

Teresa de Jesús Oviedo Socarrás

**INFLUÊNCIA DO DIABETES TIPO 1 NO REPARO DE LESÕES
PRODUZIDAS POR IMPLANTES INTRAPERITONEAIS E
SUBCUTÂNEOS EM RATOS WISTAR**

**Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Patologia
Belo Horizonte-MG
2014**

Teresa de Jesús Oviedo Socarrás

**INFLUÊNCIA DO DIABETES TIPO 1 NO REPARO DE LESÕES
PRODUZIDAS POR IMPLANTES INTRAPERITONEAIS E
SUBCUTÂNEOS EM RATOS WISTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia – área de concentração em Patologia Geral.

Orientador: Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos
Co-orientadoras: Prof^a. Dra. Sílvia Passos Andrade
Prof^a. Dra. Paula Peixoto Campos

**Belo Horizonte
Agosto 2014**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA TERESA DE JESUS OVIEDO SOCARRAS

Realizou-se, no dia 01 de agosto de 2014, às 13:30 horas, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) Bloco K3-163, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *INFLUÊNCIA DO DIABETES TIPO 1 NO REPARO DE LESÕES INTRAPERITONEAIS E SUBCUTÂNEAS EM RATOS WISTAR*, apresentada por TERESA DE JESUS OVIEDO SOCARRAS, número de registro 2010725969, graduada no curso de MEDICINA VETERINARIA E ZOOTECNIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Anilton Cesar Vasconcelos - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Milene Alvarenga Rachid (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Ricardo Gonçalves (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Marlene Isabel Vargas Vitoria (Universidade Federal de Viçosa), Prof(a). Paulo Eduardo Alencar de Souza (Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais).

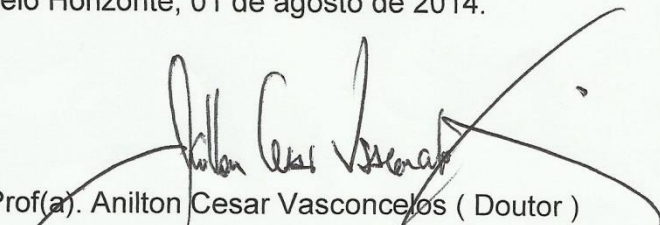
A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada


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

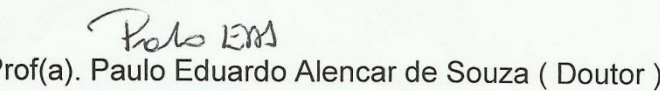
Belo Horizonte, 01 de agosto de 2014.


Prof(a). Anilton Cesar Vasconcelos (Doutor)


Prof(a). Milene Alvarenga Rachid (Doutora)


Prof(a). Ricardo Gonçalves (Doutor)


Prof(a). Marlene Isabel Vargas Vitoria (Doutora)


Prof(a). Paulo Eduardo Alencar de Souza (Doutor)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Apoptose do Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, tendo a colaboração dos Laboratórios de Angiogênese do Departamento de Fisiologia e Biofísica e do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Departamento de Parasitologia, ambos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Contou com o apoio financeiro da Universidade de Córdoba-Colômbia, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A Deus, digno de receber toda a glória, a honra e o louvor

*A meu esposo, Misael.
A pessoa certa que Deus colocou na minha vida para juntos percorrermos muitos
caminhos. A ele que me faz muito feliz, toda minha gratidão!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais uma vez ter nos trazido a uma terra que mana leite e mel, a Ele toda glória, honra e louvor.

À minha mãe, mulher que tem sido exemplo de vida, amor, bondade, fortaleza em momentos difíceis e luta permanente pelos nossos sonhos, abrindo mão dos seus próprios. Obrigada pela sábia instrução para guiar minha vida. Obrigada por sempre acreditar em mim.

Agradeço ao meu esposo Misael e aos meus queridos filhos Sarai e Sebastian, por deixarem, com alegria, tudo para trás no nosso país, priorizando o permanecermos como família. Agradeço por suportar com paciência minha ausência no lar, minhas longas jornadas de trabalho, meu cansaço e meu estresse. Dou graças a Deus porque sustentou vocês em todo tempo e direcionou-lhes pelo bom caminho e pelas veredas antigas. Esta vitória também é de vocês. Eu os amo muito!

Agradeço aos meus irmãos Daira, Mônica e Elias. Obrigada a cada um por assumir de acordo com as possibilidades o cuidado da nossa mãe durante minha ausência, coisa que também era minha responsabilidade. Obrigada pelo apoio em tudo o que precisei enquanto estive longe de casa. Amo vocês!

Ao Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos, por me receber como orientanda em seu laboratório, pela oportunidade que me ofereceu de crescer no âmbito acadêmico. Obrigada pelo apoio, carinho e ensinamentos.

Meus agradecimentos à Prof^a Sílvia Passos Andrade, por me adotar como uma orientanda, pelo carinho, confiança, direcionamento, dedicação, disposição e contribuição em todas as etapas deste trabalho.

A minha co-orientadora, Prof^a Paula Peixoto Campos, por suas importantes contribuições nesta jornada, pelo exemplo de profissionalismo, pela ajuda na realização de experimentos e por todas as conversas amigas.

Aos meus amados irmãos da Igreja Presbiteriana da Pampulha (IPP), sob o pastoreio do Reverendo Giovan Casteluber. Faltam palavras para descrever o quão grata sou a Deus por ter-nos colocado nesse lugar e pela vida de cada um de vocês. É impossível colocar mais nomes além do Reverendo neste parágrafo porque com certeza, esqueceríamos alguns e todos vocês foram importantes. Vocês nos acolheram como família literalmente, foram nossos pais e irmãos de verdade. Durante estes anos, temos sido abençoados com o ensino fiel da palavra de Deus, com o sustento permanente em oração por nós e por nossos queridos na Colômbia; obrigada pelo amor, amizade e convívio. Vocês fazem parte deste importante momento da minha vida. Serei eternamente grata a Deus pela vida de vocês e por este tempo compartilhado com a IPP. Deus os abençoe.

Aos nossos amados amigos o Prof. Germán Bohórquez Mahecha e Luz Helena de Bohórquez, pessoas que nos receberam no Brasil com muito amor e disposição para nos ajudar em tudo quanto precisávamos, e nos ofereceram sua amizade sincera, a eles a minha gratidão, afeto e apreço.

À minha querida amiga Núbia, por compartilhar comigo o temor do SENHOR, por nossas conversas edificantes, por escutar-me nos momentos difíceis, pelo carinho, e por compartilhar comigo os seus valiosos conhecimentos. Já estou sentindo falta da nossa convivência diária.

A minha amiga Irma Ximena, obrigada pela linda amizade que cresceu e se fortaleceu durante o nosso convívio longe da nossa amada pátria.

À Jéssica Coelho, Heloísa Mendes, Bárbara Verçosa, Tatiana Carvalho, Bruno Costa, Luciana Xavier, pela ajuda de índole acadêmica sempre que precisei, e muito mais pela amizade, companheirismo, agradável convívio e momentos de descontração no laboratório.

Aos amigos Juliana Merlin Cenedezi, Luciana Lavall, Lucas Amorim, Ramon Fazzolo e Pedro Carvalho, obrigada pela amizade e pela participação como estudantes de iniciação científica.

Aos meus amigos Suzane, Pollyana e Celso, obrigada pela valiosa ajuda durante meus experimentos, mais algo que não tem preço e o respeito, carinho, amizade e os momentos de descontração e risos com vocês.

À professora Luciana Moro, pelos valiosos ensinamentos de biossegurança no laboratório, pela amizade, conversas agradáveis e risos.

À professora Milene Rachid, pelo direcionamento e sugestões que enriqueceram este estudo; por todo exemplo de profissionalismo, competência e pela amizade.

À professora Mônica Alves Neves Diniz Ferreira, pela linda amizade que surgiu durante minha caminhada no ICB; pelos conhecimentos compartilhados e conversas amigas.

À Olinda, Soraia, Mirna, e Vânia, pela ajuda nos cortes e colorações histológicas, pela disposição para resolver minhas dúvidas nesta área em que dominam muito bem, e principalmente pela amizade.

Aos funcionários do Biotério e, mais do que isso, amigos Sílvio e Reginaldo, que cuidaram dos animais e estiveram à disposição para ajudar-me sempre que necessário.

Ao Daniel Menezes Souza, pelos ensinamentos e apoio para a realização do rtPCR e ao Prof. Ricardo Toshio Fujiwara, por gentilmente disponibilizar o seu laboratório para realização desta técnica molecular.

Aos docentes, coordenadores, secretárias e colegas do Curso de Pós-Graduação em Patologia Geral, pelos momentos de convivência e pelos ensinamentos compartilhados.

À CAPES, CNPq, FAPEMIG e Universidade de Córdoba (Colômbia), pelo suporte financeiro para o desenvolvimento do projeto.

A todos que, de alguma maneira, colaboraram direta ou indiretamente para que eu pudesse alcançar a meta proposta.

