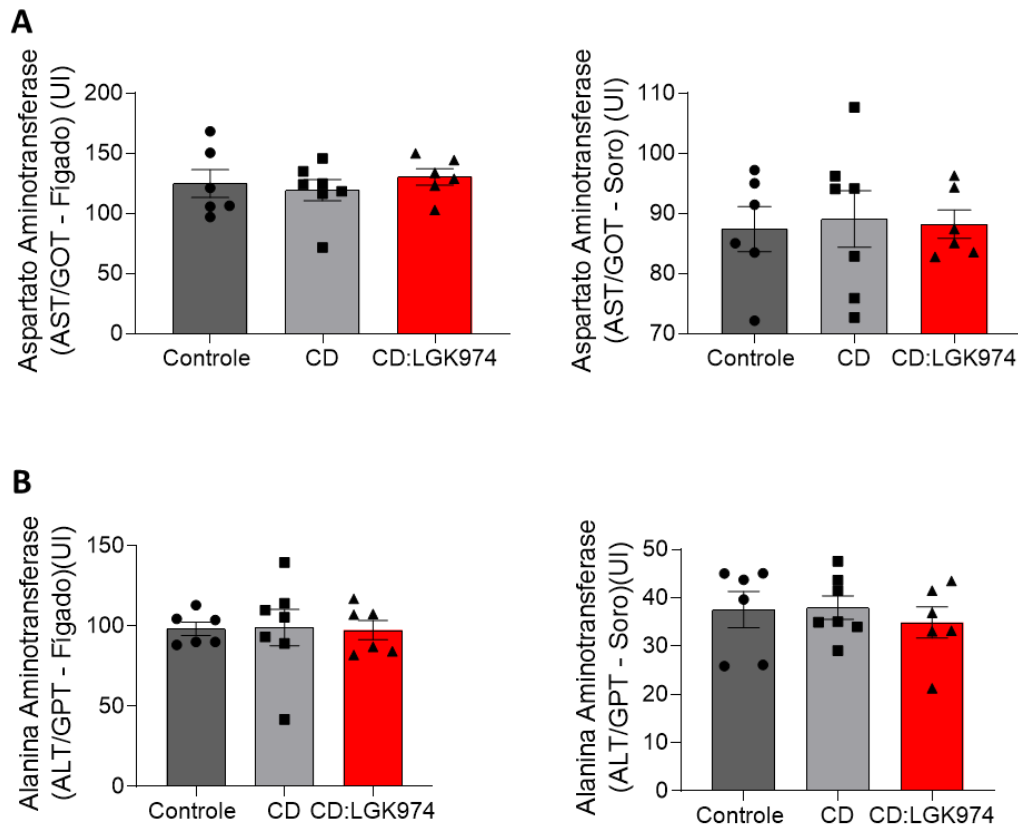


**FIGURA 14. Avaliação de fatores pró-angiogênicos e contagem de vasos** - (A-C) Seções histológicas representativas de implantes corados por H&E após 14 dias de tratamento via oral. (D) A análise morfológica da contagem de vasos formados na matriz do implante mostra uma tendência de diminuição da formação de novos vasos no grupo CD:LGK974 em comparação com os grupos controle e CD. (E) A dosagem de VEGF no implante mostra uma redução no grupo CD:LGK974 em comparação com os grupos controle e CD. Os dados são média  $\pm$  S.E.M.; One-way ANOVA; \* P < 0.05.

### 5.7 Avaliação de função hepática

As transaminases hepáticas são importantes marcadores de dano hepático, que quando alteradas podem indicar alguma toxicidade relacionada ao tratamento. Para avaliar o dano hepático foi realizado no presente trabalho a dosagem de ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase). Essa dosagem foi realizada no soro e fragmentos de fígado dos animais tratados com CD:LGK974 ou

Controle e CD. De acordo com nossos achados, não houve diferença estatística na expressão dessas enzimas entre os grupos, demonstrando a ausência de toxicidade relacionada ao tratamento (Figura 15).



**FIGURA 15 Dosagem de transaminases hepáticas.** Avaliação das transaminases hepáticas no fígado e soro. (A) Aspartato Aminotransferase (AST/GOT) (UI) concentração hepática e concentração sérica. (B) Alanina Aminotransferase (ALT/SGPT) (UI) concentração hepática e concentração sérica. Para ambas as enzimas não houve aumento significativo para os 3 grupos, demonstrando que não houve toxicidade hepática. Os dados são expressos como média  $\pm$  S.E.M.; One-way ANOVA.

## 6 DISCUSSÃO

A aplicação de biomateriais na clínica é extremamente ampla, compreendendo transplante celular, liberação controlada de drogas, substituição de estruturas anatômicas, monitoramento de condições fisiológicas, regeneração tecidual, dentre outros. Todavia, a performance desses biomateriais como implantes é dependente de sua interação com os componentes do sistema imune (VEISEH, et al., 2015). A interação desses biomateriais com o sistema imune se dá a partir do momento da implantação, que causa uma injúria ao tecido. Essa injúria, leva a um processo de inflamação inicial para que ocorra o reparo do tecido lesado, mas que se torna persistente com o passar do tempo, desencadeando um processo conhecido como reação de corpo estranho. Esse processo pode levar a danos ao implante, através da encapsulação do biomaterial por um tecido fibrótico, fazendo com que haja perda de sua função, e ainda podendo causar dor e desconforto ao paciente, sendo necessário a remoção (VEISEH, et al., 2015; FRANZ, et al., 2011). Um exemplo disto é a fibrose peritoneal resultante da diálise peritoneal. A utilização do peritônio como membrana de diálise em doentes em fase terminal de doenças renais é uma forma amplamente utilizada de terapia de substituição em todo o mundo. Contudo, é bastante comum que os doentes em diálise peritoneal sofram do processo de rejeição da membrana, desencadeando fibrose peritoneal e possivelmente levando à morte (TERRI, et al., 2021).

Além disso, outros fatores relacionados ao implante, como o biomaterial utilizado, formato e tamanho podem contribuir para o desenvolvimento da reação de corpo estranho (VEISEH, et al., 2015). Estudos anteriores mostraram que o uso de materiais menos biocompatíveis apresentam maior chance de desencadear reação de corpo estranho (MATLAGA, et al., 1976; WARD, et al., 2002). Foi mostrado também que implantes com formatos mais angulosos, como triângulos e pentágonos, desencadeiam mais reações de corpo estranho, em comparação com implantes em formatos mais arredondados e anatômicos (MATLAGA, et al., 1976; WARD, et al., 2002). Além disso, outros estudos demonstraram que a evolução da reação de corpo estranho está ligada ao tamanho do implante, e observaram também que a cinética das células inflamatórias sobre esferas de diversos biomateriais implantadas, maiores de 1.0mm era mais lenta do que em esferas menores, e por isso havia menos deposição celular sobre a superfície do implante (VEISEH, et al., 2015).

O sítio de implantação também exerce uma grande influência sobre as reações inflamatórias desencadeadas a partir do implante do biomaterial. No caso deste trabalho, sítio intraperitoneal, é possível observar um grande potencial inflamatório, devido à extensa vascularização e a presença do fluido peritoneal possibilitando o rápido recrutamento e grandes quantidades de células inflamatórias como macrófagos e linfócitos para o sítio de inflamação. Além disso, há uma extensa aderência com uma intensa integração dos implantes aos órgãos viscerais adjacentes, que também pode promover a infiltração não somente de células inflamatórias como também de fibroblastos (MENDES, et al., 2007).

Para mais, estudos anteriores relacionam o processo de fibrose com a desregulação de alguns fatores da via Wnt, que apresenta um papel crucial nos processos de proliferação, diferenciação celular e reparo tecidual (BURGY, et al., 2018). A desregulação de fatores envolvidos na via Wnt como proteínas, ligantes, receptores, podem levar ao desenvolvimento de fibrose em diversos órgãos, como coração, pulmão, rim, fígado, pele e peritônio (BURGY, et al., 2018). Nesse contexto, outros estudos propõem que a inibição de algum fator relacionado à via Wnt, como a proteína *porcupine*, responsável pela maturação da molécula Wnt, ou a inibição do receptor de Wnt, podem levar à uma diminuição da formação de fibrose (LIU, et al., 2013; YE, et al. 2018).

Várias abordagens têm sido descritas para avaliação de inflamação, fibrose e angiogênese em implantes, sendo uma delas através da utilização da matriz de poliéter-poliuretano (CAMPOS, et al., 2006; ANDRADE, et al., 1997). A implantação da matriz de poliéter-poliuretano, em diferentes sítios, como intraperitoneal e subcutâneo, é capaz de promover a mimetização da resposta inflamatória e dos estágios do reparo tecidual que acometem um implante (CAMPOS, et al., 2006; ANDRADE, et al., 1997). Essa foi a abordagem experimental utilizada no presente trabalho, no sítio intraperitoneal de camundongos, com o intuito de mimetizar o desenvolvimento da reação de corpo estranho. A fim de avaliar os efeitos da inibição da via Wnt no desenvolvimento da reação de corpo estranho em implantes intraperitoneais utilizamos o complexo CD:LGK974 como estratégia de tratamento. O complexo de inclusão CD:LGK974 foi formado a partir da interação entre ciclodextrina modificada e o fármaco LGK974.

O fármaco LGK974 é uma molécula pequena e um potente bloqueador da parte canônica da via Wnt, levando à redução do acúmulo de  $\beta$ -catenina no citoplasma, que tem sido descrita na literatura principalmente para o tratamento *in vitro* e *in vivo*, por via oral, de alguns tipos de câncer, como carcinoma de pulmão, carcinoma de cólon, hepatocelular, dentre outros tipos, e tem apresentado resultados satisfatórios na redução da proliferação de células cancerosas e na diminuição de tumores (LIU, et al., 2013; GUIMARAES, et al., 2018; YE, et al. 2018). Essa redução do acúmulo da  $\beta$ -catenina no citoplasma, também culmina na redução da translocação nuclear e consequentemente na redução da expressão de genes pró-fibróticos (BURGY, et al., 2018). Por causa disso, foi teorizado no presente trabalho, que a utilização desse potente inibidor após a implantação do biomaterial, poderia levar à diminuição considerável da reação de corpo estranho e da formação de tecido fibrótico sobre o implante.

Por ser uma molécula muito hidrofóbica, o LGK974 apresenta baixa solubilidade em solventes aquosos, apresentando assim baixa biodisponibilidade do fármaco, limitando seu uso clínico, e ainda podendo promover efeitos tóxicos ao organismo após administrado (GUIMARAES, et al., 2018). Entretanto o uso de carreadores, como a ciclodextrina, são capazes de aumentar a solubilidade, facilitar o transporte pelas barreiras biológicas, melhorar a biodisponibilidade e reduzir a toxicidade de fármacos muito insolúveis (STELLA, et al., 1997; WEBBER, et al., 2017; GUIMARAES, et al., 2018). Estudos anteriores propõem que a formação de um complexo de inclusão entre o LGK974 e as ciclodextrinas, promove a melhora da solubilidade e da biodisponibilidade do LGK974 administrado por via oral, além disso, o uso de ciclodextrinas modificadas com grupos funcionais externos como é o caso da SBE- $\beta$ CD podem melhorar a hidrofiliabilidade da ciclodextrina em si, além de promover uma maior força de interação entre as moléculas no complexo CD:LGK974 (GUIMARAES, et al., 2018). Por causa da melhora da biodisponibilidade do LGK974 ao ser complexado com a SBE- $\beta$ CD, foi utilizado no presente trabalho uma dose de 5mg/kg/dia, ao invés da dose usual descrita por diversos autores que é de 10mg/kg/dia, reduzindo assim a possibilidade de toxicidade intestinal causada pelo LGK974, observada em trabalhos anteriores (LIU, et al., 2013; GUIMARAES, et al., 2018). Além disso, no presente estudo, a toxicidade hepática do complexo CD:LGK974 foi avaliada através da dosagem das enzimas AST e ALT, que são



indicadores de dano hepático. Essas dosagens foram realizadas tanto no soro quanto em fragmentos hepáticos, que apresentam de 2 a 3 vezes mais enzimas que no soro. Não foi observado toxicidade significativa tanto no grupo tratado com o complexo CD:LGK974, como nos grupos controle e CD.

Nesse estudo, o desempenho do tratamento com o complexo CD:LGK974, foi avaliado a partir da observação do desenvolvimento da reação de corpo estranho e seus componentes entre os grupos controle, CD e CD:LGK974. Mais especificamente foram avaliados (i) a migração de células mielóides da imunidade inata para o sítio do implante, (ii) a mudança de fenótipo dos macrófagos pró-inflamatórios (M1) para os de perfil pró-fibróticos (M2), (iii) a liberação de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, (iv) a fusão de macrófagos levando ao surgimento de células gigantes, (v) a deposição de fibras de colágeno sobre a matriz do implante, (vi) a formação de cápsula fibrótica, (vii) e o perfil angiogênico, ao redor dos implantes.

O processo inflamatório tem início com a migração de células da linhagem mielóide da imunidade inata, sendo os neutrófilos as primeiras células recrutadas na resposta de qualquer tipo de injúria tecidual. Após a chegada no local, os neutrófilos aderem-se à matriz extracelular provisória ao redor do implante, liberando fatores pró-inflamatórios, como citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), espécies reativas de oxigênio (EROS) enzimas proteolíticas dentre outros (CARNICER-LOMBARTE et al., 2021). Esses fatores irão promover o recrutamento e a diferenciação de monócitos em macrófagos pró-inflamatórios (M1), para que ocorra o processo de fagocitose. A partir disso, os macrófagos residentes iniciam a liberação de mais fatores inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8) para recrutar cada vez mais macrófagos (CARNICER-LOMBARTE et al., 2021). Além disso, o processo de inflamação também leva ao recrutamento das células dendríticas que apresentam uma grande atividade fagocítica quando imaturas, e quando maduras são um importante elo entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa, na indução de respostas de células T, através da apresentação de antígenos e ainda na produção de citocinas (VATNER, et al., 2019; SAID, et al., 2015; GEISSMANN, et al., 2010).

No presente trabalho, a migração de células inflamatórias foi observada e avaliada através de uma análise qualitativa histológica do infiltrado inflamatório para o implante e score inflamatório, que mostrou uma redução do número de células

inflamatórias que migraram para o implante no grupo CD:LGK974. Além disso, através da dosagem da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , crucial na ativação clássica dos macrófagos pró-inflamatórios (M1), observou-se que o grupo CD:LGK974 apresentou uma redução dos níveis de TNF- $\alpha$  em comparação com os grupos controles e CD, sugerindo uma redução do infiltrado inflamatório para a matriz do implante. Esses achados corroboram com a avaliação da migração de células da imunidade inata de linhagem mielóide para a matriz do implante, que foi realizada através da técnica de citometria de fluxo. Através dessa técnica foi possível observar uma redução da migração de neutrófilos (CD11b+,F4/80-,Gr-1+), monócitos (CD11b+,F4/80high,Gr-1-), macrófagos (CD11b+,F4/80+,Gr-1+), células dendríticas (CD11c+), células dendríticas ativadas (CD11c+,IA-IE+) e das células de fenótipo M2, no grupo tratado com o complexo CD:LGK974, em comparação com os demais grupos. As células de fenótipo M2 foram marcadas com CD206 que é um receptor de manose, geralmente superexpresso nesse tipo celular (SHAPOURI-MOGHADDAM. et al. 2018). Para mais, alguns outros fatores poderiam ser avaliados para uma melhor definição desse fenótipo dentre as demais células, como por exemplo: Arginase-1, iNOS, IL-10, e IL-12. Esses achados indicam uma eficácia do complexo na redução dos processos inflamatórios causados pelo implante de poliéter-poliuretano no sítio intraperitoneal.

