

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Patologia

Letícia Cristine Cardoso dos Santos

**AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO PANCREÁTICA INDUZIDA POR IMPLANTE
DE MATRIZ SINTÉTICA EM ANIMAIS DIABÉTICOS TRATADOS COM INSULINA**

Belo Horizonte

2024

Letícia Cristine Cardoso dos Santos

**AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO PANCREÁTICA INDUZIDA POR IMPLANTE
DE MATRIZ SINTÉTICA EM ANIMAIS DIABÉTICOS TRATADOS COM INSULINA**

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

Área de Concentração: Patologia Investigativa

Orientadora: Profa. Dra. Paula Peixoto Campos Lopes

Belo Horizonte

2024

043

Santos, Leticia Cristine Cardoso dos.

Avaliação da proliferação pancreática induzida por implante de matriz sintética em animais diabéticos tratados com insulina [manuscrito] / Leticia Cristine Cardoso dos Santos. – 2024.

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

Orientadora: Profa. Dra. Paula Peixoto Campos Lopes.

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

1. Patologia. 2. Diabetes Mellitus. 3. Hiperglicemia. 4. Insulina. 5. Pâncreas. 6. Células Secretoras de Insulina. I. Lopes, Paula Peixoto Campos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 616



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

"AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO PANCREÁTICA INDUZIDA POR IMPLANTE DE MATRIZ SINTÉTICA EM ANIMAIS DIABÉTICOS TRATADOS COM INSULINA"

LETICIA CRISTINE CARDOSO DOS SANTOS

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

Aprovada em 23 de julho de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Mariana Martins Drumond, CEFET/MG

Profa. Dra. Luciana Xavier Pereira, UFSJ

Profa. Dra. Paula Peixoto Campos Lopes – ICB/UFMG - ORIENTADORA

Belo Horizonte, 23 de julho de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Paula Peixoto Campos Lopes, Professora do Magistério Superior**, em 24/07/2024, às 11:07, 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 **Luciana Xavier Pereira, Usuário Externo**, em 24/07/2024, às 13:39, 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 **MARIANA MARTINS DRUMOND, Usuário Externo**, em 31/07/2024, às 13:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3394838** e o código CRC **35E02A68**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA - SECRETARIA

**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 485 DE LETÍCIA CRISTINE
CARDOSO DOS SANTOS**

Realizou-se, no dia 23 de julho de 2024, às 14 horas, no formato presencial, Sala de Reuniões do Departamento de Patologia Geral – ICB/UFMG - Bloco C3 sala 241, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de Dissertação, intitulada "*Avaliação da Proliferação Pancreática Induzida por Implante de Matriz Sintética em Animais Diabéticos Tratados com Insulina*", apresentada por **Letícia Cristine Cardoso dos Santos** número de registro 2022691193, graduada no curso de Ciências Biológicas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Profa. Dra. Mariana Martins Drumond**, CEFET/MG; **Profa. Dra. Luciana Xavier Pereira**, UFSJ; **Profa. Dra. Paula Peixoto Campos Lopes** – ICB/UFMG – ORIENTADORA.

A Comissão considerou a Dissertação:

(X) APROVADA

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 23 de julho de 2024.

* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Mestre só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Dissertação, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de Diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Mestrado.



Documento assinado eletronicamente por **Paula Peixoto Campos Lopes**, Professora do **Magistério Superior**, em 24/07/2024, às 11:06, 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 **Luciana Xavier Pereira**, Usuário Externo, em 24/07/2024, às 13:39, 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 **MARIANA MARTINS DRUMOND**, Usuário Externo, em 31/07/2024, às 13:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site



https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 3394835 e o código CRC 8A9873C5.

Agradecimentos

Agradeço à Deus por ter me dado forças e resiliência e por ter colocado em minha vida pessoas especiais em meu caminho nesses últimos dois anos.

Agradeço à minha família, principalmente minha mãe e meu pai, por todo apoio e incentivo. Mesmo de longe, vocês sempre me ajudaram.

Agradeço a Prof^a e Dr^a. Paula Peixoto Campos, por me orientar, apoiar e aconselhar durante a realização deste projeto. Obrigada pela confiança.

Agradeço ao meu ex coorientador, Celso, que já não se encontra mais entre nós, por me apoiar durante a entrada no mestrado e até quando lhe foi possível. Você faz falta, amigo.

Agradeço ao professor Enio Ferreira, pela disponibilidade em me ouvir e me aconselhar com seus conhecimentos, contribuição no desenvolvimento desse projeto.

Agradeço ao professor Ricardo Gonçalves por sempre estar com as portas de seu laboratório abertas para mim e me apoiar.

Agradeço a todos os Técnicos responsáveis pelo Laboratório de Técnicas, vocês foram essenciais para a execução do meu trabalho.

Agradeço a todos os professores do departamento de Patologia Geral que me ajudaram de alguma forma.

Agradeço a todos os meus amigos do Programa, Mirielly, Nayma, Lucas, Raquel, Cindy, Gabi, Pierre, Thacy e Dai, por todo o incentivo, pelas trocas de conhecimento e os momentos de amizade.

Agradeço aos meus colegas de laboratório ou do programa, Clara, Cecília, Isabela, Larissa, Juliana, Luciana, Isadora, Fernanda, Máisa, Alex, Victor e Igor por toda ajuda.

Agradeço aos amigos que sempre me apoiaram, Thiago, Isadora, Cecília, Letícia e Fabiane, embora longe, sempre estamos nos apoiando.

Agradeço à toda equipe da Pós-graduação em Patologia: coordenação, Colegiado e secretária, Cintya, e colegas alunos de mestrado e doutorado, por todo auxílio e dedicação.

Agradeço aos membros da banca por seu tempo e contribuições.

Resumo

Diversas desordens pancreáticas como pancreatite, câncer de pâncreas e *diabetes mellitus* resultam em disfunções graves do pâncreas. Modelos de estudo têm sido desenvolvidos para possibilitar o entendimento do processo de regeneração pancreática com o intuito de auxiliar nas estratégias terapêuticas. O desenvolvimento desses modelos é de grande relevância para o entendimento da regeneração pancreática e como as células do pâncreas podem ser geradas a partir de outras pré-existentes, porém, o mecanismo de proliferação e organização dessas células ainda não foi bem elucidado. Neste trabalho, utilizamos uma matriz sintética de poliéter-poliuretano para induzir a proliferação de parênquima pancreático *in vivo* em camundongos C57BL/6 diabéticos. Após a indução química do diabetes (STZ) os animais foram divididos em três grupos, sendo que somente um grupo recebeu tratamento subcutâneo diário de insulina (G2), para avaliação da influência da glicemia na proliferação pancreática. Dois grupos (G1 e G2) receberam matrizes sintéticas cirurgicamente alocadas adjacentes ao pâncreas nativo e removidas 30 dias após a implantação. Nessa matriz, foram analisados, os componentes do pâncreas (ácinos, ductos e ilhotas), vasos sanguíneos e marcadores inflamatórios. Análises clínicas mostraram uma melhora no metabolismo dos animais tratados com insulina, que apresentaram uma recuperação do peso inicial, diminuição dos níveis glicêmicos e melhora no teste TTOG. Análises morfológicas por H&E e imuno-histoquímica foram realizadas para avaliar o tecido intra-implante neoformado. Após 30 dias, as matrizes estavam preenchidas com aglomerados de parênquima pancreático (ácinos, ductos e estruturas semelhantes a ilhotas), células inflamatórias, fibroblastos, componentes da matriz extracelular e vasos sanguíneos, entretanto, as análises mostraram que o grupo tratado com insulina apresentava maior área de proliferação intra-implante e número de ácinos por campo. Ambos os grupos apresentaram células das ilhotas positivas para insulina e para glucagon, além de células ductais e acinares positivas para KI-67 e PDX1 no tecido pancreático intra-implante. O grupo tratado com insulina apresentou um aumento em todas essas análises, exceto no número de células acinares positivas para KI-67. As análises do processo de angiogênese no tecido pancreático intra-implante por histologia e métodos imunobioquímicos demonstraram um aumento na quantidade de vasos, porém diminuição nos níveis de VEGF. Além disso, um aumento nos níveis de diversos marcadores inflamatórios (TNF- α , TGF- β , IL-10 e VEGF) e uma diminuição na expressão de moléculas de adesão (N-CAD e E-CAD) foram observados nesse grupo. O modelo de estudo utilizado demonstrou potencial em proliferar componentes exócrinos (ácinos, ductos) e endócrinos (ilhotas) e permitiu avaliação de moléculas e células envolvidas na proliferação pancreática em tecido pancreático adulto, em situações de alta demanda metabólica, apresentando melhores resultados quando os animais estão em condições de glicemia normalizada.

Palavras chaves: diabetes; hiperglicemia; insulina; proliferação pancreática; células β

Abstract

Pancreatic disorders such as pancreatitis, pancreatic cancer, and diabetes mellitus may result in severe pancreatic dysfunctions. Study models have been developed in order to provide the understanding of the pancreatic regeneration process to aid in therapeutic strategies. The development of these models is highly relevant for understanding pancreatic regeneration and how pancreatic cells can be generated from pre-existing ones; however, the mechanism of cell proliferation and organization is still not well elucidated. In this study, we used a synthetic polyether-polyurethane matrix to induce the proliferation of pancreatic parenchyma in vivo in diabetic C57BL/6 mice. After chemical induction of diabetes (STZ), the animals were divided into three groups, with only one group (G2) receiving daily subcutaneous insulin treatment to evaluate the influence of glycemia on pancreatic proliferation. Two groups (G1 and G2) received synthetic matrices surgically placed adjacent to the native pancreas and removed 30 days after implantation. In this matrix, pancreatic components (acini, ducts, and islets), blood vessels, and inflammatory markers were analyzed. Clinical analyses showed an improvement in the metabolism of insulin-treated animals, which showed a recovery of initial weight, a decrease in glycemic levels, and an improvement in the GTT test. Morphometric analyses by H&E and immunohistochemistry were performed to evaluate the newly formed intra-implant tissue. After 30 days, the matrices were filled with clusters of pancreatic parenchyma (acini, ducts, and islet-like structures), inflammatory cells, fibroblasts, extracellular matrix components, and blood vessels. However, analyses showed that the insulin-treated group had a larger intra-implant proliferation area and a higher number of acini per field. Both groups had islet cells positive for insulin and glucagon, as well as ductal and acinar cells positive for KI-67 and PDX1 in the intra-implant pancreatic tissue. The insulin-treated group showed an increase in all these analyses, except for the number of acinar cells positive for KI-67. Analyses of the angiogenesis process in the intra-implant pancreatic tissue by histology and immunobiochemical methods showed an increase in the number of vessels but a decrease in VEGF levels. Additionally, an increase in various inflammatory markers and a decrease in the expression of adhesion molecules (N-CAD and E-CAD) were observed in this group. The study model demonstrated potential in proliferating exocrine (acini, ducts) and endocrine (islets) components and allowed the evaluation of molecules and cells involved in pancreatic proliferation in adult pancreatic tissue under high metabolic demand conditions, presenting better results when the animals were in normalized glycemic conditions.

Keywords: diabetes; hyperglycemia; insulin; pancreatic proliferation; β -cells

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia Geral do Pâncreas.

Figura 2 - Organogênese geral do pâncreas em roedores.

Figura 3 - Protocolo experimental.

Figura 4 - Avaliação de parâmetros metabólicos dos animais.

Figura 5 - Macroscopia dos implantes nos animais diabéticos.

Figura 6- Proliferação e componentes exócrinos do pâncreas neoformado.

Figura 7 - Componentes endócrinos no tecido neoformado.

Figura 8 - Proliferação de células do tecido pancreático intra-implante.

Figura 9 - Proliferação de células progenitoras pancreáticas intra-implante.

Figura 10 - Análise da proliferação de vasos no pâncreas neoformado.

Figura 11 - Marcadores inflamatórios no tecido pancreático neoformado.

Figura 12 - Expressão dos genes de molécula de adesão no tecido pancreático intra-implante.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Marcadores de imunohistoquímica utilizados para análise do tecido intra-implante.

Tabela 2 - Genes e primers utilizados para a realização do PCR-RT

LISTA DE ABREVIATURAS

ADM – Metaplasia ductal acinar
ADP-ribose – adenosina difosfato (ADP) e ribose
ATP – Trifosfato de adenosina, do inglês adenosine triphosphate
Arx – Aristaless Related Homeobox (Homeobox Relacionado a Aristaless)
AUC – Área sob a curva, do inglês area under curve
BMP – Proteína morfogenética óssea
CCK – Colecistocinina
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DM – Diabetes Mellitus
DMT1 - Diabetes Mellitus Tipo 1
DMT2 – Diabetes Mellitus Tipo 2
DNA - Ácido desoxirribonucleico, do inglês deoxyribonucleic acid
E-CAD – E-caderina
FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais
FGF - Fator de crescimento de fibroblastos
GLUT2 – Transportador de glicose, do inglês glucose transporter 2
H&E- Hematoxilina-eosina
Hes1 – Hairy and Enhancer of Split-1
Hnf1 β – Hepatocyte Nuclear Factor 1 Beta (Fator Nuclear do Hepatócito 1 Beta)
HNF4 – Hepatocyte Nuclear Factor 4 (Fator Nuclear do Hepatócito 4)
HRP - Anticorpo policlonal conjugado a peroxidase de rábano
ICB- Instituto de Ciências Biológicas
IHC – Imunohistoquímica, do inglês immunohistochemistry
IL-10 – Interleucina 10
Ins1 – Insulinoma-associated 1 (Associado ao Insulinoma 1)
IPE – Insuficiência pancreática exócrina
KI-67- Kiel 67
MDA – Malonaldeído
Mnx1 – Motor Neuron and Pancreas Homeobox 1 (Fator 1 do Homeobox de Neurônios Motores e Pâncreas)
MPC – células pancreáticas multipotentes
MPO – Mieloperoxidase
MSCs – Células tronco mesenquimais, do inglês mesenchymal stem cells
NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAG - N-acetyl- β -D-glucosaminidase
NGN3 – Neurogenina 3
N-CAD – N-caderina
OGTT – do inglês oral glucose tolerance test
PBS- Tampão fosfato salina, do inglês Phosphate buffered saline
RT-PCR – Real - Time Polymerase Chain Reaction
Pdx1 - Pancreatic and duodenal homeobox 1
PDL – Ligação do ducto pancreático
PERT – Terapia de Reposição de Enzimas Pancreáticas
PTF1A - Pancreas specific transcription factor, 1a
PX – Pancreatectomia parcial
RA – Ácido retinóico, do inglês retinoic acid

RBP - Proteína de ligação recombinante, do inglês recombinant ligation protein

Rfx6 – Regulatory Factor X6 (Fator Regulatório X6)

ROS – Espécies reativas de oxigênio

Sox9 – SRY (sex determining region Y)-box 9

STZ – Estreptozotocina, do inglês streptozotocin

TGF- β - Fator de Crescimento Transformador beta, do inglês, Transforming Growth Factor Beta

TNF α - Fator de Necrose Tumoral, do inglês Tumor Necrosis Factor -Alpha

TPV – Volume total do pâncreas, do inglês, total pancreatic volume

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF - Fator de crescimento endotelial, do inglês *Vascular endothelial growth factor*

Sumário

1. Introdução	15
2. Revisão bibliográfica	16
2.1 Pâncreas	16
2.2 Organogênese do Pâncreas	20
2.3 Plasticidade celular na regeneração pancreática	25
2.4 Diabetes	28
2.5 Doenças secundárias a lesões no pâncreas	29
2.6 Tratamentos atuais para a hiperglicemia e a IPE	31
2.7 Modelos de estudo do processo de regeneração pancreática	33
2.8 Biomaterial	35
3. Justificativa	37
4. Objetivo geral	38
5. Objetivos específicos	38
6. Materiais e Métodos	39
6.1 Animais	39
6.2 Indução da Diabetes Mellitus	40
6.3 Implante de esponja sintética de poliéter-poliuretano	41
6.4 Análise de glicemia dos animais	42
6.5 Análise de histologia e morfométricas	42
6.6 Imuno-histoquímica	42
6.7 Dosagem dos níveis de Mieloperoxidase e N-acetil- β -D-glucosaminidase	43
6.8 Medição dos níveis de citocinas produzidas intra-implantes	43
6.9 Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real	44
6.10 Análise estatística	45
7. Resultados	45
7.1 Metabolismo dos animais	45
7.2 Macroscopia do tecido pancreático intra-implante induzido	47
7.3 Proliferação de tecido pancreático intra-implante (componentes exócrinos e endócrinos)	47
7.4 Análise de angiogênese no implante	54
7.5 Análise de citocinas inflamatórias no implante	56
7.6 Transição epitélio-mesênquima nas células pancreáticas em proliferação	58
8. Discussão	59
9. Conclusão	65

Referências.....	65
------------------	----

1. Introdução

O pâncreas é um importante órgão metabólico com funções essenciais nos sistemas digestivo e endócrino. Essas funções são realizadas por células dos componentes exócrino e endócrino do pâncreas. Cada um dos cinco principais tipos de células das ilhotas sintetiza e secreta hormônios que são liberados diretamente na circulação sanguínea através de uma densa rede vascular intra-ilhotas. Esses hormônios desempenham papéis essenciais na regulação dos níveis de glicose no sangue e no controle da liberação de enzimas digestivas. Por outro lado, o pâncreas exócrino é composto por células acinares que produzem enzimas e células ductais que facilitam o transporte dessas enzimas para o intestino. (Jiang et al., 2020; Shih et al., 2013).

Diversas desordens que afetam o pâncreas podem levar à destruição de seus compartimentos, resultando em hiperglicemia e graves complicações clínicas relacionadas à insuficiência da porção exócrina (Murtaugh & Keefe, 2015). O tratamento para insuficiência exócrina pancreática (IPE) consiste na reposição das enzimas pancreáticas que o pâncreas não está produzindo adequadamente. Para condições de hiperglicemia, os tratamentos principais incluem a administração de insulina exógena e o uso de medicamentos que aumentem a sensibilidade das células à insulina, dependendo dos níveis de C-peptídeo e glicose do paciente. Contudo, mesmo com a realização correta desses tratamentos, os pacientes estão sujeitos a grandes flutuações nos níveis glicêmicos e podem desenvolver complicações futuras, como doenças cardiovasculares, nefropatias e retinopatias (Guney et al., 2020; Brennand & Melton, 2009; Salinno et al., 2019). O transplante de ilhotas é atualmente o tratamento mais indicado para pacientes com deficiência de células beta, mas é limitado pela necessidade de imunossupressores, escassez de doadores e a possibilidade de falha dos enxertos após alguns anos (Lysy et al., 2015; Pepper et al., 2013; Guney et al., 2020).

Considerando as limitações dos tratamentos atuais, há uma demanda crescente por novas abordagens que possam regenerar o tecido pancreático e fornecer células beta funcionais através de proliferação, neogênese e

transdiferenciação (Zhou & Melton, 2018; Guney et al., 2020). Estudos tanto *in vivo* quanto *in vitro* demonstram que células β do pâncreas podem ser geradas a partir da replicação de células β já existentes ou formadas a partir de células não- β no pâncreas (Peshavaria et al., 2006). Além disso, células dos ductos pancreáticos e células acinares têm a capacidade de se desdiferenciar, exibindo características embrionárias pancreáticas, para formar novos lobos pancreáticos e Ilhotas de Langerhans (Thorel et al., 2010; Li et al., 2010; Xu X et al., 2008; Murtaugh & Keefe, 2015; Peshavaria et al., 2006). No entanto, esses modelos de regeneração pancreática *in vivo* e *in vitro*, como os organoides, são difíceis de desenvolver, possuem alto custo de manutenção e frequentemente não replicam com precisão as condições do organismo. Portanto, a criação de modelos de estudo da regeneração pancreática que mimetizem de forma mais precisa o ambiente vivo pode fornecer insights valiosos sobre o processo de proliferação, oferecendo uma solução mais prática e acessível para a pesquisa nesta área.

Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo estudos utilizando uma matriz sintética porosa de poliéter-poliuretano que, uma vez inserida no organismo, induz a proliferação de tecido conjuntivo em seu interior e, ao ser alocada na cavidade abdominal, permite a migração e proliferação de diversos tecidos adjacentes, incluindo o parênquima pancreático (Pereira et al., 2017). Hipotetizamos que este modelo experimental poderia ser explorado para investigar o desenvolvimento de tecido pancreático na plataforma, formado a partir de pâncreas adulto, mimetizando uma cultura de órgão *in vivo*, em condições de hiperglicemia e normoglicêmica em animais diabéticos, sem necessidade de lesão prévia no pâncreas ou adição de fatores de crescimento exógenos à plataforma. A compreensão dos processos celulares envolvidos nessa resposta é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de engenharia de tecidos utilizando o novo tecido pancreático formado.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Pâncreas

O pâncreas mamífero é um órgão glandular que tem grande influência no funcionamento do corpo humano. Anatomicamente, o pâncreas é dividido em cabeça, corpo e cauda e sua estrutura é formada por lóbulos e envolta em tecido conectivo. O ducto pancreático principal começa na cauda do pâncreas e percorre toda extensão do órgão até adentrar a parte descendente do duodeno através da papila duodenal maior (Karpinska & Czauderna, 2022).

O pâncreas é um órgão composto por um componente exócrino e um componente endócrino (Figura 1). A parte exócrina é representa 80 a 85% da massa total do órgão e é constituída por uma rede ramificada de ductos e células epiteliais secretoras que se organizam de forma circular com um lúmen central, formando os ácinos. As células acinares produzem e secretam diversas enzimas que fazem parte do suco pancreático alcalino e que ajudam no processo de digestão de alimentos no intestino. Essas enzimas, juntamente com eletrólitos e muco secretado por células globosas, são transportadas através de ductos para atuarem na degradação de proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídios que chegam ao duodeno (Server & Grapin-Botton, 2020; Dabrowski et al., 2007).

Dentre as enzimas produzidas pela parte exócrina do pâncreas estão as enzimas proteolíticas, como a tripsina, a quimotripsina, a carboxipeptidase e a elastase. Além disso, há a produção de enzimas pancreáticas lipolíticas como as lipases e fosfolipases, que digerem gordura, as enzimas lactases e amilases, as quais são responsáveis por quebrar amido em maltose, maltotriose e destrinas e as enzimas nucleolíticas, que quebram ácidos nucleicos (Karpínska & Czauderna, 2022).

A parte endócrina do pâncreas consiste em agregados circulares de células endócrinas, as ilhotas de Langerhans, dispostas em meio ao parênquima exócrino e que constituem apenas 1-2% da massa total do órgão. As ilhotas são constituídas de diferentes tipos celulares que secretam hormônios na corrente sanguínea, dentre eles estão as células α , que produzem glucagon, as células β , responsáveis pela produção de insulina, além das células δ , células ϵ -cells e células PP, que secretam somatostatina, grelina e polipeptídeo pancreático, respectivamente. (Guney et al., 2020; Al-Hasani et al., 2013).

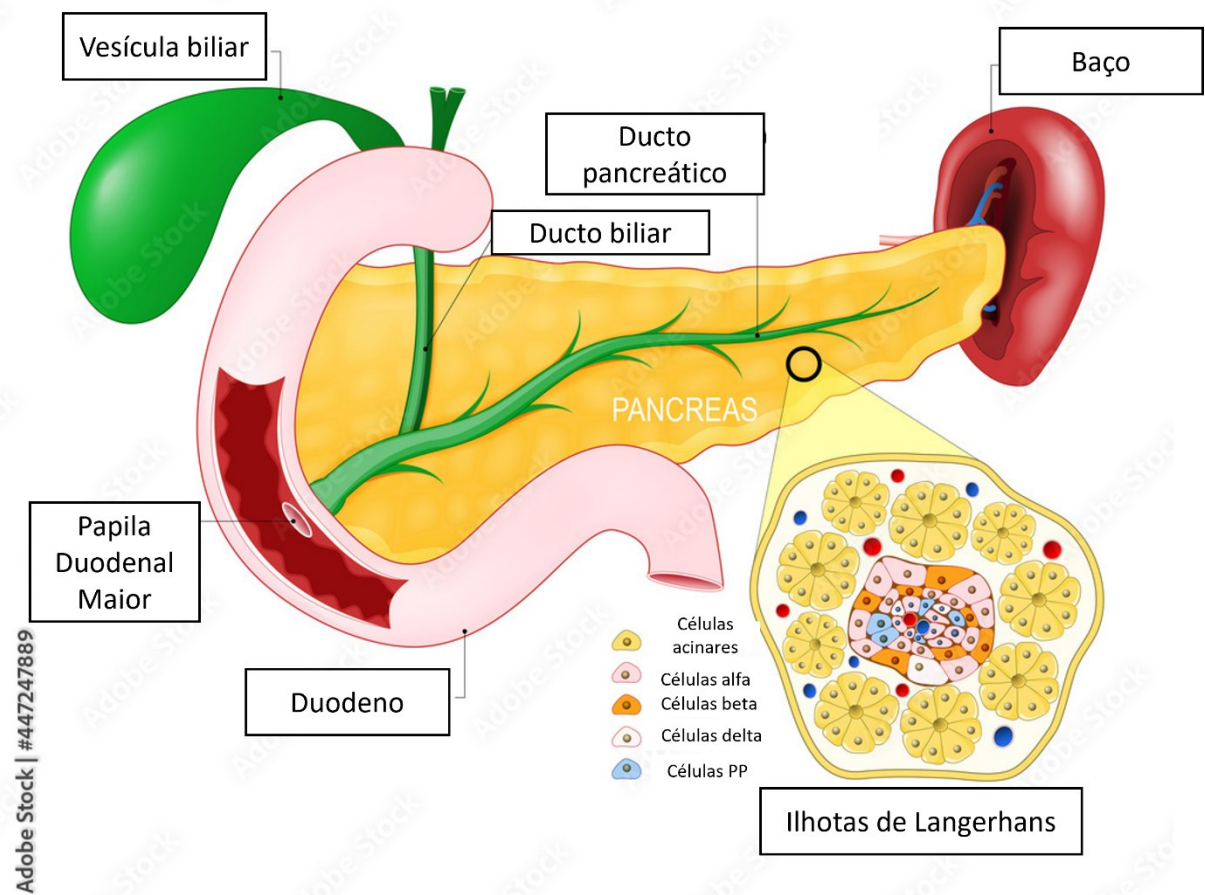


Figura 1. Anatomia Geral do Pâncreas. O pâncreas é um órgão retroperitoneal localizado atrás do estômago, estendendo-se do baço até o duodeno. As células acinares exócrinas produzem enzimas que são transportadas por uma complexa rede de ductos até o duodeno, onde auxiliam na digestão de proteínas, carboidratos e lipídios. A porção endócrina do pâncreas é composta por ilhotas de Langerhans, que contêm cinco tipos de células endócrinas: células α , β , δ , PP e ϵ (essas últimas não ilustradas). Estas células secretam hormônios diretamente na corrente sanguínea através de uma densa rede capilar que circunda as ilhotas. As ilhotas pancreáticas também são innervadas pelo sistema nervoso autônomo, o que contribui para a regulação da liberação hormonal. Fonte: Adobe Stock.

A microanatomia das Ilhotas de Langerhans contém um denso plexo capilar e é innervada pelo sistema nervoso autônomo. As células endócrinas que compõem a ilhota, principalmente as células β , são responsáveis por manter a homeostase da glicose ao reconhecerem os níveis de glicose no sangue e secretar insulina diretamente na vasculatura da ilhota em resposta a altas concentrações de glicose no sangue e devido à estimulação de neurotransmissores que são liberados (Rorsman et al., 2003). As células α produzem o hormônio glucagon, o qual possui ação antagônica ao hormônio insulina, e é responsável pela prevenção do estado de hipoglicemia no organismo. A regulação da secreção de insulina e glucagon é o principal mecanismo de regulação dos níveis de glicose no sangue. Essa regulação ocorre devido às

inervações do sistema simpático e parassimpático presente nas Ilhotas de Langerhans (Lamy et al., 2014; Xavier, 2018).