*Uma coisa peço ao SENHOR, e a buscarei:
que eu possa morar na casa do SENHOR todos os dias da minha vida,
para contemplar a beleza do SENHOR e meditar no seu templo
(Sl. 27:4).*

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	
RESUMO	
ABSTRACT.....	
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DO DIABETES <i>MELLITUS</i>	19
1.1.1 Patogenia do diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	21
1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS EM DIABETES TIPO 1.....	22
1.2.1 Modelos espontâneos de diabetes tipo 1	23
1.2.1.1 <i>Camundongos NOD</i>	23
1.2.1.2 <i>Ratos BB</i>	24
1.2.2 Modelos de diabetes tipo 1 induzido quimicamente	25
1.2.2.1 <i>Aloxana</i>	26
1.2.2.2 <i>Estreptozotocina</i>	28
1.3 ALGUMAS OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA DIABETE <i>MELLITUS</i> TIPO 1 E PERSPECTIVAS FUTURAS	31
1.3.1 Administração de insulina	31
1.3.2 Transplante de pâncreas	31
1.3.3 Transplante de ilhotas pancreáticas	33
1.3.4 Terapias a partir de células-tronco mesenquimais	34
1.3.5 Biomateriais no transplante de ilhotas pancreáticas	34
1.3.5.1 <i>Uso de biomateriais em pesquisa</i>	35
1.4 IMPORTANCIA DOS MODELOS PARA ESTUDO DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS INTERNAS.....	37
1.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE CICATRIZAÇÃO	38
1.5.1 Processo normal da cicatrização de feridas	39
1.5.1.1 <i>Inflamação e angiogênese como eventos importantes no processo de reparo</i>	41
1.6 Cicatrização de feridas em diabéticos	44
2 OBJETIVOS	47
2.1 Objetivo geral	47
2.2 Objetivos específicos	47
3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
CAPÍTULO I	
Diabetes alters inflammation, angiogenesis, and fibrogenesis in intraperitoneal implants in rats	62
Abstract	62
Introduction	62
Material and methods	63
<i>Animals</i>	63
<i>Induction of diabetes mellitus</i>	63
<i>Preparation of sponge discs and implantation</i>	63
<i>Histological staining, immunohistochemistry, and morphometric analysis</i>	63
<i>Tissue extraction and measurement of hemoglobin (Hb)</i>	63
<i>Determination of myeloperoxidase (MPO) activity</i>	64

<i>Determination of N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) activity</i>	65
<i>Measurement of VEGF, TNF-α, MCP-1 and TGF-β1 content of the sponge implants</i>	65
Statistical analysis	66
Results	66
<i>Gross appearance and histological examination of sponge implants</i>	67
<i>Measurement of angiogenesis</i>	67
<i>Inflammation in sponge implants</i>	67
<i>Measurement of TGFβ1 levels and total collagen deposition</i>	67
Discussion	67
Acknowledgments	68
References	68
CAPÍTULO II	
Foreign Body Response to Subcutaneous Implants in Diabetic Rats	70
Abstract	71
Introduction	72
Materials and Methods	73
Ethics Statement	73
Animals	73
Induction of Diabetes <i>Mellitus</i>	74
Preparation of sponge discs and implantation	74
Tissue extraction and hemoglobin (Hb) measurement	75
Determination of myeloperoxidase (MPO) activity	75
Determination of N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) activity	76
Measurement of VEGF, TNF-α, MCP-1, and TGF- β1 content of the sponge implants	76
Histological staining, immunohistochemistry, and morphometric analysis	77
Statistics	78
Results	79
Histological examination of sponge implants	79
Measurement of angiogenesis	80
Inflammation in sponge implants	80
Measurement of TGFβ1 levels and total collagen deposition	80
Apoptosis in sponge implants	81
Histological examination of the implant fibrous capsule and foreign body giant cells	81
Discussion	81
Acknowledgements	84
Competing Interests	84
References	85
Titles and Legends to Figures	88
CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
ANEXO A.....	100
ANEXO B.....	101
ANEXO C.....	102

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II

Table 1. Blood glucose level and animal weight in non-diabetic and diabetic rats during the study	90
---	----

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Patofisiologia do diabetes tipo 1	22
Figura 2. Estrutura de: A) glicose B) Estreptozotocina	28
Figura 3. Principais vias de citotoxicidade de STZ	30
Figura 4. Progressão da angiogênese induzida pela inflamação.....	43

CAPÍTULO I

Figure 1. Glycemic levels and body weight of non-diabetic and diabetic animals	64
Figure 2. Representative photograph of intraperitoneal implant in situ in rat and wet weight values of implants from diabetic and non-diabetic animals removed 10 days post-implantation	64
Figure 3. Representative histological sections (5 µm, stained with H&E) of fibrovascular tissue in 10-day old implants from non-diabetic and diabetic rats	64
Figure 4. Representative histological sections and analysis of wall thickness of 10-day old implants from non-diabetic and diabetic rats (H&E staining)	65
Figure 5. Hemoglobin content and VEGF levels in 10-day old implants from non-diabetic and diabetic rats	65
Figure 6. Vascularization in 10-day old implants of non-diabetic and diabetic rats. CD31-immunostained sections. Morphometric analysis showed decreased number of vessels in implants from diabetic compared with non-diabetic rats	66
Figure 7. Markers of inflammation in 10-day old implants from non-diabetic and diabetic rats	66
Figure 8. Markers of fibrogenesis in 10-day old implants from non-diabetic and diabetic rats	67

CAPÍTULO II

Figure 1. Histological analysis of 10-day old implants from non-diabetic and diabetic rats	91
Figure 2. Vascularization in 10-day old implants from non-diabetic and diabetic rats	92
Figure 3. Markers of inflammation in 10-day old implants from non-diabetic and diabetic rats	93
Figure 4. Markers of fibrogenesis in 10-day old implants from non-diabetic and diabetic rats	94
Figure 5. Pattern of apoptosis in 10-day old implants from non-diabetic and diabetic rats. Apoptotic	95
Figure 6. Histological characteristics of implant fibrous capsule	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BB	<i>Biobreading</i>
CAAs	Células apresentadoras de antígenos
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD31	<i>Cluster of differentiation 31</i>
CEBIO	Centro de Bioterismo
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CYP	Citocromo P450
DAB	Diaminobenzidina
DCs	Células dendríticas
DIP	Diabético intraperitoneal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Diabético subcutâneo
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais
Fas	CD95/Apo 1, proteína de transmembrana tipo II que pertence à família TNF
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GLUT1	<i>Glucose transporter 1</i>
GLUT2	<i>Glucose transporter 2</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
Hb	Hemoglobina
IFN- γ	Interferon gama
IHC	Imunoistoquímica
IL-1	Interleucina – 1
IL-10	Interleucina – 10
IL-8	Interleucina – 8
IPTR	<i>International Pancreas Transplant Registry</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDA	Malonaldeído

MEC	Matriz extracelular
MHC	Complexo Maior de histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinases de matiz
MPO	Mieloperoxidase
NAD ⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (oxidado)
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (reduzido)
NAG	N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity
NIP	Normal intraperitoneal
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
NOD	<i>Non Obese Diabetic</i>
NSC	Normal subcutâneo
OD	<i>Optical Density</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGF	Fator derivado de plaquetas
ROS	Espécies reativas do oxigênio
rpm	Revoluções por minuto
SEM	<i>Standard error of mean</i>
STZ	Estreptozotocina
TGF-α	Fator de crescimento transformante alfa
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

A alta prevalência do diabetes e o enorme potencial terapêutico dos implantes biomédicos para reparar e/ou substituir tecidos biológicos justificam investigar a influência da hiperglicemia na resposta tissular aos implantes sintéticos. Neste estudo, investigou-se o efeito do diabetes tipo 1 induzido quimicamente, em componentes do tecido fibrovascular (inflamação, angiogênese, fibrogênese e apoptose) em implantes subcutâneos e intraperitoneais de polieter-poliuretano em ratos. A angiogênese, determinada pelo número de vasos no tecido fibrovascular foi menor em implantes tanto intraperitoneais quanto subcutâneos de animais diabéticos. O nível de VEGF (citocina pró-angiogênica) não diferiu nos implantes subcutâneos de ambos os grupos, mas aumentou em implantes intraperitoneais de animais diabéticos quando comparados com não diabéticos. Os marcadores de fibrogênese (espessura da cápsula fibrosa, colágeno total e níveis de TGF- β 1) foram cerca de 2 vezes maior em implantes subcutâneos de animais não diabéticos que nos diabéticos. Entretanto tais marcadores não mostraram diferenças entre os implantes intraperitoneais de diabéticos e não diabéticos. Alguns parâmetros inflamatórios como a atividade da N-acetylglucosaminidase (NAG) e os níveis da proteína quimioatrativa para monócitos-1 (MCP-1) e do TNF- α foram mais elevados nos implantes intraperitoneais de animais diabéticos que nos não diabéticos, mas não houve diferença na acumulação de neutrófilos, como determinado pela atividade da mieloperoxidase (MPO) nos implantes intraperitoneais. Já nos implantes subcutâneos, MPO, TNF- α , MCP-1, índice de mastócitos e apoptose estavam aumentados, enquanto a atividade de macrófagos e o número de células gigantes ficaram significativamente menores no grupo diabético. Fica evidente que o padrão da reação tipo corpo estranho à matriz sintética de implantes de polieter-poliuretano difere entre ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos e sofre também a influencia do sitio de implantação. Estes achados podem ser relevantes no entendimento da interação/integração entre biomaterial e tecido no estado diabético.

ABSTRACT

The high prevalence of diabetes and the enormous therapeutic potential of biomedical implants to repair and/or replace biological tissues justify further investigation to determine the influence of hyperglycemia in tissue response to synthetic implants. This study investigated the effect of chemically induced type 1 diabetes in components of fibrovascular tissue (inflammation, angiogenesis, fibrogenesis and apoptosis) in subcutaneous and intraperitoneal implants of polyether polyurethane in rats. Angiogenesis, as determined by the number of vessels in fibrovascular tissue, was lower in both intraperitoneal and subcutaneous implants of diabetic animals. The level of VEGF (pro-angiogenic cytokine) did not differ in the subcutaneous implants of both groups but increased in intraperitoneal implants of diabetic animals when compared to non diabetics. Markers of fibrogenesis (fibrous capsule thickness, total collagen and TGF- β 1 levels) were 2-fold higher in subcutaneous implants of non diabetic animals than in diabetics. However, these markers showed no differences between intraperitoneal implants in diabetics and non diabetics. Some inflammatory parameters such as the activity of N-acetylglucosaminidase (NAG) and the levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and TNF- α were higher in intraperitoneal implants in diabetic animals than in non diabetic, but there was no difference in the accumulation of neutrophils, as determined by myeloperoxidase (MPO) activity. In subcutaneous implants, MPO, TNF- α , MCP-1, mast cells and apoptosis) were increased, while the activity of macrophages and the number of giant cells were significantly lower in the diabetic group. It is evident that the pattern of foreign body reactions to synthetic matrix of polyether polyurethane implants differs between normoglycemic and hyperglycemic rats and also suffers the influence of the implantation site. These findings may be relevant in understanding the interaction/integration between biomaterial and tissue in the diabetic state.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DO DIABETES *MELLITUS*

Diabetes é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por desordens no metabolismo dos carboidratos que cursa com hiperglicemia. A longo prazo causa complicações macrovasculares, microvasculares e neuropáticas, com deficiências no processo de reparo, assim como, disfunção e falência de vários órgãos e estruturas, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (PIROLA *et al.*, 2010, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011). A incidência destas complicações aumenta com a idade do indivíduo afetado e com a duração da doença. De todas as complicações, as lesões do pé diabético são consideradas como uma das mais devastadoras e caras (CORNELL & DORSEY, 2012).

Uma estimativa da prevalência do diabetes em pessoas entre 20 e 79 anos estimou que no ano 2013 existissem 381,8 milhões de pessoas diabéticas no mundo, e que o número de afetados em 2035 aumentaria a 591,9 milhões. O Brasil tinha aproximadamente 11,9 milhões de diabéticos em 2013 se estimou 19,2 milhões no ano de 2035 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013).