Com a falha na resolução do reparo tecidual, a inflamação torna-se crônica, levando a liberação de fatores anti-inflamatórios como IL-10, IL-3, IL-4 dentre outros, que irão reduzir o processo inflamatório e culminar na ativação alternativa dos macrófagos resultando na mudança de fenótipo dos macrófagos, de perfil pró-inflamatório (M1), para macrófagos com perfil pró-fibrótico (M2). Esse processo é realizado com a finalidade de promover o reparo através da cicatrização do tecido lesionado. Os macrófagos de perfil M2 promovem a liberação de TGF- $\beta$ 1, recrutando assim os fibroblastos que irão se aderir ao local e promover a deposição de matriz extracelular promovendo assim a fibrose e encapsulação do corpo estranho (RYSZER, T. 2015; CARNICER-LOMBARTE et al., 2021). Além disso, com o processo de cronificação da inflamação devido à falha na resolução do reparo tecidual e o aumento do recrutamento de macrófagos, há o surgimento de um componente característico da reação de corpo estranho resultante da fusão desses macrófagos, que é a célula gigante. As células gigantes são células multinucleadas com capacidade de fagocitar partículas muito maiores (>10  $\mu$ m) que um fagócito normal

(CARNICER-LOMBARTE et al., 2021). Por causa da importância desse componente, avaliamos o número dessas células nos grupos, através da contagem do número de células gigantes em lâminas de implantes coradas por H&E. Através da análise foi possível observar que o grupo CD:LGK974 apresentou uma redução significativa no número de células gigantes comparado aos grupos controle e CD, corroborando com os dados de migração de células inflamatórias e indicando uma redução dessas células, principalmente os macrófagos para a matriz do implante.

Além disso, o aumento de macrófagos pró-fibróticos (M2) durante a cronificação da inflamação induzem uma exacerbação na deposição de colágeno e desenvolvimento do processo de fibrose no implante. Os macrófagos pró-fibróticos (M2), levam ao aumento da produção de citocinas como TGF- $\beta$ 1, que irão promover o recrutamento dos fibroblastos para a matriz do implante e a sua ativação para miofibroblastos. Essas células após ativadas irão promover a deposição de matriz extracelular protéica, como o colágeno, levando a formação de uma cápsula fibrótica sobre o implante (CARNICER-LOMBARTE et al., 2021). Como visto anteriormente, essa progressão do processo de fibrose está relacionada à desregulação de alguns fatores da via Wnt, como por exemplo ao acúmulo de  $\beta$ -catenina levando ao aumento da expressão de genes e fatores pró-fibróticos como o TGF- $\beta$ 1 por exemplo (BURGY, et al., 2018). Para avaliar essa relação da desregulação de alguns fatores da via com o aumento da fibrose nos implantes, realizamos a dosagem de alguns fatores diretamente envolvidos no processo de formação de fibrose. Os fatores dosados foram TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ -catenina e a proteína  $\alpha$ -SMA, que está relacionada diretamente a ativação de fibroblastos em miofibroblastos, que promovem a deposição de matriz extracelular no implante. Foi observado uma diminuição significativa da  $\beta$ -catenina no grupo tratado com CD:LGK974 em comparação com os grupos controle e CD, sugerindo que o tratamento promoveu a inibição da via Wnt. Além disso, também foi possível observar uma tendência de diminuição de TGF- $\beta$ 1 e  $\alpha$ -SMA, no grupo tratado com o complexo CD:LGK974 em comparação com os grupos Controle e CD. Embora a redução de TGF- $\beta$ 1 e  $\alpha$ -SMA não tenham apresentado significância estatística, a sua tendência de diminuição sugere que a inibição da via Wnt foi eficaz, e que a redução desses fatores poderiam ser mais significativos com um aumento da dose do complexo administrado. Esses achados sugerem que a inibição da via Wnt pelo

complexo CD:LGK974 leva à uma redução de fatores pró-fibróticos e consequentemente da deposição de colágeno no implante.

Para a avaliação da deposição de colágeno sobre a matriz do implante e o desenvolvimento de fibrose, foi realizada uma avaliação histológica qualitativa, score fibrótico, da deposição de fibras de colágeno pela matriz do implante, e além disso também realizamos a dosagem da citocina pró-fibrótica TGF- $\beta$ 1, liberada pelos macrófagos para o recrutamento e ativação dos fibroblastos (CARNICER-LOMBARTE et al., 2021). Através dessas análises foi possível observar que houve uma diminuição significativa tanto na deposição das fibras de colágeno na matriz do implante, quanto na produção de TGF- $\beta$ 1 no grupo tratado CD:LGK974 em comparação com os grupos Controle e CD. Essa redução indica uma diminuição expressiva do recrutamento e ativação de fibroblastos para o sítio do implante, reduzindo assim a deposição de matriz extracelular no local e consequentemente o processo de fibrose. Além disso, para avaliar o processo de fibrose pela deposição do colágeno e os diferentes tipos de colágenos (I e III), foi realizada uma análise histológica onde as lâminas dos grupos foram coradas pela técnica de Picrosirius. Essa técnica possibilita a visualização dos tipos de colágeno sendo o colágeno do tipo I, composto por fibras mais espessas e presente nas fases mais tardias do processo de cicatrização, que apresentam uma coloração avermelhada/alaranjada e o colágeno do tipo III, composto por fibras mais finas e frouxas e presente na fase inicial do processo de cicatrização, apresentando coloração esverdeada, depositados pela matriz do implante sob luz polarizada (DIEGELMANN, 1997; MEDEIROS, et al., 2016). Aliada à essa técnica, foi feita a avaliação quantitativa do colágeno depositado, o que mostrou que o grupo CD:LGK974 apresentou uma redução significativa na deposição de colágeno total, e de colágeno do tipo I, em relação aos demais grupos. Essa diminuição da deposição de colágeno sobre o implante sugere que a inibição da via Wnt também leva à redução da progressão do processo de fibrose em si. Demonstrando ser uma estratégia importante para o tratamento da fibrose peritoneal, tal como a diálise peritoneal em pacientes em fase terminal de doença renal.

A formação do tecido fibrovascular decorrente do processo inflamatório desencadeado pelo implante do biomaterial, leva a liberação de fatores pró-angiogênicos como o VEGF e PDGF. Esses fatores são liberados após estímulos de

anóxia e irão agir na formação de novos vasos no local. Esses vasos recém-formados terão a função de nutrir o tecido circundante e permitir a migração de células inflamatórias participantes do processo de encapsulação e o isolamento completo do biomaterial (CASTRO, et al., 2012; CAMPOS, et al., 2006; CARNICER-LOMBARTE, et al., 2021; MARIANI, et al., 2019). Por ser um processo importante na resolução do processo de reparo e fibrose, avaliamos alguns parâmetros angiogênicos no presente trabalho. Para avaliar a formação de novos vasos, foi dosada a citocina pró-angiogênica VEGF entres os grupos, além disso, através de uma análise histológica em lâminas coradas por H&E, foi possível realizar a contagem do número de vasos por campo, entre os grupos. Com isso, foi possível observar que o grupo CD:LGK974 apresentou uma redução acentuada tanto nos níveis de VEGF, como no número de vasos, em comparação com os grupos Controle e CD. Em conjunto, esses dados sugerem que houve uma redução do processo inflamatório e da formação de tecido fibrovascular nos implantes, que podem ter culminado em uma redução de estímulos de anóxia, levando à redução da liberação de fatores pró-angiogênicos e também da formação de novos vasos, ao redor do implante.

Os achados deste trabalho mostraram que a abordagem experimental usando a matriz de poliéter-poliuretano como implante no sítio intraperitoneal foi extremamente útil para avaliação das respostas inflamatórias, fibrogênicas e angiogênicas após tratamento com complexo CD:LGK974, que atua na inibição da via Wnt. O tratamento com o complexo CD:LGK974 durante 14 dias, demonstrou efeitos importantes na redução do processo inflamatório que desencadeia a reação de corpo estranho frente ao biomaterial implantado.

## **7 CONCLUSÃO**

- O tratamento com CD:LGK974 promoveu a redução do processo inflamatório através da redução da liberação da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , o que levou a redução do infiltrado inflamatório e conseqüentemente à redução do recrutamento de células da imunidade inata de linhagem mielóide, para o implante.

- O tratamento com CD:LGK974 também promoveu a redução da formação de células gigantes, resultantes da fusão de macrófagos, no sítio do implante.
- O tratamento com CD:LGK974 promoveu a redução da progressão do processo de fibrose, através da inibição da via Wnt, além da redução de fatores pró-fibróticos como  $\alpha$ -SMA e TGF- $\beta$ 1. Além disso, também promoveu a redução da liberação da citocina pró-fibrótica TGF- $\beta$ 1, redução do recrutamento e ativação dos fibroblastos e consequentemente a redução da deposição de matriz extracelular na matriz do implante.
- O tratamento com o complexo CD:LGK974 também mostrou uma redução no processo de angiogênese através da redução na liberação da citocina pró-inflamatória VEGF e no número de novos vasos formados.
- Essa abordagem experimental demonstra um potencial valor no estudo e investigação do processo de reparo e seus componentes. Além disso, o presente estudo demonstra o potencial do complexo de inibição da via Wnt na redução de processos inflamatórios, fibrogênicos e angiogênicos, demonstrando ser uma ferramenta com grande potencial futuro de utilização no tratamento clínico de processos de rejeição à implantes de biomateriais diversos no sítio intraperitoneal.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZAHRANI, K. et al. Polyurethane versus silicone port a cath: What's going on at removal? **Journal of Pediatric Surgery**. v. 53, N°. 7, p. 1417-1419, 2018.

ANDERSON, J. M. et al. Foreign Body Reaction to Biomaterials. **Seminars in Immunology**. v. 20, N°. 2, p. 86-100, 2008.

ANDRADE, S. P. et al. Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. **Microvascular Research**. v. 54, N°. 3, p. 253-261, 1997.

BOSE, S. et al. A retrievable implant for the long-term encapsulation and survival of therapeutic xenogeneic cells. **Nature Biomedical Engineering**. v. 4, N°. 8, p. 814-826, 2020.

BURGY, O. ; KÖNIGSHOFF, M. The Wnt signaling pathways in wound healing and fibrosis. **Matrix Biology**. v. 68-69, p. 67-80, 2018.

CAMPOS, P. P. et al. Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. **Histology and Histopathology**. v. 21, N°. 10-12, p. 1263-1270, 2006.

CANNY, J. A Computational Approach to Edge Detection, **IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.** v. PAMI-8, p. 679–698, 1986.

CARNICER-LOMBARTE, A. et al. Foreign Body Reaction to Implanted Biomaterials and Its Impact in Nerve Neuroprosthetics. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. v. 9, p. 1-22, 2021. **Journal of Urology**. v. 157, N°. 1, p. 298-302, 1997.

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.

DIEGELMANN, R. F. Cellular biochemical aspects of normal and abnormal wound healing: An overview.

DUXBURY, P. ; HARVEY, J. Systematic review of the effectiveness of polyurethane-coated compared with textured silicone implants in breast surgery. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**. v. 69, N° 4, p. 452-460, 2016.

FRANZ, S. et al. Immune responses to implants - A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. **Biomaterials**. v. 32, N° 28, p. 6692-6709, 2011.

GEISSMANN, M. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**. v. 327, N° 5966, p. 656-661, 2010.

GUEDES, F. D. L. et al. Cyclodextrins: as a technological adjuvant to improve drug's bioavailability. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 89, N° 3, p. 220-225, 2008.

GUIMARAES, P. et al. Potent in vivo lung cancer Wnt signaling inhibition via cyclodextrin-LGK974 inclusion complexes. **Journal of Controlled Release**. v. 290, N° 10, p. 75-87, 2018.

HE, J. et al. Strategies for extended lifetime of implantable intraperitoneal insulin catheters. **Journal of Controlled Release**. v. 341, N° 11, p. 487-497, 2022.

JUNG, Y. PARK, J. Wnt signaling in cancer: therapeutic targeting of Wnt signaling beyond  $\beta$ -Catenin and the destruction complex. **Experimental & Molecular Medicine**. v. 52, p. 183-191, 2020.



JUNQUEIRA, L.C.U.; et al. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem. J.** v. 11, p. 447–455, 1979.

KOHANE, D. S. ; LANGER, R. Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering. **International Pediatric Research Foundation, Inc.** v.63, N°. 5, p. 487-491, 2008.

KUMAR, V. et al. Robbins & Cotran: Basic Pathology. **Elsevier.** ed. 9°, cap. 2, 2016.

LANNA, M. F. et al. Kinetics of Phenotypic and Functional Changes in Mouse Models of Sponge Implants:Rational Selection to Optimize Protocols for Specific Biomolecules Screening Purposes. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.** v. 8, N° 12, p. 1-15, 2020.

LAURANO, R. et al. Dual stimuli-responsive polyurethane-based hydrogels as smart drug delivery carriers for the advanced treatment of chronic skin wounds. **Bioactive Materials.** v. 6, N°. 9, p. 3013-3024, 2021.

LIU, J. et al. Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. **PNAS.** v. 10, N°. 50, p. 20224-20229, 2013.

MARIANI, E. et al. Biomaterials: Foreign bodies or tuners for the immune response? **International Journal of Molecular Sciences.** v. 20, N° 3, p. 1-42, 2019.

MATLAGA, B. et al. Tissue response to implanted polymers: The significance of sample shape. **Journal of Biomedical Materials Research.** v. 10, N°. 3, p. 391-397, 1976.

MEDEIROS, A. et al. Healing of surgical wounds. **Journal of Surgical and Clinical Research.** v. 7, N°. 2, p. 87-102, 2017.

MENDES, J. et al. Host response to sponge implants differs between subcutaneous and intraperitoneal sites in mice. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 83, N°. 2, p. 408-415, 2007.

NOSKOVICOVA, N. et al. Implant fibrosis and the underappreciated role of myofibroblasts in the foreign body reaction. **Cells**. v. 10, N°.10, p. 1-26, 2021.

NUSSE, R. ; CLEVERS, H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. **Cell**. v. 169, N°. 6, p. 985-999, 2017.

OTSU, N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. **IEEE Trans. Syst. Man. Cybern.** v. 9, p. 62–66, 1979.

PEREIRA, L. X. et al. Synthetic matrix of polyether-polyurethane as a biological platform for pancreatic regeneration. **Life Sciences**. v. 176, p. 67-64, 2017.

PIRES, A. L. R. et al. Biomaterials: Types, Applications and Market. **Química Nova**, v. 38, N°. 7, p. 957-971, 2015.

PONTES, G. et al. Reduced Remodeling Biomarkers Tissue Expression in Nanotextured Compared with Polyurethane Implants Capsules: A Study in Rats. **Aesthetic Surgery Journal**. v. 41, N°. 6, p. 664-683, 2021.

RATNER, B. D. et al. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. **Society for Biomaterials (SFB)**, cap. 1, p. 1-21, 1996.

RYSZER, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. **Mediators of Inflammation**. v. 2015, p. 1-17, 2020.

SAID, A. ; WEINDL, G. Regulation of Dendritic Cell Function in Inflammation. **Journal of Immunology Research**. v. 2015, p. 1-15, 2015.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A. et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**. v. 233, N° 9, p. 6425-6440, 2018.

SCHNEIDER, H.J. et al. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes, **Chemical Reviews**. v.98, p.1755-1785, 1998.

SHRIVASTAVA, R. ; SHUKLA, N. Attributes of alternatively activated (M2) macrophages. **Life Sciences**. v. 224, N° 3, p. 222-231, 2019.

STELLA, V. ; RAJEWSKI, R. Cyclodextrins: Their future in drug formulation and delivery. **Pharmaceutical Research**. v. 14, N°. 5, p. 556-567, 1997.

SZEJTLI, J. Medicinal Applications of Cyclodextrins. **Medicinal Research Reviews**. v. 14, N°. 3, p. 353-386, 1994.

TERRI, M. et al. Mechanisms of Peritoneal Fibrosis: Focus on Immune Cells–Peritoneal Stroma Interactions. **Frontiers in Immunology**. v. 12, N°. 3, p. 1-17, 2021.