As células δ (delta) compõem cerca de 10% do número total de células das ilhotas e produzem o hormônio chamado somatostatina. Dentre as funções desse hormônio estão a inibição da secreção da insulina, o glucagon e o polipeptídeo pancreático (Shamsi et al., 2021). As células PP, ou seja, que contém polipeptídeo pancreático, formam 1-2% de toda a população das Ilhotas e são capazes de inibir a liberação de glucagon em baixas concentrações de glicose no sangue (Aragon et al., 2014). As células positivas para Grelina são pouco conhecidas, entretanto, sabe-se que elas representam 1% da população de células das ilhotas. Estudos demonstram que a grelina é capaz de inibir a secreção de insulina em humanos e roedores, além de regular os outros hormônios das células endócrinas do pâncreas (Broglia et al., 2001).

As Ilhotas de Langerhans compõem os 1–2% restantes do volume total do pâncreas (TPV). Essas ilhotas variam em forma, podendo ser circulares, ovais ou altamente irregulares em suas secções transversais, e podem conter desde algumas até várias milhares de células endócrinas. Além de estarem presentes nas ilhotas, essas células também podem ser encontradas isoladas no tecido acinar e ductal do pâncreas. Embora o tamanho das ilhotas seja semelhante em humanos e camundongos, a proporção entre células beta e alfa é maior nos camundongos. As células delta e as células PP, que liberam somatostatina e polipeptídeo pancreático, respectivamente, são os tipos de células menos frequentes, constituindo menos de 10% das células em humanos e menos de 5% em camundongos.

O pâncreas exócrino representa 96–99% do volume total do pâncreas (TPV). Em humanos, o pâncreas é composto por lóbulos com demarcações incompletas e todo o parênquima é uma unidade contínua. Cada lóbulo recebe um ducto principal que se projeta em ductos menores entre os ácinos pancreáticos e artérias que se ramificam. Os ácinos são aglomerados de células acinares piramidais formando uma estrutura em forma de cúpula que canaliza secreções dos polos apicais das células acinares para os ductos intercalares (Zhou et al., 2007). Os ductos intercalares drenam dos ductos intralobulares (localizados dentro dos lóbulos) e esses, ao sair dos lóbulos, drenam para os ductos interlobulares de maior diâmetro (localizados entre os

lóbulo). O pâncreas do rato, por outro lado, exibe uma anatomia ductal bastante diferente. Um grande ducto interlobular drena cada um dos 3 lobos. O ducto do lóbulo esplênico e gástrico se unem e se juntam ao ducto biliar comum bem antes que o ducto pancreático/biliar comum entre na parede do duodeno (Guney et al., 2020).

Em camundongos, o pâncreas não é um órgão bem-organizado como ocorre em humanos. O pâncreas de roedores é distribuído difusamente dentro do mesentério de maneira dendrítica. Macroscopicamente, o lóbulo pode ser separado em 3 partes: a duodenal, a esplênica e a gástrica. O pâncreas adulto é considerado mesentérico, pois diferente do pâncreas humano compacto e retroperitoneal, seus lóbulos estão dispersos em meio a gordura mesentérica, tecido conectivo e agregados linfoides, se estendendo entre o duodeno e o baço (Treuting & Dintzis, 2012).

2.2 Organogênese do Pâncreas

O pâncreas se desenvolve a partir do intestino primitivo, derivado do endoderma, e todas as células que o compõe originam de células progenitoras multipotentes. Ele é único entre os órgãos gastrointestinais que se deriva tanto da porção dorsal quanto da porção ventral do endoderma. A parte ventral do pâncreas surge do endoderma anterior, enquanto o pâncreas dorsal se forma a partir das células do endoderma posterior. Cada uma das partes interage com diferentes tecidos circundantes, os quais irão influenciar no desenvolvimento do pâncreas (Karpinska & Czauderna, 2022).

No camundongo, o desenvolvimento do pâncreas torna-se explicitamente evidente pela primeira vez em aproximadamente E9.5 (dia embrionário 9.5), quando o endoderma do intestino anterior dorsal, acima da notocorda, se espessa e começa a se evaginar como uma protuberância que se projeta no mesênquima circundante (Figura 2). Por volta de E10, há o surgimento do anlage do pâncreas ventral e do ducto biliar comum a partir do endoderma do intestino anterior ventral. As duas protuberâncias começam a se desenvolver independentemente a partir desse momento, sendo influenciadas pelos tecidos adjacentes. A formação do pâncreas em

roedores foi classicamente dividida em duas ondas de desenvolvimento sobrepostas (Pan & Wright, 2011).

A primeira onda se refere a uma transição primária entre os dias embrionários E9.5 e E 12.3, na qual há uma mudança morfogênética no epitélio pancreático. Os principais eventos dessa transição incluem proliferação ativa das células progenitoras pancreáticas, que vão gerar um epitélio estratificado, e a formação de múltiplos microlúmens, os quais vão se coalescer subsequente, que serve como precursor para transformar todo o primórdio pancreático em uma árvore epitelial em crescimento. Nessa fase, as células estabelecem uma polaridade apical levando eventualmente a formação do ducto. (Kesavan et al., 2009; Villasenor et al., 2010). Juntamente a esses processos da primeira onda há uma compartimentalização do epitélio pancreático, que começa a se diferenciar em domínios distintos de "ponta" e "tronco". Enquanto o domínio de "ponta" contém células pancreáticas multipotentes (MPC), a região epitelial do tronco adjacente consiste em um pool progenitor bipotencial endócrino-ductal (Zhou et al., 2007).

A segunda onda começa no dia embrionário E13.5 e é caracterizada por uma expansão e ramificação do broto pancreático, além de uma diferenciação celular massiva com alocação das três linhagens pancreáticas (células acinares, tubulares e endócrinas). Assim, a maioria das células se especificam para virarem células ductais ou endócrinas, e somente uma pequena proporção das células se mantem multipotente (Pan et al., 2013). Células acinares se desenvolvem a partir de uma porção da "ponta" do epitélio que se estende e entra em um processo de proliferação para aumentar o número de "pontas" acinares. O processo denominado "divisão de ponta" dá origem ao grande número de ácinos nesse período. As células endócrinas e ductais se desenvolvem a partir de outras células progenitoras, que se encontram presentes na região do "tronco" epitelial. Estudos demonstram que há uma relação entre o local onde a célula progenitora se encontra dentro do epitélio que se ramifica e a determinação da identidade celular que essa célula recebe (Zhou et al., 2007). As células progenitoras que originam especificamente as células acinares estão localizadas predominantemente nas pontas da rede de ductos ramificados. Por outro lado, as células maduras ductais e endócrinas derivam dos troncos desses ramos (Pin & Fenech, 2020). Durante esse período, as células que irão dar origem às células

endócrinas são marcadas por altos níveis do fator de transcrição Neurogenina 3 (NGN3) (Gu et al., 2002).

A terceira onda do desenvolvimento pancreático ocorre após o dia E15 e se estende após o nascimento. Nessa fase, o epitélio se expande e há uma intensa proliferação de células acinares. De acordo com o estágio de desenvolvimento, a capacidade do epitélio do “tronco” de dar origem a células acinares muda e outros tipos de células começam a aparecer (Pan & Wright, 2011). Durante o final da gestação e nas primeiras semanas de vida pós-natal, as células endócrinas começam a se aglutinar e ganhar forma de células β , formando ilhotas maduras. No camundongo, as células β formam predominantemente o núcleo da ilhota e são cercadas por um manto de células α , δ e PP, enquanto uma pequena população de células ϵ está dispersa por toda a ilhota (Bouwens & Rooman, 2005). Estudos sugerem que as células endócrinas entram em um processo de transição epitélio-mesênquima e se aglomeram para formar as ilhotas de Langerhans (Cole et al., 2009).

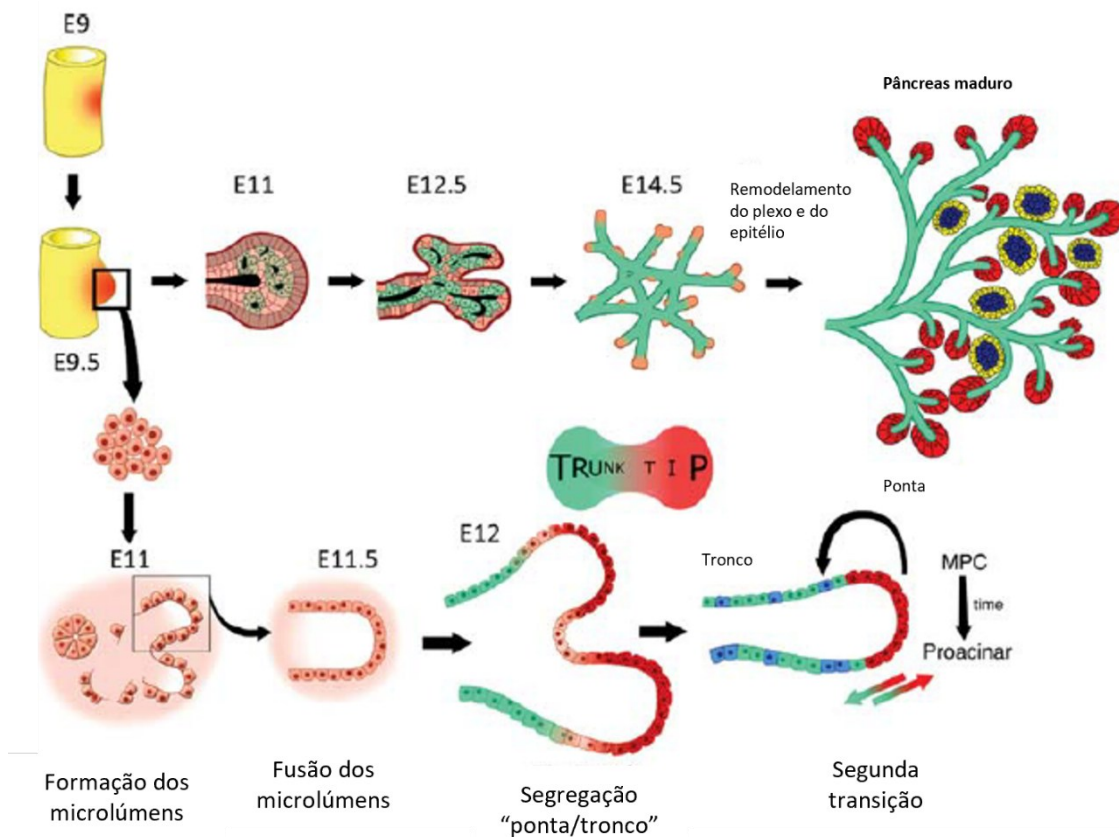


Figura 2. Organogênese geral do pâncreas em roedores. Somente uma protuberância foi demonstrada para facilitar entendimento. Início da formação do órgão, mostrando que o epitélio do intestino se torna especializado, produzindo células pancreáticas progenitoras multipotentes, que se expande em uma protuberância com células que ganham uma polarização apical e formam

microlúmens. Esses microlúmens se coalescem e se proliferam, produzindo um plexo epitelial extensivo. Células ganham características de epitélio do “tronco” (verde) ou se mantêm como células multipotentes (vermelho) que ainda irão se tornar o epitélio de “ponta”. A divisão substancial das pontas e a proliferação lateral impulsionam o rápido crescimento da árvore durante o crescimento e a resolução do plexo. Fonte e adaptado de Pan & Wright (2011).

Para que ocorra a continuidade do desenvolvimento do endoderma pancreático, uma série de interações permissivas com os tecidos vizinhos mesodérmicos, tal como a interação entre fatores extrínsecos e intrínsecos, é necessária. O mesoderma é capaz de produzir uma série de moléculas de sinalização, incluindo as vias do ácido retinóico (RA), do fator de crescimento de fibroblastos (FGF), da proteína morfogenética óssea (BMP), do WNT, Hedgehog e Notch. Essas moléculas possuem papéis específicos em cada estágio durante a padronização do endoderma. Além disso, um rígido controle das interações entre os tecidos adjacentes é necessário para a correta organogênese do pâncreas (Pan & Wright).

Poucos fatores de crescimento parecem estar envolvidos no desenvolvimento de células acinares a partir de células progenitoras multipotentes. O Ptf1a (Pancreas specific transcription fator 1a) possui um papel chave na formação dos ácinos durante a segunda onda de desenvolvimento, PTF1^{RBP-JL} se liga e ativa a expressão de Ptf1a e RBPJL, levando a um forte reforço positivo que cria um loop e corrobora com a produção de Ptf1a e RBPJL nos ácinos. O complexo de PTF1^{RBP-JL}, formado pela proteína PTF1 juntamente com outras moléculas como a proteína de ligação recombinante J (RBP), pode se ligar a promotores de genes que codificam zimogênios secretores, como a amilase, elastase 1 e 2, Cpa1, quimiotripsina, tripsina, além de genes que estão envolvidos com a maturação e diferenciação dos ácinos (Masui et al., 2010). Estudos demonstram que a perda de Ptf1a leva à agenesia dos ácinos (Krapp et al., 1998).

Outro fator importante é o Mist1, que é um membro da família de fatores de transcrição bHLH é necessário para estabelecer uma polaridade “apical-basal” e a diferenciação completa das células acinares. Assim, esse é expresso em células acinares maduras. Além disso, esse fator é responsável por limitar a proliferação das células acinares, mantendo uma quantidade normal de células (Pin et al., 2001).

Em relação às vias de sinalização, o desenvolvimento de células acinares é guiado por vias embrionárias como a Notch e a via Wnt. A inibição da via Notch no epitélio pancreático reduz o desenvolvimento das células acinares (Fujikura et al.,

2006). Por outro lado, a via canônica de sinalização do Wnt, mediado pela β -catenin, é essencial para o desenvolvimento e a proliferação das células acinares (Murtaugh et al., 2005). Outros estudos indicam que essa via é essencial para a proliferação e a regeneração de células acinares após lesão e injúria (Keefe et al., 2012).

As células endócrinas e ductais pancreáticas também são derivadas de células progenitoras multipotentes (MPCs), embora estas estejam localizadas no “tronco”. Essas células passam a ganhar características específicas, apresentando marcadores que as fazem se tornar células maduras (Kopinke et al., 2011). Os estudos atuais demonstram que a segregação dessas células acontece a partir da inibição lateral regulada pela via Notch. Assim, as células endócrinas progenitoras passam a expressar Ngn3 e induzem autonomamente a produção de ligantes Notch, que sinalizam para células vizinhas e ativam a expressão de Hes1 em células progenitoras ductais (Afelik & Rovira, 2016).

Grande parte dos estudos recentes apoiam o conceito que a diferenciação celular, é promovida pela expressão diferencial de marcadores de diferenciação em várias populações de células multipotentes. Células multipotentes distais são positivas para Pdx1, Ptf1a, Cpa1 e cMyc (expressam esses genes), as células emergentes restritas ao ducto e endócrinas são positivas para Pdx1, Mnx1, Nkx2.2, Nkx6.1, Pax4, Pax6, Arx4, Foxa1, Foxa2, HNF4, Islet1, Insm1, Rfx6, MafA, MafB, Sox9+, Hnf1 β +, Foxa2 (Oliver-Krasinski et al., 2008; Solar et al., 2009). Células progenitoras ductais dentro do “tronco” retêm expressão de fatores como Sox9, HNF1 β e Hes1 (Afelik & Rovira, 2016; Seymour et al., 2007; Stanger et al., 2005).

O gene PDX1 possui papel importante ao atuar no complexo de sinalização e transcrição que orchestra a proliferação, o crescimento e a diferenciação do pâncreas. Ele é expresso nas células do endoderma pré-pancreático e é mantido até mesmo em células β maduras (Stoffers et al., 1997). Estudos em animais mutantes para o gene PDX1 mostram que o animal não desenvolve pâncreas, indicando que células PDX1+ são em geral, progenitores pancreáticos. (Jonsson et al., 1994). Além disso, artigos sobre o desenvolvimento pancreático em animais transgênicos demonstram que células que expressam PDX1 dão origem a três tipos de linhagens, células exócrinas, endócrinas e ductos. (Gu et al., 2002).

2.3 Plasticidade celular na regeneração pancreática

A plasticidade de uma célula é determinada pela sua capacidade de se transformar, considerando seu epigenoma total, e adotar características e funcionalidades de outras células (Shein et al., 2020). O entendimento da plasticidade células do pâncreas é uma área de grande interesse e relevância clínica atualmente, principalmente ao se considerar a necessidade de tratamento de doenças como a diabetes. Sabe-se que o pâncreas adulto possui uma capacidade de regeneração bastante limitada, entretanto, muitos trabalhos vêm demonstrado a capacidade de células pancreáticas bem diferenciadas de se dediferenciar, ganhando um aspecto de células semelhante às células progenitoras, ou se transdiferenciar diretamente em uma outra célula da mesma linhagem ou de linhagem diferente (Zipori, 2004; Chera et al., 2014). Normalmente, esses processos de regeneração com subsequente proliferação se dão após estímulos com lesões cirúrgicas, químicas ou intervenções genéticas específicas, alteração os níveis de expressão de determinado gene (Pan & Wright, 2011).

Alguns estudos têm mostrado que vias de sinalização comumente encontradas durante o desenvolvimento pancreático embrionário, tais como as vias Notch, Wnt e Hh, podem ser reativadas durante processos de regeneração pancreáticos causados por lesões físicas ou químicas (Puri & Hebrok, 2010; Li et al., 2010). Em lesões de pancreatite humana foi observado que o pâncreas danificado pela doença em seu estado agudo ou crônico apresenta uma proliferação de células do tecido acinar remanescente. Essas células estão em meio a intenso processo de fibrose, infiltrado leucocitário e estruturas epiteliais que foram denominadas como metaplasia acinar-ductal ou complexos tubulares, indicando que células acinares se dediferenciaram em resposta à inflamação crônica (Zimmermann et al., 2002).

Modelos animais de pancreatite experimental para a observação da regeneração do compartimento exócrino do pâncreas utilizam a caeruleína, um hormônio de roedores análogo à colecistocinina. A administração de colecistocinina leva a lesão do compartimento exócrino do pâncreas, causando a apoptose e necrose de células acinares. Estudos demonstravam que essa lesão faz com que as células acinares ganhem aspectos de células ductais (Bockman, 1997), entretanto, artigos

recentes indicam que essas células ganham características de células progenitoras, apresentando marcadores que não são vistos em células acinares maduras. Em alguns casos, essa dediferenciação pode seguir uma subsequente rediferenciação, o que acontece quando células acinares ganham características de células progenitoras ductais e, posteriormente, se diferenciam em células acinares novamente em resposta a um processo de inflamação (Morris et al., 2010).

Estudos demonstram que a maioria dos ácinos que se proliferam derivam de outros ácinos pré-existentes, embora alguns estudos relatem que essas células acinares podem se originar a partir de outras células, como as células ductais. Criscimanna e colaboradores (2010) mostraram que lesão pancreática por toxina diftérica em camundongos induziu a morte de células acinares e endócrinas, porém, os ductos remanescentes proliferaram e as células derivadas desses ductos adquiriram propriedade acinares e endócrinas por meio da ativação de vias de sinalização importantes no desenvolvimento do pâncreas.

As células β possuem grande relevância clínica atualmente devido a sua função de regulação dos níveis glicêmicos no organismo. Assim, muito tem se focado na plasticidade e na proliferação dessas células. Pan e colaboradores (2013) mostraram que as células acinares eram capazes de se tornar células progenitoras facultativas após lesão por ligação do ducto pancreático (PDL) e administração de Estreptozotocina (STZ) em camundongos. Essas células passavam a expressar diversos fatores embrionários multipotentes e eram capazes de desenvolver em células ductais e endócrinas, como as células β . Por outro lado, Zhou e colaboradores (2008), demonstraram, em modelo in vivo, a re-expressão dos fatores de transcrição Pdx1, Ngn3, MafA, envolvidos do desenvolvimento embrionário, são capazes de levar células acinares a se diferenciarem em células β .

Em modelos de pancreatectomia parcial com 90% do órgão lesionado, foi visto que a regeneração de células β pode ocorrer pela auto-replicação das próprias células β ou mediante a neogênese de células β a partir de outras fontes celulares (Bonner-Weir et al., 1993). Outros modelos mostraram que as células β poderiam também ser provenientes de outras células endócrinas, como as células α , porém essa conversão só aconteceria em situação de intensa lesão por toxina diftérica (Thorel et al., 2010). Xu e colaboradores (2008) mostraram que as células β progenitoras já existentes no

pâncreas adulto podem ser ativadas após modelos de PDL e dar origem a todos os tipos celulares encontrados nas ilhotas. A diferenciação dessas células seria dependente de NGN3, um regulador da neogênese de células β durante o desenvolvimento embrionário.

As células pancreáticas ductais têm sido também bastante estudadas uma vez que demonstram grande capacidade de se apresentarem como fontes de células progenitoras, facultativamente ou não, tendo potencial de contribuir com a regeneração de células β . Estudos mostram que, após pancreatectomia parcial, as células ductais perdem marcadores que indicam ductos maduros e passam a expressar marcadores do epitélio pancreático embrionário, como Pdx1, Tcf2 e Sox9.

Após um período de expansão, foi visto que essas células se rediferenciavam em células exócrinas e endócrinas (Li et al., 2010). De mesma forma, outros trabalhos utilizando diferentes tipos de modelos in vivo indicam que células precursoras e progenitoras da linhagem ductal e células epiteliais do ducto terminal são capazes de dar origem a células endócrinas e exócrinas, seja por meio da reexpressão eventual ou ativação de fatores de desenvolvimento (Al-hasani et al., 2013; Criscimanna et al., 2011; Rovira et al., 2010).

A capacidade das células pancreáticas de se diferenciar em outras células tem sido crucial do ponto de vista terapêutico, uma vez que fatores e vias envolvidos no desenvolvimento embrionário podem ser reativados pós lesão através da manipulação de poucos genes ou fatores de crescimento, iniciando um processo regenerativo (Murtaugh & Keefe, 2015; Afelik & Rovira, 2016). Assim, diversos artigos demonstraram a plasticidade das células maduras presentes nos compartimentos exócrinos e endócrinos do pâncreas, uma vez que, dependendo da injúria causada, essas células são capazes de se dediferenciar, retornando a um estado semelhante às células tronco progenitoras e posteriormente atuar na regeneração e processo de reparo tecidual, por meio da reprogramação e ativação de vias de diferenciação específica para cada tipo celular.

A pesquisa sobre a plasticidade do pâncreas é de extrema importância atualmente, especialmente no contexto da diabetes. Compreender e explorar a plasticidade do pâncreas, ou seja, a capacidade de regeneração e transdiferenciação

das células pancreáticas, oferece um caminho promissor para o desenvolvimento de novas terapias regenerativas. Essas terapias poderiam potencialmente restaurar a produção de insulina, melhorando o controle glicêmico e reduzindo a dependência de insulina exógena, impactando significativamente a qualidade de vida dos pacientes diabéticos.

2.4 Diabetes

Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica caracterizada pela alteração dos índices glicêmicos no organismo, que irá resultar na característica principal da doença, a hiperglicemia. Nessa condição, o organismo apresenta anormalidades na secreção ou na ação da insulina, a qual é um hormônio produzido por células das ilhotas pancreáticas que é responsável por tornar as células capazes de captar glicose e utilizá-la como energia (International Diabetes Foundation. 2022; Sanyaolu et al., 2023).

O diagnóstico principal é o alto índice glicêmico no sangue (≥ 125 mg/dl em jejum e ≥ 200 mg/dl 2h após a ingestão de 75g de glicose) e sinais clínicos e sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, visão embaçada. Tais sintomas e sinais são mais sutis no diabetes tipo 2, levando a um diagnóstico mais tardio (American Diabetes Association, 2018; Katsarou et al. 2017). Os casos de diabetes têm aumentado sua prevalência nas últimas décadas se tornando um desafio à saúde pública no século 21 (Zimmet et al., 2001). Atualmente, a *Diabetes mellitus* afeta aproximadamente 463 milhões de pessoas, o que representa 9.3% da população mundial e, considerando os casos de obesidade e sedentarismo da modernidade, já é estipulado uma pandemia dessa doença (WHO, 2022).

A *Diabetes Mellitus* tipo 1 é causada principalmente pela destruição das células β pancreáticas (que produzem insulina), sendo considerada uma doença autoimune. Porém, pode haver casos não relacionados à autoimunidade, consistindo na forma idiopática de DMT1. Por outro lado, a *Diabetes mellitus* tipo 2 se desenvolve devido à incapacidade da célula de reconhecer o hormônio insulina, levando a um processo de resistência que pode progredir para a disfunção de células β (Mathieu et al., 2021). Os outros tipos específicos de DM podem estar relacionados por exemplo a doenças relacionadas ao pâncreas exócrino, alterações genéticas das células β ,

consequências secundárias ao uso de medicamentos. O DM gestacional ocorre quando a hiperglicemia é diagnosticada durante a gravidez (American Diabetes Association, 2017).

Em todos os casos mencionados, a diabetes levará a um estado de hiperglicemia que pode afetar a saúde do organismo como um todo. Dentre as complicações que são normalmente associadas com a Diabetes Mellitus, e, por conseguinte, a hiperglicemia, está o desenvolvimento de alterações macrovasculares, como a doença arterial coronariana, o acidente vascular cerebral e a doença arterial periférica, além de complicações microvasculares, incluindo a doença renal diabética, a retinopatia e a neuropatia periférica (Katsarou et al. 2017). As complicações secundárias como as doenças cerebrovasculares, a doença arterial periférica e coronariana constituem atualmente uma das principais causas de mortalidade associada ao diabetes (American Diabetes Association, 2018). Já complicações relacionadas a processos infecciosos, sabe-se que o estado de hiperglicemia influencia o processo inflamatório, resultando em uma redução da resposta imune, aumentando as taxas de doenças como tuberculose, infecções do trato urinário e úlceras nos pés, a qual é a maior causa de amputações de membros inferiores em pacientes diabéticos atualmente (Cubas et al., 2013; Tomic et al., 2022)

2.5 Doenças secundárias a lesões no pâncreas

Diversas desordens que acometem o pâncreas podem levar à destruição de seu compartimento endócrino, resultando em um estado secundário de hiperglicemia ou de resistência à insulina, como também causar danos ao compartimento exócrino, acarretando complicações clínicas severas relacionadas à Insuficiência Pancreática Exócrina (IPE). (Murtaugh & Keefe, 2015). É considerado hiperglicêmico o paciente com níveis maiores do que 125mg/dl de açúcar no sangue em condições de jejum, sendo já considerado diabéticos. As complicações relacionadas à hiperglicemia foram listadas no tópico acima (Mouri & Badireddy 2023).

Já a Insuficiência Pancreática Exócrina (IPE) é uma síndrome caracterizada pela destruição das células acinares do pâncreas, responsáveis pela secreção de enzimas digestivas na parte ascendente do duodeno. Essa insuficiência resulta em

má nutrição, irritações intestinais e complicações nutricionais, impactando negativamente a qualidade de vida do paciente (Layer et al., 2019). A IPE pode levar à desnutrição devido à dificuldade de absorção de nutrientes, além de causar problemas de cicatrização de feridas e enfraquecimento do sistema imunológico. Além disso, há relatos de osteoporose associada à condição, uma vez que a IPE compromete a absorção de cálcio e vitamina D (Sikkens et al., 2013; Ghodeif & Azer, 2024).