O diabetes pode ser classificado em diabetes tipo 1, tipo 2, outros tipos e diabetes gestacional. O diabetes tipo 1 é subclassificado em tipo 1a, mediado imunologicamente, e tipo 1b, de origem idiopática. Caracteriza-se pela destruição das células β das ilhotas pancreáticas levando a uma drástica diminuição de insulina circulante, podendo chegar à ausência deste hormônio. É responsável por 10% dos

casos de diabetes relatados. O diabetes tipo 2 atinge indivíduos que apresentam resistência à insulina e representa 90% dos casos relatados. Embora a etiopatogenia não seja conhecida, sabe-se que a destruição autoimune das células β não ocorre neste tipo de diabetes. Outros tipos de diabetes envolvem defeitos genéticos na função da célula β , na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, diabetes induzida por medicamentos ou substâncias químicas, infecções, formas incomuns de diabetes imuno-mediada e diabetes associada com outras síndromes genéticas. Finalmente, o diabetes gestacional é definido como qualquer grau de intolerância à glicose com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011, SYED *et al.*, 2011).

Os modelos experimentais de diabetes tipo 1 foram desenvolvidos para testar terapias visando reduzir a glicemia independente de células β ; novas formulações de insulina (JEDERSTROM *et al.*, 2005; SHESHALA *et al.*, 2009), terapias de transplante de ilhotas, (QUARANTA *et al.*, 2014.) e para melhor estudar e compreender o mecanismo das complicações crônicas microvasculares nos rins, olhos, nervos, vasos e coração (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011), Também são utilizadas para estudar os efeitos da hiperglicemia crônica sobre as células e os mediadores relacionados com o processo de cicatrização ou ainda a interação dos tecidos com a recepção de implantes dado que indivíduos diabéticos são frequentemente candidatos a estes procedimentos (LAMERS *et al.*, 2011).

1.1.1 Patogenia do diabetes *mellitus* tipo 1

O diabetes tipo 1, insulino-dependente, é caracterizado pela destruição autoimune das células β produtoras de insulina no pâncreas, processo que é mediado por eventos sinérgicos entre macrófagos, linfócitos TCD4+ e linfócitos TCD8+ (KULMALA *et al.*, 2000). O processo de auto-imunidade inicia-se com a apresentação de antígenos específicos das células β pancreáticas pelos macrófagos e/ou células dendríticas, para os linfócitos TCD4+, em associação com as moléculas de histocompatibilidade (MHC) de classe II (SALMINEN *et al.*, 2004, RAHA *et al.*, 2009). A seguir, os macrófagos ativados secretam citocinas que recrutam leucócitos e induzem uma insulite gerando radicais livres tóxicos para as células β . Após o reconhecimento dos auto-antígenos ligados às moléculas MHC de classe I, os linfócitos TCD8+ realizam a destruição das células β por citólise através da liberação de perforinas e granzimas (ATKINSON & EISENBARTH 2001, EIZIRIK & MANDRUP-POULSEN, 2001) (Figura 1).

Além do envolvimento da autoimunidade, estudos mais recentes sugerem um modelo patogênico que inclui a morte celular por apoptose. Acredita-se que as células β expressam Fas em resposta ao ataque dos clones autoreativos de linfócitos. A insuficiência do pâncreas endócrino para controlar o metabolismo da glicose do organismo leva à perda de controle energético do organismo, à hiperglicemia grave e suas complicações metabólicas resultantes (NAKAYAMA *et al.*, 2002).

1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS EM DIABETES TIPO 1

Existem dois tipos de modelos experimentais para a pesquisa do diabetes *mellitus* tipo 1: diabetes *mellitus* espontâneo e diabetes *mellitus* induzido quimicamente.

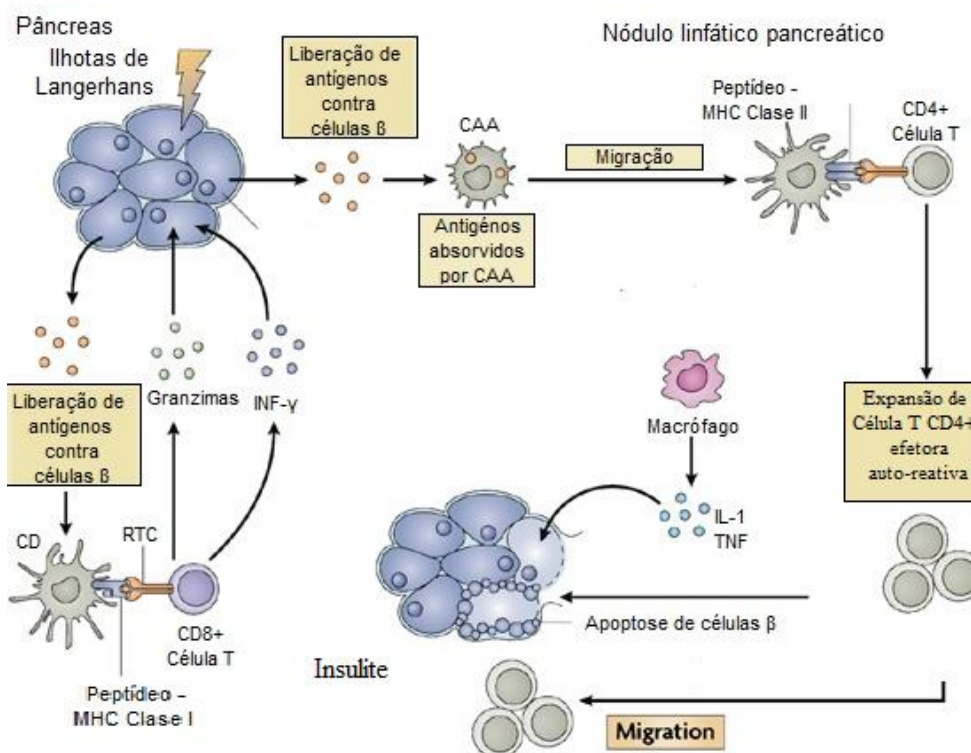


Figura 1. Patofisiologia do diabetes tipo 1. Antígenos de células β são apresentados por células apresentadoras de antígenos (CAAs) residentes no tecido a células T CD8+ em associação com MHC de classe I. As células T CD8+ causam dano às células β pela liberação de citocinas citotóxicas (como o Interferon-γ (IFN-γ) ou através da via perforina-granzima. Antígenos das células β são internalizados pelas células dendríticas (DCs) nas ilhotas pancreáticas e transportados para os linfonodos de drenagem, onde os antígenos são processados e apresentados às células T CD4+ em associação MHC da classe II. Nestes linfonodos, acontece expansão de baixa frequência de células T auto-reativas circulantes. Uma vez no pâncreas, as células T CD4+ ativadas recrutam e ativam células inflamatórias, causando insulite. A fase efetora de destruição das células β da ilhota é mediada por citocinas (principalmente interleucina - 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF), através da indução de sinalização pró - apoptótica seletiva das células β das ilhotas. (Modificado de RONCAROLO & BATTAGLIA, 2007).

1.2.1 Modelos espontâneos de diabetes tipo 1

Modelos animais que desenvolvem diabetes espontaneamente permitem a avaliação da doença sem a interferência dos efeitos secundários induzidos pelas substâncias químicas utilizadas para esta finalidade, tais como aloxano e estreptozotocina (STZ). Os defeitos imunológicos e a predisposição genética são os dois fatores patogênicos mais estudados nos modelos animais de doença autoimune espontânea como *Non-obese Diabetic* (NOD) e os ratos *Biobreading* (BB) (YANG & SANTAMARIA, 2006).

1.2.1.1 Camundongos NOD

É o modelo mais estudado da doença espontânea autoimune (DELOVITCH *et al.*, 1997). As razões para a preferência deste modelo incluem um genoma bem definido, maior quantidade de reagentes monoclonais para a análise de componentes do sistema imune e um custo razoavelmente baixo (ATKINSON & LEITER 1999). O modelo foi desenvolvido nos Laboratórios de Pesquisa Shionogi em Osaka, Japão, em 1974 a partir de uma fêmea de linhagem normoglicêmica que desenvolveu espontaneamente diabetes *mellitus*, depleção de insulina sérica e insulite. A reprodução seletiva da linhagem desta fêmea diabética produziu a linhagem "*Non-obese Diabetic*" - NOD (MAKINO *et al.*, 1980).

Semelhante ao que acontece em seres humanos, os camundongos NOD expressam transitoriamente auto-anticorpos anti-insulina no soro, antes da hiperglicemia (MARUYAMA *et al.*, 1988). Embora todos os camundongos NOD desenvolvam

insulite, que se inicia com aproximadamente 3-4 semanas de idade, esta nem sempre é seguida por diabetes. Nesta etapa, as ilhotas pancreáticas são infiltradas por linfócitos predominantemente CD4+ e CD8+, embora as células B e células NK, também estejam presentes (YOON & JUN, 2001). A insulite causa a destruição das células β , mas o diabetes se faz evidente quando 90% da insulina do pâncreas é perdida, o que acontece entre 10-14 semanas de idade, podendo chegar até 30 semanas (POZZILLI *et al.*, 1993; HANAFUSA *et al.*, 1994).

1.2.1.2 Ratos BB

Foram originados no Laboratório BioBreeding de Ottawa (Canada) a partir de ratos Wistar *outbred*. Em 1974 foi identificada pela primeira vez diabetes autoimune espontânea em uma colônia e levou à criação de duas colônias fundadoras da qual todas as existentes tem derivado, uma *inbred* (BBDP/Wor) e uma *outbred* (BBdp) (MORDES *et al.*, 2004).

Os ratos BB usualmente desenvolvem diabetes após a puberdade (90% com 8-16 semanas de idade), sendo que a incidência é igual em machos e fêmeas. O fenótipo diabético é muito intenso e requer administração de insulina para a sobrevivência dos animais. Embora os animais apresentem insulite com presença de células T, células B, macrófagos e células NK, os animais são linfopênicos com diminuição de células T CD4+ e ausência quase total de células T CD8+. Este aspecto é considerado uma desvantagem no uso de ratos BB como modelo da diabetes do tipo 1, porquanto a linfopenia não é uma característica da doença em seres humanos (MORDES *et al.*, 2004).