TIRRELL, D. A.; LANGER, R. Designing materials for biology and medicine. **Nature**, v. 428, N°. 6982, p. 487-492, 2004.

VAN ROSSUM, G. **Python tutorial**. v. May 1995. CWI Rep., p. 1–65, 1995.

VATNER, R. ; JANSSEN, E. STING, DCs and the link between innate and adaptive tumor immunity. **Molecular Immunology**. v. 110, N° 12/2017, p. 13-23, 2019.

VEISEH, O. et al. Size-and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates. **Nature Materials**. v. 14, N° 5, p. 643-652, 2015.

WARD, W. et al. The effect of microgeometry, implant thickness and polyurethane chemistry on the foreign body response to subcutaneous implants. **Biomaterials**. v. 23, N°. 21, p. 4185-4192, 2002.

WEBBER, M. J. ; LANGER, R. Drug delivery by supramolecular design. **Chemical Society Reviews**. v. 46, N°. 21, p. 6600-6620, 2017.

YE, F. et al. Wnt / $\beta$ -Catenin - Promoted Macrophage Alternative Activation Contributes to Kidney Fibrosis. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 29, p. 182-193, 2018.

YU, X. et al. Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. **Advanced Healthcare Materials**. v .4, N°. 9, p. 1268-1285, 2015.

## 9 ANEXOS

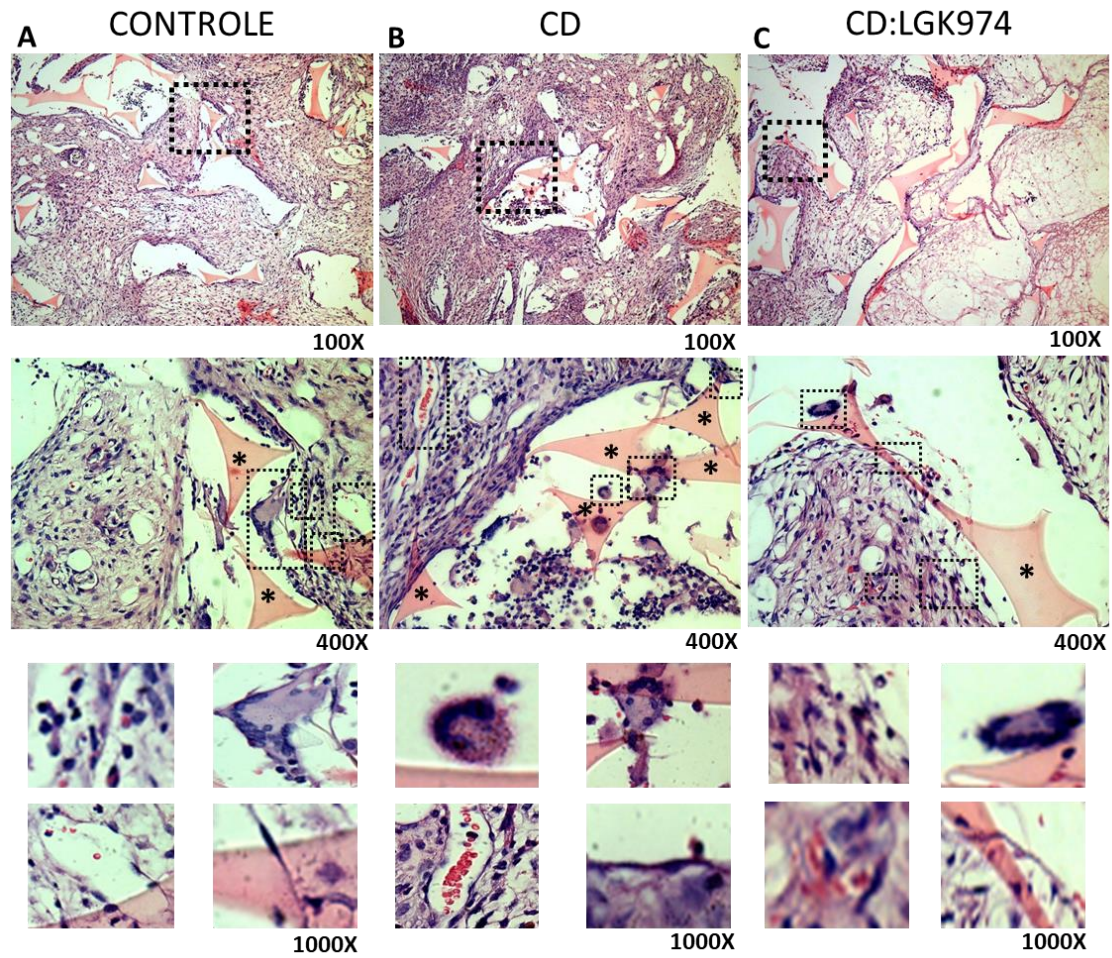
**TABELA 1. Anticorpos usados na citometria de fluxo.**

<b>Antígeno</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clone</b>	<b>Empresa</b>
LIVE/DEAD	Acqua		Thermo Fisher
Streptavidin	Pacific Orange		Thermo Fisher

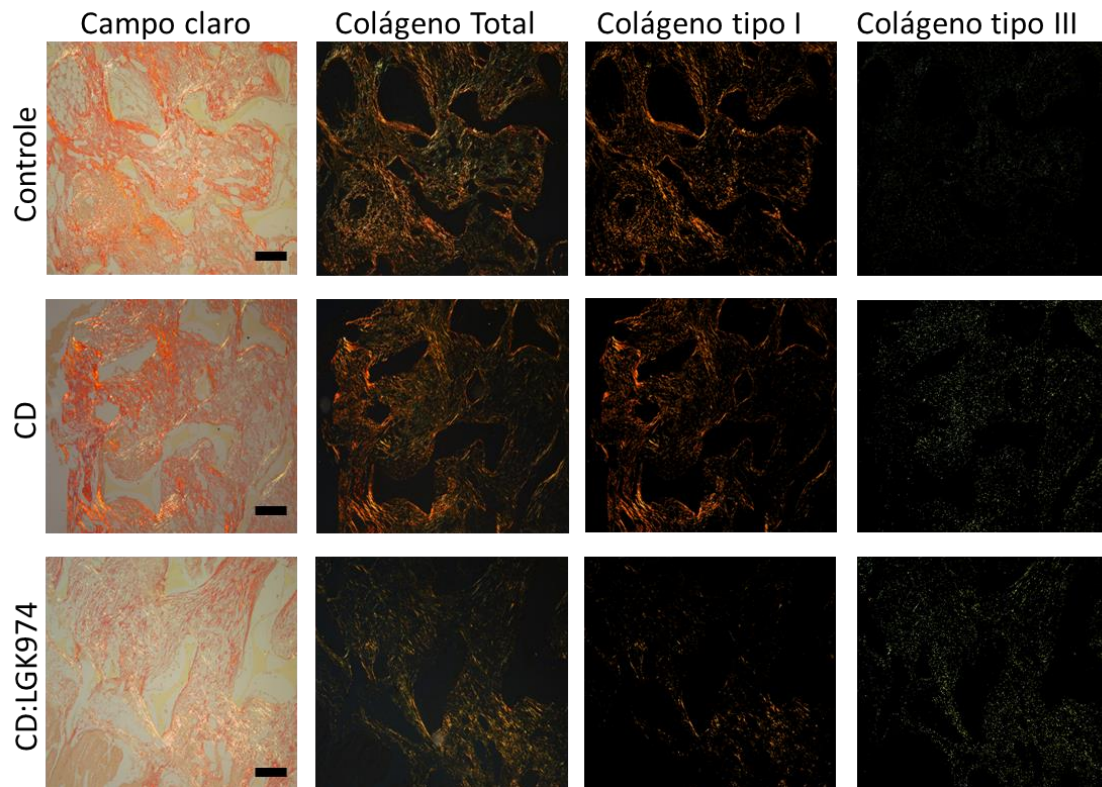
CD45	Super Bright 600	30-F11	Thermo Fisher
CD45.2	PerCP-Cy5.5	104	Thermo Fisher
CD11b	SuperBright 600	M1/70	Thermo Fisher
F4/80	APC	BM8	Thermo Fisher
Gr-1	Biotina	RB6-8C5	Thermo Fisher
CD206	FITC		Thermo Fisher
CD11c	SuperBright 645	N418	Thermo Fisher
IA-IE	APC-Efluor 780	M5/114.15.2	Thermo Fisher

---

## ANEXO 1 – Figura Suplementar 1



**FIGURA SUPLEMENTAR 1.** Morfometria em H&E - (A-C) Imagens representativas dos grupos: Controle (A), CD (B) e CD:LGK974 (C), dos componentes analisados (células inflamatórias, células gigantes, vasos e fibroblastos) pela morfometria das lâminas em H&E.

**ANEXO 2 – Figura Suplementar 2**

**FIGURA SUPLEMENTAR 2. Quantificação da deposição de colágeno no implante - (A)** Seções histológicas representativas de implantes corados por Picrosirius-Red para deposição de colágeno em campo claro e campo escuro (total, tipo I e tipo III) quantificação por luz polarizada após 14 dias de tratamento oral.

## ANEXO 3 – Artigo Submetido

### Oral formulation of Wnt inhibitor complex reduces inflammation and fibrosis in intraperitoneal implants in vivo

Ana Luíza de Castro Santos<sup>1</sup>, Natália Jordana Alves da Silva<sup>1</sup>, Celso Tarso Rodrigues Viana<sup>1</sup>, Letícia Cristine Cardoso dos Santos<sup>3</sup>, Gabriel Henrique Costa da Silva<sup>1</sup>, Sérgio Ricardo Aluotto Scalzo<sup>1</sup>, Pedro Augusto Carvalho Costa<sup>1</sup>, Itamar Couto Guedes de Jesus<sup>1</sup>, Frédéric Frézard<sup>1</sup>, Sílvia Guatimosim<sup>1</sup>, Sílvia Passos Andrade<sup>1</sup>, Rebecca M. Haley<sup>2</sup>, Michael J. Mitchell<sup>2</sup>, Paula Peixoto Campos<sup>3</sup>, Pedro Pires Goulart Guimaraes<sup>1#</sup>.

<sup>1</sup> Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil;

<sup>2</sup> Department of Bioengineering, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, United States

<sup>3</sup> Department of Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil;

#Corresponding author at: Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, 31270-901, Brazil.

#### Abstract

The use of implantable biomaterials to replace physiological and anatomical functions has been widely investigated in the clinic. In this regard, the selection of biomaterials capable of interacting with biological systems is crucial for long-term function of the implant. The implantation of the biomaterial in the body can lead to the development of inflammatory and fibrotic processes triggering a foreign body reaction, that leads to loss of function and its consequent need for removal. Wnt signaling is a pathway involved in the human body's healing process, and its dysregulation results in inflammation and fibrosis, such as in the peritoneal fibrosis. Here, we assessed the effects of oral administration of a Wnt pathway inhibitor complex (CD:LGK974) to reduce the inflammatory, fibrotic and angiogenic processes in intraperitoneal implants. CD:LGK974 significantly reduced immune cells and inflammatory cytokines in the implant region compared to the control groups. Furthermore, CD:LGK974 inhibited the collagen deposition and reduced the expression of  $\alpha$ -SMA, and TGF- $\beta$ 1, confirming the fibrosis reduction. Finally, CD:LGK974 complex decreased the number of blood vessels formed and VEGF levels, suggesting decreased angiogenesis. Thus, our work



introduces a potentially new application of the Wnt inhibitor complex to reduce peritoneal fibrosis and rejection of implants in the intraperitoneal site.

### **Keywords**

Biomaterials, Polyether-polyurethane, Foreign body reaction, Fibrosis, Wnt pathway, LGK974.

### **Introduction**

The use of implantable biomaterials to replace physiological and anatomical functions has been widely investigated in the clinic (RATNER, et al., 1996; PIRES, et al., 2015). According to their function, the biomaterials used as implants can be developed from different materials such as synthetic polymers: polyethylene (PE), polyglycolic acid (PGA), polylactic acid (PLA), poly(lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA), polyether-polyurethane; natural polymers: hyaluronic acid, chitosan; silicon, hydrogels, ceramics, nanofibers, alginate, and different types of metal such as silver, platinum, and others (YU, X, et al., 2015; KOHANE, et al., 2008). However, the implant rejection due to foreign body reaction still represents a significant issue and limitation for clinical use, which often results in implant removal (VEISEH, et al., 2015; BOSE, et al., 2020; HE, et al., 2022). The implantation of the biomaterial in the body can lead to the development of inflammatory and fibrotic processes that trigger a reaction known as a foreign body reaction (FRANZ, et al., 2011).

The polyether-polyurethane synthetic matrix model is used to mimic inflammatory, fibrogenic, and angiogenic responses present during the repair process, and in the foreign body reaction triggered after biomaterial implantation (CAMPOS, et al., 2006; CASTRO et al., 2012; PEREIRA, et al., 2017). This synthetic matrix consists of an acellular and avascularized polymeric structure, which allows the infiltration of inflammatory cells, formation of fibrotic tissue, and neovascularization (CAMPOS, et al., 2006). Moreover, polyurethane is a biomaterial widely used in the clinic, found in catheters, silicone prostheses, controlled drug release systems, among others (DUXBURY, et al., 2016; ALZHRANI, et al., 2018; LAURANO, et al., 2021; PONTES, et al., 2021). In this sense, this implant model can be used at different sites, such as the intraperitoneal region, to assess the processes triggered after the implantation of a biomaterial in the body. (CAMPOS et al., 2006; MENDES, et al., 2007). Peritoneal fibrosis is a common pathological event found in more than 50% of patients with peritoneal implants, such as dialysis catheter or membrane (TERRI, et al., 2021).

Under conditions of tissue damage, the immune system acts to promote repair of the site that has been damaged by some agent (KUMAR, et al., 2016). The implantation of biomaterials, biodevices or prostheses, can lead to an inflammatory and fibrotic process,

through the development of a foreign body reaction. (CARNICER-LOMBARTE, et al., 2021). This process begins at the moment of the injury to receive the implant, triggering a continuous inflammatory process (acute phase). Following, the next stage of the fibrosis process (chronic phase) promotes the encapsulation and isolation of the implant from the rest of the body to induce a repair of the injured tissue (CARNICER-LOMBARTE et al., 2021; NOSKOVICOVA et al., 2021). This process can damage the integrity of the implant and result in consequent need for removal (CARNICER-LOMBARTE et al., 2021; NOSKOVICOVA et al., 2021). Some signaling pathways, including the Wnt pathway, play a crucial role in tissue repair (BURGY, et al., 2018). On the other hand, dysregulation in the Wnt signaling can lead to fibrosis among other diseases (BURGY, et al., 2018).

The Wnt pathway is divided into two branches: 1) the canonical ( $\beta$ -catenin-dependent) component, which primarily regulates cell proliferation and therefore tissue repair, and 2) the non-canonical ( $\beta$ -catenin-independent and calcium-dependent), which promotes the regulation of cell polarity and movement (BURGY, et al., 2018; JUNG, et al., 2020). Recent studies showed that Wnt signaling inhibition improves treatment of diseases, such as cancer and fibrosis (JUNG, et al., 2020). In this regard, LGK974 is a small molecule in phase II clinical trials (NCT01351103) by Novartis, which acts as an inhibitor of the porcupine protein and promotes Wnt ligand maturation (JUNG, et al., 2020).

In terms of physicochemical characteristics, LGK974 presents very low solubility, which limits its use. As it is administered orally, its low solubility makes it difficult to develop formulations for oral administration and limits bioavailability. Recently, our group demonstrated that LGK974 complexation with cyclodextrins (CD) can improve solubility, stability, bioavailability, and minimize toxicity in the gastrointestinal tract (GUIMARÃES, et al., 2018). Cyclodextrins (CD) are naturally cyclic oligosaccharides that can differ in size according to the number of glycoside monomers, ranging from 6 ( $\alpha$ -cyclodextrins) (6), 7 ( $\beta$ -cyclodextrins), and 8  $\gamma$ -cyclodextrins) (STELLA, et al., 1997; SZEJTLI, et al., 1994). They have a conical shape, a hydrophobic cavity, and a hydrophilic external part. Because of these characteristics, cyclodextrins can interact with a wide range of substances, forming, for example, host-guest inclusion complexes through weak van der Waals-type interactions between the drug and the hydrophobic cavity, and other types of interactions on their external part. (STELLA, et al., 1997; SZEJTLI, et al., 1994; GUEDES, et al., 2008).