Dentre as doenças que podem causar a lesão do compartimento endócrino do pâncreas resultando em hiperglicemia estão a pancreatite crônica (causada principalmente pelo consumo excessivo de bebida alcoólica) ou aguda, cálculos biliares, doença celíaca, além da fibrose cística, que é mais facilmente encontrada em crianças mais novas. Cirurgias de ressecção do pâncreas, como a pancreatectomia parcial ou total, levarão inevitavelmente a uma condição de hiperglicemia/diabetes (Meier & Giese, 2015). A hiperglicemia pode também ter como causa desordens endócrinas, relacionadas à hormônios, como a Síndrome de Cushing, causada pelo excesso de cortisol, a acromegalia, devido ao excesso de hormônio de crescimento, e a feocromocitoma, tumor raro da glândula adrenal, que altera a produção de catecolaminas (Tosur et al., 2020).

Estudos têm demonstrado que alguns medicamentos também são capazes de reduzir a produção, secreção ou ação da insulina, levando a uma hiperglicemia induzida. Embora seu mecanismo seja pouco entendido, o uso de glicocorticoides pode inibir a supressão de apetite, aumentando a ingestão de alimento, o ganho de peso e, por conseguinte, resultando em resistência à insulina. A fenitoína e o uso de estrógenos também têm sido associados a hiperglicemia (Mouri & Badireddy 2023).

De forma parecida, as duas principais doenças que podem causar a IPE são a pancreatite crônica e a fibrose cística. Mais de metade dos pacientes que sofrem com pancreatite crônica desenvolvem IPE, sendo que o risco depende da causa e do estágio da doença (Das et al., 2014). Em relação à fibrose cística, cerca de 85% dos pacientes já apresentam IPE durante o início da infância. Dentre as outras condições relacionadas à IPE estão a pancreatite aguda, o adenocarcinoma pancreático ductal e processos de cirurgia de ressecção do pâncreas (Whitcomb et al., 2023).

2.6 Tratamentos atuais para a hiperglicemia e a IPE

Em relação à Insuficiência Pancreática Exócrina, o tratamento inclui mudanças no estilo de vida e na dieta, de forma que facilite e melhore a capacidade do corpo de digerir e absorver nutriente. Atualmente, a Terapia de Reposição de Enzimas Pancreáticas (PERT) é o principal tratamento recomendado para a IPE e casos de má nutrição. O tratamento é composto por um coquetel de enzimas pancreáticas como amilases, proteases e lipases, que ajudam na absorção e restauram o processo digestivo fisiológico normal (Whitcomb et al. 2023).

Considerando os tratamentos para a hiperglicemia, os casos de resistência à insulina comumente vistos no Diabetes Mellitus Tipo 2 são tratados por meio de uma dieta restritiva juntamente com administração de medicamentos como a metformina, que é um medicamento que ajuda a controlar a produção de glicose pelo fígado e a aumentar a sensibilidade à insulina, devido ao maior uso de glicose pelos músculos (Freeman et al., 2024).

Já a opção de tratamento atual mais conhecida focada no *Diabetes Melitus* tipo 1 e sua terapia consiste no controle contínuo da glicemia por meio da administração diária e contínua de insulina exógena, associado a um estilo de vida saudável. O controle dos níveis glicêmicos é importante para prolongar a vida do paciente, evitando o desenvolvimento de complicações secundárias (Salinno et al., 2019; The Diabetes Control and Complications Trial Research Group; 1993).

O uso da insulina exógena como tratamento para DMT1 surgiu no início dos anos 90 e durante o passar dos anos foram desenvolvidas insulinas humana recombinantes análogas, cujas moléculas se aproximaram cada vez mais da molécula de insulina produzida pelo corpo em questões de rapidez e duração da sua ação no organismo (Katsarou et al., 2017). As recomendações repassadas aos pacientes nos tratamentos atuais visam se aproximar o máximo possível do mecanismo fisiológico normal, no qual o pâncreas secreta continuamente uma pequena quantidade de insulina e produz quantidades maiores em resposta a uma refeição rica em carboidratos (Salsali & Nathan, 2006). Por outro lado, novas abordagens para o tratamento de insulina foram desenvolvidas, como os “pumps” de insulina e

equipamentos que permitem um monitoramento fácil e contínuo dos níveis glicêmicos de forma indolor e tranquila (Arlington, 2018).

Entretanto, grande parte dos pacientes não conseguem controlar de forma adequada a administração de insulina e se adequar a uma dieta estrita, estando propensos a sofrerem grandes variações nos níveis de glicose no sangue, como situações de hipoglicemia (Guney et al., 2020). Como consequência desses episódios hipoglicêmicos, o paciente pode sofrer desde alterações leves como fraqueza e mudança de humor, até alterações mais graves como perda de consciência que pode ocasionar acidentes e coma. A alta recorrência desses eventos pode também alterar a capacidade cognitiva dos pacientes (Frier 2014; Martín-Timón & del Cañizo-Gómez 2015).

A melhor opção de tratamento para os casos de hiperglicemia é o transplante de pâncreas, o qual foi inicialmente descrito na década de 60 (Kelly et al. 1967). As vantagens do transplante abrangem independência da insulina, a não ocorrência de hipoglicemia e melhora das complicações macro e microvasculares. Entretanto, a aplicação e manutenção desse tratamento são limitadas por vários fatores. A obtenção de ilhotas pancreáticas depende da disponibilidade de doadores, tanto vivos quanto cadavéricos, e geralmente é necessária a contribuição de mais de um doador para se obter a quantidade suficiente de ilhotas. Além disso, o processo de transplante exige um tratamento contínuo com drogas imunossupressoras, o que pode facilitar que o paciente contraia uma infecção em um estado já vulnerável (Pepper et al., 2013).

Apesar de ser uma técnica já aplicada na clínica, os enxertos de ilhotas pancreáticas apresentam uma capacidade de atuação limitada. Estudos demonstram que a taxa de sobrevivência e a manutenção desses enxertos de ilhotas após o transplante são bastante baixas. Além disso, 76% dos pacientes que recebem o transplante voltam a depender de insulina em até dois anos após a cirurgia. (Brennand & Melton, 2009). Levando em consideração as limitações das abordagens atuais, há uma demanda crescente de novas abordagens que sejam capazes de compreender a plasticidade das células pancreáticas, além de suscitar a regeneração do tecido pancreático e fornecer células β funcionais a partir de proliferação, neogênese ou transdiferenciação (Zhou & Melton, 2018; Guney et al., 2020).

2.7 Modelos de estudo do processo de regeneração pancreática

Com a grande demanda de compreensão sobre a capacidade regenerativa do pâncreas e a plasticidade das células pancreáticas, vários modelos de estudo têm sido desenvolvidos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Dentre os modelos *in vitro* estão o uso de culturas de células de ilhotas em suspensão e o uso de células tronco em associação com biomateriais como scaffolds sintéticos ou naturais, como o pâncreas decelularizado. Embora alguns estudos demonstrem o uso de scaffolds recelularizado em animais a partir de transplantes, a maioria dos modelos *in vivo* focam no estabelecimento de uma lesão pancreática em roedores, que mimetize ou não uma doença e permita estudar e observar a regeneração pancreática de diferentes ângulos (Bonner-Weir et al., 1993; Peshavaria et al., 2006).

Um dos principais modelos *in vivo* visa reproduzir a pancreatite, uma condição inflamatória que atinge principalmente a parte exócrina do pâncreas e que pode se apresentar tanto de forma aguda, quanto crônica. A pancreatite pode ser induzida em camundongos utilizando ceruleína, um análogo da colecistocinina (CCK) um hormônio que estimula a secreção de enzimas acinares em altas doses. Após um ciclo de injeção de caeruleína de 1 a 2 dias, o resultado é um processo de apoptose e necrose generalizada das células acinares, seguida por uma metaplasia ductal acinar (ADM) transitória (Lerch & Gorelik., 2013). Outro modelo utilizado é o modelo de ligação parcial do ducto (PDL), no qual ocorre a ligação cirúrgica do ducto principal pancreático antes de sua junção com o ducto biliar. Essa ligação resulta uma obstrução da drenagem das secreções exócrinas, causando um forte processo inflamatório que leva a perda de células acinares por morte e desdiferenciação (Zimmermann et al., 2002; Aguayo-Mazzucato & Bonner-Weir, 2018).

O modelo de pancreatectomia parcial (PX), o qual consiste na retirada cirúrgica de 60-90% do pâncreas em ratos e de 50-80% em camundongos adultos, é o modelo mais antigo utilizado para se observar a capacidade regenerativa do pâncreas. Esse modelo permite o estudo amplo da plasticidade das células acinares e da regeneração de células β das ilhotas de Langerhans (Bonner-Weir et al., 1993; Peshavaria et al., 2006; Socorro et al., 2020). Há também o modelo de ablação celular mediada por

toxina diftérica que ocorre por meio da ativação transgênica da via de morte celular pela toxina da difteria, utilizando um promotor específico. Esse método permitiu observar o potencial de células produtoras de insulina e células produtoras de glucagon se transdiferenciarem em novas células β (Thorel et al., 2010).

A Estreptozotocina (STZ), modelo utilizado neste trabalho, é frequentemente utilizada para induzir diabetes por meio da ablação química de células β pancreáticas. A STZ foi inicialmente descrita como um antibiótico de amplo espectro produzido pela bactéria *Streptomyces achromogenes* (Vavra et al. 1959). Posteriormente, a STZ foi utilizada como um agente quimioterapêutico em cânceres de células das ilhotas pancreáticas e outras doenças neoplásicas, mas somente em 1963 surgiram os primeiros estudos indicando os efeitos diabetogênicos que poderiam resultar da administração dessa droga (Eleazu et al., 2013). A STZ é um análogo da glicose, consistindo em uma glicosamina-nitrosureia, que tem a capacidade de se acumular preferencialmente nas células β produtoras de insulina. Assim, sua estrutura química permite sua entrada através do receptor de glicose GLUT2, levando a necrose massiva ou parcial de células β , dependendo do protocolo de administração escolhido (Akinlade et al., 2021).

A células β do pâncreas são mais propensas e mais sensíveis em se associar com moléculas de glicose do que outras células do organismo, tendo, portanto, maior capacidade de captar a STZ e reagir aos seus efeitos nocivos (Eleazu et al., 2013). Entre os mecanismos de toxicidade da STZ estão a metilação do DNA, a produção de óxido nítrico e a geração de radicais livres como peróxido de hidrogênio. No interior da célula, a STZ se decompõe de forma espontânea em uma molécula de isocianato, a qual pode levar a carboxilação de proteínas celulares, alterando estrutura e função biológica, e em uma molécula de metildiazohidróxido, que pode gerar grupos metila, que reagem com DNA. Danos ao DNA acionam vias de reparo que ativam a enzima nuclear poli (ADP-ribose) polimerase dependentes de NAD⁺, levando a sua diminuição e, conseqüentemente, à redução dos níveis de ATP disponíveis, resultando em depleção das reservas de energia celular e causando a morte das células β (Piepper et al., 1999).

Outro mecanismo é a liberação de radicais de óxido nítrico pela STZ, o qual pode agir como doadora de óxido nítrico nas células pancreáticas. Assim, esse

reagente interage inibindo a atividade da enzima aconitase, importante no ciclo do ácido cítrico e, por conseguinte, na produção de energia celular. Dessa forma, o óxido nítrico impede a produção de ATP, levando à alquilação e dano do DNA (Friederich et al., 2009). STZ também leva a diminuição da atividade antioxidante, uma vez que as células pancreáticas já são deficientes em catalase e glutathione peroxidase, enzimas antioxidantes importantes, e ao aumento simultâneo dos níveis de malonaldeído (MDA), um marcador de dano celular causado pela peroxidação lipídica. Isso ocorre devido à liberação de radicais livres como espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem levar a auto oxidação da glicose e glicação de proteínas (Eleazu et al., 2013).

A diferença entre os modelos que utilizam STZ se dá principalmente devido as doses administradas (Furman, 2021). Protocolos utilizando uma única dose alta de STZ são utilizados para estudar o Diabetes Mellitus Tipo1, uma vez que essa dose gera um processo de extensa necrose das células B dentro de até 48h, resultando em perda total da capacidade do pâncreas de produzir insulina e em hiperglicemia. Estudos indicam que esse protocolo pode levar a uma fase de hipoglicemia em até seis horas após a administração de STZ devido à grande liberação de insulina pela morte das células. Porém, doze horas após a injeção, os animais já se apresentam hiperglicêmicos (Akinlade et al., 2021). O outro protocolo estabelecido se dá por meio da aplicação de doses múltiplas de STZ em uma dose baixa, levando à lesão parcial das ilhotas pancreáticas e induzindo um processo inflamatório que pode causar uma perda na atividade de células β , resultando em deficiência na produção de insulina e hiperglicemia. Embora esse último protocolo mimetize mais a patogênese de DM1, a administração de dose única ainda é o protocolo mais utilizado em modelos animais de diabetes.

2.8 Biomaterial

A engenharia de tecido tem demonstrado grande potencial no desenvolvimento de materiais que permitem ou facilitam o tratamento de doenças que são capazes de causar danos graves ou até mesmo falência de órgãos (Chandrika et al., 2021). Biomateriais são estruturas desenvolvidas na engenharia de tecidos e que são desenvolvidas a partir de produtos naturais e/ou sintéticos que são capazes de

mimetizar um órgão e sua funcionalidade, sendo esses então utilizados como dispositivos para substituir uma parte ou função de um sistema vivo de forma a atenuar ou superar alguma disfunção tecidual (Park & Lakes, 2007). Os biomateriais também funcionam como plataformas na regeneração de tecidos, proporcionando suporte para a interação de células e moléculas (Langer & Tirrell, 2004).

A busca por novos biomateriais tem sido uma alternativa para o transplante de ilhotas e para os estudos de regeneração pancreática, uma vez que a matriz é capaz de servir como suporte para diferenciação de células do pâncreas anteriormente inoculadas ou transplantadas (Amer et al. 2014; Desai & Shea 2016). Trabalhos recentes têm utilizado diferentes tipos de biomaterial, dentre eles hidrogéis, scaffolds de órgãos decelularizados e meios com Matrigel, para maximizar o processo de transplante de ilhotas e/ou células tronco e facilitar a diferenciação de células β (Chung, 2008; Chandrika et al., 2021; Bhang et al., 2013; Mirmalek-Sani et al., 2013; Jin et al., 2013).

O sucesso de um biomaterial depende da sua capacidade de evitar processos de rejeição por reparo tecidual e proporcionar um microambiente favorável à interação de células e matriz extracelular (Naderi et al. 2011). A porosidade do biomaterial, o tamanho dos seus poros a interconectividade desses poros pode influenciar a capacidade das células de se estabelecerem no ambiente e o processo de vascularização (Somo et al. 2015). De fato, um dos principais obstáculos atuais na engenharia de tecidos é produzir um biomaterial que possibilite o desenvolvimento de uma rede vascular adequada que permita a nutrição e oxigenação local e um melhor cross talk entre as células e as moléculas presentes no local (Lysy et al., 2011; Goh et al., 2013).

Os biomateriais como os scaffolds de órgãos descelularizados representam um grande avanço nos modelos de medicina regenerativa, uma vez que apresentam uma matriz extracelular natural e que, dependendo do protocolo de decelularização, é capaz de preservar moléculas indispensáveis para a adesão das células, a integridade estrutural e a vascularização (Gilbert et al., 2006). Entretanto, a maioria desses modelos dependem de um processo custoso de decelularização, a sua recelularização com outras células da linhagem pancreática ou células tronco e a adição de fatores de crescimento. Assim apesar dos avanços nessa área da pesquisa

e do desenvolvimento de diferentes tipos de biomateriais, sintéticos ou naturais, ainda não foi estabelecido um material que mimetize por completo o microambiente do tecido pancreático, de forma que permita a associação fisiológica entre as células pancreáticas e a matriz extracelular, e assim, seja capaz de manter células e tecidos viáveis por longo período.

Durante os últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo estudos utilizando uma matriz sintética de poliéter-poliuretano que consiste em um biomaterial permeável e poroso que possui formato de disco, com dimensões de 8 mm de diâmetro e 5 mm de espessura, começou a ser utilizado em implantes subcutâneos em modelo animal no início da década de 50 (Grindlay & Waugh, 1951), sendo modificado cerca de quatro décadas depois, por Andrade e colaboradores (1987), com o objetivo de se estudar processos como angiogênese, inflamação, reparo e proliferação tecidual (Andrade et al. 1997; Campos et al. 2008). Este biomaterial é inicialmente acelular, avascular e sem adição de componentes em sua estrutura e pode ser implantado tanto na região subcutânea quanto na região intra-peritoneal, ocorrendo pós-implantação uma resposta que induz a formação de um tecido fibroproliferativo entre os poros, permitindo o estudo dos diversos processos citados acima. Interessantemente, observou-se também presença de parênquima de órgãos adjacentes intra-implante (Mendes et al., 2007) sugerindo uma reposta proliferativa de órgãos próximos. Uma vez alocada na cavidade abdominal, essa matriz possibilita a migração e proliferação de diversos tecidos adjacentes, inclusive de células do parênquima pancreático (Pereira et al., 2017).

3. Justificativa

Doenças associadas a lesões no tecido pancreático podem levar a síndromes secundárias que resultam em condições de hiperglicemia ou insuficiência da porção exócrina. Os tratamentos para essas condições apresentam diversas limitações e, dessa forma, vários modelos experimentais para o estudo da regeneração e proliferação do pâncreas têm sido desenvolvidos com o intuito de atenuar ou sanar esse problema. Entretanto, os modelos atuais são de difícil desenvolvimento, possuem alto custo e manutenção, e, em sua maioria, não mimetizam as condições

do organismo. Assim, este trabalho se justifica devido à necessidade de novos modelos experimentais que permitam investigar e compreender o processo de proliferação e regeneração do tecido pancreático considerando condições fisiológicas do organismo adulto sem lesões prévias ou adição de agentes exógenos.

4. Objetivo Geral

Analisar as moléculas, células e componentes da matriz extracelular envolvidos no processo de proliferação pancreática dentro da matriz sintética 30 dias após a implantação da matriz sintética de políeter-poliuretano adjacente ao pâncreas em animais diabéticos tratados ou não com insulina.

5. Objetivos específicos

Analisar o crescimento de parênquima pancreático no interior da matriz sintética de poliéter-poliuretano implantada em animais diabéticos em condições de hiperglicemia e normoglicemia (tratados ou não com insulina) por meio de:

- Avaliação de parâmetros clínicos e metabólicos como peso, níveis glicêmicos e realizar o Teste de Tolerância Oral a Glicose (OGTT);
- Avaliação morfométrica da área proliferada de parênquima pancreático (porção exócrina e endócrina) intra-implante por meio da técnica de H&E, considerando área total de parênquima pancreático, número de ácinos, ductos e vasos sanguíneos por campo;
- Avaliação, por meio de imunohistoquímica, do tecido pancreático intra-implante, o número de células produtoras de insulina e o número de células produtoras de glucagon considerando a quantidade de células totais das ilhotas; e avaliar o número de células positivas para KI-67 e PDX1 por campo;

- Avaliação de parâmetros inflamatórios por meio da análise intra-implante das dosagens bioquímicas da concentração do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), Fator de Crescimento Transformador beta (TGF- β), das enzimas Mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) e da Interleucina-10 (IL-10);
- Quantificação da angiogênese morfometricamente através da contagem de vasos no tecido pancreático intra-implante (H&E) e bioquimicamente pela dosagem da concentração do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) intra-implante.
- Avaliação dos níveis de expressão dos genes E-CAD (E-caderina) e N-CAD (N-caderina) intraimplante por meio de análises moleculares (RT-PCR).

6. Materiais e Métodos

6.1 Animais

Para a execução deste trabalho foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 (n=30 por grupo) que possuíam de 7 a 8 semanas, pesando entre 19 e 25 gramas. Os animais eram provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração padrão (NUVILAB CR-1 Brasil) e acomodados no biotério do Departamento de Patologia Geral, sob um ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos mantiveram os padrões estabelecidos nas diretrizes para o cuidado e uso de animais experimentais pela Comitê Institucional de Bem-Estar Animal e em conformidade com a Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da UFMG (CEUA protocolo 58/2023).

Animais diabéticos foram separados em três grupos (Figura 3):

- SHAM – Animais diabéticos controle
- G1 – Animais diabéticos que receberam o implante
- G2 – Animais diabéticos que receberam o implante e foram tratados com insulina diariamente, 2x por dia

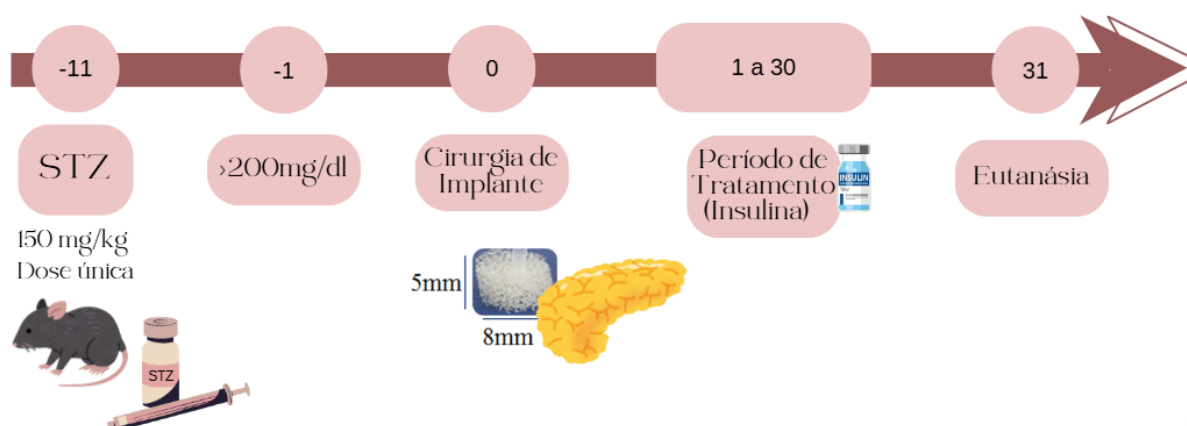


Figura 3. Protocolo experimental. No dia -11 foi administrado 150mg/kg de STZ nos animais para a indução da diabetes. No dia -1 os animais que apresentavam glicemia acima de 200mg/dl foram separados em 3 grupos (SHAM, G1 e G2). No dia 0 os animais dos grupos G1 e G2 receberam a matriz sintética, implantada anexa ao pâncreas. Entre o dia 1 e 30 os animais do grupo G2 foram tratados com insulina 2x ao dia. No dia 31 ocorreu a eutanásia de todos os animais.

6.2 Indução da Diabetes Mellitus

A Diabetes Mellitus foi induzida nos camundongos por meio do composto Streptozotocina (STZ) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA), diluída em tampão Citrato Fostato 50mM (pH 4.5), de acordo com o protocolo estabelecido por Furman (2021) e Pereira (2017). Os animais foram pesados e foi realizado o protocolo de indução utilizando apenas uma única dose do composto (150mg/kg), a qual foi administrada intraperitonealmente. Foi determinado um N inicial de 30 animais por grupo.

A ração dos animais foi retirada 4h antes do processo de administração e em seguida foi fornecido aos animais uma diluição de sacarose (10%) ad libitum durante três dias consecutivos, tendo como objetivo impedir/reduzir a mortalidade causada pela hipoglicemia devido à intensa necrose de células Beta e liberação de insulina. Após esse período, os animais tiveram livre acesso à água filtrada e comida.

Seguindo o protocolo estabelecido, a glicemia dos animais foi medida 10 dias após a aplicação da dose de STZ. Somente os animais que apresentaram níveis glicêmicos >250mg/dl foram utilizados para o experimento (80% dos animais). Os

níveis glicêmicos no sangue foram medidos também antes da injeção e semanalmente após a confirmação da Diabetes Mellitus utilizando o On Call® Plus II Monitor de Glicose (ACON Laboratories, Inc. São Diego CA, EUA).

Dois grupos de animais receberam o implante (G1 e G2) um dia após a confirmação da Diabetes Mellitus, sendo que um destes (G2) recebeu diariamente (2x dia) doses de insulina HUMULIN® R (REGULAR, Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN 46285, USA), a 0.03 UI, 2x ao dia, intraperitonealmente, em um período 12h/12h, para manutenção e normalização dos índices glicêmicos. Os animais foram tratados durante 30 dias.

6.3 Implante de esponja sintética de poliéter-poliuretano

Matrizes sintéticas de poliéter-poliuretano (Vitafoam Ltd, Manchester, U.K.) foram cortadas em discos de 8mm de diâmetro por 5mm de espessura foram embebidos em álcool 70% (overnight) e esterilizados pelo método de ebulição em água destilada durante trinta minutos anteriormente à cirurgia (Andradde et al., 1987).

Todos os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (60mg/kg) e xilazina (10mg/kg). A tricotomia foi realizada apenas no local de inserção da esponja e foi realizada a antissepsia da pele com álcool a 70% e Clorexidina 2%. As matrizes sintéticas acelulares foram implantadas na região intraperitoneal, anexas ao pâncreas. A pele e o peritônio foram suturados separadamente com pontos simples, utilizando fios de nylon 5-0 não absorvível. Durante o pós-operatório, os animais foram monitorados e avaliados qualquer sinal de infecção no sítio cirúrgico ou sofrimento do animal. Nenhum animal foi descartado por rejeição ao implante.

No dia posterior ao implante da esponja foi iniciado o tratamento com insulina durante 30 dias seguidos. Após esse período, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os implantes foram removidos, pesados, devidamente acondicionados e posteriormente processados para as análises imunobioquímicas e histológicas.

6.4 Análise de glicemia dos animais

Os níveis de glicose no sangue foram medidos com o auxílio do On Call® Plus II Monitor de Glicose (ACON Laboratories, Inc. São Diego CA, EUA). Os níveis de glicose no sangue dos animais foram medidos semanalmente ao longo do experimento.

6.5 Análise de histologia e morfométricas

Os implantes e o pâncreas dos animais foram removidos e fixados em formol a 10% por 24 horas. Após inclusão em parafina, cortes com espessura de 5 µm foram corados com hematoxilina e eosina (H&E), enquanto outros cortes foram processados para análise imuno-histoquímica. Dependendo da análise, 20 ou 15 campos foram capturados pelo software QCapture Pro com a câmera QColor5 conectada a um microscópio Olympus BX43 com ampliação de 100x ou 400x, na objetiva de 10x ou 40x respectivamente, para realização das análises morfométrica da área intra-implante, número de ácinos, ductos e vasos sanguíneos. Os parâmetros morfométricos foram analisados pelo software Image Pro Plus 8.0.

6.6 Imuno-histoquímica

As análises de imunohistoquímica foram realizadas em cortes desparafinizados dos implantes. Os cortes foram hidratados e submetidos a etapas de recuperação antigênica, bloqueio de peroxidase endógena e bloqueio de proteína. Em seguida, as lâminas foram incubadas durante a noite a 8°C com os seguintes anticorpos primários demonstrados na Tabela 1. No dia seguinte, foram realizadas as etapas de anticorpo secundário e HRP. O cromógeno DAB foi usado para visualizar a atividade da peroxidase. Os cortes foram então contra-corados com hematoxilina. O controle negativo foi realizado omitindo o anticorpo primário e realizado simultaneamente.

Tabela 1. Marcadores de imunohistoquímica utilizados para análise do tecido intra-implante.