Ratos BB já foram usados em estudos de neuropatia diabética (ZHANG *et al.*, 2007), segundo MORDES *et al.* (2004) o modelo de diabetes com ratos BB é indicado para indução da tolerância ao transplante de ilhotas; por outro lado WALLIS *et al.* (2009) indicam este modelo como sendo útil para elucidar mais sobre a genética da diabetes de tipo 1.

1.2.2 Modelos de diabetes tipo 1 induzido quimicamente

Embora estejam disponíveis vários modelos espontâneos de diabetes *mellitus*, o mais frequentemente utilizado é a indução química da doença. O Diabetes induzido quimicamente é um modelo simples de diabetes que pode ser usado em roedores e em animais maiores. Neste modelo, uma alta porcentagem das células β pancreáticas é destruída, e assim, há pouca produção de insulina endógena, levando a hiperglicemia e perda de peso, que são sinais clínicos característicos da doença.

Os modelos de diabetes induzidos quimicamente têm a desvantagem de que os produtos utilizados podem ser tóxicos para outros órgãos. Já foram, por exemplo, relatadas mudanças nas isoenzimas P450 (CYP) após a administração de substâncias químicas para induzir diabetes. Esta situação deve ser considerada quando são testados medicamentos utilizando este modelo da doença (LEE *et al.*, 2010).

A indução química do diabetes que ocorre após a destruição seletiva das células β do pâncreas tem sido amplamente utilizada em estudos das complicações e vários

outros aspectos causados pela doença. Vários agentes químicos são citotóxicos para as células β , porém a STZ e Aloxana são de longe as drogas mais usadas e investigadas para induzir diabetes em animais de experimentação como ratos camundongos e coelhos. Ambas as drogas exercem sua ação diabetogênica quando são administradas por via parenteral (intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea). A dose destes agentes químicos necessária para a indução do diabetes depende da espécie animal, da via de administração, do peso e estado nutricional (FEDERIUK *et al.*, 2004).

O aloxano e STZ são moléculas pequenas que se assemelham à glicose e se ligam ao transportador de glicose GLUT-2, nas células β pancreáticas e no fígado. Ambas as moléculas se decompõem rapidamente em solução aquosa, para produzir potentes radicais livres, sendo que as células β têm defesas relativamente fracas contra o estresse oxidativo (LENZEN *et al.*, 1996). Elas são especialmente sensíveis aos danos mediados por radicais livres.

1.2.2.1 Aloxana

Os primeiros experimentos que relatam que a aloxana (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine; 5,6-dioxyuracil) pode produzir necrose em ilhotas pancreáticas datam de 1940 (DUNN *et al.*, 1943; BAILEY & BAILEY; 1943), sendo criada a expressão "diabetes aloxânico". Os danos às ilhotas pancreáticas ficavam confinados às células β secretoras de insulina através de efeito direto atribuído à absorção rápida pelas células β e à geração de espécies reativas do oxigênio (ROS) (NERUP *et al.*, 1994).

A aloxana gera radicais superóxido e hidroxila e rapidamente induz a morte celular por necrose das células β dentro de 48 horas após a injeção. Sabe-se que o ácido dialúrico é formado como resultado da redução do aloxano e então, é re-oxidado estabelecendo um ciclo redox para a geração de radicais superóxidos (MUNDAY, 1988). Radicais superóxidos são capazes de liberar íons férricos de ferritina e gerar íons ferrosos (SAKURAI & OGISO, 1995). Esses radicais sofrem modificações para peróxido de hidrogênio e, logo depois, radicais hidroxilas altamente reativos (ZHANG *et al.*, 1991). Um dos alvos dos ROS é o DNA das ilhotas pancreáticas. Sua fragmentação ocorre nas células β expostas a aloxana (SAKURAI & OGISO, 1995). Segundo MALAISSE (1982), a ação diabetogênica da aloxana ocorre em função de todas as lesões provocadas nas células β das ilhotas pancreáticas por gerar estresse oxidativo e atua inibindo a ação da enzima glicoquinase, determinando a inibição da secreção de insulina induzida por glicose (LENZEN & PANT, 1988).

As doses em camundongos variam de 50 a 200 mg/kg-1 e em ratos de 40 a 200 mg kg-1, dependendo da linhagem e da via de administração; sendo que a administração intraperitoneal e subcutânea apresenta doses três vezes mais elevadas do que a via intravenosa (SZKUDELSKI, 2001). A dose de 100 mg/kg-1 foi usada para criar um modelo de diabetes a longo prazo em coelhos (WANG *et al.*, 2010). Deve notar-se que a aloxana tem uma dose diabetogênica estreita, e mesmo uma sobredosagem leve pode causar toxicidade geral, especialmente no rim (SZKUDELSKI, 2001).

1.2.2.2 *Estreptozotocina*

A STZ (2-deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosourea)-1-D-glucopyranose) é um antibiótico de amplo espectro produzido pela bactéria *Streptomyces achromogenes*, ocorre de forma natural e é particularmente tóxico em mamíferos para as células β produtoras de insulina do pâncreas por ser um análogo citotóxico da glicose. STZ tem peso molecular de 265 g/mol e a sua estrutura quimicamente é composta por nitrosourea ligado a um grupo metilo e a uma molécula de glicose (DOLAN, 1997), (Figura 2)

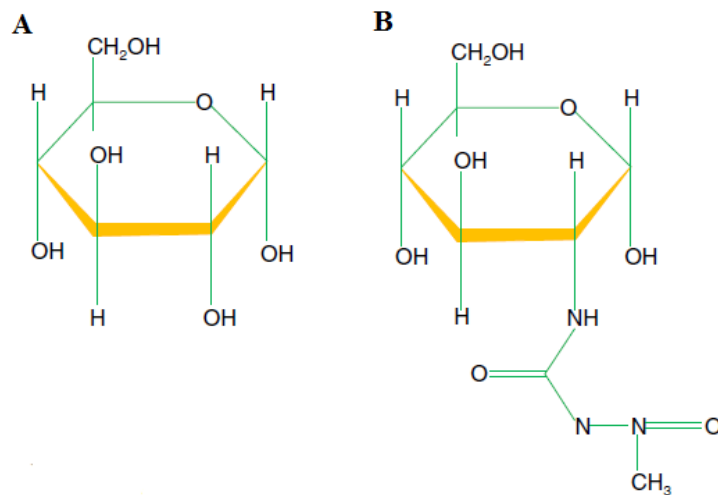


Figura 2. Estrutura de: A) glicose B) Estreptozotocina (Modificado de Eleazu *et al.*, 2013).

O Mecanismo de ação da STZ na depleção de células β tem sido amplamente estudado ao longo dos anos. É proposto que a STZ é absorvida através da membrana celular pelo transportador de glicose GLUT-2 das células β pancreáticas onde provoca a morte de células β por lesão no DNA, devido à porção nitrosourea da molécula (ELSNER *et al.*, 2007). A base bioquímica da citotoxicidade de STZ que resulta em morte celular (apoptose/necrose) está associada a três vias principais (Figura 3) que são:

1. Metilação do DNA, consiste na adição de grupos metila ao DNA. A atividade de metilação do DNA da fração metilnitrosourea da STZ, conduz a danos no DNA que resultam na ativação da enzima nuclear poli-ADP-ribose-sintetase, como parte do mecanismo de reparo do DNA da célula e, conseqüentemente na depleção de NAD⁺. A depleção das reservas energéticas celulares resulta em inibição da biossíntese e secreção de insulina e necrose das células β pancreáticas (PIEPER *et al.*, 1999).
2. A produção de óxido nítrico, a partir de um grupo nitroso presente na molécula de STZ, é outro possível mecanismo da ação diabetogênica atuando como agente alquilante de proteínas e doador de óxido nítrico (FRIEDERICH *et al.*, 2009).
3. Geração de radicais livres, como o peróxido de hidrogênio, a STZ provoca um aumento significativo no malonaldeído (MDA), mas diminui enzimas antioxidantes, como a catalase, glutatona-peroxidase e superóxido dismutase. A diminuição da atividade antioxidante associada ao aumento simultâneo da atividade de MDA indica a suscetibilidade do pâncreas à indução do estresse oxidativo por STZ. (WEST, 2000; GUL *et al.*, 2003; LENZEN, 2008).

Devido ao fato de que a STZ entra na célula através do transportador GLUT-2, a ação tóxica não é específica para β células e pode provocar danos a outros tecidos, incluindo fígado e rim (SZKUDELSKI, 2001; LENZEN, 2008).

A dose de STZ necessária para a indução de diabetes depende da espécie animal, e da via de administração (HAYASHI *et al.*, 2006, KING, 2012). Os melhores resultados são obtidos quando a substância é administrada em jejum e preparada imediatamente antes da administração usando tampão citrato estéril (0.1M, pH 4,5).

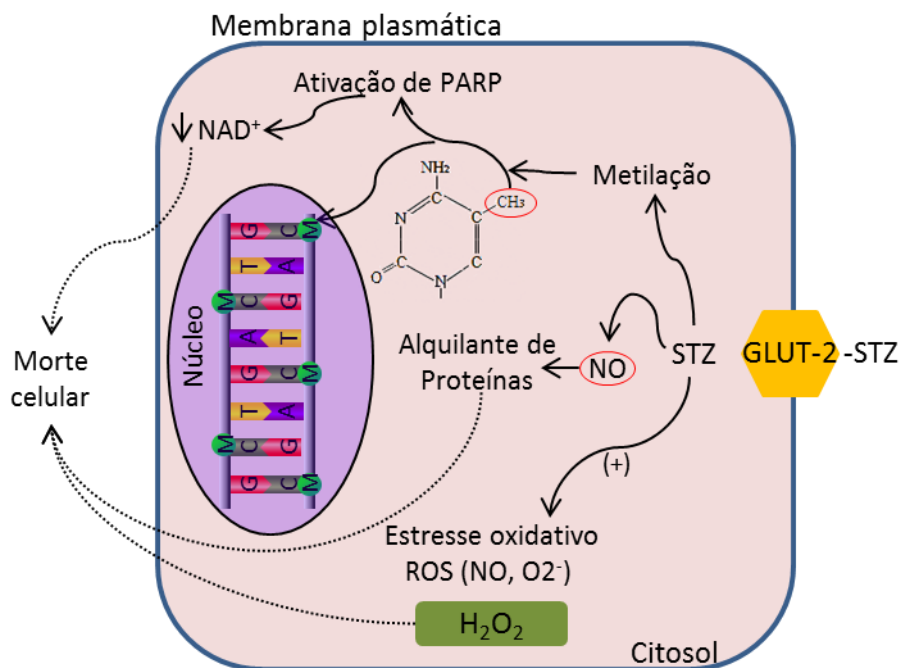


Figura 3. Principais vias de citotoxicidade da STZ.