Herein, we investigated the use of the complex (CD:LGK974) to reduce inflammatory, fibrotic and angiogenic processes in intraperitoneal implants of polyether-polyurethane in vivo. The Wnt pathway inhibition complex is formed by sulfobutyl-ether- $\beta$ -cyclodextrin-modified cyclodextrin ( $\beta$ SBECD) and the insoluble drug LGK974 (CD:LGK974). Thus, we hypothesized

that the orally administered CD:LGK974 complex can reduce the foreign body reaction and prevent fibrosis formation in intraperitoneal implants through inhibition of the Wnt pathway.

## **Material and methods**

**Preparation of CD:LGK974 inclusion complex.** Inclusion complexes between LGK974 and  $\beta$ SBECD were obtained by the freeze-drying technique considering the CD:drug molar ratio of 10:1. LGK974 and  $\beta$ SBECD were dispersed in Milli-Q water, and the suspension was stirred at room temperature on a magnetic stirrer (IKA- CMAGHS7), followed by pH adjustment to ~4-5 using a 0.1N HCl solution, or until complete solubilization of the mixture. This mixture was kept under stirring at room temperature for 2-4 hours. Subsequently, the solution was lyophilized, and the obtained powder was stored in a freezer at -20 C° (GUIMARAES et al., 2018).

**2D-NMR.** The confirmation of the CD:LGK974 complex formation was performed using 2D nuclear magnetic resonance (-2D-NMR). Briefly, CD:LGK974 complex was dissolved in D<sub>2</sub>O (concentration: ~15mg/mL), and then 2D 'H' Nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY, with mixing time of either 400 or 650 ms, 250 FID) was performed. CD:LGK974 complexation and structure were determined through the correlation of proton cross-peaks observed between CD (-CH-, 3-4.2 ppm) and LGK974 (aromatic -CH-, 7.7-9.2 ppm) (GUIMARAES et al., 2018).

**Animal model.** Male C57BL/6 mice aged 8 to 12 weeks (25-30g), obtained from the Central Animal Facility of UFMG, were used (total N=68). The animals were kept throughout the treatment period in the vivarium of the Department of Physiology, Institute of Biological Sciences (ICB/UFMG), in-unit cages, ventilated racks with microisolators, under a 12-hour light/dark cycle, with feed (NUVILAB CR-1 Brazil) and water *ad libitum* for 14 days. The protocols for animal experimentation were approved by the Ethics Committee at the Federal University of Minas Gerais (CEUA/UFMG) (Protocol No. 282/2018). All procedures were performed following the standards established in the guidelines and policies of the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

**Preparation of sponge discs, implantation, and treatment.** Disc-shaped synthetic matrix of polyether-polyurethane (Vitafoam Ltd., Manchester, UK) containing 5 mm thick by 8 mm diameter were used as peritoneal implants (Fig 1C). Implants were soaked in 70% (v/v) alcohol until sterilized in boiling distilled water for 30 min before implantation. (ANDRADE, et al., 1987). Mice were anesthetized through intraperitoneal injection of Ketamine (60mg/kg) and Xylazine (10mg/kg). After ventrally hair removal, the aseptic technique was performed using ethanol

70% (v/v) before surgery. During the surgery procedure, a 1 cm incision was made in the midline alba of the abdomen to implant the synthetic matrix in the intraperitoneal site (Fig 1 D). After surgery, mice were sutured with non-absorbable nylon thread and placed in individual boxes. Following, mice were divided into 3 groups (Control, CD, CD:LGK974) in a randomized manner and treated 24 hours after implantation of synthetic matrix by daily oral administration for 14 days (60  $\mu$ L/day): CD:LGK974 complex (dose: 5mg/kg/day); CD equivalent dose to the complex (dose: 230mg/kg/day); and Control (saline 0.9%) (Fig 1 E).

**Sample and fluid collection.** After 14 days of treatment, mice were euthanized and intraperitoneal implants were harvested, weighed, and photographed under a magnifying glass (Nikon SMZ 445 LED base stereomicroscope) at 0.67x and 5x magnification. Liver tissues were also harvested for biochemical and histological analyses. Blood samples were collected for biochemical analysis.

**Histopathological analyses.** Harvested implants were fixed in 10% formalin for 48 hours and then processed for paraffin embedding. Following, sections with 5  $\mu$ m thickness were prepared and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for morphometric analysis (inflammatory cells, giant cells, fibroblasts, and vessels) (Figure S2). To assess the score of inflammation, sections were evaluated according to the following score: 0 - Absent; 1 - Small amount of cells present; 2 - Normal amount of cells present; 3 - Predominantly neutrophils present; 4 - Predominantly mononuclear cells present. To assess the fibrotic score, collagen deposition in the sections was evaluated following the following score: 0: Absent; 1: Presence of few fine fibers; 2: Accentuated presence of fine fibers; 3: Presence of fine fibers and thick fibers; 4: Predominance of thick collagen fibers (THOMPSON et al, 1998). Furthermore, the counting of giant cells and the number of vessels per field (15 fields per slide), were assessed using conventional microscopy (Olympus BX51).

**Collagen Deposition Evaluation.** Collagen production was assessed using Picrosirius red stain (JUNQUEIRA, et al., 1976). This method allows differentiation between thick/mature collagen (red and orange to yellow birefringence) and thin/immature collagen (greenish birefringence), under polarized light, according to the degree of matrix deposition and maturity (JUNQUEIRA, et al., 1976). Briefly, samples were fixed in a 10% neutral buffered formalin solution for 48 h and then processed for paraffin inclusion. After cross-section to 10  $\mu$ m thickness, a deparaffinization step was performed in xylene and ethanol, followed by hydration in a series of graded alcohols until distilled water, followed by incubation with a Sirius red (Sigma) solution diluted in 0.1% saturated picric acid. After 45 min at room temperature, samples were rinsed with distilled water. Sections were examined by polarization microscopy (Olympus, CX41). To quantify each collagen area type, a threshold algorithm was used to

determine the red ( $\text{red} > \text{green} + \text{blue} * 1.2$ ) and green ( $\text{green} > \text{red} + \text{blue} * 0.7$ ) pixels (the multiplication factor in the formulae was determined empirically for the current image set). Then, the red and green pixels were counted to determine the tight and thin collagen areas, respectively. To obtain the tissue area, the brightfield image was transformed into a grayscale image and binarized (OTSU, 1979). To segment the tissue of interest and avoid artifacts and segmentations outside of the region of interest, a combination of the Canny edge detector and morphological operations (dilation and erosion) were used (CANNY, 1986). The total tissue area was quantified by counting the number of white pixels in the region of interest of the binarized image. Once each collagen type and tissue pixel area were obtained, the collagen content was calculated as a percentage of the area tissue.

***Determination of cytokines (TNF- $\alpha$ , VEGF, TGF- $\beta$ 1) in the implants.*** To dosage the cytokines TNF- $\alpha$ , VEGF, and TGF- $\beta$ 1 in the implants, an ELISA immunoassay was performed. Briefly, implants were homogenized in PBS (pH 7.4), and centrifuged at 10,000 x g for 30 min at 4 °C. Cytokines were measured in 100  $\mu$ L of the supernatant using immunoassay kits (R & D Systems, USA), according to the manufacturer's protocol. The supernatant was then added to the ELISA plate, which was previously sensitized with a murine monoclonal antibody specific for the cytokine of interest, followed by a second polyclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP). Following, the plate was washed to remove unbound antibody-enzyme reagents and a colorimetric substrate solution (50  $\mu$ L of a 1:1 solution of hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine (10mg/mL) in DMSO) was added to the wells. After 20 min of incubation, the colorimetric reaction was stopped by adding 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50  $\mu$ L), and the color intensity was measured at 540 nm in a spectrophotometer (Thermoplate Tekmar). The standards used for the calibration curve (recombinant murine cytokines at 0.5-<sup>log10</sup> dilutions) varied from 7.5 pg/mL to 1000 pg/mL (100  $\mu$ L). The results were expressed as pg cytokine/mg wet tissue.

***Western Blotting.*** The evaluation of protein expression in the implants was performed by Western Blotting. Briefly implants were homogenized on ice for 20 min in lysis buffer (NaCl, 100mM; Tris-base, 50mM; EDTA-2Na, 5mM; Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 50mM; MgCl<sub>2</sub>, 1mM; pH 8.0) with detergents (Nonidet P40 1%, Triton x-100 0.3% and sodium deoxycholate 0.5%), containing protease inhibitors (PMSF 200 mM; benzamidine 15.7 mg/mL; pepstatin 10 mM; aprotinin 10 mg/mL) and phosphatase inhibitors (NaF 20 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM). Following tissue homogenization, samples were centrifuged for 12 min at 8000 rpm and 4 C°, and the supernatant collected and stored at -80 C° for later use. Proteins were quantified according to the Bradford method. Then, proteins (40 $\mu$ g) were separated in a 10% SDS-PAGE gel, followed by Western blotting. The runs were performed with fixed voltage at 120V and variant amperage for 1h and 40 min. Transfer to PVDF membrane was performed using the semi-dry apparatus

(BioRad), with fixed voltage at 20V and variant amperage for 45 min. Immediately after, the membranes were washed in TBS-T solution (in mmol/L: NaCl, 150; Tris, 25 and 0.05% Tween 20, pH 8.0). Blocking was performed in TBS-T solution with 5% milk for 1 hour at room temperature. The membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibody diluted in 1% milk solution in TBS-T. The following antibodies were used:  $\beta$ -catenin (RRID: AB\_397555, 1:1000, BD Biosciences)  $\alpha$ -SMA (RRID: AB\_1951138, 1:1000, ABCAM) and TGF- $\beta$ 1 (RRID: AB\_1144265, 1:1000, ABCAM). After incubation with the primary antibody, the membranes were washed with TBS-T for 30 min under agitation (3 times, 10 min) and incubated with the HRP secondary antibody for 1 hour. The following secondary antibodies were used: anti-mouse (RRID: AB\_258008, 1:15000, Sigma-Aldrich) and anti-goat (RRID: AB\_258242, 1:15000, Sigma-Aldrich). After this period, the membranes were washed again with TBS-T for 30 min (3 times of 10 min). Immunodetection was performed using enhanced chemiluminescence detected with LAS 4000 equipment (GE Healthcare Life Science). Protein levels were expressed as a ratio of optical densities by analysis in ImageQuant TL®. HSP90 (RRID: AB\_675659, 1:3000, Santa Cruz Biotechnology) was used to normalize protein expression.

***Immunophenotypic and functional features of infiltrating leukocytes.*** The migration of myeloid lineage cells was performed by immunophenotyping using flow cytometry. Harvested implants were macerated in 0.2% collagenase and then incubated at 37 °C for 30 min. Cells were centrifuged, and pellet incubated in 0.25% trypsin was added and incubated for 5 min at 37 °C, and the reaction was stopped with 10% PBS-SBF. Samples were filtered using cell strainer (40  $\mu$ m), centrifuged and RBC (Red blood cells) were lysed. Samples were resuspended in FACS buffer (PBS 1X, 0.1% BSA 2mM azide). For the assessment of cell viability and blocking of nonspecific binding, cells were incubated with Live/Dead (Invitrogen) containing FcBlock (Invitrogen) for 15 min at room temperature and centrifuged at 2500 rpm for 3 min at 4 °C. Next, to perform extracellular labeling, cells were incubated with an antibody mix, described in supplementary materials - Table 1, for 20 min at room temperature. Samples were then centrifuged at 2500 rpm for 3 min at 4 °C, and incubated with streptavidin , for 15 min at room temperature. Subsequently, samples were centrifuged at 2500 rpm for 3 min at 4 °C, and the supernatant was discarded. Next, the cells were resuspended in 200  $\mu$ L of FACS buffer and transferred to cytometry tubes. Sample acquisition was performed on a LSR Fortessa cytometer (BD), and results were analyzed using FlowJo 10 software (TreeStar).

***Determination of liver toxicity.*** To assess liver toxicity, liver transaminases serum Aspartate Aminotransferase (AST) and Alanine Aminotransferase (ALT) were quantified on serum and liver samples. Liver samples were homogenized in 2 mL of PBS (pH 7.4). The enzymes AST and ALT, were dosed in the liver and serum samples using a Bioclin Kit (Copyright © 2012

Bioclin/Quibasa), following the manufacturer's protocol information, adapted for 96-well plate (MELLO, S.C.S, 2016).

**Statistical Analysis.** The study results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Analysis of statistical normality of the data was performed using GraphPad Prism 8.0 software, using One-Way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-test. For non-parametric data, the Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison post-test were used. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

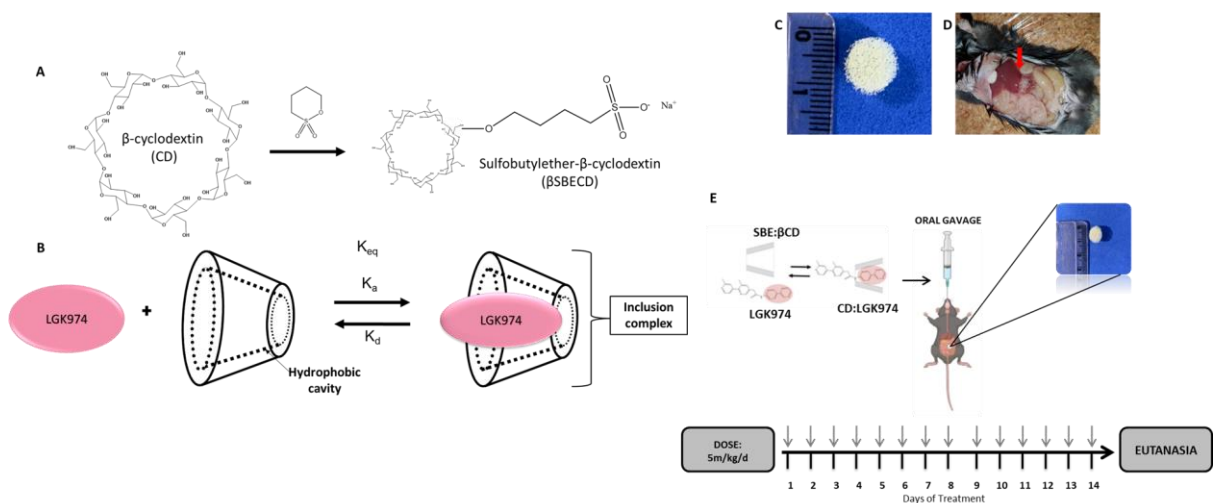
## Results

### **Synthesis and characterization of the CD:LGK974 inclusion complex.**

To characterize the host-guest interaction and CD:LGK974 complex formation (Figure 1 A-B), 2D NOESY NMR was performed. The 2D correlation provides an effective interpretation and characterizes the complexation, considering that interactions are weak and accompanied by small chemical shift variation (SCHNEIDER, et al., 1998). The 2D NOESY NMR confirmed the formation of the CD:LGK974 complex by intense cross-peaks found between hydrogens H3 and H5 of  $\beta$ SBECD and aromatic hydrogens of the LGK974 molecule (Figure S1).