Marcador (Clone)	Diluição	Marca
Insulin	1:100	Dako
Glucagon	1:100	Santa Cruz Biotechnology
KI-67	1:200	Abcam
PDX1	1:80	Santa Cruz Biotechnology

6.7 Dosagem dos níveis de Mieloperoxidase e N-acetil- β -D-glucosaminidase

A infiltração de neutrófilos nos implantes foi avaliada indiretamente por análise da atividade da mieloperoxidase (MPO) (Pereira et al, 2017). Os implantes foram pesados, homogeneizados em tampão NaPO₄ 0,05 M (pH 6,0) e centrifugados a 5000rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida foram adicionados tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,3 mM) a amostra para coloração da enzima MPO, sendo a reação interrompida pela adição de 50 μ l de H₂SO₄ (4M). A atividade de MPO nas amostras sobrenadantes foi determinada medindo a alteração na absorbância a 450 nm. Os resultados são expressos como alteração na densidade óptica (DO) por grama (g) de tecido úmido.

A infiltração de macrófagos nos implantes foi avaliada indiretamente pelos níveis da enzima lisossômica N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) (Orellano et al., 2015). As amostras foram homogeneizadas em solução de NaCl (0,9% v / v) contendo 0,1% v/v de Triton X-100 (Promega, Madison, WI, EUA) e centrifugadas a 3.000rpm por 10 min a 4°C. As amostras do sobrenadante foram incubadas por 30 minutos a 37°C com 100 μ l de P-nitrofenil-N-acetil-beta-D-glucosaminidase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), preparados em tampão citrato/fosfato (Ácido cítrico 0,1 M; Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 4,5) para produzir uma concentração final de 2,24 mM. A reação foi interrompida pela adição de 100 μ l de tampão de glicina a 0,2 M (pH10,6). A hidrólise do substrato foi determinada medindo a absorção a 405 nm. Os resultados são expressos em nmol/mg de tecido úmido.

6.8 Medição dos níveis de citocinas produzidas intra-implantes

As citocinas TNF- α , TGF- β , VEGF e IL-10 nos implantes foram determinadas por Kits de Imunoensaio (R and D Systems, EUA) de acordo com o protocolo do

fabricante. Os implantes foram homogeneizados em PBS pH 7.4 contendo 0.05% de Tween 20 e centrifugados a 10.000 ×g por 30 min. Após esse procedimento, 100 µL do sobrenadante foram usados para medir as citocinas. Diluições dos sobrenadantes livres de células foram adicionadas a placas de ELISA revestidas com um anticorpo monoclonal murino específico contra a citocina, seguido pela adição de um segundo anticorpo policlonal conjugado a peroxidase de rábano (HRP), também contra a citocina. Após lavagem para remover qualquer reagente de anticorpo-enzima não ligado, uma solução de substrato (50 µL de uma solução 1:1 de peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina 10 mg/ml em DMSO) foi adicionada aos poços. O desenvolvimento da cor foi interrompido após incubação de 20 minutos com ácido sulfúrico 2 M (50 µL) e a intensidade da cor foi medida a 540 nm em um espectrofotômetro (Thermoplate). Os resultados foram expressos como picograma de citocina/mg de tecido úmido.

6.9 Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real

Para avaliar a expressão gênica de CDH1 (E-cad), CDH2 (N-cad), e do normalizados GAPDH realizou-se a extração de RNA total das esponjas retiradas de ambos os grupos camundongos. Cada amostra foi macerada em microtubos contendo 1000µL de Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A extração do RNA total foi feita de acordo com o protocolo do fabricante, sem modificações. Ao final da extração de RNA o pellet foi ressuspensionado em 100µL de água estéril livre de DNase e RNase, e as amostras foram quantificadas utilizando Nanodrop (NanoDrop Lite Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, EUA).

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit High-capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA) sem modificações e seguido as recomendações do fabricante, em um volume final de reação de 20 µL. O mix foi submetido à incubação de 10 minutos a 25 °C, seguido de 2 horas a 37 °C e por fim 5 minutos a 85 °C no termociclador MiniAmp™ Plus Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, EUA).

As amostras de cDNA resultantes da Transcrição Reversa (RT) foram submetidas à PCR em tempo real utilizando o PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix

(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e os primers descritos na Tabela 2. As amostras (20 ng de cDNA) foram aplicadas em placas de 96 poços ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em duplicata, com o volume final de 20 µL.

Tabela 2. Genes e primers utilizados para a realização do PCR-RT

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
GAPDH	GTGGAGTCTACTGGTGTCTT	GGTTCACACCCATCACAAAC
CDH1 (E-CAD)	CATCATTGAGAGGGAGACAG	GACACGGCATGAGAATAGAG
CDH2 (N-CAD)	CTGACTGAGGAGCCTATGAA	CAGTCTCTCTTCTGCCTTTG

Os dados da PCR em tempo real foram acessados pelo método CT comparativo ($[CT \text{ médio do gene alvo}] - [CT \text{ médio do controle endógeno}]$), o controle endógeno S18 foi usado para normalizar o gene alvo e gerar o ΔCT . O $\Delta\Delta CT$ ($[\Delta CT \text{ amostra}] - [\Delta CT \text{ do controle}]$) foi calculado, e o $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi aplicado para obter os níveis de expressão relativa de cada gene alvo (Schmittgen, Livak, 2001).

6.10 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ SEM ou mediana. A normalidade e homoscedasticidade foram determinadas de acordo com o Shapiro-Wilk test para posterior análise estatística. A análise estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prisma 8.0, e foi considerado estatisticamente significativo um valor de $p < 0,05$. As comparações entre os grupos foram feitas através do teste t de Student, One Way ANOVA, 2Way ANOVA ou Mann Whitney (para dados não paramétricos).

7. RESULTADOS

7.1 Metabolismo dos animais

Os níveis glicêmicos dos animais foram medidos semanalmente durante o experimento. Nos animais não diabéticos (SHAM) foi observado uma diminuição do seu peso ao longo do experimento, enquanto os animais que foram tratados com insulina (G2) tiveram um ganho de peso significativo até o final do mesmo período (Fig. 4 A) (p value = 0.0098). Os animais diabéticos com implante (G1), também apresentaram uma redução de peso, embora não tenha sido significativo comparado aos demais grupos. Em relação aos níveis glicêmicos (Fig. 4 B), os animais do grupo tratado (G2) apresentaram uma redução significativa dos níveis glicêmicos (p value = $<0,0001$) em relação aos outros grupos no dia 30.

Além disso, foi realizado um teste de tolerância oral a glicose nos animais diabéticos com implante (G1) e nos animais tratados com insulina (G2). A análise mostrou que houve diferença entre os grupos (Fig. 4 C) no teste de tolerância oral a glicose em resposta ao aumento dos níveis glicêmicos no sangue.

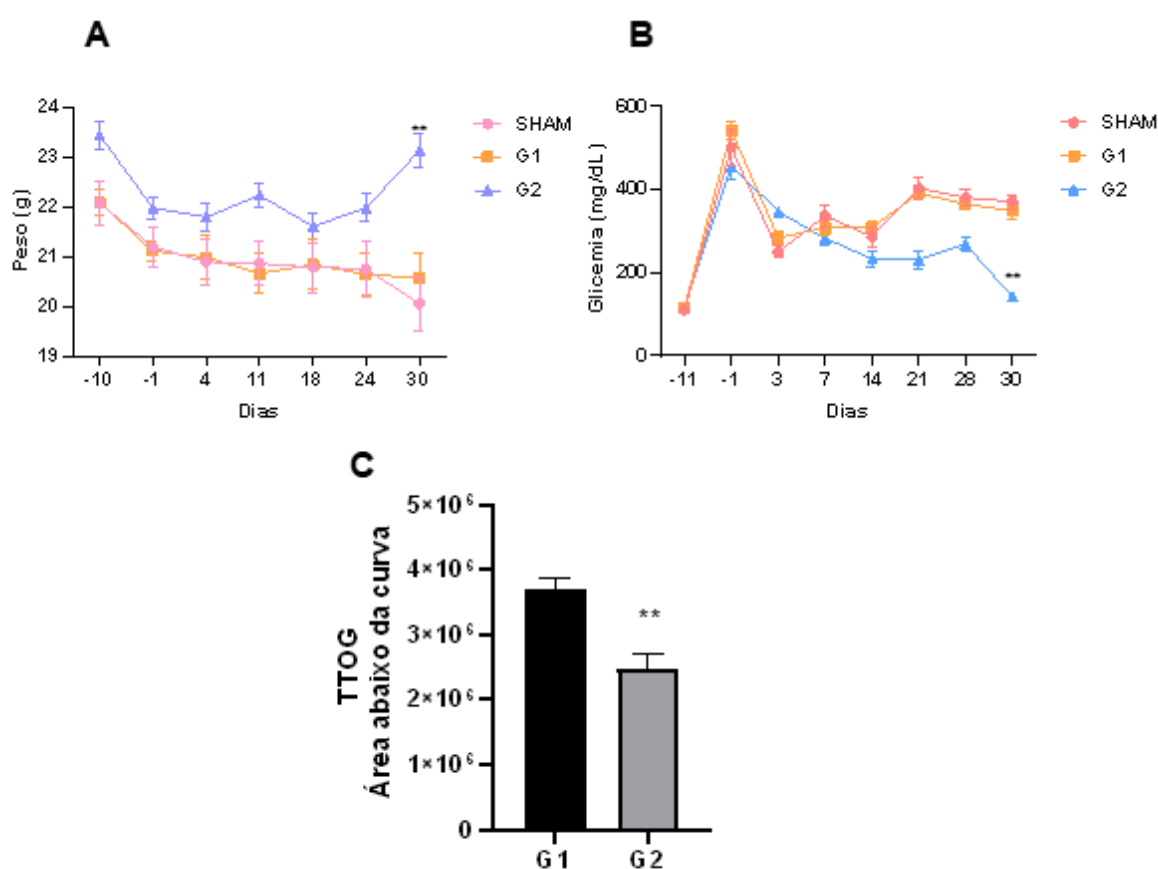


Figura 4. Avaliação de parâmetros metabólicos dos animais. O peso dos animais do grupo SHAM (diabéticos), G1 (diabéticos com implante) e G2 (diabéticos com implante e tratamento) foi monitorado antes e durante o tratamento e avaliados em gramas (Fig. 4 A). Os níveis glicêmicos foram observados antes e após a cirurgia de implantação da esponja (Fig. 4 B). Teste de tolerância oral a glicose (OGTT) (Fig. 4 C), o resultado foi dado como área abaixo da curva (AUC) medido por 120 min (C). Os valores são expressos em média $\pm$ SEM. Teste One Way ANOVA ou 2Way Anova. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001

7.2 Macroscopia do tecido pancreático intra-implante induzido

Quanto aos aspectos macroscópicos dos implantes, foi observado que em ambos os grupos a matriz se manteve aderida ao pâncreas, não sendo possível separá-los após o período de tratamento (30 dias). No grupo tratado com insulina (G2) foi observado que a matriz se encontrava totalmente envolta pelo pâncreas (Fig. 5 B), indicando uma maior aderência do que no grupo hiperglicêmico (G1) (Fig. 5 A).

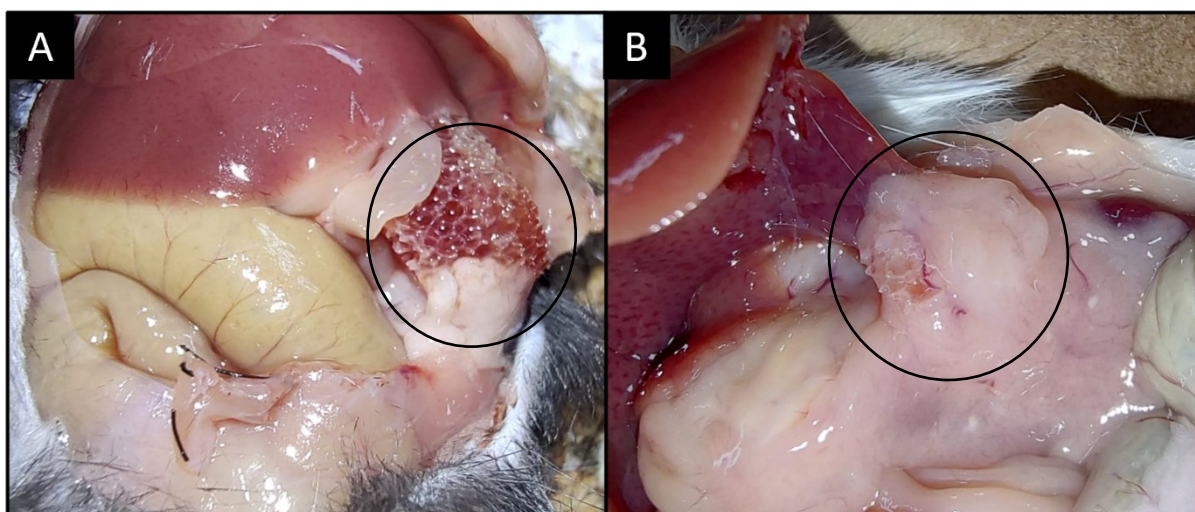


Figura 5. Macroscopia dos implantes nos animais diabéticos. Imagem representativa do grupo 1 e do grupo 2, tratado com insulina, em A e B, respectivamente. Observa-se que a matriz, no círculo, se apresenta totalmente envolvida pelo pâncreas no grupo normoglicêmicos.

7.3 Proliferação de tecido pancreático intra-implante (componentes exócrinos e endócrinos)

Ambos os grupos que receberam o implante de matriz sintética adjacente aos pâncreas apresentaram proliferação de tecido um tecido fibrovascular juntamente com um parênquima pancreático. O biomaterial foi bem tolerado pelos animais e aqueles que apresentaram sinais de infecção foram descartados (cerca de 3 animais). A Fig. 6 A e B mostra imagens representativas coradas em H&E do pâncreas neoformado no grupo 1 e grupo 2, respectivamente.

Em relação à proliferação pancreática intra-implante, considerando componente endócrinos (ilhotas) e exócrinos (ácinos, ductos e vasos), uma análise realizada da área nos permitiu confirmar que no grupo G2 houve uma proliferação maior do que no grupo G1 (Fig. 6 C) (p value = 0,0041). De forma parecida, a avaliação do número dos componentes exócrinos demonstrou que houve um aumento significativo de ácinos (Fig. 6 D) (p value = <0,0001). O número de ductos se manteve inalterado entre os grupos (Fig. 6 E) (p value = 0,3649).

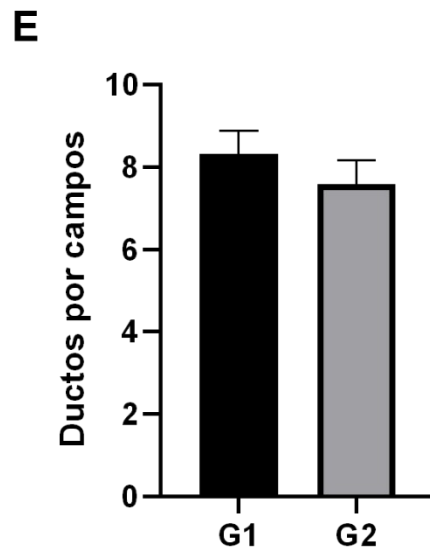
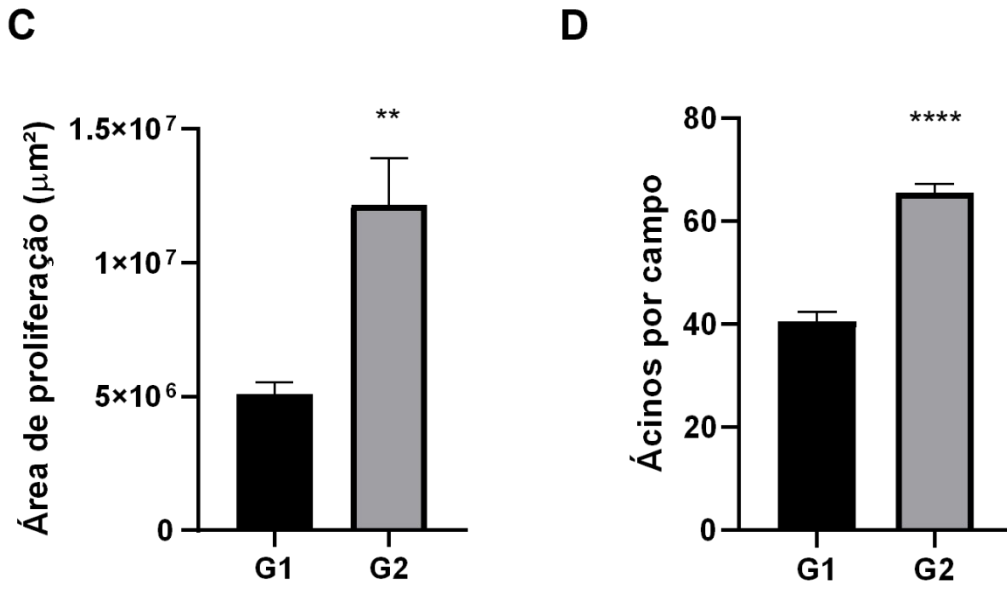
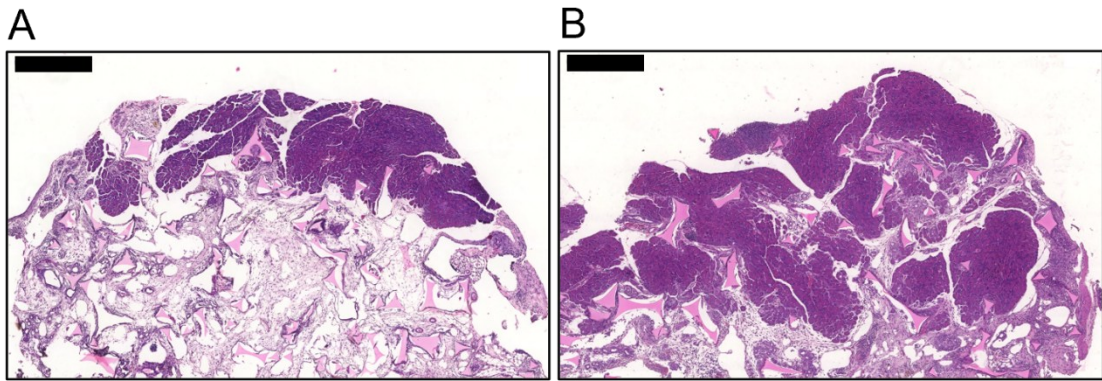


Figura 6. Proliferação e componentes exócrinos do pâncreas neoformado. Em A e B observa-se seções histológicas coradas em H&E referentes ao grupo G1 e G2 respectivamente, no aumento de 5x. C) Área de proliferação intra-implante. D) Número de ácinos por campo. E) Número de ductos por campo. Total de 15 campos por lâmina. N = 5. Barra = 500µm. Os valores são expressos em média $\pm$ SEM. Teste t de Student; **P < 0.01; ***P < 0.001

Para quantificar a infiltração do parênquima pancreático dentro do implante, foi avaliado o número de células produtoras de insulina e células produtoras de glucagon por meio de imuno-histoquímica. Em relação à produção de insulina, o grupo tratado com insulina, G2, (Fig. 7 B) apresentou um aumento no número de células produtoras desse hormônio (Fig. 7 E) (p value = 0,0162) em comparação ao grupo não tratado, G1 (Fig. 7 A). Um resultado semelhante foi visto na marcação de células produtoras de glucagon nos implantes, uma vez que o grupo G2 (Fig. 7 D) teve um aumento significativo (Fig. 7 F) (p value = 0,0036) em comparação ao grupo G1 (Fig. 7 C).

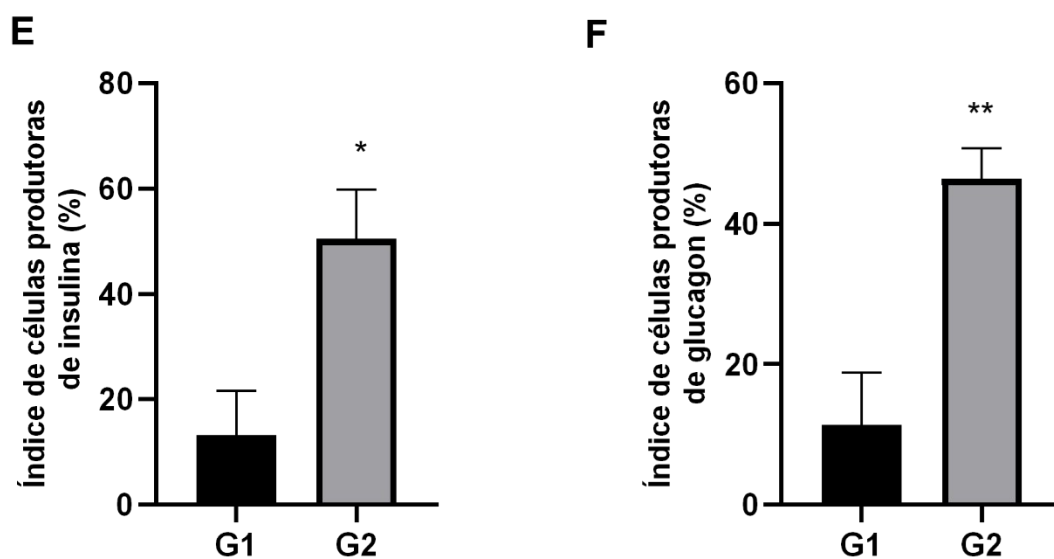
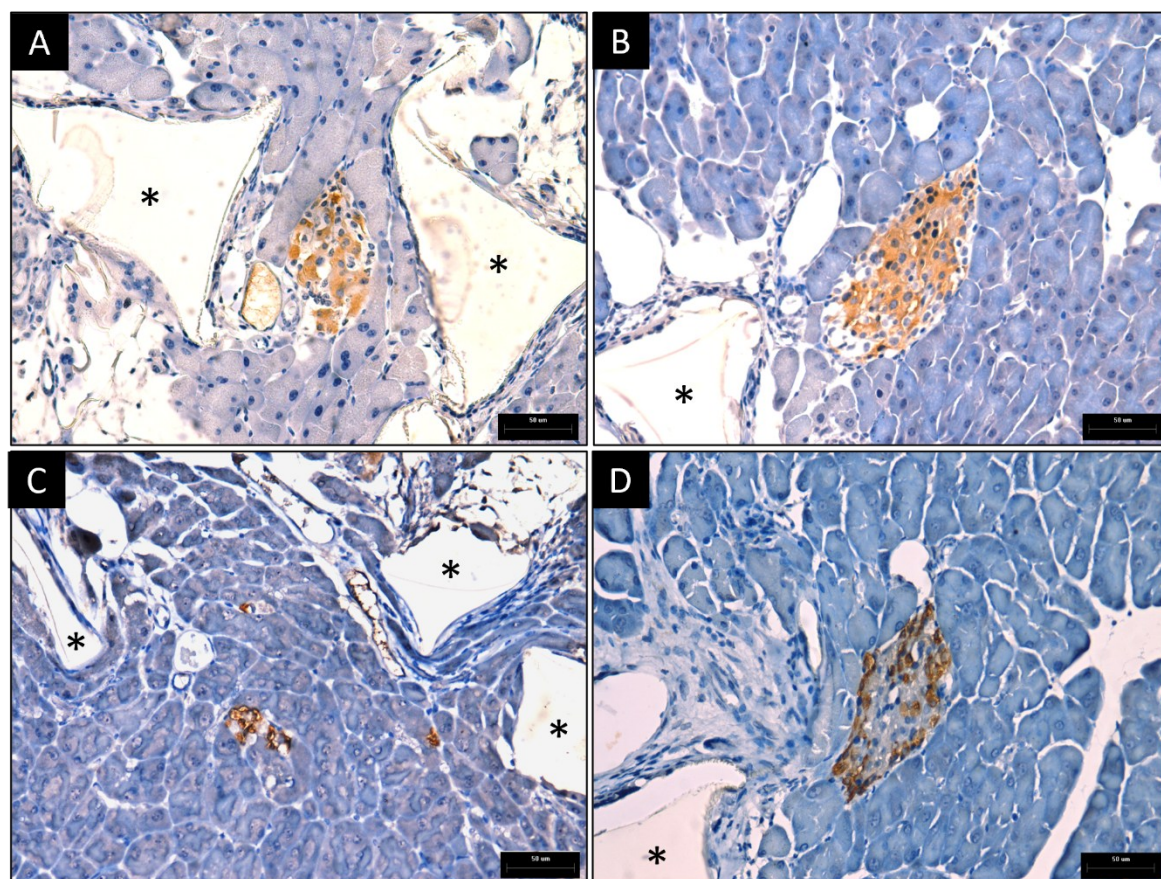


Figura 7. Componentes endócrinos no tecido neoformado. Imagens representativas da matriz sintética (*) com marcação de imuno-histoquímica demonstrando células produtoras de insulina em ilhotas do grupo G1 (A) e grupo G2 (B), e células produtoras de glucagon do grupo G1 (C) e grupo G2 (D). Índice (%) de células produtoras de insulina no grupo G2 em relação ao grupo G1 (E). Índice (%)

de células produtoras de glucagon no grupo G2 em relação ao grupo G1 (F). N = 6. Barra = 50µm. Foram avaliadas todas as ilhotas encontradas na matriz. Os valores são expressos em média ± SEM. Teste t de Student *P < 0.05; **P < 0.01

Para quantificar a proliferação no parênquima pancreático dentro do implante, foi avaliado o número de células positivas para KI-67 e células positivas para PDX1 por meio de imuno-histoquímica. Em relação às células ductais positivas para KI-67, o grupo G2 (Fig. 8 B) apresentou um aumento no número de células positivas (Fig. 6 E) (p value = 0,0351) em comparação ao grupo G1 (Fig. 8 A). Porém, em relação às células acinares positivas para KI-67, foi visto que o grupo G1 (Fig. 8 C) teve um aumento significativo (Fig. 8 F) (p value = 0,0004) nas células positivas em comparação ao grupo G2 (Fig. 8 D).

Em relação à contagem de células ductais positivas para PDX1, foi observado que o grupo tratado com insulina (Fig. 9 B), G2, apresentou uma quantidade maior de células positivas por campo (Fig. 9 C) (p value = 0,0320) do que o grupo hiperglicêmico (Fig. 9 A).