Existem na literatura várias dosagens da STZ dependendo do protocolo experimental específico. Neste sentido DEEDS *et al.* (2011), relataram doses únicas ou múltiplas em diferentes linhagens de camundongos. Em ratos, a dose de 60mg/kg de STZ provoca citotoxicidade e aparecimento de diabetes clínica dentro de 72 horas após administração.

1.3 ALGUMAS OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA DIABETES *MELLITUS* TIPO 1 E PERSPECTIVAS FUTURAS

1.3.1 Administração de insulina

A insulina é um hormônio descoberto por Frederick Banting e Charles Best, em 1921. É produzida nas células beta das ilhotas de Langerhans e permite à glicose entrar nas células fornecendo energia e mantendo a glicemia dentro dos limites normais. Sua utilização terapêutica representou um grande avanço na sobrevivência dos pacientes afetados por diabetes *mellitus* tipo 1. A administração de insulina atrasa a apresentação de complicações crônicas da doença, requerendo, no entanto, um controle permanente e rigoroso da glicemia difícil de ser realizado, além de poder causar episódios frequentes de hipoglicemia (SCHMID, 2007).

1.3.2 Transplante de pâncreas

Até o final de 2004, a *International Pancreas Transplant Registry* (IPTR) contabilizava 23.043 transplantes do pâncreas no mundo. O procedimento cirúrgico no diabetes tipo 1 foi utilizado em humanos pela primeira vez em 1966 (KELLY *et al.*, 1967). Inicialmente, as taxas de sobrevivência do enxerto e do paciente foram baixas, até a introdução de um tratamento imunossupressor com ciclosporina, uso de agentes anti célula T e de técnicas cirúrgicas mais adequadas (ROBERTSON *et al.*, 2000). Entretanto, o maior fator limitante para a sobrevivência do paciente é o órgão transplantado, nem sempre fácil de obter (GRUESSNER & SUTHERLAND, 2005).

O transplante de pâncreas só é indicado em pacientes que apresentam os seguintes critérios: 1) história de complicações metabólicas frequentes, agudas e graves, tais como hipoglicemia, hiperglicemia, cetoacidose, doença renal crônica terminal secundária; 2) problemas clínicos e emocionais incapacitantes da terapia com insulina exógena e 3) incapacidade do tratamento com insulina para prevenir as complicações agudas da doença (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2003).

O transplante simultâneo de pâncreas e rim é eficaz para pacientes diabéticos com enfermidade renal terminal. No entanto, complicações pós-cirúrgicas como hematúria, hemorragia abdominal, infecção abdominal, trombose, fístula pancreática continuam sendo problema e afetam a taxa de sobrevivência em curto prazo (ZHENG *et al.*, 2011).

Embora o transplante de pâncreas melhore a qualidade de vida e contribua na diminuição das complicações tardias do diabetes, seus benefícios são frequentemente diminuídos com as complicações cirúrgicas e com o tratamento imunossupressor, com toxicidade renal dos anticalcineurínicos (ciclosporina A, tacrolimus). Cerca de 30% dos pacientes transplantados só de pâncreas, irão requerer tratamento de substituição da função renal 10 anos após o transplante, devido à nefrotoxicidade associada ao uso de imunossupressores (SUTHERLAND *et al.*, 2001).

1.3.3 Transplante de ilhotas pancreáticas.

Como opção terapêutica para o diabetes *mellitus* tipo 1, surgiu o transplante de ilhotas de Langerhans, ainda experimental. Vários sítios anatômicos têm sido testados para o implante de ilhotas, mas o fígado consagrou-se como local de escolha mediante a infusão através da veia porta (ROBERTSON, 2010), devido a sua capacidade de acomodar o volume da infusão e ao fato de que a insulina é fisiologicamente secretada no sangue portal (ELIASCHEWITZ *et al.*, 2004). Entre os eventos desfavoráveis possíveis nesta técnica destacam-se a embolização e trombose de ramos terminais da veia porta e os efeitos locais das altas concentrações de insulina liberada pelas ilhotas transplantadas nos hepatócitos (BHARGAVA *et al.*, 2004).

Ainda que o transplante de ilhotas também exija terapia anti rejeição, doses menores de imunossupressores parecem ser suficientes (ROBERTSON, 2004). O transplante de ilhotas é considerado um procedimento mais restrito que o transplante de pâncreas, primeiramente porque as ilhotas representam apenas 1 a 2% da massa celular do órgão. Assim, podem ser necessários vários doadores. Além disso, a limitada eficiência no seu isolamento, e as perdas por morte celular após a separação e a implantação das ilhotas no paciente podem ser fatores importantes. Como alternativas potenciais têm sido consideradas o transplante de células geradas a partir de células tronco (HUSSAIN THEISE, 2004), a expansão de células β adultas da ilhota e ainda ilhotas xenogênicas (REN *et al.*, 2007).

1.3.4 Terapias a partir de células-tronco mesenquimais

Existe a hipótese que células β derivadas de células-tronco mesenquimais podem ser utilizadas para repor a massa de ilhotas pancreáticas em pacientes diabéticos. Atualmente, existem diferentes protocolos para a diferenciação destas células-tronco mesenquimais retiradas a partir de diversos tecidos de origem como ilhota pancreática (HUANG & TANG 2003; ZHANG *et al.*, 2005), tecido pancreático ductal e acinar (SEEBERGER *et al.*, 2006; BAERTSCHIGER *et al.*, 2008), células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (KAJIYAMA *et al.*, 2010), medula óssea (PHADNIS *et al.*, 2011), sangue do cordão umbilical (GAO *et al.*, 2008), placenta (KADAM *et al.*, 2010) e líquido amniótico (TROVATO *et al.*, 2009).

Embora nenhum método pareça ser maduro o suficiente para testes clínicos, os progressos recentes em reprogramação celular são um bom prognóstico para pensar no uso de células-tronco mesenquimais como método para desenvolver terapias personalizadas para diabetes tipo 1 (DOMÍNGUEZ-BENDALA *et al.*, 2012).

1.3.5 Biomateriais no transplante de ilhotas pancreáticas

As desvantagens já mencionadas ao transplante intraportal de ilhotas pancreáticas têm estimulado a procura por sítios para transplante extra-vascular extra-hepático como a cavidade intraperitoneal (BLOMEIER *et al.*, 2006), fibras musculares (ESPES *et al.*, 2011), capsula renal (ZMUDA *et al.*, 2011) e locais de transplante bioartificial usando biomateriais.

A vantagem dos biomateriais no transplante de ilhotas é que o microambiente pode ser adaptado a fim de proporcionar um suporte espacial e funcional ideal para as células, o que poderia levar a um aumento na sobrevivência. BLOMEIER *et al.* (2006) demonstraram que a eficácia do transplante de ilhotas em tecido adiposo pode ser melhorada usando suportes poliméricos.

Atualmente, muitas pesquisas estão encaminhadas a testar andaimes tridimensionais para o transplante de ilhotas pancreáticas (BLOMEIER *et al.*, 2006; PEDRAZA *et al.*, 2012) ou ainda “semeados” com células-tronco ou células β pancreáticas progenitoras para alcançar a normalização dos níveis de glicose em indivíduos diabéticos (TUCH *et al.*, 2011; TUCH *et al.*, 2014). No entanto, a integração do biomaterial no indivíduo diabético e fibrose pericapsular que leva a necrose das células encapsuladas é um desafio a superar que precisa ser melhor caracterizado no indivíduo diabético.

1.3.5.1 *Uso de biomateriais em pesquisa*

O termo biomaterial compreende qualquer substância de origem natural ou sintética, concebida para substituir, total ou parcialmente, sistemas biológicos que deixaram de apresentar suas funções (WILLIAN, 1987). Os biomateriais desempenham um papel central nas estratégias modernas de medicina regenerativa e engenharia de tecidos (LANGER & TIRRELL, 2004). Podem facilitar a restauração da estrutura e função dos tecidos lesados ou disfuncionais a partir de transportadores que alojem células transplantadas ou através de matrizes que sustentem a morfogênese em tecidos de bioengenharia construídos *ex vivo*. Esses materiais devem fornecer um

suporte tridimensional provisório para interagir molecularmente com células e controlar a sua função, orientando espacial e temporalmente complexos processos multicelulares de formação e regeneração tecidual.

A inserção subcutânea de esponjas de poliéster poliuretano representa um modelo *in vivo* para a análise de diversas respostas celulares como a proliferação e diferenciação celular, apoptose, inflamação e angiogênese (FERREIRA *et al.*, 2004; CAMPOS *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2011).

Poliuretanos são polímeros caracterizados pela presença de grupos NHCOO que são capazes de ligar-se ao hidrogênio, tanto com os grupos homólogos de cadeias diferentes e com as moléculas de água (DI LANDRO *et al.*, 1991). Esta característica pode permitir a sua interação com o microambiente tissular.

Andaimes tridimensionais de poliéster poliuretano têm sido amplamente utilizados para estudos de angiogênese, regulação da matriz extracelular (MEC) e resposta inflamatória (ANDRADE & FERREIRA, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2011; CASTRO *et al.*, 2012, PEREIRA *et al.*, 2012). Muitas pesquisas são conduzidas utilizando biomateriais para recriar um microambiente favorável à proliferação celular incluindo ilhotas pancreáticas em pacientes com diabetes tipo 1 (SALVAY *et al.*, 2008; GIBLY *et al.*, 2011; JALILI *et al.*, 2011). Neste caso, as esponjas de poliéster poliuretano podem atuar como uma plataforma para fornecimento de sangue e sinais moleculares, tais como proteínas da MEC, que contribuam para um enxerto e função eficaz das ilhotas pancreáticas. No entanto, é importante conhecer a resposta do tecido em indivíduos diabéticos a este biomaterial.

1.4 IMPORTANCIA DOS MODELOS PARA ESTUDO DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS INTERNAS

A diminuição da capacidade de cicatrização é frequentemente associada com a diabetes clínica e experimental (WAN *et al.*, 2013). Com a finalidade de estudar esta alteração foram desenvolvidos modelos experimentais de reparo de feridas em animais por meio da implantação de dispositivos, principalmente subcutâneos (SCHILLING *et al.*, 1959; MARTSON *et al.*, 1998). Um dos dispositivos mais utilizados tem sido as esponjas (BROADLEY *et al.*, 1989; TEIXEIRA *et al.*, 1999; SCHÄFFER *et al.*, 2007), que permitem que as células invadam e se estabeleçam na matriz esponjosa permitindo a coleta de células, fluidos e tecidos para estudo da ferida diabética.