### **Inhibition of Wnt signaling by CD:LGK974 complex reduced the inflammatory response.**

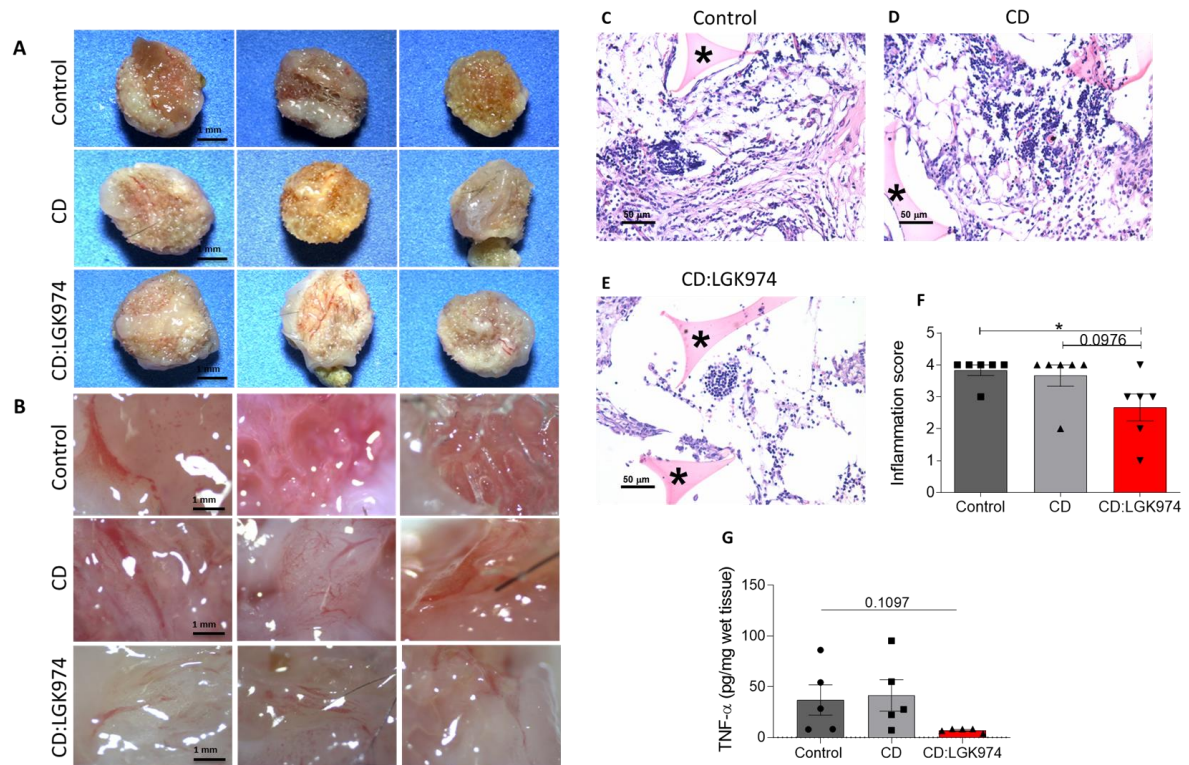
24 hours after implantation of the synthetic matrix in the intraperitoneal site mice were treated with saline 0.9%, CD or CD:LGK974 for 14 days (Fig 1 C-E). On day 14th of treatment, mice were euthanized and intraperitoneal implants were harvested.



**FIGURE 1. Schematic of inclusion complex, synthetic matrix implantation, and CD:LGK974 treatment** - (A) Chemical structure of modified  $\beta$ -cyclodextrin (sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin). (B) Schematic of host-guest complex under thermodynamic

equilibrium. (C) Macroscopic image of the synthetic polyether-polyurethane matrix before implantation. (D) Implanted and adhered matrix in the intraperitoneal cavity of C57BL/6 mice. (E) Schematic overview showing the treatment with CD:LGK974 by oral gavage for 14 days.

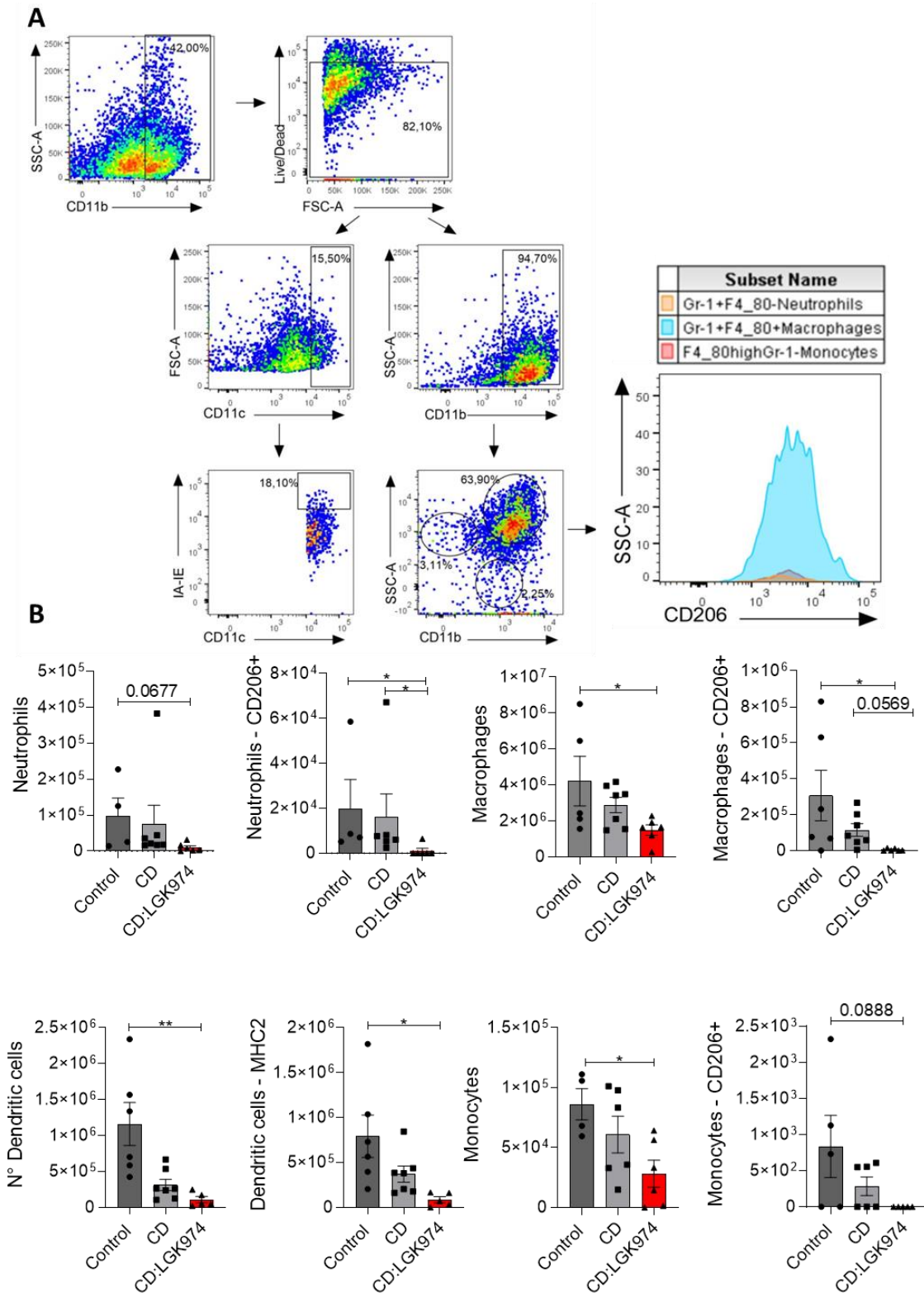
First, we performed macroscopic analysis of the implants from mice treated with CD:LGK974. As shown in Figure 2A-B, implants from CD:LGK974 treated mice showed less fibrotic tissue and fewer microvessels, compared to the Control and CD-treated groups. To assess the inflammatory profile, sections of the implants stained with H&E and pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  were analyzed. Mice treated with CD:LGK974 presented reduced inflammatory infiltrate, resulting in a decrease of inflammatory score compared to the Control and CD groups (Figure 2 C-F; Figure S2). Furthermore, mice treated with CD:LGK974 showed a reduction in the production of pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  compared to the Control and CD groups (Figure 2 G).



**FIGURE 2. CD:LGK974 complex treatment reduced inflammation in the polyether-polyurethane implant** - (A) Representative images of implants treated with saline (Control), CD and CD:LGK974 (from up to bottom) for 14 days. 0.67x magnification. (B) Representative images of implants were focused at 5x magnification. (C-E) Representative histological sections of implants stained with H&E after 14 days of oral treatment (portions of implant matrix indicated by \*). (C) Control: saline; (D) SBE- $\beta$ CD; (E) CD:LGK974 (dose: 5mg/kg/d). (F) CD:LGK974-treated group decreased implant-induced inflammatory infiltration compared to Control and CD groups. (G) CD:LGK974-treated group decreased pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  compared to Control and CD groups. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.; One-way ANOVA \*  $P < 0.05$ .



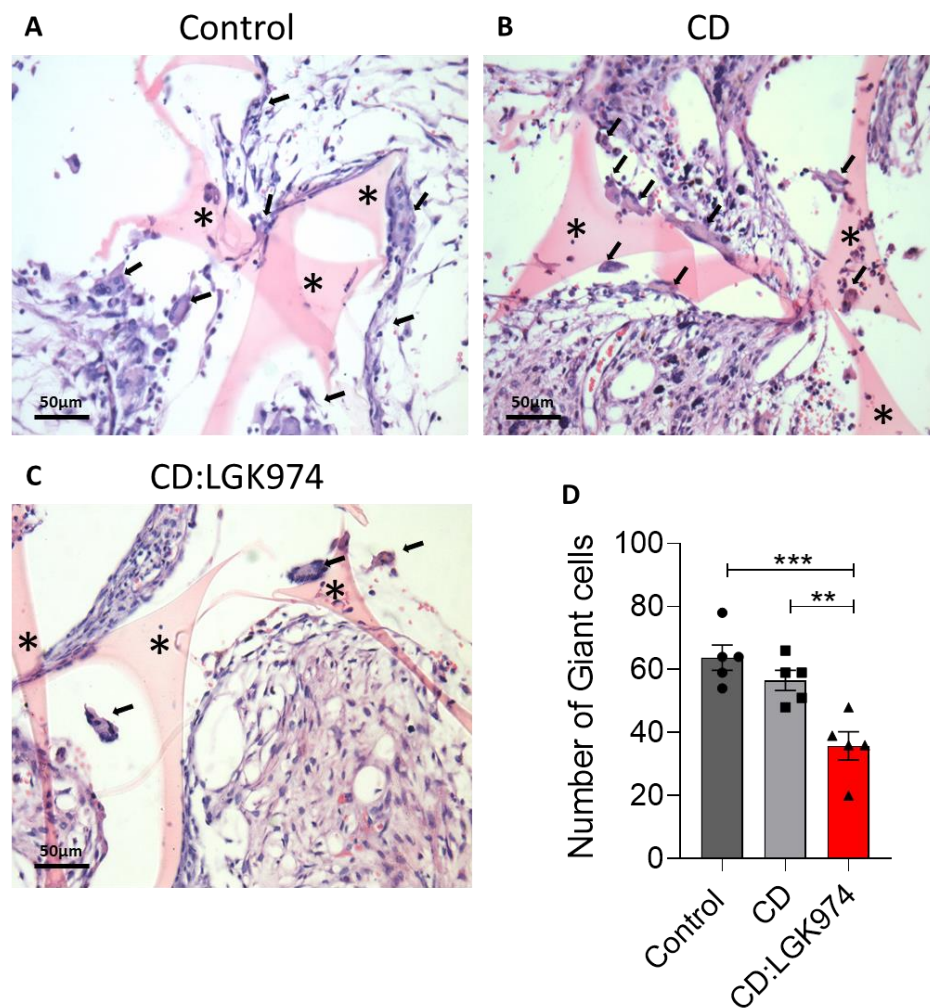
To assess the cell migration of the myeloid lineage into the implant, we used flow cytometry technique. Cells of the myeloid lineage, such as macrophages, neutrophils, monocytes, dendritic cells, and cells expressing the mannose receptor CD206 are directly involved in inflammatory response in the chronic/persistent phase of foreign-body reaction (ANDERSON, et al., 2008; CHU, et al., 2019). To determine the boolean gate, doublets were eliminated using a combination of forward scatter area (FSC-A) vs forward scatter height (FSC-H), debris of fluorochromes were discarded, and cells were gated as a function of time versus FSC-A to prevent potential interference from flow interruptions. CD45+ live cells were used for myeloid panel analysis, and within that, a gate was performed for the analysis of CD11b+ (myeloid cells), dendritic cells (CD11c+), and activated dendritic cells (CD11+IA-IE+). CD206 proportion was defined on macrophages (CD11b+F4/80+Gr-1+), neutrophils (CD11b+F4/80-Gr-1+) and monocytes (CD11b+F4/80highGr-1-). The mice group treated with CD:LGK974 significantly decreased the migration of these immune cells to the implant compared to Control and CD groups, which highlights its anti-inflammatory potential (Figure 3 A-B). Furthermore, the pro-fibrotic profile M2, an important component of the chronic/persistent phase of inflammation and fibrosis process, was evaluated in these cells. CD:LGK974 treated-group reduced migration of M2-profile cells by decreasing CD206 (mannose receptor). Together, these results demonstrated that CD:LGK974 decreased expression of pro-inflammatory cytokines and consequently reduced the migration of both myeloid immune cell and M2-profile cells to the implant.



**FIGURE 3. Inhibition of Wnt signaling by CD:LGK974 complex modulates myeloid cells migration.** (A) Representative large dot image of the gating strategy used to obtain myeloid cell records. (B) Number of myeloid cells in the implant Macrophages (CD11b<sup>+</sup>,F4/80<sup>+</sup>,Gr-1<sup>+</sup>), CD206<sup>+</sup> Macrophages (F4/80<sup>+</sup>,Gr-1<sup>+</sup>,CD206<sup>+</sup>), Neutrophils (CD11b<sup>+</sup>,F4/80<sup>-</sup>,Gr-1<sup>+</sup>), CD206<sup>+</sup> Neutrophils (F4/80<sup>-</sup>,Gr-1<sup>+</sup>,CD206<sup>+</sup>), Dendritic cells (CD11c<sup>+</sup>), Activated dendritic cells (CD11c<sup>+</sup>,IA-IE<sup>+</sup>), Monocytes

(CD11b+, F4/80high, Gr-1-), CD206+ Monocytes (F4/80high, Gr-1-, CD206+). In all conditions, CD:LGK974 significantly decreased cell migration to the implant compared to Control group. Data are mean  $\pm$  S.E.M.; One-way ANOVA; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

Giant cells are the end-stage response of the foreign-body reaction, composed of macrophages clusters which leads to multinucleated cell formation with greater phagocytosis capacity, triggered by sponges at the intraperitoneal site (ANDERSON, et al., 2008). Mice treated with CD:LGK974 complex significantly decreased the number of giant cells in the implant compared to Control and CD groups (Figure 4 A-D).