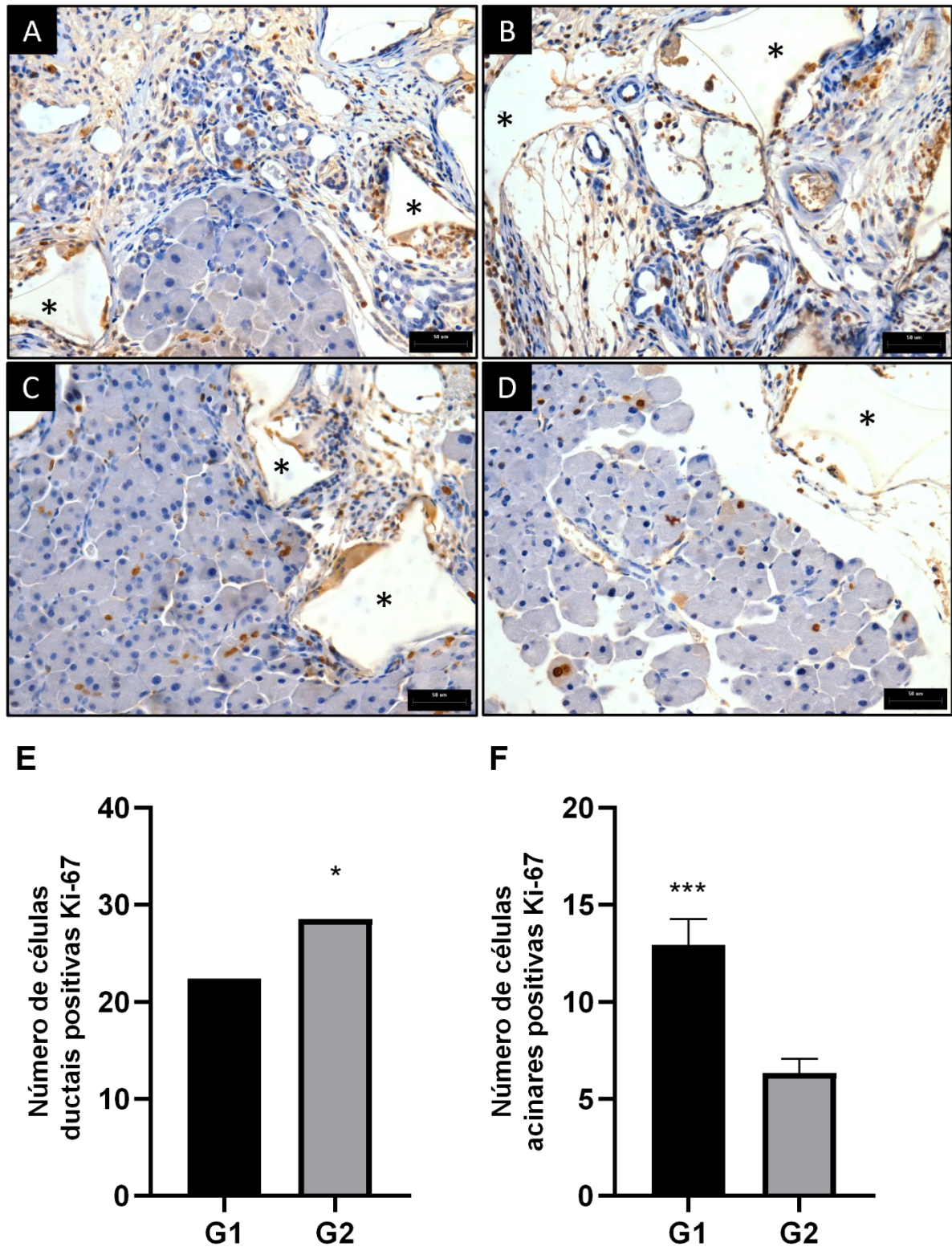


Figura 8. Células positivas para Ki-67 no tecido pancreático intra-implante. Imagens representativas da marcação de imuno-histoquímica demonstrando células ductais positivas para Ki-67 na matriz (*) do grupo 1 (A) e grupo 2 (B), e células acinares positivas para Ki-67 do grupo 1 (C) e grupo 2 (D). Número de células ductais positivas para Ki-67 por campo (E) e número de células acinares

positivas para KI-67 por campo (F). N = 5. Barra = 50µm. Os valores são expressos em média ± SEM. Teste t de Student e Mann-Whitney. *P < 0.05; ***P < 0.001;

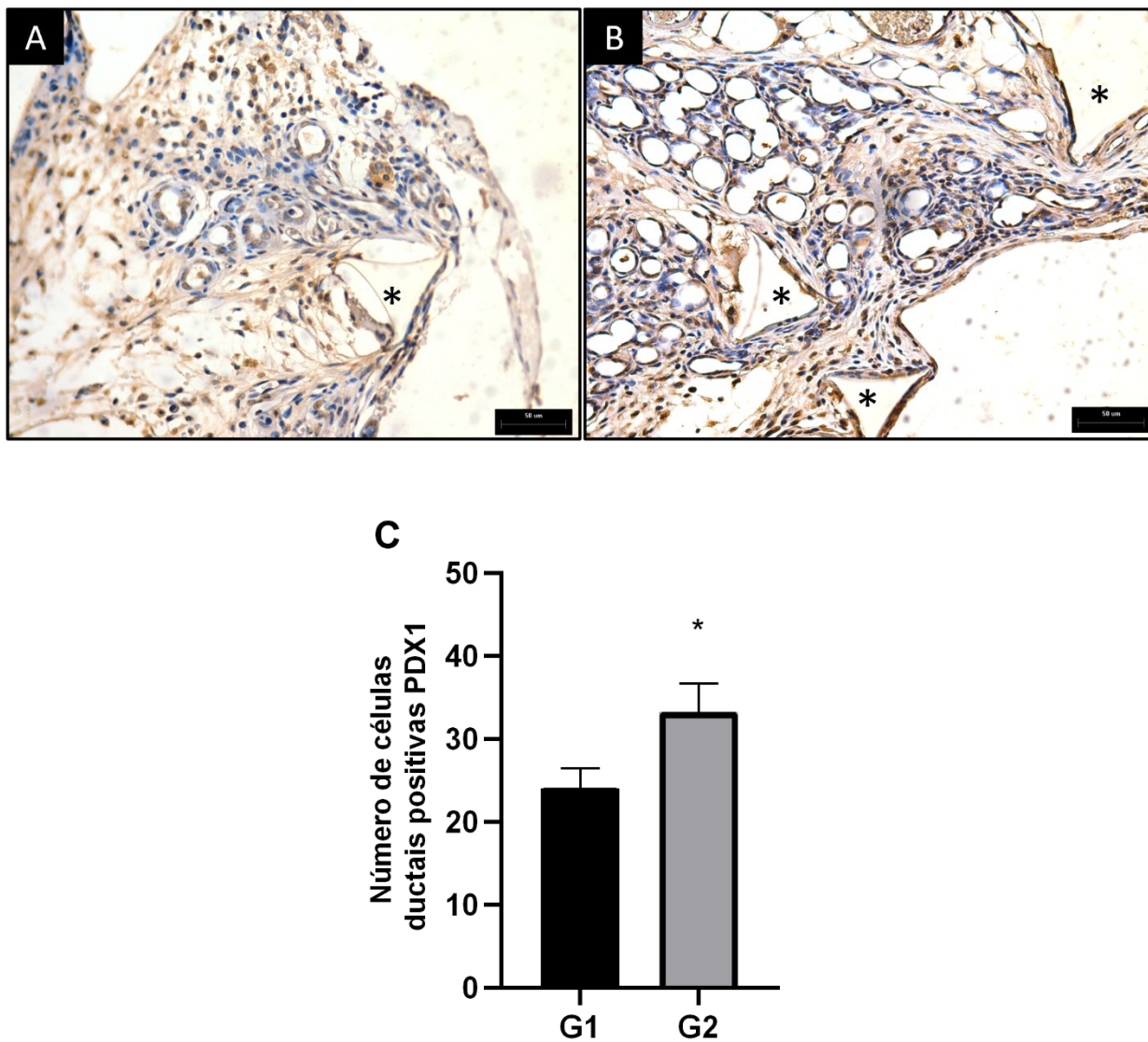


Figura 9. Proliferação de células progenitoras pancreáticas intra-implante. Imagens representativas da marcação de imuno-histoquímica demonstrando células ductais positivas para PDX1 no grupo 1 (A) e grupo 2 (B). Número de células ductais positivas para PDX1 por campo. N = 5. Barra = 50µm. Os valores são expressos em média ± SEM. Teste t de Student *P < 0.05;

7.4 Análise de angiogênese no implante

A avaliação dos parâmetros vasculares no pâncreas neoformado foi determinada por análise morfométrica de seções coradas em H&E do grupo G1 (Fig. 10 A) e grupo G2 (Fig. 10 B). Os dados mostraram que o número de vasos sanguíneos foi maior no grupo 2 (Fig. 10 C) (p value = 0,0138) em comparação ao grupo sem tratamento. Esse resultado está em discordância com a análise de VEGF intra-implante, que demonstrou uma redução dos níveis desse fator de crescimento no mesmo grupo (Fig. 10 D) (p value = 0,0364).

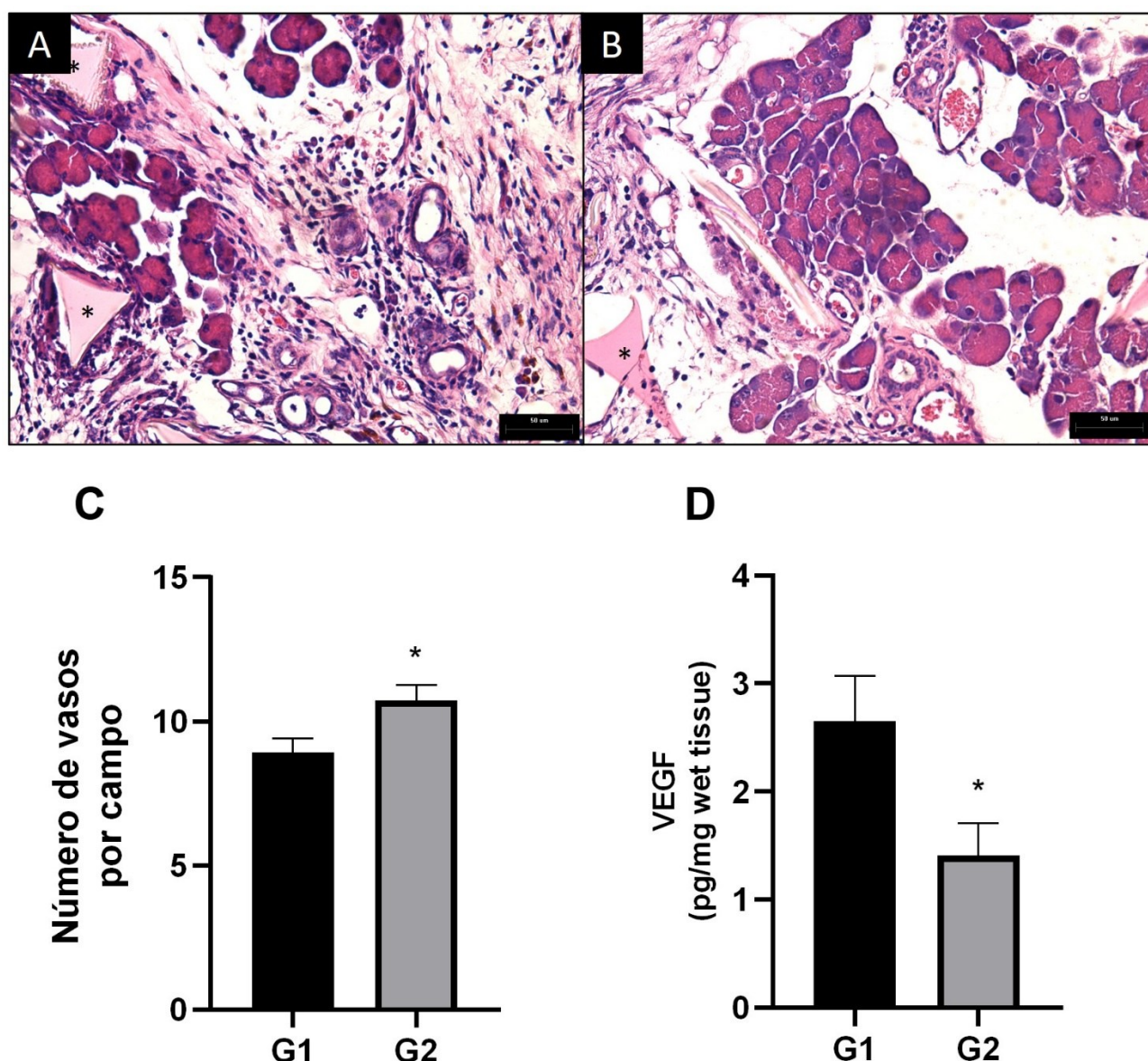


Figura 10. Análise da proliferação de vasos no pâncreas neoformado. Seções histológicas representativas da análise do número de vasos dentro da matriz do grupo G1 (A) e grupo G2 (B). Análise morfométrica dos vasos presentes em ambos os grupos (C). Níveis do Fator de Crescimento

Endotelial Vascular em tecido úmido (D). Os valores são expressos em média $\pm$ SEM. N = 5 e 8. Barra = 50 μ m. Teste t de Student *P < 0.05

7.5 Análise de citocinas inflamatórias no implante

Em relação às citocinas inflamatórias, foi realizada a análise de ELISA para diversos marcadores e observou-se que a concentração de TNF- α intra-implante apresentou-se significativamente aumentada no grupo G2 (Fig. 11 A) (p value = 0,0449). Entretanto, a dosagem de mieloperoxidase (MPO), um avaliador indireto dos níveis de neutrófilos não demonstrou redução significativa, embora o grupo tratado com insulina tenha apresentado uma redução de 34% nos níveis da enzima (Fig. 11 B) (p value = 0,2465).

Quanto aos níveis da citocina TGF- β , os dados mostraram que o grupo tratado com insulina (G2) apresentou um aumento significativo desse marcador intra-implante (Fig. 11 C) (p value = 0,0497). A mesma tendência foi observada nos níveis de N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) intra-implante (Fig. 11 D), os quais aumentaram significativamente (p value = 0,0003) e nos níveis de IL-10 (Fig. 11 E), que também apresentaram aumento (p value = 0,0341).

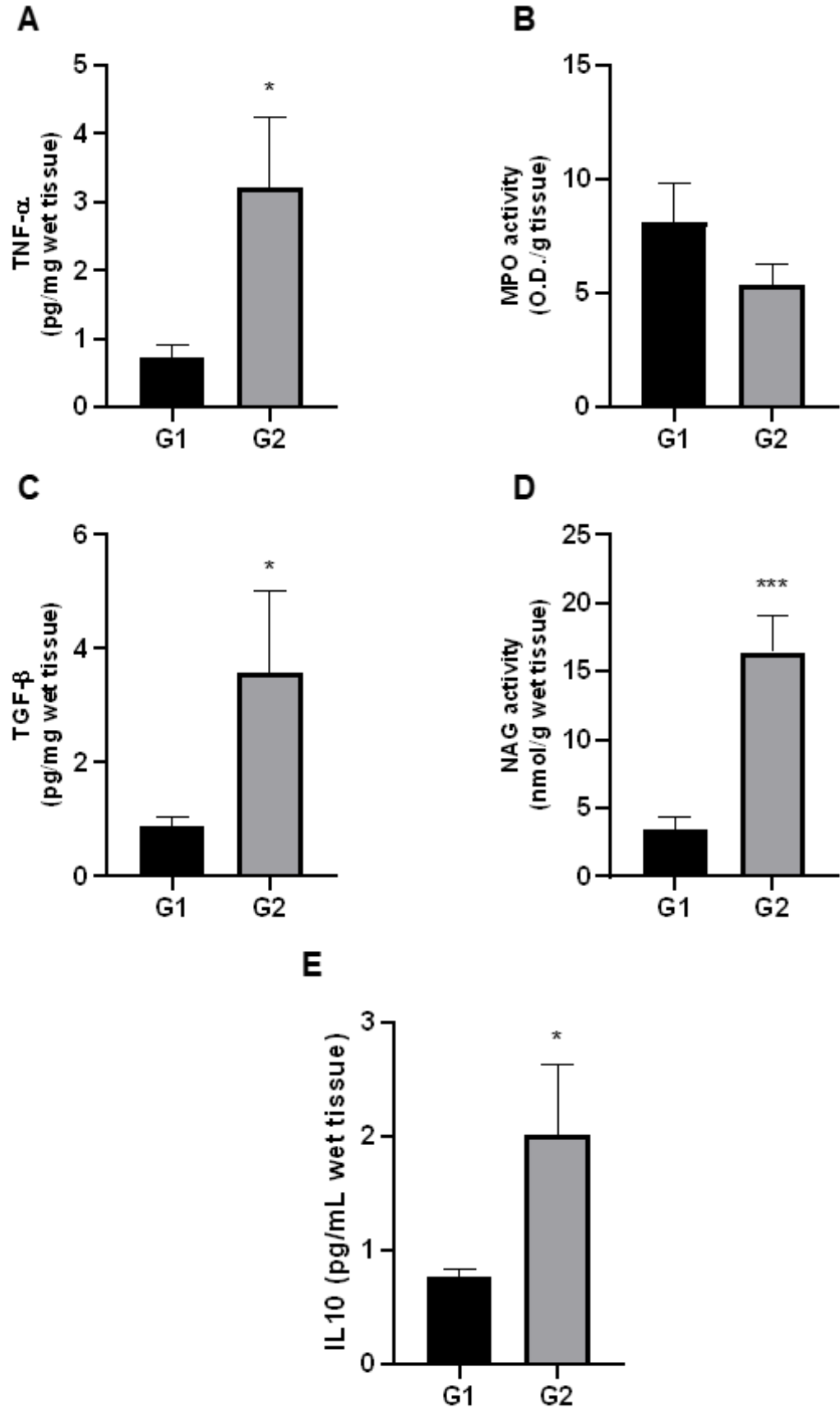


Figura 11. Marcadores inflamatórios no tecido pancreático neoformado. Um aumento nos níveis de TNF- α (A) foi observado no grupo tratado com insulina após o período de tratamento. A atividade de MPO se manteve inalterada entre os grupos (B). Ambos os níveis de TGF- β (C), NAG (D) e da citocina IL-10 (E) apresentaram um aumento significativo no grupo G2. N = 8. Os valores são expressos em média $\pm$ SEM. Teste t de Student *P < 0.05; ***P < 0.001

7.6 Transição epitélio-mesênquima nas células pancreáticas em proliferação

Com o intuito de avaliar quais as moléculas de adesão as células proliferadas na matriz apresentavam, assim como observar seu comportamento entre os grupos, foi realizada a técnica de PCR em tempo real. Os resultados mostraram que tanto a expressão do marcador epiteliais de adesão, E-CAD (Fig. 12 A), quanto a expressão do marcador mesenquimal, N-CAD (Fig. 12 B), tiveram uma igual diminuição (p value = 0.0179) no grupo tratado com insulina (G2).

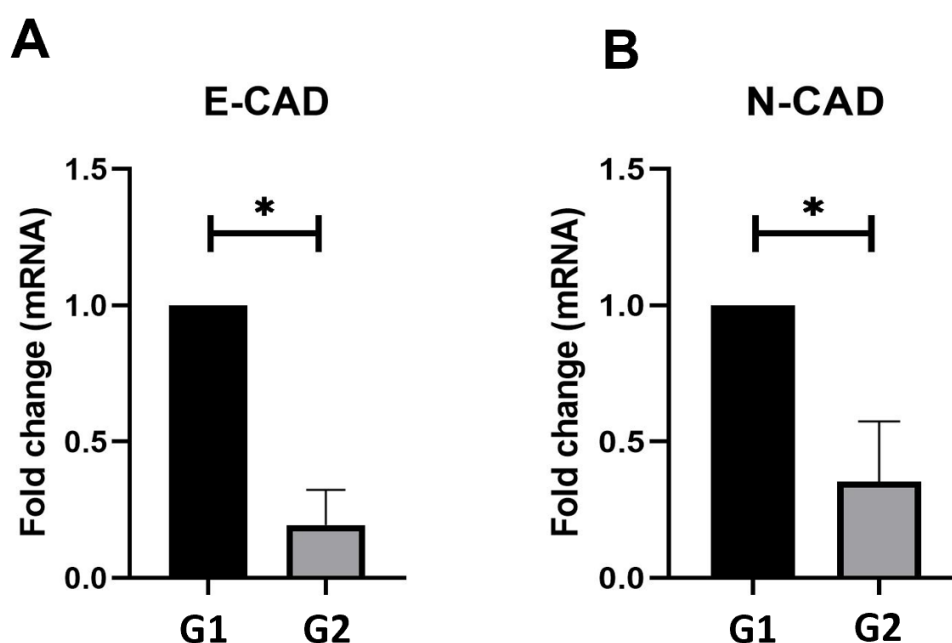


Figura 12. Expressão dos genes de molécula de adesão no tecido pancreático intra-implante. Ambos os níveis da expressão de E-CAD (A), quanto de N-CAD (B) apresentaram uma diminuição significativa no grupo 2. N = 5. Os valores são expressos em média $\pm$ SEM. N = 6; Teste t de Student *P < 0.05;

8. Discussão

Diversas desordens pancreáticas como pancreatites agudas ou crônicas, cânceres de pâncreas e o próprio Diabetes Mellitus são doenças que resultam em lesões nos compartimentos exócrino e endócrino do pâncreas, resultando em graves complicações, incluindo condições de hiperglicemia e insuficiência pancreática exócrina (Olesen, 2019; Jalal et al., 2019; Al-Hasani et al., 2013; Server & Grapin-Botton, 2020). Considerando isso, modelos experimentais de estudo têm sido desenvolvidos para possibilitar o entendimento da regeneração e proliferação de células pancreáticas e os mecanismos envolvidos nesse processo, como a recelularização de scaffolds e modelos de lesão física ou químicas, como o modelo de ligadura de ducto pancreático, a pancreatectomia parcial ou a ablação por toxinas químicas, como o uso da ceruleína (Zhou & Melton, 2018).

O desenvolvimento desses modelos é de grande relevância para o entendimento da regeneração pancreática e da plasticidade das células desse órgão. Várias abordagens indicam que as células do pâncreas podem ser geradas a partir de outras pré-existentes (), porém, o mecanismo de proliferação dessas células em animais adultos sem a influência de fatores externos ainda não foi bem elucidado. Portanto um modelo *in vivo* que mimetize as condições normais do organismo, sem lesão prévia, e que não necessite de fatores de crescimentos exógenos ou outros componentes da matriz para a indução do processo de proliferação que ocorre em organismos adultos, é uma importante ferramenta de estudo para este processo.

Já se sabe que o pâncreas, especialmente a parte endócrina, possui uma taxa de renovação celular extremamente baixa em condições fisiológicas normais, entretanto, em modelos experimentais a regeneração pancreática depende de diversos aspectos, dentre eles estão o tipo de lesão ou método usado para levar as células pancreáticas à morte, bem como a extensão da lesão (Afelik & Rovira, 2017). Resultados prévios de nosso grupo de pesquisa apresentaram um modelo que, ao ser implantado de forma adjacente ao pâncreas nativo do animal, é capaz de induzir o crescimento de um tecido pancreático em seu interior ativando mecanismos de proliferação nas células do pâncreas de animais adultos saudáveis (Pereira et al., 2017). Neste trabalho focamos em avaliar como as células pancreáticas se

proliferaram, migraram e se organizaram para formar um tecido semelhante ao pâncreas dentro da matriz e quais aspectos angiogênicos e inflamatórios estariam envolvidos nesse processo em animais diabéticos tratados com hiperglicemia ou tratados com insulina.

Considerando os dados referentes ao metabolismo dos animais, somente o grupo tratado com insulina (G2) apresentou uma recuperação de peso após a indução inicial do Diabetes Mellitus, o que pode estar associado também com a diminuição dos níveis de glicose nesse mesmo grupo e o retorno da capacidade do organismo desses animais em utilizar a glicose como fonte de energia. Embora o grupo G2 fosse tratado diariamente com administração de insulina, ao final do experimento foi visto que alguns animais se apresentaram normoglicêmicos, fazendo com que não houvesse mais necessidade de continuidade de administração do hormônio. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores do grupo de pesquisa, no qual a indução da proliferação de parênquima pancreático em matriz sintética na presença de células tronco adiposas humanas em camundongos diabéticos foi capaz de reduzir os níveis glicêmicos dos animais (Pereira et al., 2017). Em outro estudo, Sachs e colaboradores (2020) mostraram que camundongos tratados com insulina em modelo de diabetes induzida por STZ obtiveram melhora nos níveis glicêmicos dos animais e aumento do número de células positivas para insulina no pâncreas.

Já em relação aos aspectos macroscópicos do implante, foi observado no dia da eutanásia que os implantes do grupo G2 apresentavam-se mais envoltos e aderidos ao pâncreas nativo dos animais em relação ao grupo G1. Diversos estudos têm indicado uma ação protetora da insulina sobre as células pancreáticas em animais hiperglicêmicos, Bruce e colaboradores (2021), por exemplo, mostraram que a insulina tem a capacidade de proteger as células acinares pancreáticas ao preservar o suprimento de ATP glicolítico para a bomba de cálcio em modelo de camundongos com pancreatite aguda.

Interessantemente, o tecido pancreático neoformado dentro da matriz se desenvolveu adjacente a uma matriz extracelular composta por um tecido conjuntivo denso, com presença de células inflamatórias, vasos sanguíneos e fibroblastos. As análises morfológicas mostraram que nos implantes de ambos os grupos (diabético e diabético+ insulina) foi formado um tecido pancreático bem estruturado dentro da

matriz, sendo composto de áreas com componentes acinares, ductos pancreáticos e células endócrinas, que foram confirmados com a marcação de imunohistoquímica para células positivas para insulina e glucagon. Ambos os componentes exócrinos e endócrinos proliferados dentro da matriz apresentavam morfologias habituais, sendo as áreas bem proliferadas compostas por ácinos bem formados, ductos característicos em número maior que o usual e Ilhotas de Langerhans bem delimitadas que apresentaram diferentes tipos celulares.

Em geral, a área de tecido pancreático intra-implante foi maior no grupo tratado com insulina durante o período do experimento (G2), o que está de acordo com resultados encontrados por Hegyi e colaboradores (2012) que demonstraram que a administração combinada de CCK-8 com insulina corroborou com a atividade mitótica de células acinares em ratos diabéticos com pancreatite, enquanto o CCK-8 sozinho não teve efeito esse efeito. Já Wang e colaboradores (2014) sugerem que a condição de hiperglicemia é capaz de gerar um estado de glicotoxicidade que leva à perda expressiva de ilhotas e células β produtoras de insulina a partir de um aumento nos níveis de apoptose e desdiferenciação dessas células.

Inicialmente, foi realizada imunohistoquímica para marcação de células produtoras de insulina e células produtoras de glucagon. Ambos os grupos diabéticos com implante apresentaram células positivas para esses marcadores, embora o grupo tratado com insulina (G2) tenha demonstrado um aumento significativo da presença dessas células em ilhotas formadas dentro do implante em relação ao grupo hiperglicêmico. Estudos indicam que condição de hiperglicemia pode danificar de forma significativa a reprogramação de células acinares em células β tanto em quantidade quanto em estado de diferenciação e função em modelos de camundongos transgênicos (Cavelti-Weder et al., 2016), o que pode sugerir que o fato do grupo G2 possuir uma quantidade maior células acinares pode corroborar com a proliferação de células β das ilhotas.

Além disso, diversas células isoladas ou morfologicamente parecidas com ácinos também eram positivas para ambos os marcadores. Esses resultados podem indicar que essas células não só são capazes de migrar pelo implante, mas também se diferenciar a partir de outras células. Dessa forma, para investigar esta questão foi realizada imuno-histoquímica para KI-67, o qual é uma proteína nuclear associada à

proliferação celular e à transcrição do RNA ribossômico, e para o gene PDX1 (Pancreatic and Duodenal Homeobox 1) que codifica uma proteína homônima e é considerado um regulador mestre no desenvolvimento do pâncreas embrionário, guiando a diferenciação das células progenitoras pancreáticas em diferentes tipos de células pancreáticas, além de ser necessário para a maturação e a preservação da identidade das células β das ilhotas (Ebrahim et al., 2022). Os resultados demonstraram que o grupo tratado com insulina (G2) apresentou um número maior de células ductais positivas para KI-67 em comparação com o grupo hiperglicêmico (G1). A mesma tendência foi observada na imuno-histoquímica realizada para PDX1, que pode ser encontrado tanto no núcleo das células quanto no citoplasma. Estudos mostraram que células acinares eram ativadas após tratamento com Estreptozotocina + PDL, expressando fatores multipotentes embrionários e se tornando capazes de se diferenciar em células ductais ou endócrinas, incluindo células β maduras Pdx1HI, Nkx6.1+ and MafA+ (Pan et al., 2013). Já Rovira e colaboradores (2010), observaram que as células acinares poderiam adquirir um estado de células progenitoras em resposta às lesões, apresentando reativação da sinalização de PDX1 e da via WNT, a qual está normalmente ativa em células progenitoras pancreáticas embrionárias (Napolitano et al., 2023). Por outro lado, foi observado em modelo de pancreatectomia parcial que as células dos ductos pancreáticos também servem como uma fonte de regeneração ao passarem por um processo reprodutível de desdiferenciação, ao apresentar marcadores do epitélio pancreático embrionário (Pdx1, Tcf2 e Sox9), e rediferenciação em diferentes tipos de células endócrinas e exócrinas (Li et al., 2010). Dessa forma, é possível que as células marcadas positivamente para PDX1 sejam células progenitoras ou indiquem de células β maduras, uma vez que foi observado também a marcação de PDX1 em Ilhotas de Langerhans intra-implante.