A implantação de esponjas de poliéster poliuretano tem sido amplamente utilizada para estudar a resposta análoga ao processo de reparo no hospedeiro, porém, em uma matriz sintética. A matriz esponjosa, inicialmente acelular e avascular, é implantada no animal (tecido subcutâneo ou cavidade intraperitoneal) dando início a um processo de reparo caracterizado inicialmente pela presença de células inflamatórias dentro do compartimento da esponja seguido por angiogênese e deposição da MEC (CAMPOS *et al.*, 2011). O modelo proporciona um ambiente inflamado em fase aguda ou crônica, dependendo do tempo que o implante permanece no animal, sendo que cada um dos componentes da resposta tecidual pode ser estudado após a extração da esponja.

1.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE CICATRIZAÇÃO

O diabetes é um dos grandes desafios da medicina moderna, uma vez que é considerada uma epidemia global do século XXI (WASIKOWA & BASIAK, 2012). A doença muitas vezes leva ao desenvolvimento de graves complicações que em sua maioria são curiosamente o resultado de um processo de cura prejudicada. A diminuição da cicatrização de feridas reflete alterações na expressão genética, na resposta celular, no funcionamento da célula e do metabolismo em geral (BRUHN-OLSZEWSKA *et al.*, 2012).

A cicatrização é um processo biológico complexo e multifatorial no qual há interação simultânea de eventos celulares, bioquímicos e imunológicos levando à reconstituição e restauração da integridade tecidual. Quando ocorre uma lesão tissular é ativada uma cascata de eventos, com a finalidade de reparar o dano, sendo que o processo normal de cicatrização de feridas progride através de uma série de eventos ordenados em quatro fases iniciadas pela hemostasia, inflamação, proliferação (caracterizada angiogênese e formação de tecido de granulação), e finalmente remodelação do tecido (MENKE *et al.*, 2008; STOJADINOVIC *et al.*, 2008; JAUL, 2009; STRONCEK *et al.*, 2009). Estas fases e as suas funções biofisiológicas devem ocorrer na sequência correta, no momento específico, e continuar por um período em uma intensidade adequada. O diabetes, entre outros fatores, pode afetar a cicatrização de feridas interferindo em uma ou mais fases do processo, causando reparação tecidual inadequada ou deficiente (MATHIEU *et al.*, 2006).

1.5.1 Processo normal da cicatrização de feridas.

A cicatrização de feridas tem sido descrita de forma simplificada em quatro fases denominadas hemostasia, inflamação, proliferação e maturação. No entanto, a cicatrização é uma complexa interação entre células inflamatórias e mediadores químicos solúveis com coordenada precisão e uma sobreposição significativa entre as fases antes mencionadas.

A hemostasia, caracterizada pela acumulação e agregação de plaquetas no local da ferida, dá início à formação de um coágulo e de uma matriz provisória necessária para a migração celular (WERNER & GROSE, 2003; EMING *et al.*, 2007). A produção de trombina que inicia a transformação do fibrinogênio em fibrina é responsável pela formação de uma malha de estabilização das plaquetas no local da lesão. As plaquetas, induzidas pela trombina, sofrem a degranulação plaquetária liberando vários fatores de crescimento, como o Fator derivado de plaquetas (PDGF), o Fator de crescimento transformante- β (TGF- β), o Fator de crescimento epidérmico (EGF), o Fator de crescimento transformante- α (TGF- α) e o Fator de crescimento de células endoteliais (VEGF); além de glicoproteínas adesivas como a fibronectina e trombospondina, que são importantes constituintes da MEC provisória (ARNOLD & WEST 1991; STREIT *et al.*, 2000).

Simultaneamente, são produzidos numerosos mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos que permeabilizam os vasos sanguíneos, permitindo a migração de leucócitos ao local da ferida (fase inflamatória). Neutrófilos e monócitos são atraídos em resposta aos agentes quimiotáticos como produtos da decomposição do

colágeno, citocinas TGF- β , TNF- α , IL-1 e Fator plaquetário IV. Os monócitos do sangue periférico, infiltrados no local da ferida são então ativados transformando-se em macrófagos que são as principais células envolvidas no processo de reparo (CLARK, 1996; SINGER & CLARK 1999; MONACO & LAWRENCE, 2003; MARTIN & LEIBOVICH, 2005).

O macrófago ativado é uma célula efetora fundamental, além de remover bactérias e outros produtos estranhos do local da ferida, produzem fatores necessários para a fase proliferativa do processo de reparação tecidual. Os macrófagos secretam fatores quimiotáticos que atraem outras células inflamatórias ao local da ferida e produzem prostaglandinas, que funcionam como potentes vasodilatadores, afetando a permeabilidade dos microvasos. Estas células produzem também vários fatores de crescimento, tais como o PDGF, o TGF- β , o Fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o VEGF, que se destacam como as principais citocinas necessárias para estimular a formação do tecido de granulação (SINGER & CLARK, 1999).

A fase proliferativa da cicatrização de feridas se sobrepõe as fases de hemostasia e inflamação, envolve epitelização, angiogênese, e formação de uma matriz provisória. Os fatores de crescimento liberados pelos macrófagos estimulam a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e fibroplasia, que compõem o chamado tecido de granulação. O processo de migração e proliferação celular requer a secreção de metaloproteinases de matriz (MMP) para a degradação parcial do coágulo e da MEC no local da ferida. A digestão parcial da MEC forma um espaço para as células migratórias e é um processo fortemente regulado para manter um balanço entre a degradação e a formação de novo tecido (MADLENER *et al.*, 1998).

A fase de maturação na cicatrização de feridas se sobrepõe à fase de proliferação, nesta etapa a matriz provisória, composta de colágeno tipo III, proteoglicanos e fibronectina é substituída por uma matriz mais forte e bem organizada composta por colágeno tipo I. O TGF- β é uma citocina predominante na fase de maturação que inibe a produção de MMP, regula positivamente a expressão de inibidores de MMP, tem um papel importante na remodelação da matriz de fibroblastos/colágeno e na organização da MEC (LAWRENCE & DIEGELMANN, 1994; GRINELL, 2003). A contração da ferida, que é a última etapa do processo de reparo, é o resultado da atividade das células mesenquimais.

1.5.1.1 Inflamação e angiogênese como eventos importantes no processo de reparo

A angiogênese ou desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes é um processo que ocorre em todas as fases da vida do indivíduo, tanto em processos fisiológicos como patológicos. Em organismos adultos, a angiogênese é necessária para a cicatrização de feridas, o crescimento, e função dos órgãos reprodutivos femininos incluindo a ovulação, o desenvolvimento folicular, formação do corpo lúteo, liberação de progesterona, crescimento do endométrio, regressão e reparação durante o ciclo menstrual, e a formação de um tecido totalmente vascularizado para a implantação e placentação durante a gravidez (FRASER & LUNN, 2000; CHARNOCK-JONES *et al.*, 2004; FRASER & DUNCAN, 2005; CHEN & ZHENG, 2014). O aumento inadequado é observado no desenvolvimento tumoral e inflamações crônicas como a retinopatia diabética, entre outros (BIKFALVI *et al.*, 1997; CRAWFORD *et al.*, 2009).

Diversas evidências sugerem que a angiogênese está intimamente ligada à inflamação, porquanto muitos mediadores gerados após uma lesão tecidual são capazes de induzir direta ou indiretamente a formação de novos vasos sanguíneos. Sendo assim, a angiogênese inflamatória pode ser entendida como a habilidade das células endoteliais e dos leucócitos de responderem ao estímulo comum das citocinas (JACKSON *et al.*, 1997).

A angiogênese é um processo complexo que envolve a ativação de muitos receptores e seus respectivos ligantes, encaminhados a sinalizar a degradação da matriz extracelular, migração e proliferação celular, e formação de estruturas tubulares funcionais por brotamento a partir de pequenos vasos pré-existentes. Sob condições normais, deve existir um balance entre os mediadores químicos que promovem a angiogênese (pro-angiogênicos) e os que a inibem (anti-angiogênicos) (CARMELIET, 2000).

O processo de angiogênese se inicia em resposta a fatores que ativam as células endoteliais que recobrem os capilares existentes (Figura 4). Inicialmente os vasos se dilatam e sofrem alterações nas uniões das células endoteliais; os pericitos que envolvem estas células e inibem a sua proliferação, se separam da parede dos vasos e da membrana basal por degradação proteolítica mediada por MMP (ARROYO & IRUELA-ARISPEM, 2010).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma citocina capaz de induzir vasodilatação via produção de óxido nítrico (NO), e aumentar a permeabilidade das células endoteliais sendo considerado como principal responsável de iniciar o

processo de angiogênese (CARMELIET, 2000; AHLUWALIA & TARNAWSKI, 2012). O aumento da permeabilidade das células endoteliais causa o extravasamento de proteínas plasmáticas o que permite o estabelecimento de uma MEC provisional que funciona como suporte para a migração das células endoteliais. Após a ativação das células endoteliais e degradação da membrana basal inicia-se a invasão do tecido pelos brotamentos capilares neoformados (NASH *et al.*, 2001; HANGAI *et al.*, 2002).