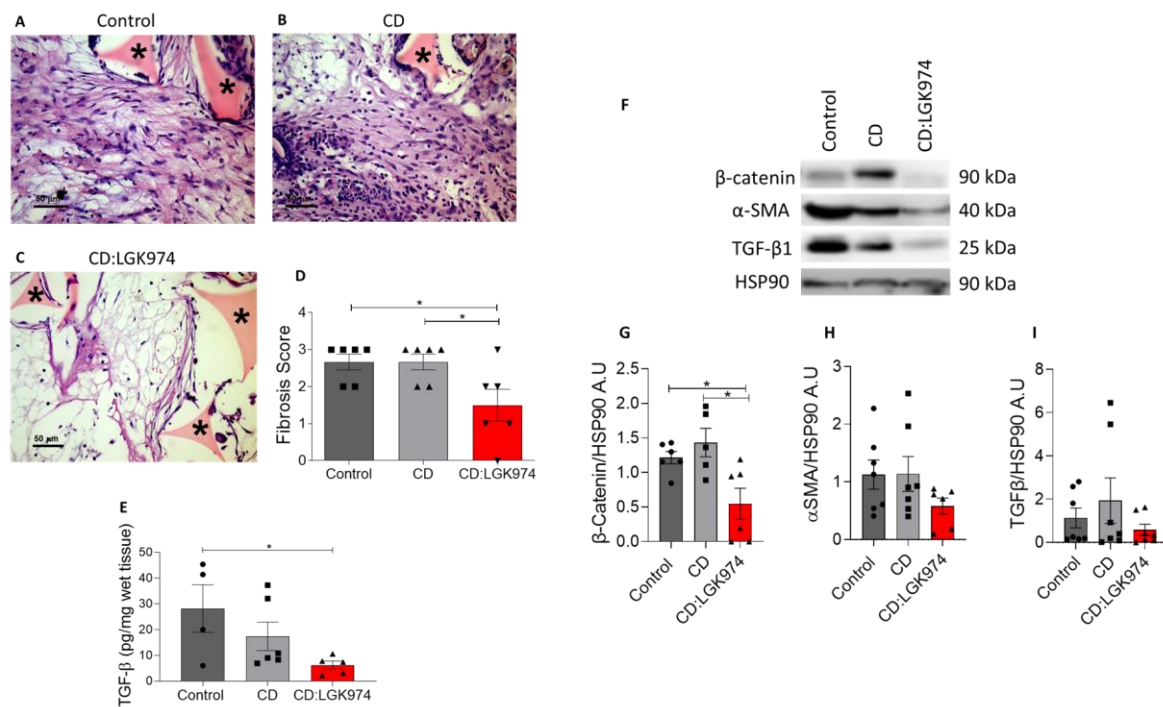


**FIGURE 4. Giant cell reduction is triggered during CD:LGK974 treatment** - (A-C): Representative histological sections of implants after 14 days of oral treatment (portions of implant matrix are indicated by \*). (A) Control: Saline; (B) SBE- $\beta$ CD; (C) CD:LGK974 (dose: 5mg/kg/d). (D) Morphometric analysis of giant cells/field (indicated by arrows) shows that CD:LGK974 significantly decreased their number in implants compared to Control and CD groups. Data are mean  $\pm$  S.E.M.; One-way ANOVA; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

#### ***Inhibition of Wnt signaling with CD:LGK974 complex decreased implant fibrosis***

To investigate the occurrence of fibrosis in the implant, we analyzed the fibrosis score in histological sections of the implant, as well as the production of pro-fibrotic cytokines,

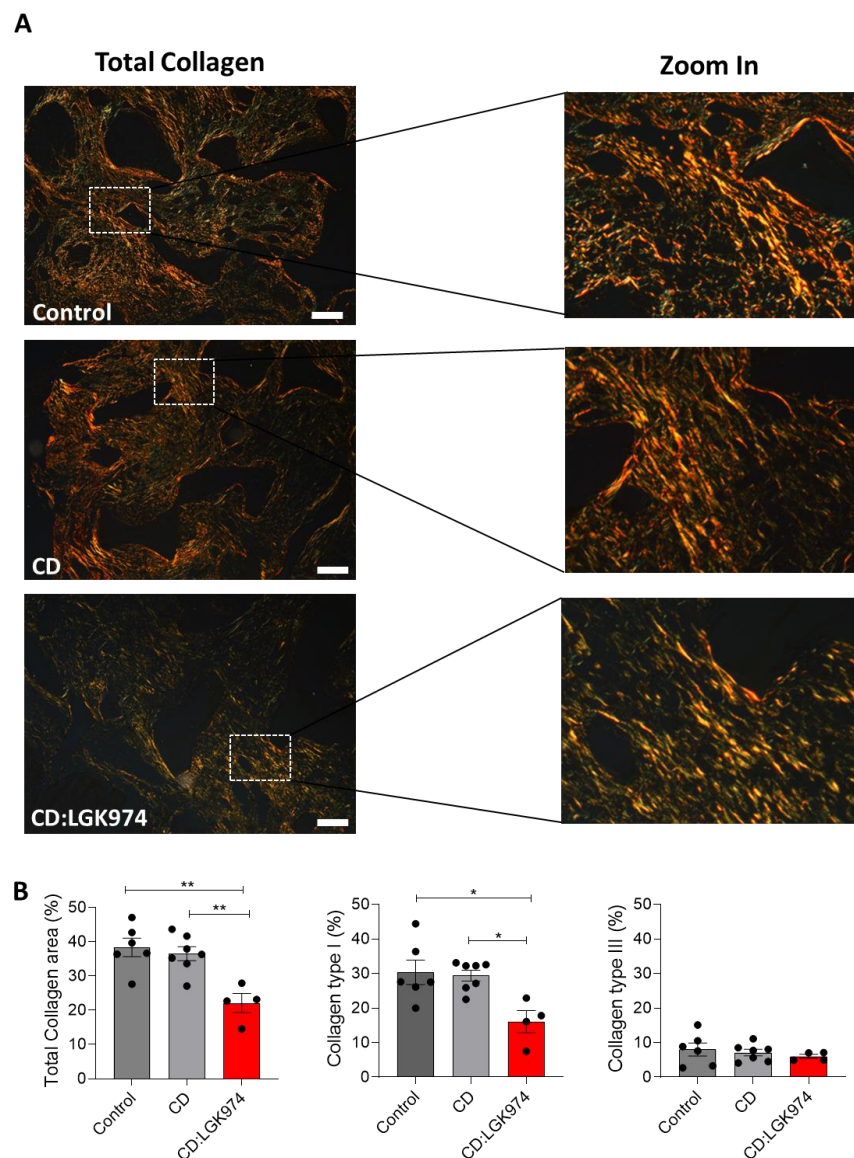
expression of fibrosis-related proteins, and collagen deposition. The fibrotic score was determined by deposition of fibrotic tissue in the implant matrix. Mice treated with CD:LGK974 demonstrated a significant reduction in the deposition of implant-associated fibrotic tissue compared to Control and CD groups (Figure 5 A-D). In addition, the release of the pro-fibrotic cytokine TGF- $\beta$ 1 was significantly reduced in CD:LGK974 treated-group compared to the other groups (Figure 5 E). Importantly, the expression of  $\beta$ -catenin protein, a nuclear transcription cofactor of the Wnt pathway, was significantly reduced in mice treated by CD:LGK974 complex compared to Control and CD groups (Figure 5G). CD:LGK974 treated-group also decreased  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ 1 expression compared to Control and CD (Figure 5 H-I). These results suggest that inhibition of the Wnt pathway was effective in reducing pro-fibrotic factors as well as extracellular matrix deposition in the implants (Figure 5 F-I).



**FIGURE 5. Fibrosis is decreased by CD:LGK974 complex treatment in implants.** (A-C): Representative histological sections of implants after 14 days of oral treatment, stained by H&E (portions of the implant matrix are indicated by \*). (A) Control: saline 0,9%; (B) CD:SBE- $\beta$ CD; (C) CD:LGK974 (dose: 5mg/kg/d). (D) Treatment with CD:LGK974 significantly decreased fibrosis in the implants compared to control and CD groups. (E) CD:LGK974 significantly reduced pro-fibrotic cytokine TGF- $\beta$ 1 compared to Control and CD groups. (F) Representative images of semiquantitative analysis by Western Blotting of  $\beta$ -catenin,  $\alpha$ -SMA, and TGF- $\beta$ 1 in intraperitoneal implants normalized by HSP90. (G-I) Treatment with CD:LGK974 complex decreased  $\beta$ -catenin and pro-fibrotic  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ 1 in intraperitoneal implants. Data are mean  $\pm$  S.E.M.; One-way ANOVA; \* P < 0.05.

Fibrosis is characterized by persistent inflammation to repair tissue in a delayed manner or through cicatrization, which consists of replacing normal tissue with connective tissue through the exacerbated deposition of extracellular matrix, such as collagen (ANDERSON, et al., 2008; CARNICER-LOMBARTE, et al., 2021). The collagen deposited during the fibrosis process consists of collagen type III (thinner), which is the first collagen to

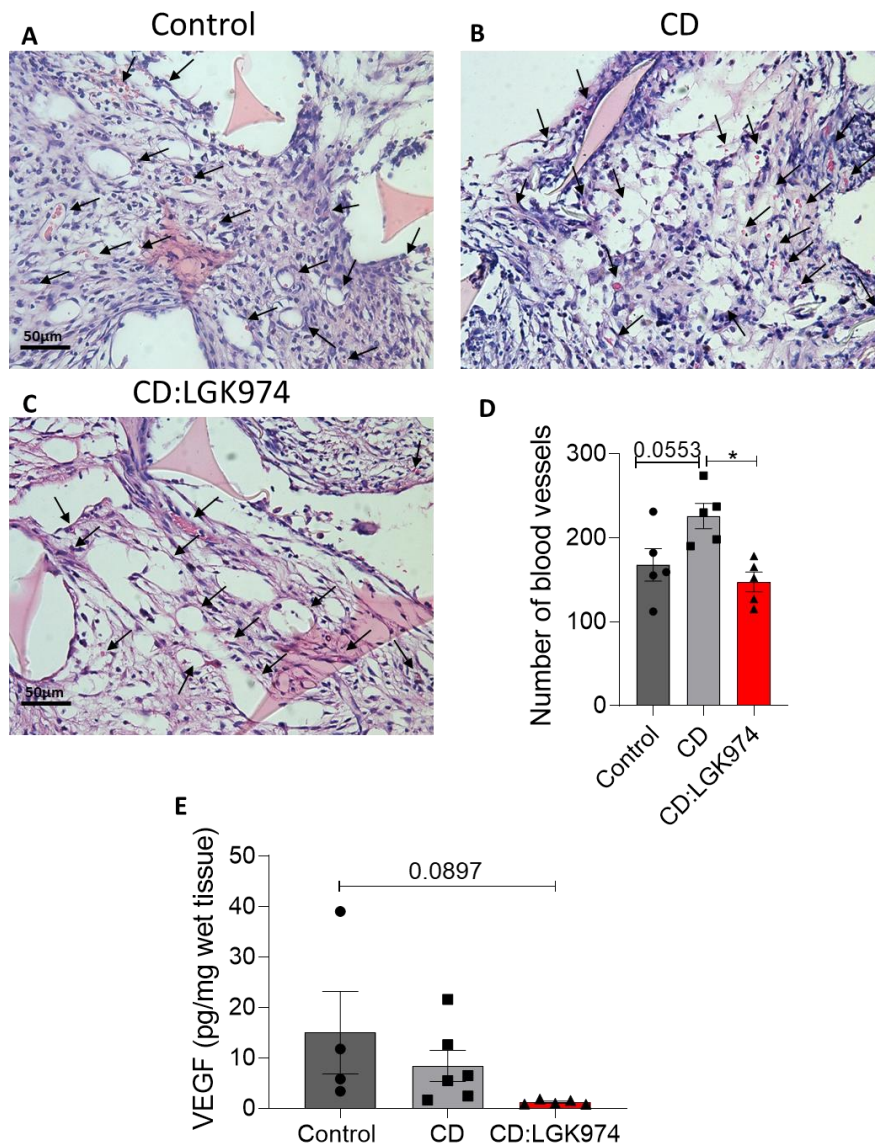
be deposited, and collagen type I (thickest). To assess the deposition of type I (red/orange) and type III (green) collagen we analyzed stained sections with Picrosirius by using polarized light. Mice treated with CD:LGK974 complex significantly decreased total collagen and type I collagen deposition compared to the Control and CD groups, which indicated a considerable reduction of fibrosis formation in the implant. Furthermore, there was no difference in type III collagen deposition between the groups. (Figure 6 A-B). Collectively, these results indicated that mice treated with CD:LGK974 reduced deposition of total and type I collagen at the implant.



**FIGURE 6. CD:LGK974 treatment decreased collagen deposition in the implants** - (A) Representative histological sections of Picrosirius-Red stained implants for collagen deposition quantification (total, type I, and type III) using polarized light after 14 days of oral treatment. Zoomed images of type I collagen fibers (red/orange) and type III collagen fibers (green), in each group. (B) Morphometric analysis of collagen deposition showed a significant decrease in total and type I collagen deposition in mice treated with CD:LGK974 compared to Control and CD groups. Data are mean  $\pm$  S.E.M.; One-way ANOVA; \*  $P < 0.05$ .

***CD:LGK974 treatment alters the angiogenic profile of implants.***

The formation of fibrovascular tissue, a result of the inflammatory process triggered by the implant, leads to the release of pro-angiogenic factors such as VEGF and PDGF. These factors have a crucial role in the formation of new vessels, which will feed the surrounding tissue and allow the migration of inflammatory cells to encapsulate and isolate the biomaterial (CASTRO, et al., 2012; CAMPOS, et al., 2006; CARNICER-LOMBARTE, et al., 2021; MARIANI, et al., 2019). To investigate the angiogenesis process in the implant, we assessed the number of vessels and the production of pro-angiogenic factor VEGF. The evaluation of new vessels formation was performed through morphometric analysis of the H&E-stained sections, counting the number of vessels per field (15 fields per slide - 40X). The treatment with CD:LGK974 reduced the number of vessels compared to Control and CD groups (Figure 7 A-D). Moreover, mice treated with CD:LGK974 decreased the production of pro-angiogenic cytokine VEGF compared to other groups, which reinforced the reduced foreign body reaction after treatment with CD:LGK974 (Figure 7 E).



**FIGURE 7. CD:LGK974 treatment decreased the number of vessels and levels of pro-angiogenic factors.** (A-C) Representative H&E sections of vessels (indicated by arrows) in the implants after 14 days of oral treatment. (D) Mice treated with CD:LGK974 decreased the number of vessel formation in the implant compared to Control and CD groups. (E) Mice treated with CD:LGK974 decreased levels of VEGF in the implant compared to Control and CD groups. Data are mean  $\pm$  S.E.M.; One-way ANOVA with Tukey multiple comparison corrections; \*  $P < 0.05$ .

### ***Liver transaminases measurement.***

Liver transaminases are essential biomarkers of liver damage that, when altered, may indicate a damaging process in the liver (KOBAYASHI, et al, 2020). To assess whether the treatment with the CD:LGK974 complex induces liver toxicity, levels of Alanine aminotransferases (ALT) and Aspartate aminotransferases (AST) enzymes were measured. The dosage was performed in serum and liver fragments of animals from each experimental group. There was no difference in the levels of AST or ALT between mice treated with

CD:LGK974 compared to control and CD groups, which is indicative of no toxicity due to CD:LGK974 treatment (Figure S4).

## Discussion

The application of biomaterials in clinical practice is extremely broad, including cell transplantation, controlled drug release, replacement of anatomical structures, monitoring of physiological conditions, and tissue regeneration (RATNER, et al., 1996; VEISEH, et al., 2015). However, the performance of these biomaterials, such as implants, depends on their interaction with immune system components (VEISEH, et al., 2015), which occurs from the moment of implantation that causes an injury to the tissue. At first, this injury leads to an inflammation process to repair the injured tissue, but over time it becomes persistent, triggering a process known as foreign body reaction that can damage the implant through the encapsulation of the biomaterial by fibrotic tissue, causing loss of function, pain and discomfort to the patient (VEISEH, et al., 2015; FRANZ, et al., 2011).

The implantation site greatly influences the inflammatory reactions triggered by the implanted biomaterial. The intraperitoneal site has a great inflammatory potential due to the extensive vascularization and the presence of peritoneal fluid, enabling the rapid recruitment of large quantities of inflammatory cells such as macrophages and lymphocytes to the site of inflammation (MENDES, et al., 2007). Moreover, it is expected an extensive adherence with an intense integration of the implants to the adjacent visceral organs, which may also promote the infiltration not only of inflammatory cells but also of fibroblasts (MENDES, et al., 2007).

Previously, the process of fibrosis was correlated with the dysregulation of the Wnt pathway in several tissues, which plays a key role in the proliferation, cell differentiation, and tissue repair (BURGY, et al., 2018). In this context, the inhibition of the Wnt pathway by the blockage of porcupine protein or inhibition of the Wnt receptor may decrease fibrosis (LIU, et al., 2013; YE, et al. 2018).