Em relação às análises angiogênicas, em ambos os grupos foi notada a formação de vasos sanguíneos bem desenvolvidos em meio ao tecido fibrovascular e no tecido pancreático neoformado. O grupo tratado com insulina (G2) apresentou um aumento significativo no número de vasos durante as análises morfométricas em comparação ao grupo hiperglicêmico (G1). O processo de angiogênese intra-implante é essencial não somente para o desenvolvimento do tecido pancreático, mas também para a manutenção das estruturas recém-formadas, como as ilhotas que são estruturas altamente vascularizadas (Cao & Wang, 2014). Além disso, o processo de

vascularização de um biomaterial é essencial para promover a migração de proliferação de células, tanto de determinado tecido, quanto células inflamatórias (Ngo & Harley, 2020). Os resultados dos dados imunobioquímicos, por outro lado, mostraram que os níveis de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) se encontram reduzidos no grupo G2, tratado com insulina, podendo indicar que o processo de angiogênese não se encontra tão ativo nesse grupo, de forma que esses fatores de crescimento não estão sendo produzidos como antes, provavelmente devido ao fato do tecido já apresentar uma quantidade suficiente de vasos sanguíneos para sua nutrição.

Estudos *in vivo* demonstram que a presença de mediadores inflamatórios, como citocinas, é capaz de causar o aumento na expressão de NGN3, um marcador essencial para a diferenciação de células progenitoras de ilhotas, levando à proliferação de células β (Xiao et al., 2013). Outros estudos *in vivo* demonstram que citocinas pro-inflamatórias como TNF α , IL-1 β , IFN γ são capazes de ativar uma reprogramação das células ductais, que sofrem transdiferenciação para células endócrinas, independentemente do estresse por hiperglicemia (Valdez et al., 2016). Interessantemente, os níveis de TNF- α se encontraram aumentados no grupo tratado com insulina (G2) em comparação com o grupo não tratado (G1), o que pode indicar a ação desse fator na proliferação das células, confirmando os dados anteriores que mostram que houve maior crescimento de tecido pancreático no grupo G2. Entretanto não houve diferença entre os grupos nos níveis da enzima Mieloperoxidase, um marcador indireto dos níveis de neutrófilos, indicando que o processo inflamatório estaria mudando para um perfil crônico, o que pode ser confirmado devido ao aumento de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, no grupo G2.

Concomitantemente, a análise de TGF- β intra-implante demonstrou um aumento significativo em seus níveis no grupo tratado com insulina (G2). Segundo Lee e colaboradores (2021), o TGF- β possui papel importante no desenvolvimento do pâncreas endócrino, tal como a proliferação de células β , diferenciação e apoptose. Além disso, Xiao e colaboradores (2013), mostraram em estudo *in vivo* que a sinalização do receptor TGF- β é necessária para a proliferação basal das células β . Eles também observaram que o processo inflamatório e o aumento da carga de trabalho das células β , por questões de hiperglicemia, são estimulantes para a

proliferação das células β . Um resultado parecido foi encontrado na análise da atividade da enzima NAG, um marcador indireto dos níveis de macrófagos. Assim como foi visto pelo nosso grupo de pesquisa anteriormente, os macrófagos parecem estar ativamente envolvidos em promover um microambiente adequado para a manutenção do tecido pancreático (Pereira et al., 2017). Por outro lado, Xiao e colaboradores (2014) observaram que macrófagos recrutados mediante processo inflamatório são capazes de estimular a proliferação de células β no pâncreas por meio da indução de expressão de SMAD7 nessas células.

Os resultados relacionados à expressão dos genes E-CAD e N-CAD indicaram uma redução de ambos os genes no grupo tratado com insulina (G2). As moléculas de caderinas estão envolvidas na regulação da adesão célula-célula, bem como na modulação de processos morfogenéticos e de diferenciação cruciais durante o desenvolvimento. A E-caderina é importante na manutenção do fenótipo epitelial e na regulação da homeostase dos tecidos, modulando várias vias de sinalização (Van & Berx, 2008). Já a N-caderina está mais presente em tecidos não epiteliais e é expressa em células neurais, células endoteliais, células estromais e osteoblastos, podendo ser como um indicador do processo de transição epitélio-mesênquima (EMT) (Wang et al., 2016). Já foi observado que a transição epitélio-mesênquima é essencial para o desenvolvimento do pâncreas e a formação das Ilhotas de Langerhans primitivas (Cole et al., 2009). Além disso, estudos *in vivo* demonstram que o processo inflamatório induz a transição epitelial-mesênquimal (EMT) e a regulação positiva do marcador de progenitor endócrino, NGN3, em células pancreáticas em camundongos (Valdez et al., 2016). Dessa forma, associamos a presença de ambos os marcadores como um indicativo da capacidade das células pancreáticas de se proliferarem, migrarem e se aderirem novamente às células recém-formadas ou à matriz.

Os achados desse trabalho mostram que a matriz sintética de poliéter-poliuretano, ao ser implantada adjacente ao pâncreas, foi capaz de induzir a proliferação, migração e diferenciação das células pancreáticas, desenvolvendo um tecido pancreático intra-implante que é capaz de estimular a produção de hormônios necessários para o reestabelecimento da homeostasia durante a condição de diabetes mellitus. Além disso, a normalização dos níveis glicêmicos em animais diabéticos teve papel fundamental para a diferenciação das células dos compartimentos exócrino e

endócrino do pâncreas permitindo um aumento da resposta proliferativa do pâncreas destes animais normoglicêmicos.

9. Conclusão

A normalização dos níveis glicêmicos em animais diabéticos teve papel fundamental para a diferenciação das células dos compartimentos exócrino e endócrino do pâncreas, permitindo um aumento da resposta proliferativa.

O modelo de estudo utilizado demonstrou ser adequado para a avaliação da proliferação pancreática *in vivo*, sendo capaz de induzir a migração, proliferação e diferenciação de células acinares, ductais e endócrinas no interior do implante, desenvolvendo um tecido pancreático organizado nos poros da matriz sintética de poliéter-poliuretano.

Além disso, o modelo evidenciou processos de transdiferenciação entre as células pancreáticas adultas para a formação de um novo tecido.

Referências

- Afelik S, Rovira M. Pancreatic β -cell regeneration: Facultative or dedicated progenitors? *Mol Cell Endocrinol.* 2017 Apr 15;445:85-94. doi: 10.1016/j.mce.2016.11.008. Epub 2016 Nov 9. PMID: 27838399.
- Al-Hasani K, Pfeifer A, Courtney M, Ben-Othman N, Gjernes E, Vieira A, Druelle N et al. Adult duct-lining cells can reprogram into β -like cells able to counter repeated cycles of toxin-induced diabetes. *Dev Cell.* 2013 Jul 15;26(1):86-100. doi: 10.1016/j.devcel.2013.05.018. Epub 2013 Jun 27. PMID: 23810513.
- Andrade SP, Fan TP, Lewis GP. Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. *Br J Exp Pathol* 1987;68:755e66.
- Aragon F., Karaca M., Novials A., Maldonado R., Maechler P., Rubi B. Pancreatic polypeptide regulates glucagon release through PPYR1 receptors expressed in mouse and human α -cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015;1850:343–351. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.11.005.
- B. L. Furman, *Curr. Protoc.* 2021, 1, 78.
- Balakrishnan S, Dhavamani S, Prahalathan C. β -Cell specific transcription factors in the context of diabetes mellitus and β -cell regeneration. *Mech Dev.* 2020 Sep;163:103634

Brennand K, Melton D. Slow and steady is the key to β -cell replication. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine* 2009, 13: 472-487. PMID: 19379145, PMCID: PMC2820566

Broglio F., Arvat E., Benso A., Gottero C., Muccioli G., Papotti M., van der Lely A.J., Deghenghi R., Ghigo E. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:5083–5086.

Bouwens L, Rومان I. Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev.* 2005;85(4):1255-1270. doi:10.1152/physrev.00025.2004

Cao Z, Wang X. The endocrine role between b cells and intra-islet endothelial cells. *vol.61*; 2014. p. 647e54.

Cockell M, Stevenson BJ, Strubin M, Hagenbuchle O, and Wellauer PK. Identification of a cell-specific DNA-binding activity that interacts with

Cole L, Anderson M, Antin PB, Limesand SW. One process for pancreatic beta-cell coalescence into islets involves an epithelial-mesenchymal transition. *J Endocrinol.* 2009;203(1):19-31. doi:10.1677/JOE-09-0072

Da Silva Xavier G. The Cells of the Islets of Langerhans. *J Clin Med.* 2018 Mar 12;7(3):54. doi: 10.3390/jcm7030054. PMID: 29534517; PMCID: PMC5867580.

Ebrahim N, Shakirova K, Dashinimaev E. PDX1 is the cornerstone of pancreatic β -cell functions and identity. *Front Mol Biosci.* 2022 Dec 15;9:1091757. doi: 10.3389/fmolb.2022.1091757. PMID: 36589234; PMCID: PMC9798421.

Gu D, Arnush M, Sarvetnick N. Endocrine/exocrine intermediate cells in streptozotocin-treated Ins-IFN-gamma transgenic mice. *Pancreas.* 1997;15:246–250.

Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development.* 2002;129(10):2447-2457. doi:10.1242/dev.129.10.2447

Guney MA, Lorberbaum DS, Sussel L. Pancreatic β cell regeneration: To β or not to β . *Curr Opin Physiol.* 2020 Apr;14:13-20. doi: 10.1016/j.cophys.2019.10.019. Epub 2019 Nov 5. PMID: 32864533; PMCID: PMC7454996.

Hegyi P., Rakonczay-Jr Z., Sari R., Czako L., Farkas N., Gog C., Nemeth J., Lonovics J., Takacs T. (2004) Insulin is necessary for the hypertrophic effect of cholecystokinin-octapeptide following acute necrotizing experimental pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* 10, 2275–2277

Jalal M, Campbell JA, Hopper AD: Practical guide to the management of chronic pancreatitis. *Frontline Gastroenterol* 2019, 10:253-260.

Ji-Hyun Lee, Ji-Hyeon Lee, Sushil G Rane, TGF- β Signaling in Pancreatic Islet β Cell Development and Function, *Endocrinology*, Volume 162, Issue 3, March 2021, bqaa233,

Jiang Z, White RA, Wang TC. Adult Pancreatic Acinar Progenitor-like Populations in Regeneration and Cancer. *Trends Mol Med.* 2020 Aug;26(8):758-767

Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T. and Edlund, H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371, 606-609.

Karpińska M, Czauderna M. Pancreas-Its Functions, Disorders, and Physiological Impact on the Mammals' Organism. *Front Physiol.* 2022;13:807632. Published 2022 Mar 30. doi:10.3389/fphys.2022.807632

Kesavan G, Sand FW, Greiner TU, et al. Cdc42-mediated tubulogenesis controls cell specification. *Cell.* 2009;139(4):791-801. doi:10.1016/j.cell.2009.08.049

Kopinke D, Brailsford M, Shea JE, Leavitt R, Scaife CL, Murtaugh LC. Lineage tracing reveals the dynamic contribution of Hes1+ cells to the developing and adult pancreas. *Development.* 2011;138(3):431-441. doi:10.1242/dev.053843

Krapp, M. Knofler, B. Ledermann, K. Burki, C. Berney, N. Zoerkler, O. Hagenbuchle, P.K. Wellauer The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev.*, 12 (1998), pp. 3752-3763

Lamy CM, Sanno H, Labouèbe G, Picard A, Magnan C, Chatton JY, Thorens B. Hypoglycemia-activated GLUT2 neurons of the nucleus tractus solitarius stimulate vagal activity and glucagon secretion. *Cell Metab.* 2014 Mar 4;19(3):527-38. doi: 10.1016/j.cmet.2014.02.003. PMID: 24606905.

Li WC, Rukstalis JM, Nishimura W, Tchipashvili V, Habener JF, Sharma A, Bonner-Weir S. Activation of pancreatic-duct-derived progenitor cells during pancreas regeneration in adult rats. *J Cell Sci.* 2010 Aug 15;123(Pt 16):2792-802.

Li WC, Rukstalis JM, Nishimura W, Tchipashvili V, Habener JF, Sharma A, Bonner-Weir S. Activation of pancreatic-duct-derived progenitor cells during pancreas regeneration in adult rats. *J Cell Sci.* 2010;123:2792–2802.

Lysy PA, Weir GC, Bonner-Weir S. Concise review: pancreas regeneration: recent advances and perspectives. *Stem Cells Transl Med.* 2012 Feb;1(2):150-9.

Maddaloni E., Bolli G. B., Frier B. M., Little R. R., Leslie R. D., Pozzilli P., and Buzzetti R., C-peptide determination in the diagnosis of type of diabetes and its management: a clinical perspective, *Diabetes, Obesity & Metabolism.* (2022) 24, no. 10, 1912–1926

Masui T, Swift GH, Deering T, Shen C, Coats WS, Long Q, Elsässer HP, Magnuson MA, MacDonald RJ. Replacement of Rbpj with Rbpjl in the PTF1 complex controls the final maturation of pancreatic acinar cells. *Gastroenterology.* 2010 Jul;139(1):270-80. doi: 10.1053/j.gastro.2010.04.003. Epub 2010 Apr 14. PMID: 20398665; PMCID: PMC2902682.

Mathieu C., Martens P.-J., Vangoitsenhoven R. (2021). One Hundred Years of Insulin Therapy. *Nat. Rev. Endocrinol.* 17, 715–725. 10.1038/s41574-021-00542-w

Mendes JB, Campos PP, Ferreira MA, Bakhle YS, Andrade SP. Host response to sponge implants differs between subcutaneous and intraperitoneal sites in mice. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007 Nov;83(2):408-15. doi: 10.1002/jbm.b.30810. PMID: 17415768.

Murtaugh LC, Keefe MD. Regeneration and repair of the exocrine pancreas. *Annu Rev Physiol.* 2015;77:229-49. Epub 2014 Oct 24. PMID: 25386992; PMCID: PMC4324082.

Napolitano T, Silvano S, Ayachi C, Plaisant M, Sousa-Da-Veiga A, Fofo H, Charles B, Collombat P. Wnt Pathway in Pancreatic Development and Pathophysiology. *Cells*. 2023 Feb 9;12(4):565.

Orellano, L.A. et al. Angiopreventive versus angiopromoting effects of allopurinol in Pan FC, Wright C. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev Dyn*. 2011;240(3):530-565. doi:10.1002/dvdy.22584

Pan FC, Wright C. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev Dyn*. 2011;240(3):530-565. doi:10.1002/dvdy.22584

Pan, F.C., Bankaitis, E.D., Boyer, D., Xu, X., Van de Casteele, M., Magnuson, M.A., Heimberg, H., Wright, C.V., 2013. Spatiotemporal patterns of multipotentiality in Ptf1a-expressing cells during pancreas organogenesis and injury-induced facultative restoration. *Development* 140 (4), 751e764.

Pepper AR, Gala-Lopez B, Ziff O, Shapiro AJ. Current status of clinical islet transplantation. *World J Transplant*. 2013 Dec 24;3(4):48-53. doi: 10.5500/wjt.v3.i4.48. PMID: 24392308; PMCID: PMC3879523.

Pereira LX, Viana CTR, Orellano LAA, Almeida SA, Vasconcelos AC, Goes AM et al. Synthetic matrix of polyether-polyurethane as a biological platform for pancreatic regeneration. *Life Sci*. 2017 May 1;176:67-74

Pereira LX, Viana CTR, Orellano LAA, de Almeida SA, de Lazari MGT, Couto LC, Vasconcelos AC, Andrade SP, Campos PP. Kinetics of pancreatic tissue proliferation in a polymeric platform in mice. *Pancreatology*. 2018 Mar;18(2):221-229

Peshavaria M, Larmie BL, Lausier J, Satish B, Habibovic A, Roskens V, Larock K, Everill B, Leahy JL, Jetton TL. Regulation of pancreatic beta-cell regeneration in the normoglycemic 60% partial-pancreatectomy mouse. *Diabetes*. 2006;55:3289–3298.

Pin, Christopher L, and Fenech, Melissa. 2020. Development of the Pancreas. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2020.11

Puri S, Hebrok M. Cellular plasticity within the pancreas--lessons learned from development. *Dev Cell*. 2010;18(3):342-356. doi:10.1016/j.devcel.2010.02.005

Rankin, M. M. & Kushner, J. A. Adaptive β -cell proliferation is severely restricted with advanced age. *Diabetes* 58, 1365–1372 (2009).

Rorsman P., Renstrom E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2003;46:1029–1045. doi: 10.1007/s00125-003-1153-1.

Sachs S, Bastidas-Ponce A, Tritchler S, Bakhti M, Böttcher A, Sánchez-Garrido MA et al. Targeted pharmacological therapy restores β -cell function for diabetes remission. *Nat Metab*. 2020 Feb;2(2):192-209

Salinno, & Cota, & Bastidas-Ponce, & Tarquis-Medina, Marta & Lickert, & Bakhti, Mostafa. (2019). β -Cell Maturation and Identity in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 20. 5417.

Sever D, Grapin-Botton A. Regeneration of the pancreas: proliferation and cellular conversion of surviving cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2020 Oct;64:84-93. doi: 10.1016/j.gde.2020.06.005. Epub 2020 Jul 25. PMID: 32721583.

Seymour PA, Freude KK, Tran MN, Mayes EE, Jensen J, Kist R, Scherer G, Sander M. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:1865–1870. doi: 10.1073/pnas.0609217104.

Shamsi BH, Chato M, Xu XK, Xu X, Chen XQ. Versatile Functions of Somatostatin and Somatostatin Receptors in the Gastrointestinal System. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Mar 16;12:652363. doi: 10.3389/fendo.2021.652363. PMID: 33796080; PMCID: PMC8009181.

Shih, H. P., Wang, A. and Sander, M. (2013). Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 81-105.

Stanger BZ, Stiles B, Lauwers GY, et al. Pten constrains centroacinar cell expansion and malignant transformation in the pancreas. *Cancer Cell*. 2005;8(3):185-195. doi:10.1016/j.ccr.2005.07.015

Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet*. 1997;15(1):106-110. doi:10.1038/ng0197-106

Thorel F, Népote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, Herrera PL. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature*. 2010 Apr 22;464(7292):1149-54.

Treuting P and Dintzis S, eds. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*. Oxford, UK: Academic Press; 2012. 461 pp.

Uday Chandrika K, Tripathi R, Kameshwari Y, Rangaraj N, Mahesh Kumar J, Singh S. Refunctionalization of Decellularized Organ Scaffold of Pancreas by Recellularization: Whole Organ Regeneration into Functional Pancreas. *Tissue Eng Regen Med*. 2021 Feb;18(1):99-112

Valdez IA, Dirice E, Gupta MK, Shirakawa J, Teo AKK, Kulkarni RN. Proinflammatory Cytokines Induce Endocrine Differentiation in Pancreatic Ductal Cells via STAT3-Dependent NGN3 Activation. *Cell Rep*. 2016 Apr 19;15(3):460-470.

Villasenor A, Chong DC, Henkemeyer M, Cleaver O. Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis. *Development*. 2010;137(24):4295-4305. doi:10.1242/dev.052993

Wang Z, York NW, Nichols CG, Remedi MS. Pancreatic β cell dedifferentiation in diabetes and redifferentiation following insulin therapy. *Cell Metab*. 2014 May 6;19(5):872-82.

Wei, Y., Quan, L., Zhou, T. et al. The relationship between different C-peptide level and insulin dose of insulin pump. *Nutr. Diabetes* 11, 7 (2021)

Xiao X, Chen Z, Shiota C, Prasad K, Guo P, El-Gohary Y, Paredes J, Welsh C, Wiersch J, Gittes GK. No evidence for β cell neogenesis in murine adult pancreas. *J Clin Invest*. 2013 May;123(5):2207-17

Xiao X, Gaffar I, Guo P, et al. M2 macrophages promote beta-cell proliferation by up-regulation of SMAD7. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014;111:E1211–20.

Xu X et al. Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* 132, 197–207 (2008). [PubMed: 18243096]

Xu X, D'Hoker J, Stangé G, Bonn   S, De Leu N, Xiao X, et al. Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell*. 2008 Jan 25;132(2):197-207. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.015. PMID: 18243096.

Zipori D. The nature of stem cells: state rather than entity. *Nat Rev Genet*. 2004;5(11):873-878. doi:10.1038/nrg1475

Zhao H, Huang X, Liu Z, Pu W, Lv Z, He L, Li Y, Zhou Q, Lui KO, Zhou B. Pre-existing beta cells but not progenitors contribute to new beta cells in the adult pancreas. *Nat Metab*. 2021 Mar;3(3):352-365.

Zhou, Q., Melton, D.A. Pancreas regeneration. *Nature* 557, 351–358 (2018).

EVALUATION OF PANCREATIC PROLIFERATION INDUCED BY A SYNTHETIC MATRIX IN DIABETIC ANIMALS TREATED WITH INSULIN

Abstract

Pancreatic disorders such as pancreatitis, pancreatic cancer, and diabetes mellitus may result in severe pancreatic dysfunctions. Study models have been developed in order to provide the understanding of the pancreatic regeneration process to aid in therapeutic strategies. The development of these models is highly relevant for understanding pancreatic regeneration and how pancreatic cells can be generated from pre-existing ones; however, the mechanism of cell proliferation and organization is still not well elucidated. In this study, we used a synthetic polyether-polyurethane matrix to induce the proliferation of pancreatic parenchyma in vivo in diabetic C57BL/6 mice. After chemical induction of diabetes (STZ), the animals were divided into three groups, with only one group (G2) receiving daily subcutaneous insulin treatment to evaluate the influence of glycemia on pancreatic proliferation. Two groups (G1 and G2) received synthetic matrices surgically placed adjacent to the native pancreas and removed 30 days after implantation. In this matrix, pancreatic components (acini, ducts, and islets), blood vessels, and inflammatory markers were analyzed. Clinical analyses showed an improvement in the metabolism of insulin-treated animals, which showed a recovery of initial weight, a decrease in glycemic levels, and an improvement in the GTT test. Morphometric analyses by H&E and immunohistochemistry were performed to evaluate the newly formed intra-implant tissue. After 30 days, the matrices were filled with clusters of pancreatic parenchyma (acini, ducts, and islet-like structures), inflammatory cells, fibroblasts, extracellular matrix components, and blood vessels. However, analyses showed that the insulin-treated group had a larger intra-implant proliferation area and a higher number of acini per field. Both groups had islet cells positive for insulin and glucagon, as well as ductal and acinar cells positive for KI-67 and PDX1 in the intra-implant pancreatic tissue. The insulin-treated group showed an increase in all these analyses, except for the number of acinar cells positive for KI-

67. Analyses of the angiogenesis process in the intra-implant pancreatic tissue by histology and immunobiochemical methods showed an increase in the number of vessels but a decrease in VEGF levels. Additionally, an increase in various inflammatory markers and a decrease in the expression of adhesion molecules (N-CAD and E-CAD) were observed in this group. The study model demonstrated potential in proliferating exocrine (acini, ducts) and endocrine (islets) components and allowed the evaluation of molecules and cells involved in pancreatic proliferation in adult pancreatic tissue under high metabolic demand conditions, presenting better results when the animals were in normalized glycemic conditions.

Keywords: Diabetes, hyperglycemia, insulin, pancreatic proliferation, β -cells

Introduction

The pancreas is a metabolic organ with essential functions in the digestive and endocrine systems. These are exocrine and endocrine cell functions, and each of the five main types of islet cells synthesizes and secretes a hormone: insulin (β cells), glucagon (α cells), somatostatin (δ cells), pancreatic polypeptide (P.P. cells), and ghrelin (ϵ cells). Insulin and glucagon are released directly into the bloodstream via a dense intra-islet vascular network and are essential to regulating blood glucose levels. On the other hand, the exocrine pancreas is composed of acinar and ductal cells that produce enzymes and facilitate the transportation of these enzymes to the intestine (Jiang et al., 2020; Shih et al., 2013).

Many pancreas-disturbing disorders can lead to the destruction of its compartments and result in a state of hyperglycemia, as well as severe clinical complications related to the insufficiency of the exocrine portion (Murtaugh & Keefe, 2015). The treatment for exocrine pancreatic insufficiency (EPI) aims to replace pancreatic enzymes not adequately produced by the pancreas. Meanwhile, treatments for hyperglycemic conditions mainly include the administration of exogenous insulin and insulinotropic drugs, depending on the patient's C-peptide and glucose levels. However, even when performed correctly, patients who undergo these treatments are prone to large fluctuations in blood glucose levels and, in the future, tend to develop complications such as cardiovascular disease, nephropathy, and retinopathy (Guney et al., 2020; Brennand & Melton, 2009; Salinno et al., 2019). Islet transplantation is currently the most indicated treatment for patients with B-cell deficiency. However, it is limited due to the need for immunosuppressive drugs, the scarcity of donors, and the possibility of graft failure after a few years (Lysy et al., 2015; Pepper et al., 2013; Guney et al., 2020).

Due to the limitations of current treatments, there is a growing demand for new approaches capable of regenerating pancreatic tissue and providing functional B cells from proliferation, neogenesis, and transdifferentiation (Zhou & Melton, 2018; Guney

et al., 2020). *In vivo* and *in vitro* studies show that pancreatic B cells can be generated by replicating the pre-existing B cells or formed from non-B pancreatic cells (Peshavaria et al., 2006). Alternately, pancreatic duct cells and acinar cells are capable of dedifferentiating and presenting embryonic pancreatic aspects to form new pancreatic lobules and Islets of Langerhans (Thorel et al., 2010; Li et al., 2010; Xu X et al., 2008; Murtaugh & Keefe, 2015; Peshavaria et al., 2006). However, these *in vivo* and *in vitro* models for studying pancreatic regeneration, like organoids, are difficult to develop, expensive to maintain, and mainly do not mimic the conditions of the organism. Therefore, establishing a pancreatic regeneration model by simulating an environment similar to a living organism could provide essential clues to unraveling the proliferation process, offering a more practical and accessible solution for research in this area.

Our research group has been conducting studies using a porous synthetic polyether-polyurethane matrix. When inserted in an organism, this matrix can induce connective tissue proliferation inside it. When placed in the abdominal cavity, the migration and proliferation of various adjacent tissues, including pancreatic parenchyma, are enabled. (Pereira et al., 2017). We hypothesized that this experimental model could contribute to investigating the development of pancreatic tissue formed from the adult pancreas by mimicking an organ culture *in vivo* under conditions of hyperglycemia and normoglycemia in diabetic animals. To achieve this, we analyzed the molecules, cells, and components of the extracellular matrix involved in pancreatic proliferation within the platform 30 days after the implantation. Understanding the cellular processes involved in this response is fundamental for developing tissue engineering strategies using the newly formed pancreatic tissue.