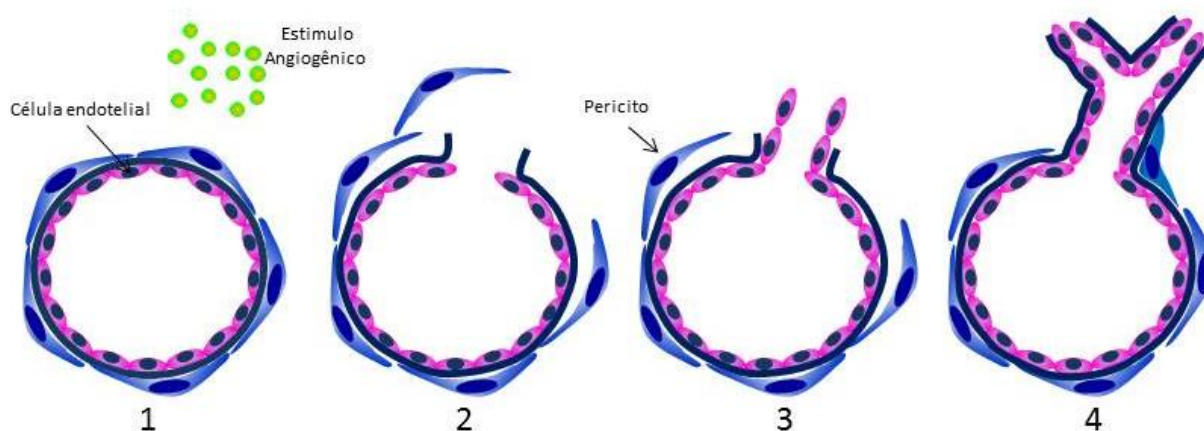


Figura 4. Progressão da angiogênese induzida pela inflamação. (1) Estimulação das células endoteliais por citocinas angiogênicas. A inflamação induzida por fatores sistêmicos ou locais ativam o programa angiogênico, aumentando a permeabilidade dos vasos e desestabilizando as junções das células endoteliais. (2) Degradação da lâmina basal do vaso e formação do broto. Proteases secretadas pela célula endotelial produzem proteólise da MEC durante o brotamento capilar induzido por estímulos inflamatórios. (3) expansão do broto e formação do lúmen vascular. A MEC é impulsada por forças mecânicas, e um broto capilar é formado como resultado da migração celular direcionada por sinais de fatores de crescimento durante a angiogênese mediada por inflamação. (4) Vaso sanguíneo neoformado funcional.

Para que ocorra a migração e proliferação das células endoteliais e o brotamento dos novos vasos sanguíneos é necessário a degradação proteolítica da membrana basal do vaso original e a remodelação do estroma perivascular (MOSES, 1997). Vários tipos celulares contribuem para a degradação da MEC dentre eles as células

epiteliais, células do sistema imunológico e fibroblastos (JAIN, 2003). A etapa final do processo de angiogênese compreende a maturação das células endoteliais constituintes do novo vaso e a determinação da polaridade das células endoteliais, que será importante para a formação do lúmen capilar e para as interações célula-célula e célula-matriz (BISCHOFF, 1995). A estabilização do vaso neoformado é alcançada após a migração das células mesenquimais para a proximidade dos vasos neoformados e a posterior diferenciação deste tipo celular em pericitos ou células musculares lisas e pela regeneração da MEC e da membrana basal (JAIN, 2003).

Finalmente, segundo JAIN (2003) os determinantes moleculares de maturação neovascular podem ser agrupados em três categorias:

1. União dos fatores de crescimento a um tipo de receptor celular, com seu efeito correspondente;
2. Regulação molecular das interações celulares;
3. Regulação molecular das interações entre as células endoteliais e a matriz extracelular.

1.6 Cicatrização de feridas em diabéticos

Uma complicação frequente em pacientes diabéticos é a cicatrização prejudicada em feridas agudas e a susceptibilidade ao desenvolvimento de feridas crônicas, tais como lesões ulcerativas nos membros inferiores. As ulcerações com falha na reparação em indivíduos com diabetes são uma das principais causas de admissões

em hospitais nos países desenvolvidos e é a principal morbidade associada ao diabetes, muitas vezes causando dor, sofrimento e menor qualidade de vida. Estima-se que em 15% dos indivíduos com diabetes ocorrem ulcerações e que 84% das amputações relacionadas a membros inferiores são realizadas em indivíduos portadores da doença.

A cicatrização deficiente que ocorre em indivíduos com diabetes, envolve diversos aspectos como neuropatia (CHENG *et al.*, 2013), hipóxia, angiogênese diminuída (MATHIEU *et al.*, 2006;), disfunção dos fibroblastos e células epidérmicas (BREM & TOMIC-CANIC, 2007), altos níveis de metaloproteases (MENGHINI *et al.*, 2013), danos produzidos por espécies reativas de oxigênio (LAN *et al.*, 2013) e produtos finais da glicação avançados (VOUILLARMET *et al.*, 2013). Na diabetes, tem sido observado que todas as fases de cicatrização de feridas estão afetadas. Isto leva a um quadro específico de ferida diabética, que é uma característica da síndrome do pé diabético.

Um grande número de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas liberados pelos ceratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e plaquetas, têm os seus níveis séricos alterados na diabetes. Esses fatores são responsáveis por iniciar o processo de reparo de feridas e sua manutenção. Feridas diabéticas são caracterizadas por um nível reduzido de fatores de crescimento e seus receptores como TGF- β 1, PDGF, VEGF, IL-8, IL-10 (BLAKTYNY & JUDE, 2009). A diminuição dos níveis desses fatores de crescimento poderia contribuir para uma pobre regeneração do tecido e cicatrização de feridas prejudicada.

Embora existam diferenças etiológicas e clínicas evidentes, as lesões cutâneas e serosas têm eventos comuns como hemostasia, inflamação, proliferação, angiogênese e remodelação da matriz extracelular (SINGER & CLARK, 1999). Estes eventos têm sido estudados de forma exaustiva na pele de indivíduos diabéticos (BREM & TOMIC-CANIC, 2007), mas não há informação suficiente em outras localizações anatômicas como na cavidade intraperitoneal ou no subcutâneo, necessárias devido às frequentes complicações na cicatrização que se apresentam neste tipo de pacientes após procedimentos de elevada complexidade como o transplante de rim (ROINE *et al.*, 2010) ou devido ao uso destes sítios anatômicos como local de implante de células encapsuladas e outros dispositivos médicos.

Dado que o processo de cicatrização no diabetes tipo 1 pode ocorrer de diferentes formas dependendo do lugar da lesão os estudos sobre o mecanismo de reparo em ambos os modelos (subcutâneo e intraperitoneal) devem fornecer informações importantes a respeito de possíveis benefícios para os seres humanos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do diabetes *mellitus* tipo 1 na resposta às lesões induzidas por implantes intraperitoneais e subcutâneos em ratos Wistar.

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar as alterações decorrentes do diabetes tipo 1 na inflamação, angiogênese e fibrogênese induzida por implantes intraperitoneais de uma matriz sintética. (Publicado em: *Microvascular Research* 93: 23–29 em março de 2014).

Estudar a influência da hiperglicemia no recrutamento e ativação de células inflamatórias, neovascularização, apoptose, e fibrose induzida por uma matriz sintética implantada subcutaneamente. (Submetido à revista *PlosOne* em 08 de maio de 2014).

3. Referências Bibliográficas

AHLUWALIA, A.; TARNAWSKI, A.S. Critical role of hypoxia sensor--HIF-1alpha in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. **Curr Med Chem**, v.19, p.90-97, 2012.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes *mellitus*. **Diabetes Care**, v.34, p.62-9, 2011.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Pancreas transplantation for patients with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v.26, p.S120, 2003.

ANDRADE, S.P.; FERREIRA, M.A. The sponge implant model of angiogenesis. **Methods Mol Biol**. v.467, p.295-304, 2009.

ARAÚJO, F.A.; ROCHA, M.A.; FERREIRA, M.A.; CAMPOS, P.P.; CAPETTINI, L.S.; LEMOS, V.S.; ANDRADE, S.P. Implant-induced intraperitoneal inflammatory angiogenesis is attenuated by fluvastatin. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v.38, p.262-268, 2011.

ARNOLD, F.; WEST, D.C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacol Ther**. v.52, p.407-422, 1991.

ARROYO, A.G.; IRUELA-ARISPE, M.L. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. **Cardiovasc Res**. v.86, p.226-235, 2010.

ATKINSON, M.A.; EISENBARTH, G.S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet**. v.358, p.221-229, 2001.

ATKINSON, M.A.; LEITER, E.H. The NOD mouse model of type 1 diabetes: As good as it gets? **Nat Med**. v.5, p.601-604, 1999.

BAERTSCHIGER, R.M.; BOSCO, D.; MOREL, P.; SERRE-BEINIER, V.; BERNEY, T.; BUHLER, L.H.; GONELLE-GISPERT, C. Mesenchymal stem cells derived from human exocrine pancreas express transcription factors implicated in beta-cell development. **Pancreas**. v.37, p.75-84, 2008.

BHARGAVA, R.; SENIOR, P.A.; ACKERMAN, T.E.; RYAN, E.A.; PATY, B.W.; LAKEY, J.R.; SHAPIRO, A.M. Prevalence of hepatic steatosis after islet transplantation and its relation to graft function. **Diabetes**. v.53, p.1311-1317, 2004.

BIKFALVI, A. Angiogenesis and cancer. **Bull Cancer**. v.84, p.885-890, 1997.

BLAKYTTY, R.; JUDE, E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. **Diabet Med**. v.23, p.594-608, 2006.

BLOMEIER, H.; ZHANG, X.; RIVES, C.; BRISSOVA, M.; HUGHES, E.; BAKER, M.; POWERS, A.C.; KAUFMAN, D.B.; SHEA, L.D.; LOWE, W.L. Jr. Polymer scaffolds as synthetic microenvironments for extrahepatic islet transplantation. **Transplantation**. v.82, p.452-459, 2006.

BREM H, TOMIC-CANIC M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. **J Clin Invest**. v.117, p.1219-1222, 2007.

BROADLEY, K.N.; AQUINO, A.M.; HICKS, B.; DITESHEIM, J.A.; MCGEE, G.S.; DEMETRIOU, A.A.; WOODWARD, S.C.; DAVIDSON, J.M. The diabetic rat as an impaired wound healing model: stimulatory effects of transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor. **Biotechnol Ther**. v.1, p.55-68, 1989-1990.

BRUHN-OLSZEWSKA, B.; KORZON-BURAKOWSKA, A.; GABIG-CIMIŃSKA, M.; OLSZEWSKI, P.; WĘGRZYN, A.; JAKÓBKIEWICZ-BANECKA, J. Molecular factors involved in the development of diabetic foot syndrome. **Acta Biochim Pol**. v.59, p.507-513, 2012.

CAMPOS, P.P.; ANDRADE, S.P.; MORO, L.; FERREIRA, M.A.; VASCONCELOS, A.C. Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. **Histol Histopathol**. v.21, p.1263-1270, 2006.

CAMPOS, P.P.; VASCONCELOS, A.C.; FERREIRA, M.A.; ANDRADE, S.P. Alterations in the dynamics of inflammation, proliferation and apoptosis in subcutaneous implants of lupus-prone mice. **Histol Histopathol**. v.26, p.433-442, 2011.

CARMELIET P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nat Med.** v.6, p. 389-395, 2000.