The implantation of the polyether-polyurethane matrix in different sites, such as intraperitoneal and subcutaneous, is capable to mimic the inflammatory response and stages of tissue repair that affect an implant (CAMPOS, et al., 2006; ANDRADE, et al., 1997). Here, the polyether-polyurethane matrix was implanted in the intraperitoneal site of mice to mimic the development of the foreign body reaction. Peritoneal fibrosis is a deleterious pathologic event quite common in patients with peritoneal dialysis, which causes failure and discontinuation of the treatment. Besides peritoneal fibrosis, infectious peritonitis, a major cause of morbidity and mortality in patients with peritoneal dialysis, also induces angiogenesis and fibrosis (TERRI, et al., 2021).



Our approach consisted in assessing the effects of Wnt pathway inhibition on the development of foreign body reaction in intraperitoneal implants via treatment with CD:LGK974 complex. LGK974 is a blocker of the canonical component of the Wnt pathway, which reduces the accumulation of  $\beta$ -catenin in the cytoplasm and culminates in decreased nuclear translocation and consequently expression of pro-fibrotic genes. Some studies have demonstrated the potential of the inhibition of canonical Wnt signaling to the treatment of cancer, with promising results in the reduction of cancer cell proliferation and shrinking tumors (LIU, et al., 2013; GUIMARAES, et al., 2018; YE, et al. 2018; BURG, et al., 2018).

Because it is a very hydrophobic molecule, LGK974 has low solubility in aqueous solvents, which limits its clinical use. Toxic body effects after oral administration are also reported (LIU, et al., 2013; GUIMARAES, et al., 2018). To overcome these limitations, we used a previously reported CD:LGK974 complex, which is a supramolecular compound using CD as a carrier. CDs increase solubility, facilitate transport across biological barriers, improve bioavailability and reduce the toxicity of extremely insoluble drugs (STELLA, et al., 1997; WEBBER, et al., 2017; GUIMARAES, et al., 2018). Previously, our group characterized the CD:LGK974 complex formation and demonstrated that this complex improves the solubility and bioavailability of LGK974 when administered orally. Because of the improved bioavailability of LGK974 when complexed with SBE- $\beta$ CD, a dose of 5mg/kg/day was used in the present work instead of the usual dose of 10mg/kg/day, which also reduces the possibility of toxicity caused by LGK974 (LIU, et al., 2013; GUIMARAES, et al., 2018).

In this work, we confirmed our initial hypothesis that the inhibition of Wnt signaling via CD:LGK974 complex would decrease foreign body reaction and formation of fibrotic tissue over the implant. In addition, we found no liver toxicity after treatment with CD:LGK974 complex by dosing the enzymes AST and ALT in serum and in liver fragments (Figure S4).

The performance of treatment with the CD:LGK974 complex was evaluated by observing the development of the foreign body reaction and its components between the Control, CD, and CD:LGK974 groups. Upon arrival at the site, neutrophils adhere to the temporary extracellular matrix around the implant, releasing pro-inflammatory factors such as cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), reactive oxygen species (ROS) proteolytic enzymes, and others (CARNICER-LOMBARTE, et al., 2021). These cytokines will promote the recruitment of dendritic cells and monocytes triggering the differentiation into pro-inflammatory macrophages (M1). Following, the resident macrophages initiate the release of additional inflammatory factors such as TNF- $\alpha$ , interleukins (IL-1, IL-6, and IL-8) to recruit more macrophages (CARNICER-LOMBARTE et al., 2021; GEISSMANN, et al., 2010). In this way, CD:LGK974 decreased the migration of neutrophils (CD11b+F4/80-Gr-1+), monocytes

(CD11b+F4/80highGr-1-), macrophages (CD11b+F4/80+Gr-1+), dendritic cells (CD11c+), activated dendritic cells (CD11c+IA-IE+) and M2 phenotype cells compared to the other groups. M2 phenotype cells were labeled with CD206 which is a mannose receptor, usually overexpressed in this cell type (SHAPOURI-MOGHADDAM. et al. 2018). M2 profile macrophages promote the release of TGF- $\beta$ 1, which recruits fibroblasts that will adhere to the site and promote the extracellular matrix deposition, thus promoting fibrosis and encapsulation of the foreign body (RYSZER, T. 2015; CARNICER-LOMBARTE et al., 2021). Therefore, our findings indicate the ability of the complex to reduce the inflammatory process caused by the implantation of the polyether-polyurethane matrix in the intraperitoneal site.

The chronification of the inflammation due to the failure to repair the tissue and the increased recruitment of macrophages resulted in the formation of giant cells, which consist of the fusion of these macrophages. The presence of giant cells is one of the characteristics of the foreign body reaction. Giant cells are multinucleated cells with the ability to phagocytize much larger particles (>10  $\mu$ m) than a normal phagocyte (CARNICER-LOMBARTE et al., 2021). Thus, we assessed the number of giant cells in stained sections of the implant. Mice treated with CD:LGK974 significantly reduced the number of giant cells compared to the Control and CD groups, which corroborated the data about decreased migration of inflammatory cells, especially macrophages.

Furthermore, the chronification of inflammation triggered by the implant also leads to the phenotype change of pro-inflammatory macrophages (M1) to profibrotic macrophages (M2), which stimulates collagen deposition and fibrosis (CARNICER-LOMBARTE et al., 2021). The progression of fibrosis is related to the upregulation of Wnt signaling, such as the accumulation of  $\beta$ -catenin and consequently increased expression of pro-fibrotic genes and factors such as TGF- $\beta$ 1 (BURGY, et al., 2018; CARNICER-LOMBARTE et al., 2021). Thus, to correlate the upregulation of Wnt signaling with increased fibrosis in implants, we dosed some factors directly involved in fibrosis formation, such as TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ -catenin, and  $\alpha$ -SMA protein. Treatment with CD:LGK974 complex significantly decreased  $\beta$ -catenin compared to Control and CD groups, which indicates the inhibition of the Wnt pathway. In addition, treatment with CD:LGK974 complex decreased TGF- $\beta$ 1 and  $\alpha$ -SMA compared to Control and CD groups. Decreased TGF- $\beta$ 1 levels indicates a lower recruitment and activation of fibroblasts to the implants, which reduces the deposition of extracellular matrix and, consequently, fibrosis (NOSKOVICOVA, et al., 2021). Although the reduction of  $\alpha$ -SMA did not show statistical significance, their decreasing trend suggests that the inhibition of the Wnt pathway was effective, and the reduction of these factors could be enhanced by increasing the complex dose. Collectively, these findings show that inhibition of the Wnt pathway by the CD:LGK974 complex reduces pro-fibrotic factors and, consequently, collagen deposition in the implant.

We also demonstrated that mice treated with CD:LGK974 decreased collagen deposition and fibrosis formation in the implant via histological evaluation and fibrotic score, of the deposition of collagen fibers by the implant matrix. Through these analyses, it was found a decreased collagen fiber deposition in the implant of mice treated with CD:LGK974 complex. We also demonstrated, quantitatively, that CD:LGK974 reduced total collagen and type I collagen deposition in the implant compared to other groups. The reduced deposition of type III and I collagen in the implants suggests a decreased chronic inflammatory process as well as fibroblasts recruitment and activation (DIEGELMANN, 1997; MEDEIROS, et al., 2016; CARNICER-LOMBARTE, et al., 2021). Together, our results provide important evidence that CD:LGK974 complex reduces fibrosis in implants in the intraperitoneal site, highlighting its potential as a promising strategy for the treatment of peritoneal fibrosis, including peritoneal dialysis in patients in end-stage renal disease.

Beyond inflammation, the formation of fibrovascular tissue triggered by the implant also induced the release of pro-angiogenic factors, such as VEGF (CASTRO, et al., 2012; CAMPOS, et al., 2006). These newly formed vessels will have the function of nourishing the surrounding tissue and allowing the migration of inflammatory cells, which contribute to the encapsulation process and the complete isolation of the biomaterial (CASTRO, et al., 2012; CAMPOS, et al., 2006; CARNICER-LOMBARTE, et al., 2021; MARIANI, et al., 2019). Angiogenic parameters were assessed due to their importance in the resolution of inflammation and fibrosis. Treatment with CD:LGK974 reduced not only VEGF levels but also the number of vessels compared to Control and CD groups. Together, these findings suggest that our treatment resulted in a decrease in anoxic stimuli, leading to a reduction in the release of pro-angiogenic factors and as well as the formation of new vessels around the implant.

## **Conclusion**

Our approach using the polyether-polyurethane matrix as an implant in the intraperitoneal site was extremely useful to assess the inflammatory, fibrogenic and angiogenic responses after treatment with CD:LGK974 complex, which acts by inhibiting the Wnt pathway. We demonstrated that treatment with CD:LGK974 complex for 14 days significantly reduced the inflammatory process that triggers the foreign body reaction in the implanted biomaterial. In addition, the treatment with CD:LGK974 complex decreased fibrosis and angiogenesis in the implant. Thus, our work introduces a potentially new application of the Wnt inhibitor complex to reduce peritoneal fibrosis and rejection of implants in the intraperitoneal site.

## **References**

ALZAHIRANI, K. et al. Polyurethane versus silicone port a cath: What's going on at removal? **Journal of Pediatric Surgery**. v. 53, N°. 7, p. 1417-1419, 2018.

- ANDERSON, J. M. et al. Foreign Body Reaction to Biomaterials. **Seminars in Immunology**. v. 20, N° 2, p. 86-100, 2008.
- ANDRADE, S. P. et al. Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. **Microvascular Research**. v. 54, N° 3, p. 253-261, 1997.
- BOSE, S. et al. A retrievable implant for the long-term encapsulation and survival of therapeutic xenogeneic cells. **Nature Biomedical Engineering**. v. 4, N° 8, p. 814-826, 2020.
- BURGY, O. ; KÖNIGSHOFF, M. The Wnt signaling pathways in wound healing and fibrosis. **Matrix Biology**. v. 68-69, p. 67-80, 2018.
- CAMPOS, P. P. et al. Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. **Histology and Histopathology**. v. 21, N° 10-12, p. 1263-1270, 2006.
- CANNY, J. A Computational Approach to Edge Detection, **IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.** v. PAMI-8, p. 679–698, 1986.
- CARNICER-LOMBARTE, A. et al. Foreign Body Reaction to Implanted Biomaterials and Its Impact in Nerve Neuroprosthetics. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. v. 9, p. 1-22, 2021. **Journal of Urology**. v. 157, N° 1, p. 298-302, 1997.
- 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.
- DIEGELMANN, R. F. Cellular biochemical aspects of normal and abnormal wound healing: An overview.
- DUXBURY, P. ; HARVEY, J. Systematic review of the effectiveness of polyurethane-coated compared with textured silicone implants in breast surgery. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**. v. 69, N° 4, p. 452-460, 2016.
- FRANZ, S. et al. Immune responses to implants - A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. **Biomaterials**. v. 32, N° 28, p. 6692-6709, 2011.
- GEISSMANN, M. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**. v. 327, N° 5966, p. 656-661, 2010.
- GUIMARAES, P. et al. Potent in vivo lung cancer Wnt signaling inhibition via cyclodextrin-LGK974 inclusion complexes. **Journal of Controlled Release**. v. 290, N° 10, p. 75-87, 2018.
- HE, J. et al. Strategies for extended lifetime of implantable intraperitoneal insulin catheters. **Journal of Controlled Release**. v. 341, N° 11, p. 487-497, 2022.
- JUNG, Y. PARK, J. Wnt signaling in cancer: therapeutic targeting of Wnt signaling beyond  $\beta$ -Catenin and the destruction complex. **Experimental & Molecular Medicine**. v. 52, p. 183-191, 2020.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; et al. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem. J.** v. 11, p. 447–455, 1979.
- KOBAYASHI, A. et al. Specificity of transaminase activities in the prediction of drug-induced hepatotoxicity. **Journal of Toxicological Sciences**. v. 45, N° 9, p. 515-537, 2020.

- KOHANE, D. S. ; LANGER, R. Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering. **International Pediatric Research Foundation, Inc.** v.63, N°. 5, p. 487-491, 2008.
- KUMAR, V. et al. Robbins & Cotran: Basic Pathology. **Elsevier.** ed. 9°, cap. 2, 2016.
- LANNA, M. F. et al. Kinetics of Phenotypic and Functional Changes in Mouse Models of Sponge Implants: Rational Selection to Optimize Protocols for Specific Biomolecules Screening Purposes. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.** v. 8, N° 12, p. 1-15, 2020.
- LAURANO, R. et al. Dual stimuli-responsive polyurethane-based hydrogels as smart drug delivery carriers for the advanced treatment of chronic skin wounds. **Bioactive Materials.** v. 6, N°. 9, p. 3013-3024, 2021.
- LIU, J. et al. Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. **PNAS.** v. 10, N°. 50, p. 20224-20229, 2013.
- MARIANI, E. et al. Biomaterials: Foreign bodies or tuners for the immune response? **International Journal of Molecular Sciences.** v. 20, N° 3, p. 1-42, 2019.
- MATLAGA, B. et al. Tissue response to implanted polymers: The significance of sample shape. **Journal of Biomedical Materials Research.** v. 10, N°. 3, p. 391-397, 1976.
- MEDEIROS, A. et al. Healing of surgical wounds. **Journal of Surgical and Clinical Research.** v. 7, N°. 2, p. 87-102, 2017.
- MENDES, J. et al. Host response to sponge implants differs between subcutaneous and intraperitoneal sites in mice. **Journal of Biomedical Materials Research.** v. 83, N°. 2, p. 408-415, 2007.
- NOSKOVICOVA, N. et al. Implant fibrosis and the underappreciated role of myofibroblasts in the foreign body reaction. **Cells.** v. 10, N°.10, p. 1-26, 2021.
- NUSSE, R. ; CLEVERS, H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. **Cell.** v. 169, N°. 6, p. 985-999, 2017.
- OTSU, N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. **IEEE Trans. Syst. Man. Cybern.** v. 9, p. 62–66, 1979.
- PEREIRA, L. X. et al. Synthetic matrix of polyether-polyurethane as a biological platform for pancreatic regeneration. **Life Sciences.** v. 176, p. 67-64, 2017.
- PIRES, A. L. R. et al. Biomaterials: Types, Applications and Market. **Química Nova,** v. 38, N°. 7, p. 957-971, 2015.
- PONTES, G. et al. Reduced Remodeling Biomarkers Tissue Expression in Nanotextured Compared with Polyurethane Implants Capsules: A Study in Rats. **Aesthetic Surgery Journal.** v. 41, N°. 6, p. 664-683, 2021.
- RATNER, B. D. et al. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. **Society for Biomaterials (SFB),** cap. 1, p. 1-21, 1996.
- RYSZER, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. **Mediators of Inflammation.** v. 2015, p. 1-17, 2020.
- SAID, A. ; WEINDL, G. Regulation of Dendritic Cell Function in Inflammation. **Journal of Immunology Research.** v. 2015, p. 1-15, 2015.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A. et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**. v. 233, N° 9, p. 6425-6440, 2018.

SCHNEIDER, H.J. et al. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes, **Chemical Reviews**. v.98, p.1755-1785, 1998.

SHRIVASTAVA, R. ; SHUKLA, N. Attributes of alternatively activated (M2) macrophages. **Life Sciences**. v. 224, N° 3, p. 222-231, 2019.

STELLA, V. ; RAJEWSKI, R. Cyclodextrins: Their future in drug formulation and delivery. **Pharmaceutical Research**. v. 14, N°. 5, p. 556-567, 1997.

SZEJTLI, J. Medicinal Applications of Cyclodextrins. **Medicinal Research Reviews**. v. 14, N°. 3, p. 353-386, 1994.

TERRI, M. et al. Mechanisms of Peritoneal Fibrosis: Focus on Immune Cells–Peritoneal Stroma Interactions. **Frontiers in Immunology**. v. 12, N°. 3, p. 1-17, 2021.