Materials and Methods

Animals

This study used male mice of the C57BL/6 strain (n=30 per group) that were 7 to 8 weeks old and weighed between 19 and 25 grams. The animals came from the Bioterism Center (CEBIO) of the Institute of Biological Sciences (ICB) of the Federal University of Minas Gerais (UFMG).

The animals were kept with free access to water and standard feed (NUVILAB CR-1 Brasil) and housed in the General Pathology Department's vivarium under a 12-hour light/dark cycle. All procedures complied with the standards established in the guidelines for the care and use of experimental animals by the Institutional Animal Welfare Committee and followed UFMG's Research Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA protocol 58/2023).

Induction of Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus was induced in the mice utilizing the compound Streptozotocin (STZ) (Sigma—Aldrich, St. Louis, MO). Louis, MO, USA), diluted in 50mM Citrate-Phosphate buffer (pH 4.5), according to the protocol established by Furman (2021) and Pereira (2017). The animals were weighed, and the induction protocol was carried out using a single dose of the compound (150mg/kg), administered intraperitoneally.

The administration occurred 4 hours after the animals' feeding. They were then given a dilution of sucrose (10%) ad libitum for three consecutive days to prevent/reduce mortality caused by hypoglycemia due to intense β cell necrosis and insulin release. After this period, the animals had free access to filtered water and food.

Following the established protocol, the animals' blood glucose was measured ten days after the STZ dose. Only animals with blood glucose levels >250mg/dl proceeded in the experiment. Blood glucose levels were measured before the injection and weekly after confirmation of Diabetes Mellitus using the On Call® Plus II Glucose Monitor (ACON Laboratories, Inc. San Diego, CA, USA).

Two groups of animals received the implant one day after confirmation of diabetes mellitus. One group received daily (twice daily) insulin HUMULIN® R (REGULAR, Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN 46285, USA) intraperitoneally over 12h/12h to maintain and normalize glycemic indices. The animals were treated for 30 days.

Polyether-polyurethane synthetic sponge implant

Synthetic polyether-polyurethane matrices (Vitafoam Ltd, Manchester, U.K.) cut into discs 8mm in diameter by 5mm thick, soaked in 70% alcohol (overnight), and sterilized by boiling in distilled water for thirty minutes before surgery (Andradde et al., 1987).

All animals were anesthetized with a mixture of ketamine (60mg/kg) and xylazine (10mg/kg). Only the sponge insertion site was trichotomized, and the skin was antiseptic with 70% alcohol and 2% chlorhexidine. The acellular synthetic matrices were implanted in the intraperitoneal region, attached to the pancreas. The skin and peritoneum were sutured separately with single stitches using non-absorbable 5-0 nylon thread. Any signs of infection at the surgical site or animal suffering were assessed and monitored during the postoperative period.

The day after the sponge was implanted, insulin treatment started for 30 consecutive days. After this period, the animals were euthanized by cervical dislocation, and the implants were removed, weighed, adequately packaged, and then processed for immunobiochemical and histological analysis.

Analysis of the animals' blood glucose

Blood glucose levels were measured weekly throughout the experiment using the On Call® Plus II Glucose Monitor (ACON Laboratories, Inc., San Diego, CA, USA).

Histological and morphometric analysis

The implants and the pancreas of the animals were removed and fixed in 10% formaldehyde for 24 hours. After embedding in paraffin, sections with a thickness of 5 µm were stained with hematoxylin and eosin (H&E), while other sections were processed for immunohistochemical analysis. Depending on the analysis, 20 or 15 fields were captured using the QCapture Pro software with a QColor5 camera connected to an Olympus BX43 microscope at 100x or 400x magnification with a 10x or 40x objective, respectively. The morphometric analysis of the intra-implant area, number of acini, ducts, and blood vessels was performed using a 10x or 40x objective at 100x or 400x magnification, respectively. Morphometric parameters were analyzed using Image Pro Plus 8.0 software.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical analyses on dewaxed sections of the implants were performed. The sections were hydrated and subjected to antigen recovery, endogenous peroxidase, and protein blocking. The slides were then incubated overnight at 8°C with the primary antibodies described in Table 1. The next day, the secondary antibody and HRP steps were carried out. The DAB chromogen allowed peroxidase activity visualization. The sections were then counterstained with hematoxylin. The negative control was performed simultaneously by omitting the primary antibody.

Table 1. Immunohistochemical markers used for intra-implant tissue analysis.

Marker (Clone)	Dilution	Brand
Insulin	1:100	Dako
Glucagon	1:100	Santa Cruz Biotechnology
KI-67	1:200	Abcam
PDX1	1:80	Santa Cruz Biotechnology

Measurement of Myeloperoxidase and N-acetyl-β-D-glucosaminidase levels

Neutrophil infiltration of the implants was assessed indirectly by analyzing myeloperoxidase (MPO) activity (Pereira *et al.*, 2017). The implants were weighed, homogenized in 0.05 M NaPO₄ buffer (pH 6.0), and centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes at 4°C. Tetramethylbenzidine (1.6 mM) and H₂O₂ (0.3 mM) were then added to the sample to stain the MPO enzyme, and the reaction was stopped by adding 50 µl of H₂SO₄ (4M). MPO activity in the supernatant samples was determined by measuring the change in absorbance at 450 nm. The results are expressed as a change in wet tissue's optical density (O.D.) per gram (g).

The infiltration of macrophages into the implants was indirectly assessed by the levels of the lysosomal enzyme N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) (Orellano *et al.*, 2015). The samples were homogenized in NaCl solution (0.9% v/v) containing 0.1% v/v Triton X-100 (Promega, Madison, WI, USA) and centrifuged at 3,000 rpm for 10 min at 4°C. The supernatant samples were incubated for 30 minutes at 37°C with 100µl of P-nitrophenyl-N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), prepared in citrate/phosphate buffer (0.1 M citric acid; 0.1 M Na₂HPO₄, pH 4.5) to produce a final concentration of 2.24 mM. The reaction was stopped by adding 100 µl of 0.2 M glycine buffer (pH 10.6). Substrate hydrolysis was determined by measuring absorption at 405 nm. The results are expressed in nmol/mg wet tissue.

Measurement of the levels of cytokines produced intra-implants

According to the manufacturer's protocol, the cytokines TNF-α, TGF-β, VEGF, and IL-10 in the implants were determined using Immunoassay Kits (R and D Systems, USA). The implants were homogenized in PBS pH 7.4 containing 0.05% Tween and centrifuged at 10,000 ×g for 30 min. After this procedure, 100 µl of the supernatant was used to measure the cytokines. Dilutions of the cell-free supernatants were added to ELISA plates coated with a specific murine monoclonal antibody against the cytokine, followed by the addition of a second polyclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP), also against the cytokine. After washing to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution (50 µL of a 1:1 solution of hydrogen peroxide and 10 mg/ml tetramethylbenzidine in DMSO) was added to the wells. The color reaction stopped after a 20-minute incubation by adding 2 M sulfuric acid (50 µL), and color intensity was measured at 540 nm in a spectrophotometer (Thermoplate). The results were expressed as a picogram of cytokine/mg of wet tissue.

RNA Extraction, Reverse Transcription, and Real-Time PCR

To evaluate the gene expression of CDH1 (E-cad), CDH2 (N-cad), and the normalizer GAPDH, total RNA was extracted from the sponges removed from both groups of mice. Each sample was macerated in microtubes containing 1000 µL of Trizol® (Invitrogen

Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The total RNA extraction was performed according to the manufacturer's protocol without modifications. At the end of the RNA extraction, the pellet was resuspended in 100 μ L of sterile DNase and RNase-free water, and the samples were quantified using a NanoDrop (NanoDrop Lite Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA).

cDNA synthesis was performed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA) without modifications and following the manufacturer's recommendations, in a final reaction volume of 20 μ L. The mix was incubated for 10 minutes at 25 °C, followed by 2 hours at 37 °C and finally 5 minutes at 85 °C in the MiniAmp™ Plus Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA).

The cDNA samples resulting from the Reverse Transcription (RT) were subjected to real-time PCR using the PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and the primers described in Table X. The samples (20 ng of cDNA) were applied in duplicate to ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plates with Barcode (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), in a final volume of 20 μ L.

Table 2. Genes and primers used for RT-PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
GAPDH	GTGGAGTCTACTGGTGTCTT	GGTTCACACCCATCACAAAC
CDH1 (E-CAD)	CATCATTGAGAGGGAGACAG	GACACGGCATGAGAATAGAG
CDH2 (N-CAD)	CTGACTGAGGAGCCTATGAA	CAGTCTCTCTTCTGCCTTTG

Real-time PCR data were assessed using the comparative CT method ([mean CT of target gene] - [mean CT of endogenous control]). The endogenous control S18 was used to normalize the target gene and generate the Δ CT. The $\Delta\Delta$ CT ([Δ CT sample] - [Δ CT control]) was calculated, and the $2^{-\Delta\Delta$ CT method was applied to obtain the relative expression levels of each target gene (Schmittgen, Livak, 2001).

Statistical analysis

The results are as mean $\pm$ SEM or median. Normality and homoscedasticity were determined according to the Shapiro-Wilk test for subsequent statistical analysis. Statistical analysis was carried out using GraphPad Prisma 8.0 software, and a value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Comparisons between the groups

used *Student's t-test*, One Way ANOVA, 2Way ANOVA, or Mann-Whitney (for non-parametric data).

RESULTS

Animal metabolism

The animals' blood glucose levels were measured weekly during the experiment. In the diabetic animals (SHAM), a decrease in weight was observed throughout the experiment, while the animals treated with insulin (G2) had a significant weight gain by the end of the same period (Fig. 1 A) (p-value = 0.0098). Diabetic animals with implants (G1) also showed a weight reduction, although this was not significant compared to the other groups. Concerning glycemic levels (Fig. 1B), the animals in the treated group (G2) showed a significant reduction in glycemic levels (p-value = <0.0001) compared to the other groups on day 30.

In addition, an oral glucose tolerance test was carried out on the diabetic animals with the implant (G1) and the animals treated with insulin (G2). The analysis showed a difference between the groups in the oral glucose tolerance test in response to increased blood glucose levels (Fig. 1 C).

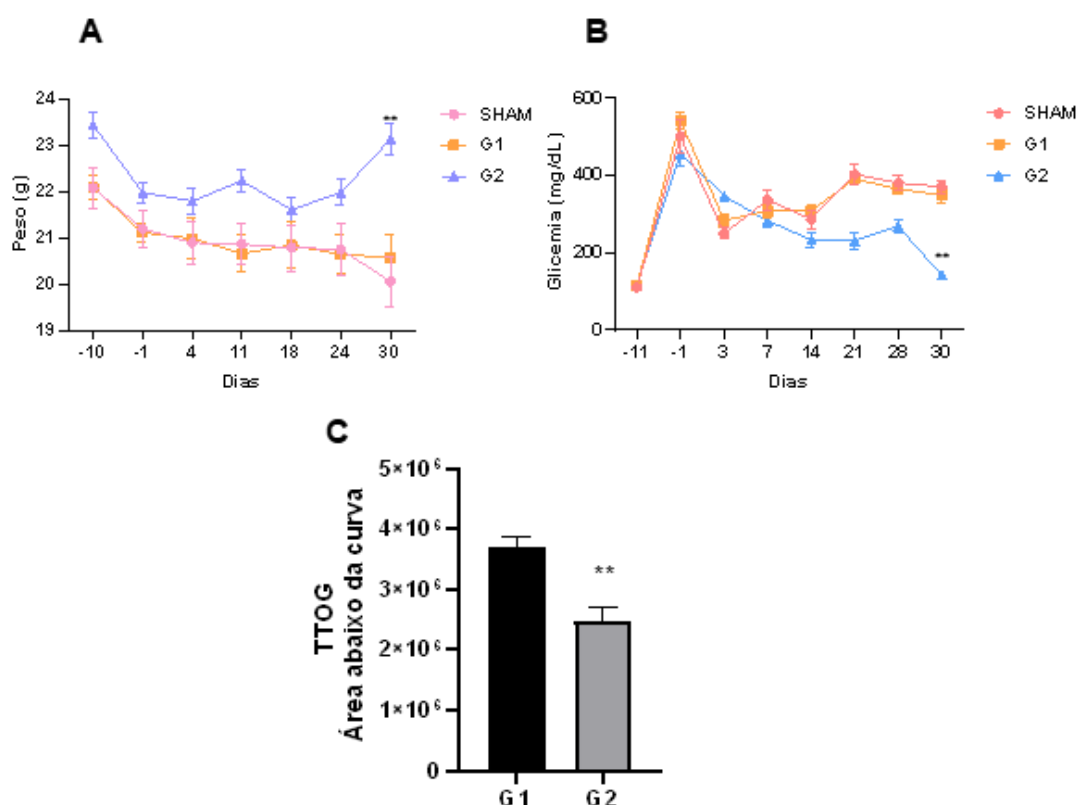


Figure 1. Evaluation of the animals' metabolic parameters. The weight of the animals in groups SHAM (non-diabetics), G1 (diabetics with implant), and G2 (diabetics with implant and treatment) was monitored before and during treatment and evaluated in grams (A). Glycemic levels were observed before and after sponge implantation surgery (B). In the oral glucose tolerance test (OGTT), the result was given as the area under the curve (AUC) measured for 120 min (C). Values expressed as mean $\pm$ SEM. One Way ANOVA or 2 Way ANOVA test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Macroscopy of Induced Intra-Implant Pancreatic Tissue

Regarding the macroscopic aspects of the implants, it was observed that in both groups, the matrix remained adhered to the pancreas, making it impossible to separate them after the treatment period (30 days). In the insulin-treated group (G2), the matrix was found to be completely enveloped by the pancreas (Fig. 2 B), indicating greater adherence compared to the hyperglycemic group (G1) (Fig. 2 A).

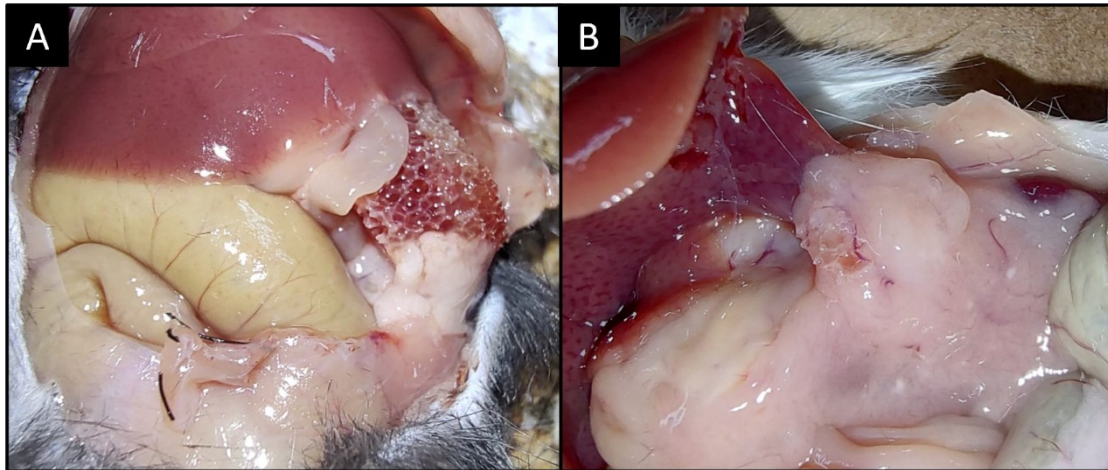


Figure 2. Macroscopy of implants in diabetic animals. Representative images of group 1 and group 2, which was treated with insulin, in A and B, respectively. It can be observed that the matrix is surrounded by the pancreas in the normoglycemic group.

Intra-implant pancreatic tissue proliferation (exocrine and endocrine components)

Both groups that received the synthetic matrix implant adjacent to the pancreas showed proliferation of fibrovascular tissue and pancreatic parenchyma. The animals tolerated the biomaterial well, and those that showed signs of infection were discarded. Fig. 3 A and B show representative H&E-stained images of the neoformed pancreas in group G1 and group G2, respectively.

Regarding intra-implant pancreatic proliferation, considering endocrine (islets) and exocrine (acini, ducts, and vessels) components, an analysis carried out by analyzing the area allowed us to confirm that group G2 showed more significant proliferation than group G1 (Fig. 3 C) (p -value = 0.0041). Similarly, the evaluation of the number of exocrine components showed that there was a significant increase in acini (Fig. 3 D) (p -value = <0.0001). The number of ducts remained unchanged between the groups (Fig. 3 E) (p -value = 0.3649).

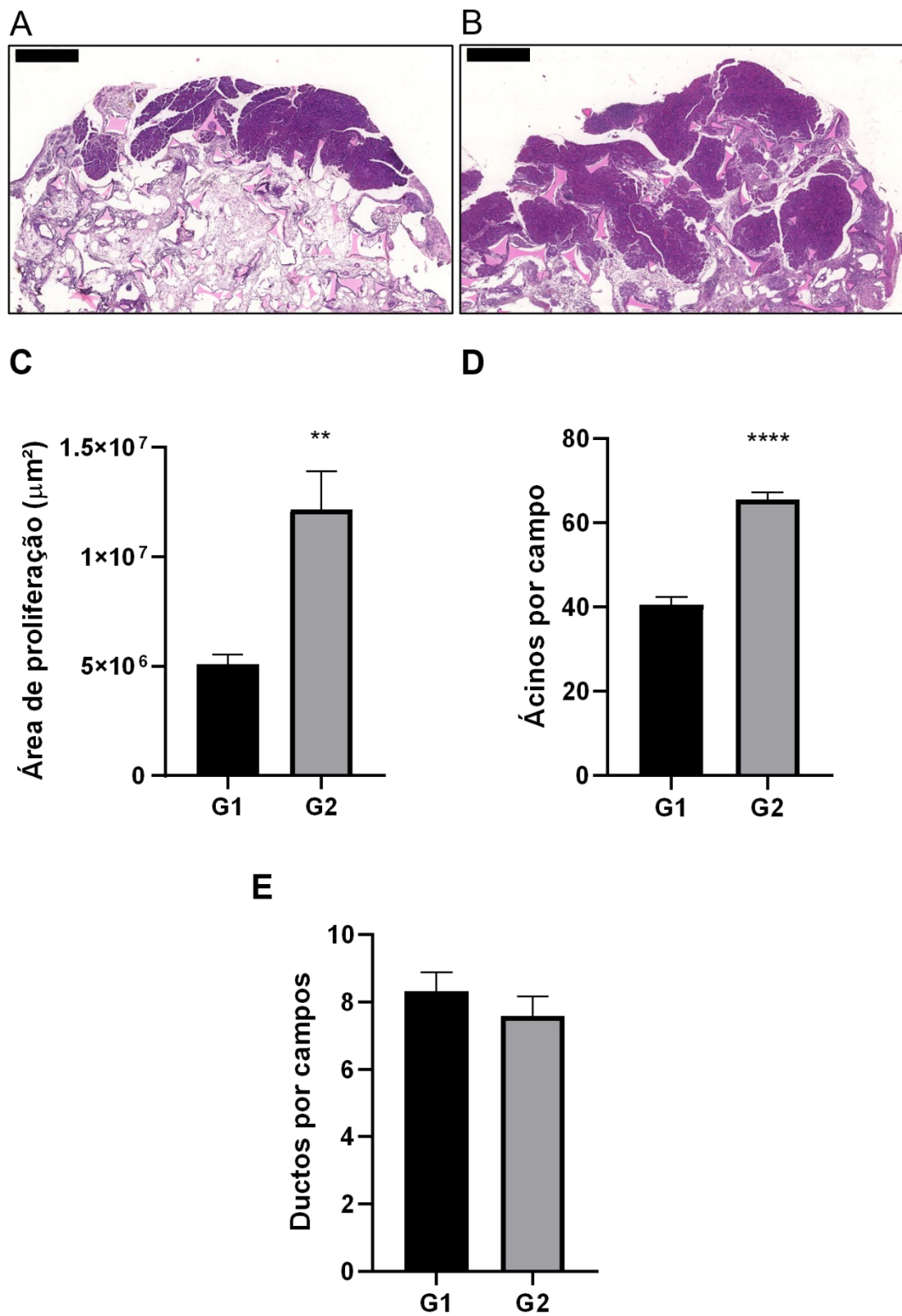


Figure 3. Proliferation and exocrine components of the neoformed pancreas. A and B show histological sections stained in H&E for groups 2 and 3, respectively, at 5x magnification. C) Intra-implant

proliferation area. D) Number of acini per field. E) Number of ducts per field. Total of 15 fields per slide. N = 5. Bar = 500µm. Values expressed as mean ± SEM. *Student's t-test*; **P < 0.01; ***P < 0.001.

In order to quantify the infiltration of pancreatic parenchyma within the implant, the number of insulin-producing cells and glucagon-producing cells was evaluated through immunohistochemistry. Regarding insulin production, the insulin-treated group, G2 (Fig. 4 B), showed an increase in the number of cells producing this hormone (Fig. 4 E) (p value = 0.0162) compared to the untreated group, G1 (Fig. 4 A). A similar result was observed in the staining of glucagon-producing cells in the implants, as group G2 (Fig. 4 D) had a significant increase (Fig. 4 F) (p value = 0.0036) compared to group G1 (Fig. 4 C).

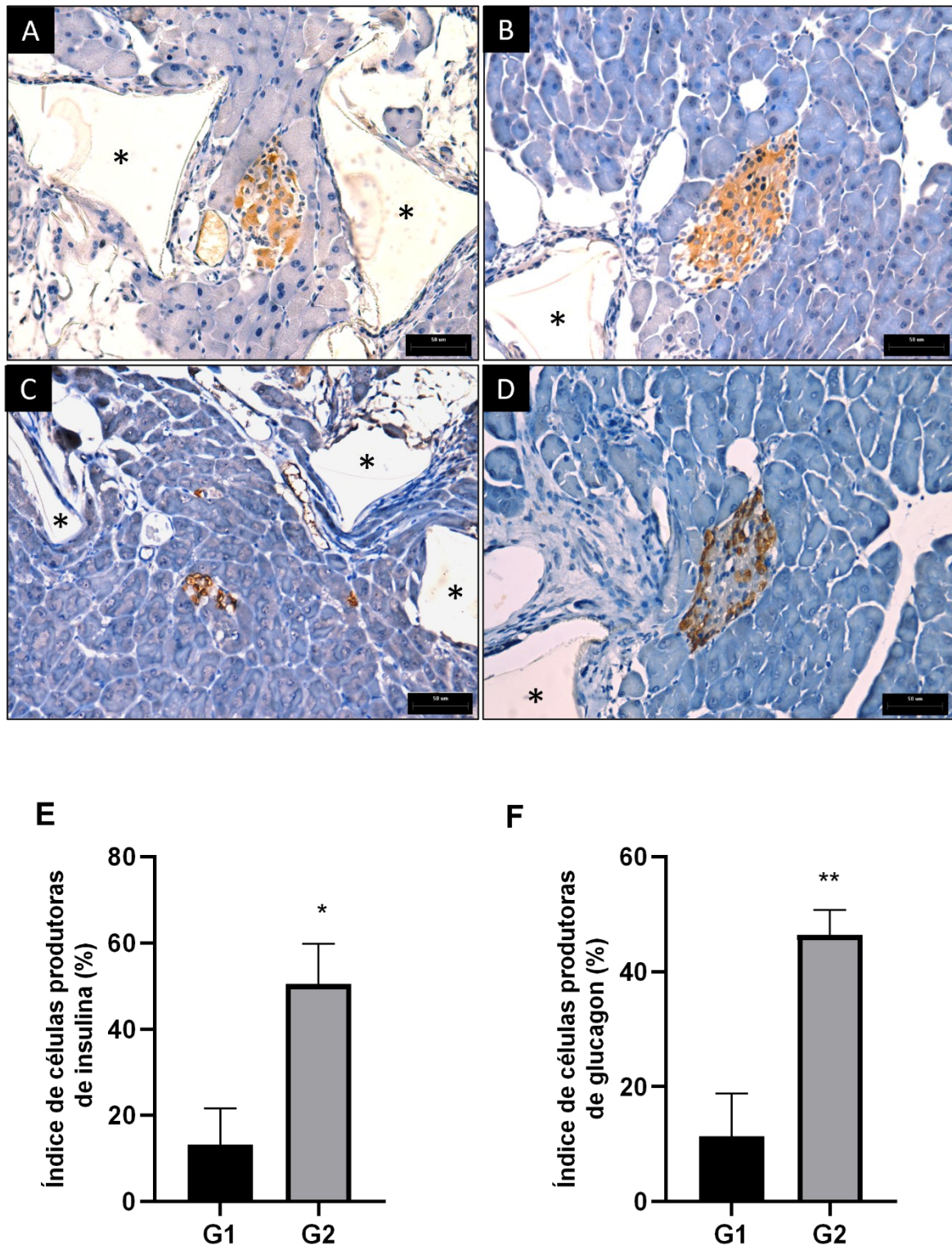


Figure 4. Endocrine components in neoformed tissue. Representative images of immunohistochemical staining showing insulin-producing cells in islets from group 2 (A) and group 3 (B), as well as glucagon-producing cells from group 1 (C) and group 2 (D). Index (%) of insulin-producing cells in group 2 compared to group 1 (E). Index (%) of glucagon-producing cells in group 2 compared to group 1 (F). N = 6. Bar = 50µm. Values are as mean ± SEM. Student's *t*-test *P < 0.05; **P < 0.01

To quantify proliferation in the pancreatic parenchyma within the implant, the number of KI-67-positive cells and PDX1-positive cells was evaluated through immunohistochemistry. Regarding KI-67-positive ductal cells, group G2 (Fig. 5 B) showed an increase in the number of positive cells (Fig. 5 E) (p value = 0.0351) compared to group G1 (Fig. 5 A). However, regarding KI-67-positive acinar cells, group G1 (Fig. 5 C) showed a significant increase (Fig. 5 F) (p value = 0.0004) in positive cells compared to group G2 (Fig. 5 D).

Regarding the count of PDX1-positive ductal cells, it was observed that the insulin-treated group (Fig. 6 B), G2, had a higher number of positive cells per field (Fig. 6 C) (p value = 0.0320) compared to the hyperglycemic group (Fig. 6 A).