TIRRELL, D. A.; LANGER, R. Designing materials for biology and medicine. **Nature**, v. 428, N°. 6982, p. 487-492, 2004.

VAN ROSSUM, G. **Python tutorial**. v. May 1995. CWI Rep., p. 1–65, 1995.

VATNER, R. ; JANSSEN, E. STING, DCs and the link between innate and adaptive tumor immunity. **Molecular Immunology**. v. 110, N° 12/2017, p. 13-23, 2019.

VEISEH, O. et al. Size-and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates. **Nature Materials**. v. 14, N° 5, p. 643-652, 2015.

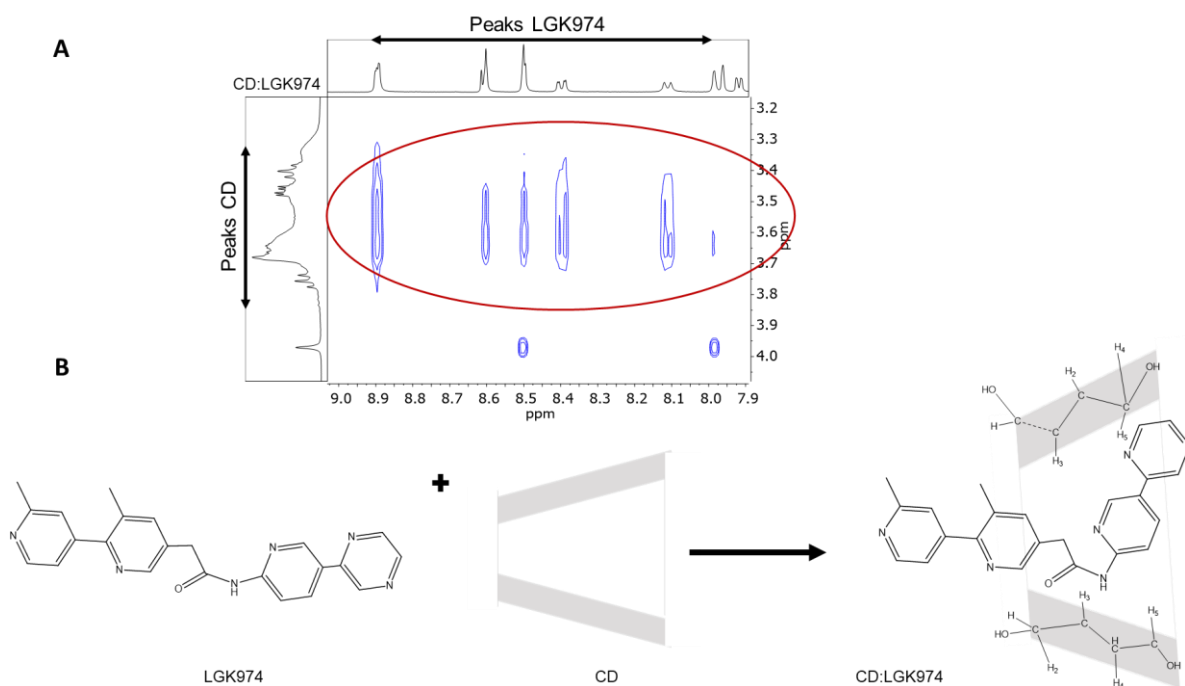
WARD, W. et al. The effect of microgeometry, implant thickness and polyurethane chemistry on the foreign body response to subcutaneous implants. **Biomaterials**. v. 23, N°. 21, p. 4185-4192, 2002.

WEBBER, M. J. ; LANGER, R. Drug delivery by supramolecular design. **Chemical Society Reviews**. v. 46, N°. 21, p. 6600-6620, 2017.

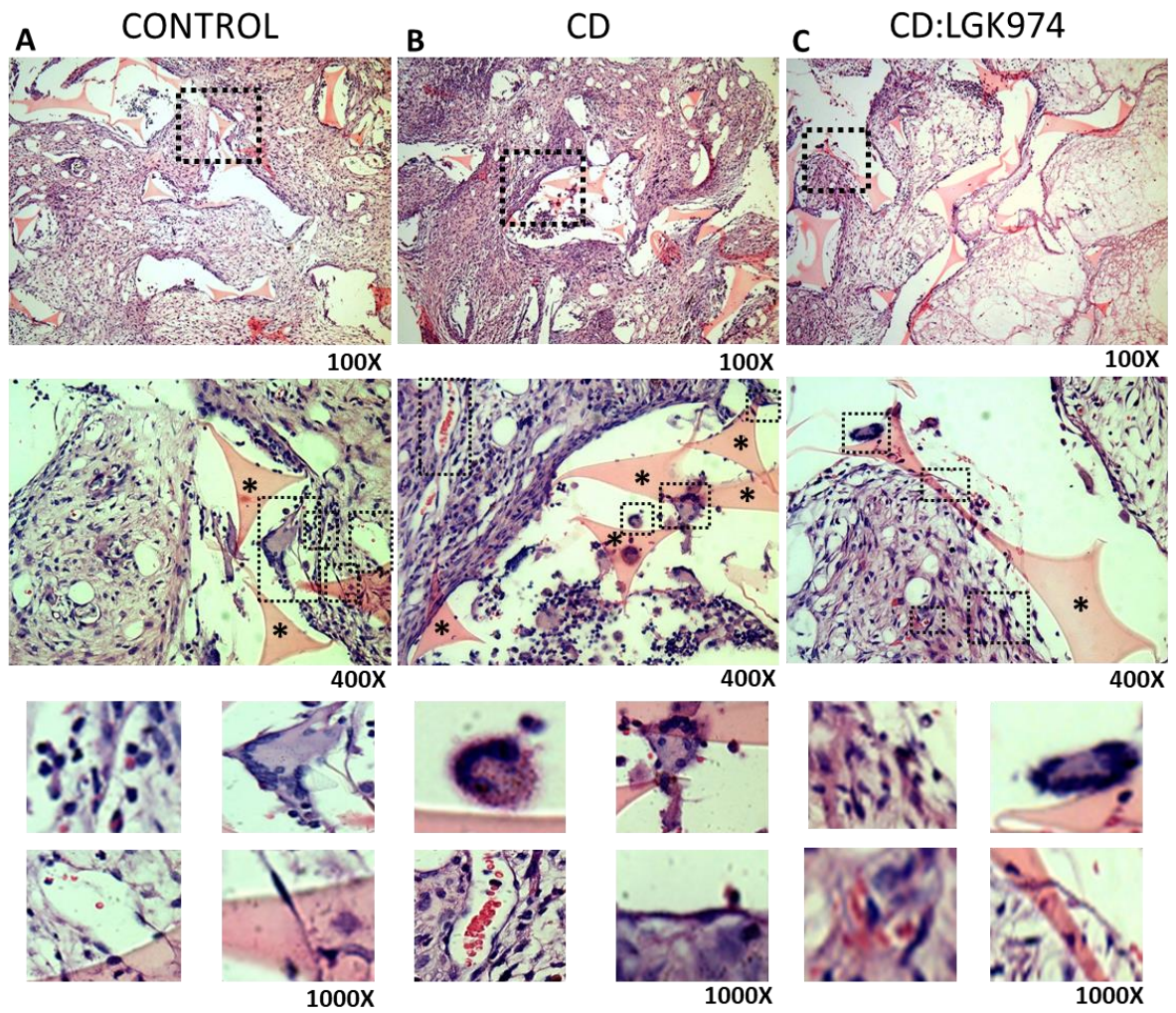
YE, F. et al. Wnt / $\beta$ -Catenin - Promoted Macrophage Alternative Activation Contributes to Kidney Fibrosis. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 29, p. 182-193, 2018.

YU, X. et al. Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. **Advanced Healthcare Materials**. v .4, N°. 9, p. 1268-1285, 2015.

## Supplementary Figures

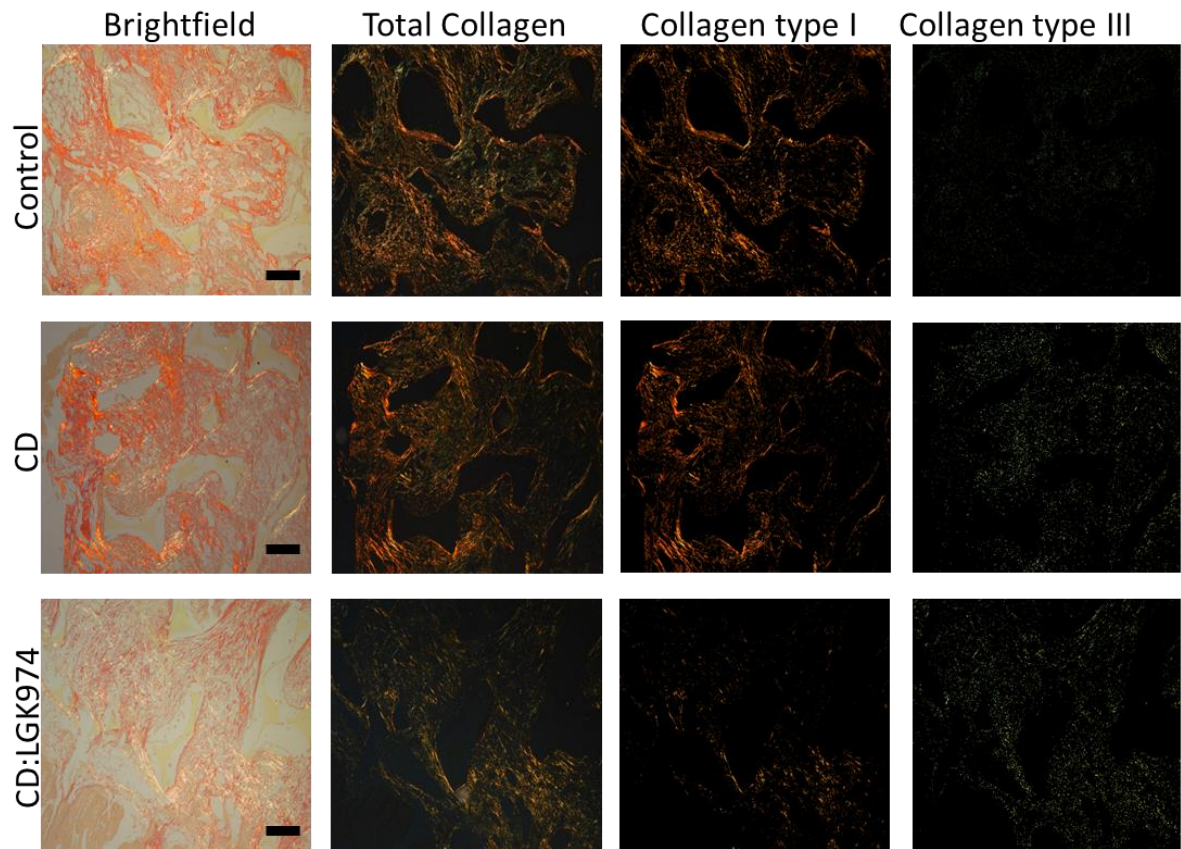


**FIGURE S1. Characterization of the CD:LGK974 complex** - (A) 2D NOESY-RMN spectrum of the CD:LGK974 complex. (B) Proposed geometric arrangement of LGK974 in the SBE- $\beta$ CD cavity with 2D spectrum.

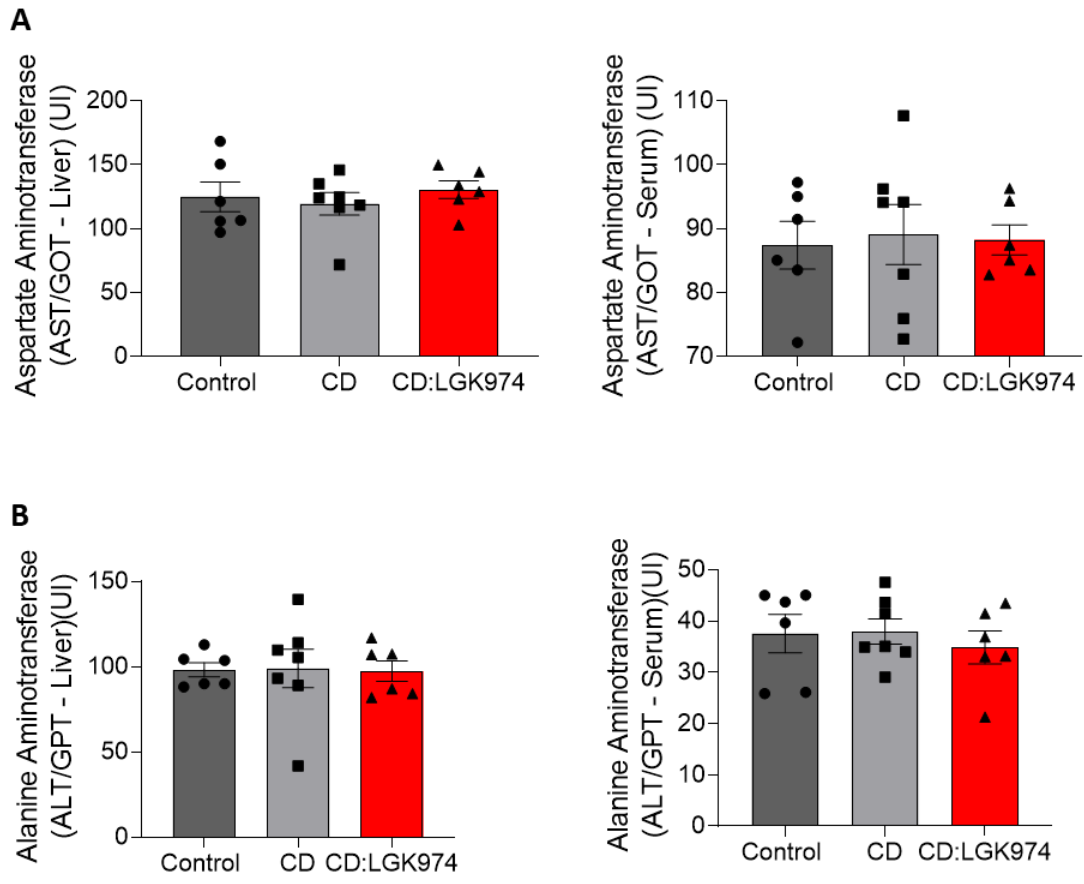


**Figure S2. Representative morphometric images in the implants: Control (A), CD (B), and CD:LGK974 (C), of the analyzed components (inflammatory cells, giant cells, vessels, and fibroblasts) by morphometry of the slides in H&E.**





**Figure S3. Quantification of collagen deposition in the implant** - (A) Representative histological sections of implants stained by Picrosirius-Red for collagen deposition in brightfield and darkfield (total, type I and type III) quantification by polarized light after 14 days of oral treatment.



**Figure S4. Liver transaminases dosage** - Evaluation of liver and serum transaminases. (A) Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) (IU) liver concentration and serum concentration. (B) Alanine Aminotransferase (ALT/SGPT) (IU) liver concentration and serum concentration. There was no significant increase for the 3 groups for both enzymes, demonstrating that there was no liver toxicity. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.; One-way ANOVA.

**Table S1. Flow cytometry antibodies.**

Antigen	Fluorochrome	Clone	Company
LIVE/DEAD	Acqua		Thermo Fisher
Streptavidin	Pacific Orange		Thermo Fisher
CD45	Super Bright 600	30-F11	Thermo Fisher
CD45.2	PerCP-Cy5.5	104	Thermo Fisher
CD11b	SuperBright 600	M1/70	Thermo Fisher
F4/80	APC	BM8	Thermo Fisher
Gr-1	Biotina	RB6-8C5	Thermo Fisher
CD206	FITC		Thermo Fisher
CD11c	SuperBright 645	N418	Thermo Fisher
IA-IE	APC-Efluor 780	M5/114.15.2	Thermo Fisher