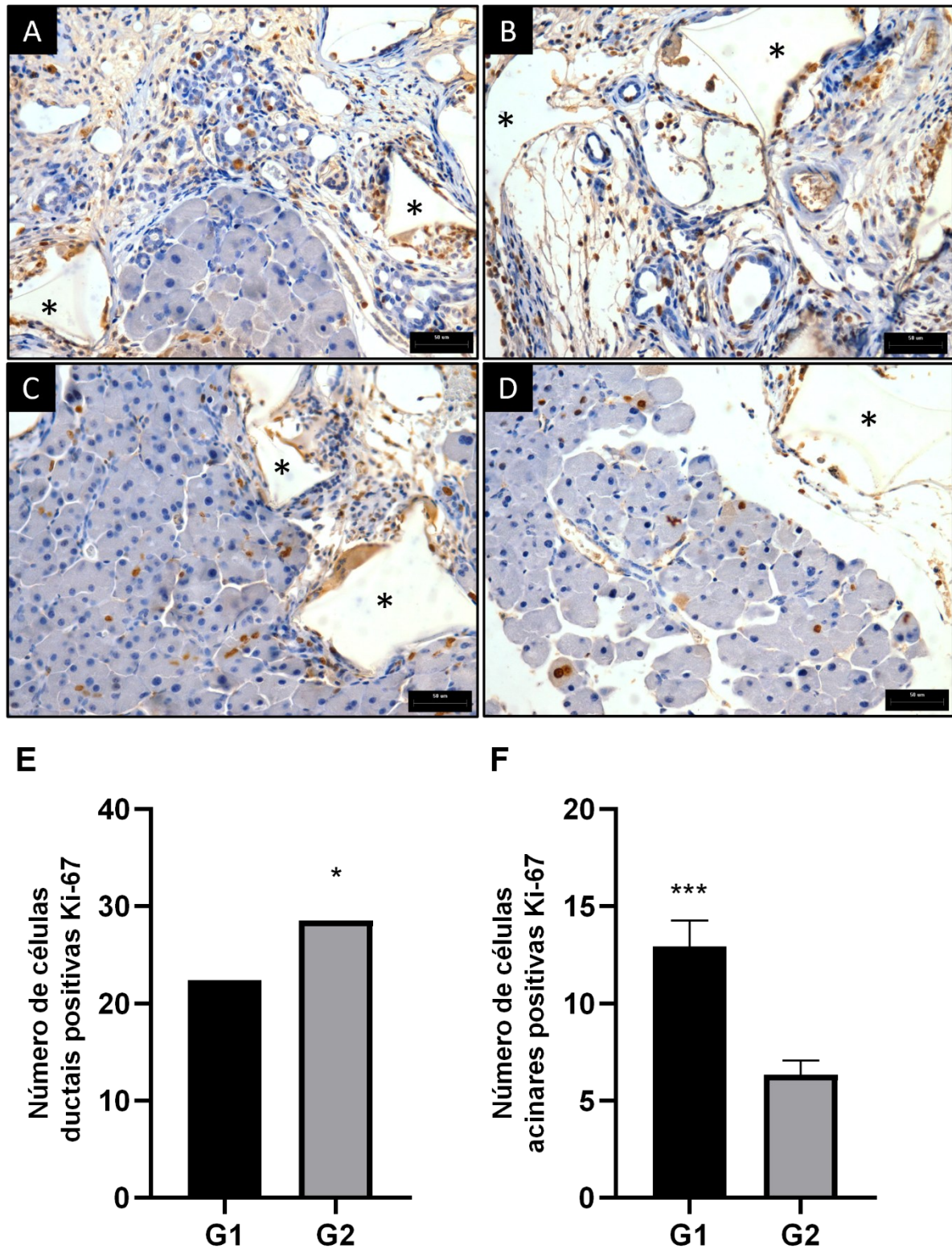


Figure 7=5. KI-67 marker in pancreatic tissue cells within the implant. Representative images of immunohistochemical staining showing Ki-67-positive ductal cells in group 1 (A) and group 2 (B), and Ki-67-positive acinar cells in group 1 (C) and group 2 (D). Number of Ki-67-positive ductal cells per field (E) and number of Ki-67-positive acinar cells per field (F). N = 5. Scale bar = 50 μ m. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Student's t-test and Mann-Whitney test. *P < 0.05; ***P < 0.001.

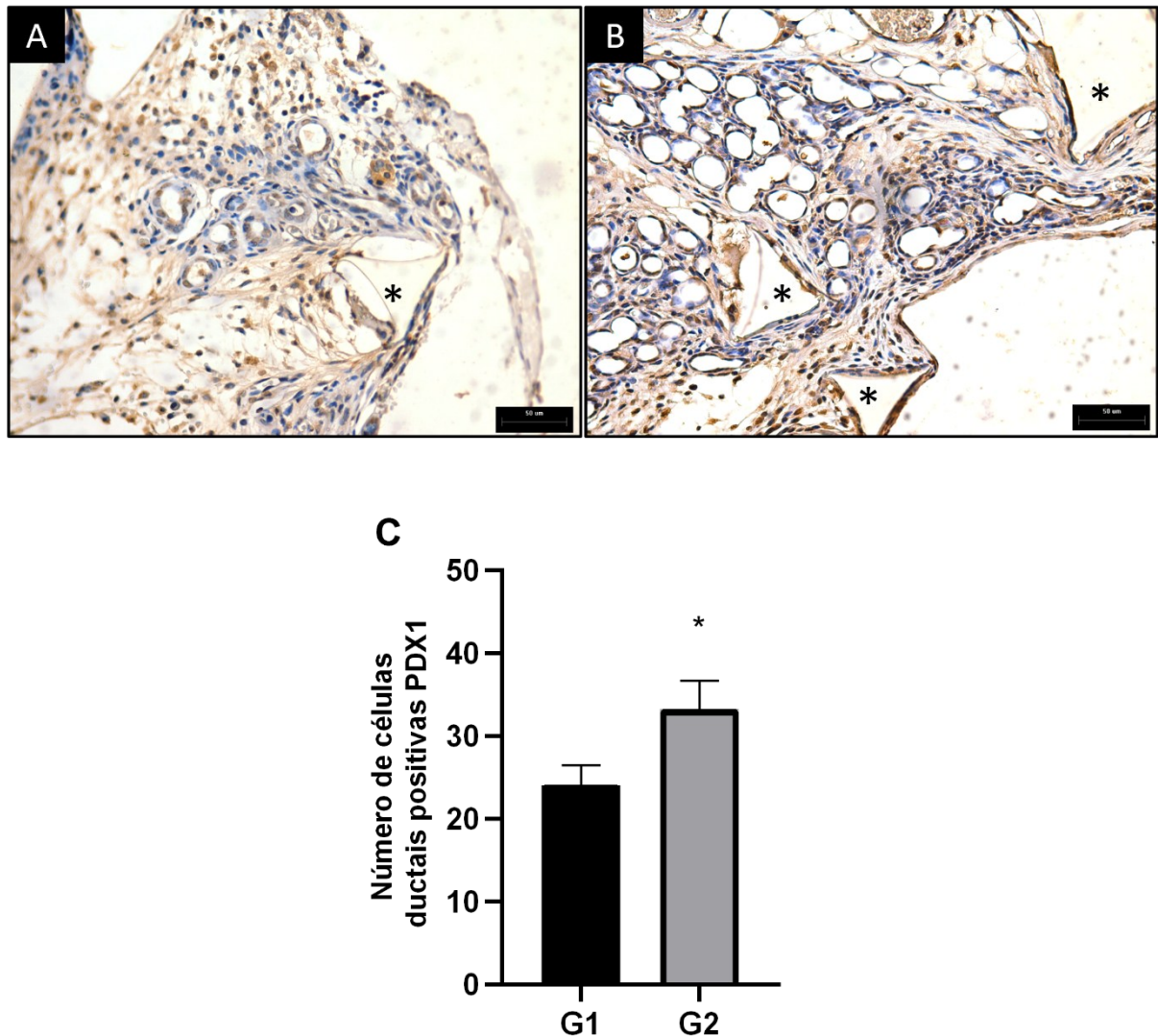


Figure 6. PDX1 positive cell within intra-implant pancreatic tissue. Representative images of immunohistochemical staining showing PDX1-positive ductal cells in group 1 (A) and group 2 (B). Number of PDX1-positive ductal cells per field (C). N = 5. Scale bar = 50 μm. Values are expressed as mean ± SEM. Student's t-test *P < 0.05.

Analysis of implant angiogenesis

The evaluation of vascular parameters in the neoformed pancreas was determined by morphometric analysis of H&E stained sections from groups 1 (Fig. 7 A) and 3 (Fig. 7 B). The data showed that the number of blood vessels was higher in group 2 (Fig. 7 C) (p-value = 0.0138) compared to the untreated group. This result disagrees with the analysis of intra-implant VEGF, which showed a reduction in the levels of this growth factor in the same group (Fig. 7 D) (p-value = 0.0364).

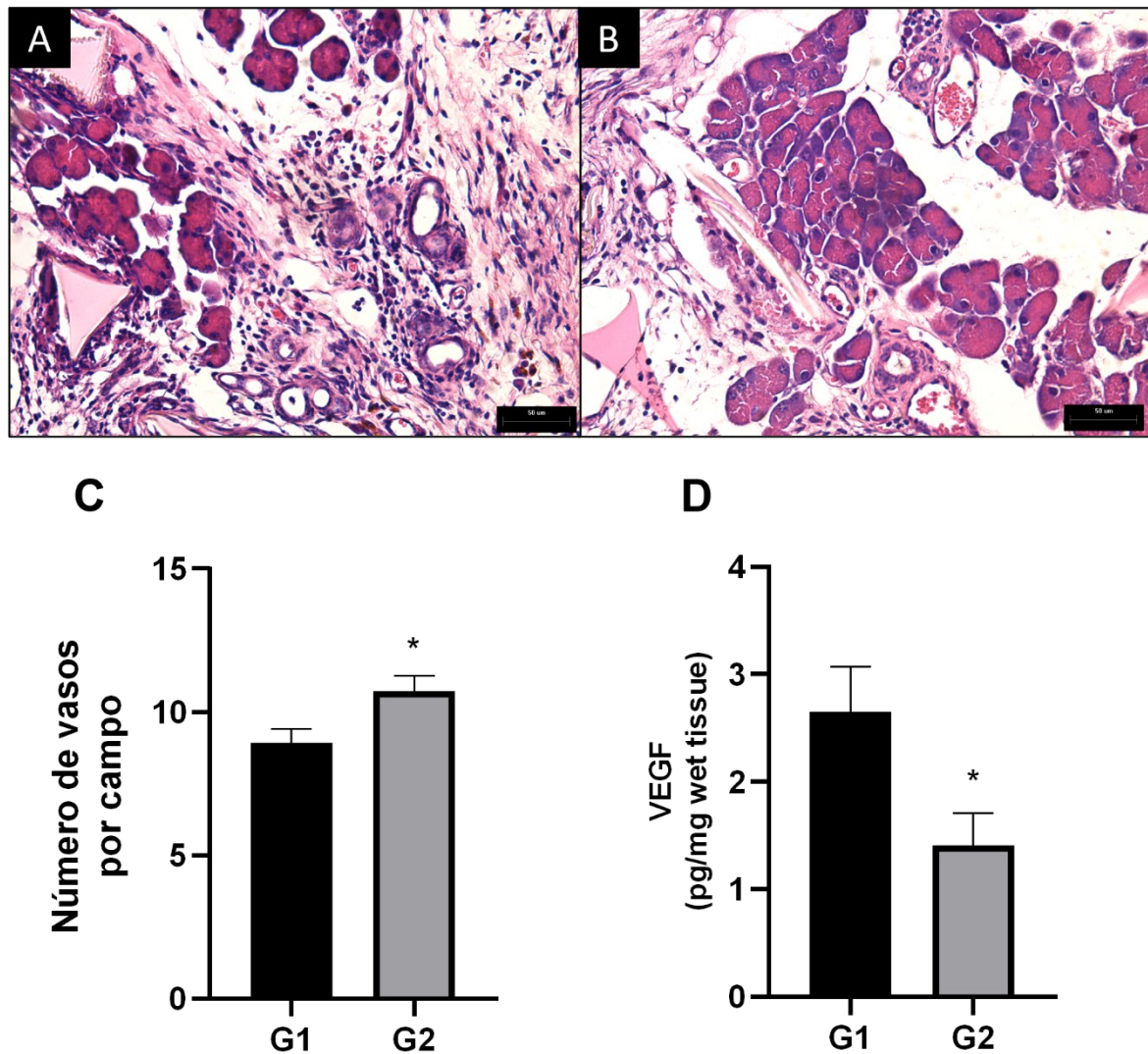


Figure 7. Analysis of vessel proliferation in the neoformed pancreas. Representative histological sections of the analysis of the number of vessels within the matrix of groups 1 (A) and 2 (B). Morphometric analysis of the vessels present in both groups (C). Vascular Endothelial Growth Factor levels in wet tissue (D). Values expressed as mean $\pm$ SEM. Student's t-test *P < 0.05

Analysis of inflammatory cytokines in the implant

Regarding inflammatory cytokines, ELISA analysis was performed for various markers and it was observed that the intra-implant concentration of TNF- α was significantly increased in group G2 (Fig. 8 A) (p value = 0.0449). However, the measurement of myeloperoxidase (MPO), an indirect indicator of neutrophil levels, did not show a significant reduction, although the insulin-treated group showed a 34% reduction in enzyme levels (Fig. 8 B) (p value = 0.2465).

As for the levels of the cytokine TGF- β , the data showed that the insulin-treated group (G2) had a significant increase in this marker within the implant (Fig. 8 C) (p value = 0.0497). A similar trend was observed in the levels of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) within the implant (Fig. 8 D), which significantly increased (p value = 0.0003), and in the levels of IL-10 (Fig. 8 E), which also showed an increase (p value = 0.0341).

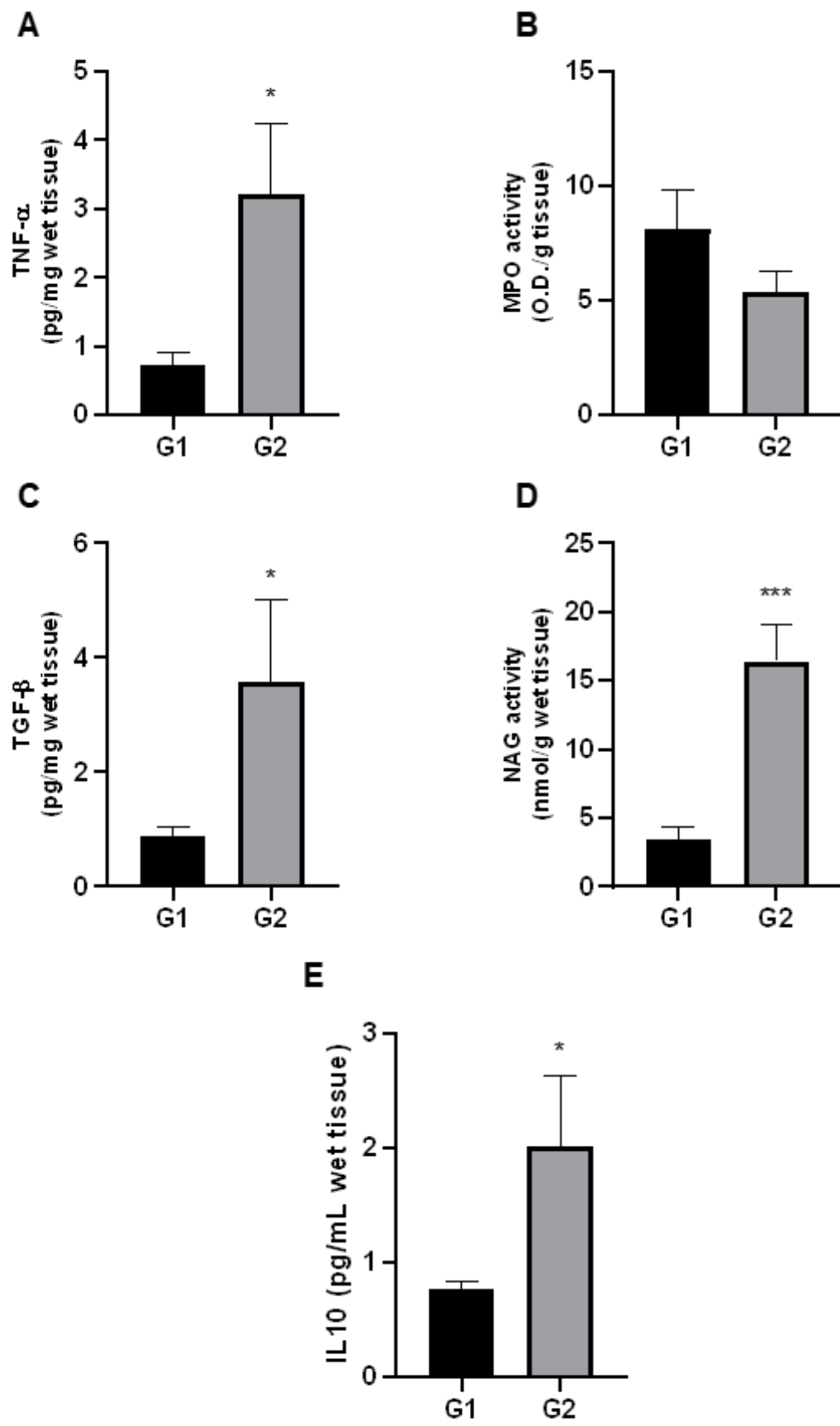


Figure 8. Inflammatory markers in newly formed pancreatic tissue. An increase in TNF- α levels (A) was observed in the insulin-treated group after the treatment period. MPO activity remained unchanged between groups (B). Both TGF- β (C), NAG (D), and the cytokine IL-10 (E) levels showed a significant increase in group G2. N = 8. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Student's t-test *P < 0.05; ***P < 0.001.

4.6 Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Proliferating Pancreatic Cells

To evaluate which adhesion molecules the proliferating cells in the matrix expressed, as well as to observe their behavior between groups, real-time PCR was performed. The results showed that both the expression of the epithelial adhesion marker E-CAD (Fig. 9 A) and the mesenchymal marker N-CAD (Fig. 9 B) equally decreased (p value = 0.0179) in the insulin-treated group (G2).

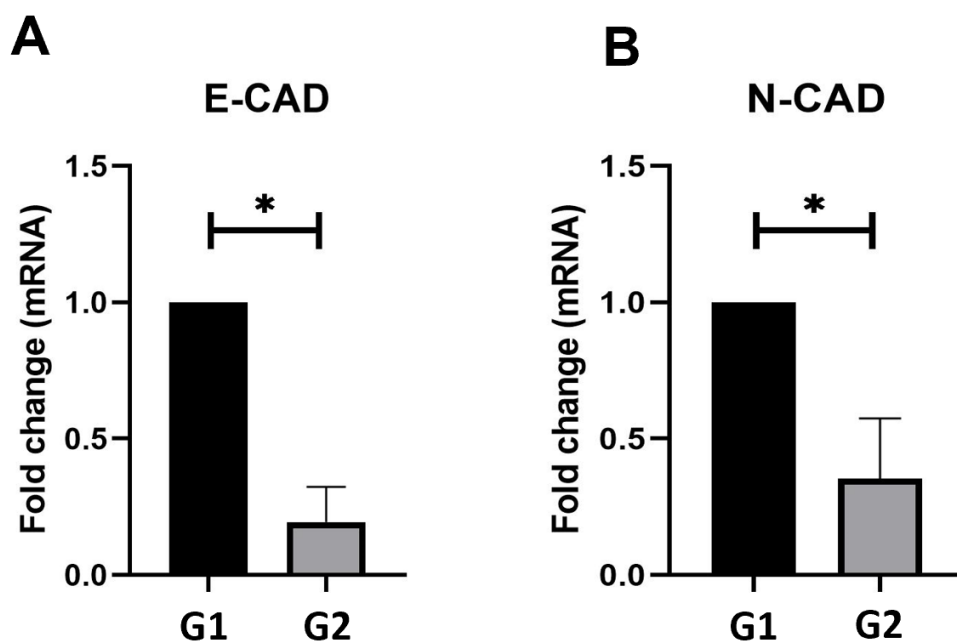


Figure 9. Expression of adhesion molecule genes in intra-implant pancreatic tissue. Both the levels of E-CAD (A) and N-CAD (B) expression showed a significant decrease in group 2. N = 5. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. N = 6; Student's t-test *P < 0.05.

Discussion

Various pancreatic disorders such as pancreatitis, pancreatic cancer, and diabetes mellitus itself are diseases that result in damage to the exocrine and endocrine compartments of the pancreas (Olesen, 2019; Jalal et al., 2019; Al-Hasani et al., 2013;

Server & Grapin-Botton, 2020). Study models have been developed to understand pancreatic regeneration, such as the recellularization of scaffolds, pancreatic duct ligation, partial pancreatectomy, or ablation by chemical toxins (Zhou & Melton, 2018). The development of these models is of great importance for understanding pancreatic regeneration and how pancreatic cells generate from pre-existing ones, but the mechanism of proliferation of these cells still needs to be well elucidated. Therefore, an essential study tool for this process is an *in vivo* model that mimics the conditions of the organism and does not require exogenous growth factors or other matrix components to induce the proliferation process that occurs in adult organisms.

It is known that pancreatic regeneration depends on several aspects, including the type of injury or method used to kill the pancreatic cells and the extent of the injury (Afelik & Rovira, 2017). In our study, we presented a model that, when implanted adjacent to the animal's native pancreas, can induce the growth of pancreatic tissue by triggering signaling pathways that activate proliferation mechanisms in the pancreas cells (Pereira et al., 2017). We focused on evaluating how the cells proliferated, migrated, and organized themselves to form a pancreas-like tissue within the matrix and what angiogenic and inflammatory aspects would be involved in this process in hyperglycemic (diabetic) and normoglycemic (insulin-treated diabetic) animals.

Considering the data on the animals' metabolism, only the group treated with insulin (G3) showed a weight recovery after the initial induction of diabetes mellitus, which may also be associated with the decrease in glucose levels in the same group and the return of these animals' bodies' ability to use glucose as an energy source. Although group 3 was treated daily, at the end of the experiment, some animals showed normoglycemia without the need for continued insulin administration. These results are in line with previous studies by the research group, in which the induction of pancreatic parenchyma proliferation in a synthetic matrix in the presence of human adipose stem cells in diabetic mice was able to reduce the animals' glycemic levels (Pereira et al., 2017). In another study, Sachs and colleagues (2020) showed that mice treated with insulin had improved glycemic levels and an increase in the number of insulin-positive cells.

Interestingly, the neoformed pancreatic tissue within the matrix developed adjacent to an extracellular matrix composed of dense connective tissue with inflammatory cells, blood vessels, and fibroblasts. Histological and morphometric analyses showed that in the implants of both groups (diabetic and diabetic+insulin) a well-structured pancreatic tissue was formed within the matrix, consisting of acinar areas, pancreatic ducts, and endocrine components, acinar areas, pancreatic ducts and endocrine components, by immunohistochemical staining for cells positive for insulin and glucagon. In general, the area of intra-implant pancreatic tissue was more extensive in the insulin-treated group throughout the experiment, which is in line with the results found by Hegyi et al. agreement with the results found by Hegyi et al. (2012), who demonstrated that the regeneration of exocrine components of pancreatic tissue can be restored after

administration of exogenous insulin. Wang et al. (2014) suggest that hyperglycemia is capable of generating a state of glycototoxicity that leads to the significant loss of insulin-positive islets and β -cells due to an increase in the levels of apoptosis and dedifferentiation of these cells.

Immunohistochemistry was initially performed to mark insulin-producing cells and glucagon-producing cells. Both implanted diabetic groups showed positive cells for these markers, although the insulin-treated group showed a significant increase in the presence of these cells in islets formed inside the implant. In addition, several isolated cells or cells morphologically similar to acini were also positive for both markers. So, in order to investigate this issue, immunohistochemistry was performed for KI-67, a nuclear protein associated with cell proliferation and ribosomal RNA transcription, and for the gene PDX1 (Pancreatic and Duodenal Homeobox 1), which encodes a homonymous protein considered a master regulator in pancreatic development. Besides that, PDX1 guides the differentiation of pancreatic progenitor cells into different types of pancreatic cells and is necessary for the maturation and preservation of the identity of islet β -cells (Ebrahim et al., 2022). The results showed that the insulin-treated group (G2) had a higher number of KI-67-positive ductal cells compared to the hyperglycemic group (G1). A similar result was observed in the immunohistochemistry performed for PDX1. Studies have shown that acinar cells were activated after treatment with Streptozotocin + PDL, expressing multipotent embryonic factors and becoming capable of differentiating into ductal or endocrine cells, including mature β -cells Pdx1HI, Nkx6.1+, and MafA+ (Pan et al., 2013). Concerning acinar cells, Rovira et al. (2010) observed that these cells could acquire a progenitor cell state in response to injury, showing reactivation of PDX1 signaling and the WNT pathway, which is usually active in embryonic pancreatic progenitor cells (Li et al., 2010). Therefore, it is possible that the PDX1-positive cells are progenitor cells or indicate mature β -cells, as PDX1 staining was also observed in intra-implant islets of Langerhans.

Regarding angiogenic analysis, both groups showed the formation of well-developed blood vessels in the middle of the fibrovascular tissue and the neoformed pancreatic tissue. However, in morphometric analysis, the insulin-treated group showed a significant increase in the number of vessels. The process of intra-implant angiogenesis is essential not only for the development of pancreatic tissue but also for the maintenance of the newly formed structures (Cao & Wang, 2014). However, the immunobiochemical data showed that VEGF levels were reduced in group 3, indicating that the angiogenesis process was not as active in this group, probably because the tissue had sufficient blood vessels for its nutrition.

The presence of inflammatory mediators is capable of causing an increase in the expression of NGN3, an essential marker for the differentiation of islet progenitor cells, leading to the proliferation of β -cells, as seen by Xiao and collaborators (2013). Other studies have shown that pro-inflammatory cytokines such as TNF α , IL-1 β , and IFN γ can activate endocrine reprogramming in ductal cells of the exocrine compartment

(Valdez et al., 2016). Interestingly, TNF- α levels increased in the insulin-treated group (G3) compared to the untreated group (G2), but there was no increase in myeloperoxidase levels, an indirect marker of neutrophil levels. However, there was no increase in the levels of the enzyme Myeloperoxidase, an indirect marker of neutrophil levels, indicating that the inflammatory process was changing to a chronic profile, which can be confirmed by the increase in IL-10, an anti-inflammatory cytokine, in group G2.

At the same time, analysis of intra-implant TGF- β showed an increase in its levels in the insulin-treated group. According to Lee et al. (2021), TGF- β plays an essential role in the development of the endocrine pancreas, such as β -cell proliferation, differentiation, and apoptosis. In addition, previous in vivo studies have reported the effect of cytokines from chronic inflammation on the stimulation of ductal cells (Gu et al., 1997). A similar result was found when analyzing the activity of the NAG enzyme, an indirect marker of macrophage levels. As seen by our research group previously, macrophages appear to be actively involved in promoting a suitable microenvironment for the maintenance of pancreatic tissue (Pereira et al., 2017). Xiao et al. (2014) observed that macrophages recruited through an inflammatory process can stimulate the proliferation of β cells in the pancreas by inducing the expression of SMAD7 in these cells.

Results related to the expression of the genes E-CAD and N-CAD indicated a reduction of both genes in the insulin-treated group (G2). Cadherin molecules are involved in regulating cell-cell adhesion, as well as in modulating crucial morphogenetic and differentiation processes during development. E-cadherin is important for maintaining the epithelial phenotype and regulating tissue homeostasis, modulating various signaling pathways (Van & Berx, 2008). In contrast, N-cadherin is more prevalent in non-epithelial tissues and is expressed in neural cells, endothelial cells, stromal cells, and osteoblasts, and can serve as an indicator of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process (Wang et al., 2016). It has been observed that epithelial-mesenchymal transition is essential for pancreas development and the formation of primitive islets of Langerhans (Cole et al., 2009). Furthermore, in vivo studies demonstrate that inflammation induces epithelial-mesenchymal transition (EMT) and upregulates the endocrine progenitor marker NGN3 in pancreatic cells in mice (Valdez et al., 2016). Thus, we associate the presence of both markers as indicative of the ability of pancreatic cells to proliferate, migrate, and re-adhere to newly formed cells or the matrix.

The findings of this article show that the synthetic polyether-polyurethane matrix, when implanted next to the pancreas, was able to induce cell proliferation, migration, and differentiation, developing intra-implant pancreatic tissue capable of stimulating the production of hormones necessary to re-establish homeostasis during diabetes mellitus. In addition, the normalization of glycemic levels in diabetic animals played a fundamental role in differentiating cells from the exocrine and endocrine compartments

of the pancreas, allowing an increase in the proliferative response of the pancreas in these normoglycemic animals.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.