CASTRO, P.R.; MARQUES, S.M.; CAMPOS, P.P.; CARDOSO, C.C.; SAMPAIO, F.P.; FERREIRA, M.A.; ANDRADE, S.P. Kinetics of implant-induced inflammatory angiogenesis in abdominal muscle wall in mice. **Microvasc Res.** v.84, p.9-15, 2012.

CHARNOCK-JONES, D.S. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. **Placenta.** v.25, p.103-113, 2004.

CHEN, D.B.; ZHENG, J. Regulation of placental angiogenesis. **Microcirculation.** v.21, p.15-25, 2014.

CHENG, C.; SINGH, V.; KRISHNAN, A.; KAN, M.; MARTINEZ, J.A.; ZOCHODNE, D.W. Loss of innervation and axon plasticity accompanies impaired diabetic wound healing. **PLoS One.** v.8, e75877, 2013.

CLARK, R.A.F. Wound repair: overview and general considerations. In: Clark RAF, editor. The molecular and cellular biology of wound repair. 2nd ed. New York: Plenum Press; p.3-50. 1996.

CORNELL, S.; DORSEY, V.J. Diabetes Pharmacotherapy in 2012. Considerations in Medication Selection. **Postgraduate Med.** v.124, p.84-94, 2012.

CRAWFORD, T.N.; ALFARO, D.V. 3rd.; KERRISON, J.B.; JABLON, E.P. Diabetic retinopathy and angiogenesis. **Curr Diabetes Rev.** v.5, p.8-13, 2009.

DELOVITCH, T.L.; SINGH, B. The Nonobese Diabetic Mouse as a Model of Autoimmune Diabetes: Immune Dysregulation Gets the NOD. **Immunity.** v.7, p.727-738, 1997.

DI LANDRO, L.; PEGORARO, M.; BORDOGMA, L. Interactions of polyether - polyurethanes with water vapour and water-methane separation selectivity. **J Memb Sci,** v.64, p.229-236, 1991.

DOLAN, M.E. Inhibition of DNA repair as a means of increasing the antitumor activity of DNA active agents. **Adv Drug Deliv Rev.** v.26, p.105-118, 1997.

DOMÍNGUEZ-BENDALA, J.; LANZONI, G.; INVERARDI, L.; RICORDI, C. Concise review: mesenchymal stem cells for diabetes. **Stem Cells Transl Med.** v.1, p.59-63, 2012.

DUNN, J.S.; MCLETCHIE, N.G.B. Experimental alloxan diabetes in the rat. **Lancet.** v.245, p.384-387, 1943.

DUNN, J.S.; SHEEHAN, H.L.; MCLETCHIE, N.G.B. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. **Lancet.** v.244, p.484-487, 1943.

EIZIRIK, D.L.; MANDRUP-POULSEN, T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. **Diabetologia.** v.44, p.2115-2133, 2001.

ELEAZU, C.O.; ELEAZU, K.C.; CHUKWUMA, S.; ESSIEN, U.N. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. **J Diabetes Metab Disord.** v.12, p.60. 2013.

ELIASCHEWITZ, F.G.; AITA, C.A.M.; GENZINI, T.; NORONHA, I.L.; LOJUDICE, F.H.; KROGH, K. *et al.* First Brazilian pancreatic islet transplantation in a patient with type 1 diabetes *mellitus*. **Transplant Proc.** v.36, p.1117-1118, 2004.

EMING, S.A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J.M. Gene therapy and wound healing. *Clin Dermatol.* v.25, p.79-92, 2007.

ESPES, D.; ERIKSSON, O.; LAU, J.; CARLSSON, P.O. Striated muscle as implantation site for transplanted pancreatic islets. **J Transplant.** ID 352043, 2011.

FERREIRA, M.A.; BARCELOS, L.S.; CAMPOS, P.P.; VASCONCELOS, A.C.; TEIXEIRA, M.M.; ANDRADE, S.P. Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO). **Br J Pharmacol.** v.141, p.1185-1192, 2004.

FRASER, H.M.; DUNCAN, W.C. Vascular morphogenesis in the primate ovary. **Angiogenesis.** v.8, p.101-116, 2005.

FRASER, H.M.; LUNN, S.F. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. **Br Med Bull.** v.56, p.787-797, 2000.

FRIEDERICH, M.; HANSELL, P.; PALM, F. Diabetes, oxidative stress, nitric oxide and mitochondria function. **Curr Diabetes Rev.** v.5, p.120-144, 2009.

GAO, F.; WU, D.Q.; HU, Y.H.; JIN, G.X.; LI, G.D.; SUN, T.W.; LI, F.J. In vitro cultivation of islet-like cell clusters from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. **Transl Res.** v.151, p.293-302, 2008.

GIBLY, R.F.; ZHANG, X.; GRAHAM, M.L.; HERING, B.J.; KAUFMAN, D.B.; LOWE, W.L. Jr.; SHEA, L.D. Extrahepatic islet transplantation with microporous polymer scaffolds in syngeneic mouse and allogeneic porcine models. **Biomaterials.** v.32, p.9677-9684, 2011.

GRINELL, F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. **Trends Cell Biol.** v.13, p.264-269, 2003.

GRUESSNER, A.C.; SUTHERLAND, D.E. Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant registry (IPTR) as of June 2004. **Clin Transplant.** v.19, p.433-455, 2005.

GUL, M.; LAAKSONEN, D.E.; ATALAY, M.; VIDER, L.; HANNIEN, O; Effects of endurance training on tissue glutathione homeostasis and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Scand J Med Sci Sports.** v.12, p.163-170, 2002.

HANAFUSA, T.; MIYAGAWA, J.; NAKAJIMA, H.; TOMITA, K.; KUWAJIMA, M.; MATSUZAWA, Y.; TARUI, S. The NOD mouse. **Diabetes Res Clin Pract.** S307-11, 1994.

HANGAI, M.; KITAYA, N.; XU, J.; CHAN, C.K.; KIM, J.J.; WERB, Z.; RYAN, S.J. BROOKS, P.C. Matrix metalloproteinase-9-dependent exposure of a cryptic migratory control site in collagen is required before retinal angiogenesis. **Am J Pathol.** v.161, p. 1429-1437, 2002;

HAYASHI, K.; KOJIMA, R.; ITO, M. Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice. **Biol Pharm Bull.** v. 29, p. 1110-1119, 2006.

HUANG, H.; TANG, X. Phenotypic determination and characterization of nestin-positive precursors derived from human fetal pancreas. **Lab Invest.** v.83, p.539-547, 2003.

HUSSAIN, M.A.; THEISE, N.D. Stem-cell therapy for diabetes *mellitus* **Lancet.** v.64, p.203-205, 2004.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, **Diabetes Atlas**, 2013. acessado em 04 de agosto de 2014, URL Online version of IDF Diabetes Atlas: www.idf.org/diabetesatlas

JACKSON, J.R.; SEED, M.P.; KIRCHER, C.H.; WILLOUGHBY, D.A.; WINKLER, J.D. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. **FASEB J.** v.11, p. 457-465, 1997.

JAIN, R.K. Molecular regulation of vessel maturation. **Nat Med.** v.9, p. 685-693, 2003.

JALILI, R.B.; MOEEN REZAKHANLOU, A.; HOSSEINI-TABATABAEI, A.; AO, Z.; WARNOCK, G.L.; GHAHARY, A. Fibroblast populated collagen matrix promotes islet survival and reduces the number of islets required for diabetes reversal. **J Cell Physiol.** v.226, p.1813-1819, 2011.

JAUL, E. Non-healing wounds: the geriatric approach. **Arch Gerontol Geriatr,** v.49, p.224-226, 2009.

JEDERSTROM, G.; GRASJO, J.; NORDIN, A.; SJOHOLM, I.; ANDERSSON, A. Blood glucose-lowering activity of a hyaluronan-insulin complex after oral administration to rats with diabetes. **Diabetes Technol Ther.** v. 7, p. 948-957, 2005.

KADAM, S.; MUTHYALA, S.; NAIR, P.; BHONDE, R. Human placenta-derived mesenchymal stem cells and islet-like cell clusters generated from these cells as a novel source for stem cell therapy in diabetes. **Rev Diabet Stud.** v.7, p.168-182, 2010.

KAJIYAMA, H.; HAMAZAKI, T.S.; TOKUHARA, M.; MASUI, S.; OKABAYASHI, K.; OHNUMA, K. Pdx1-transfected adipose tissue-derived stem cells differentiate into

insulin-producing cells in vivo and reduce hyperglycemia in diabetic mice. **Int J Dev Biol.** v.54, p.699-705, 2010.

KELLY WD, LILLEHEI RC, MERKEL FK, IDEZUKI Y, GOETZ FC. Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. **Surgery.** 1967; 61(6): 827–37.

KING, A.J. The use of animal models in diabetes research. **Br J Pharmacol.** v. 166, p. 877-94, 2012.

KULMALA, P.; SAVOLA, K.; REIJONEN, H.; VEIJOLA, R.; VAHASALO, P.; KARJALAINEN, J. *et al.* Genetic markers, humoral autoimmunity, and prediction of type 1 diabetes in siblings of affected children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. **Diabetes.** v.49, p.48-58, 2000.

LAMERS, M.L; ALMEIDA, M.E.S.; VICENTE-MANZANARES, M.; HORWITZ, A.F.; SANTOS, M.F. High Glucose-Mediated Oxidative Stress Impairs Cell Migration. **PLoS ONE.** V; 6 e22865, 2011.

LAN, C.C.; WU, C.S.; HUANG, S.M.; WU. I.H.; CHEN, G.S. High-glucose environment enhanced oxidative stress and increased interleukin-8 secretion from keratinocytes: new insights into impaired diabetic wound healing. **Diabetes.** v.62, p. 2530-2538, 2013.

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

LAWRENCE, W.; DIEGELMANN, R. Growth factors in wound healing. **Clin Dermatol.** v.12, p.157-69, 1994.

LEE, J.H.; YANG, S.H.; OH, J.M.; LEE, M.G. Pharmacokinetics of drugs in rats with diabetes *mellitus* induced by alloxan or streptozocin: comparison with those in patients with type I diabetes *mellitus*. **J Pharm Pharmacol.** v.62, p.1-23, 2010.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia.** v.51, p.216-226, 2008.

LENZEN, S.; DRINKGERN, J.; TIEDGE, M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. **Free Rad. Biol. Med.** v.20, p. 463-466, 1996.

LIEKENS, S.; DE CLERCK, E.; NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochem Pharmacol.** v.61, p.253-270, 2001.

MADLENER, M.; PARKS, W.C.; WERNER, S. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. **Exp Cell Res.** v.242, p.201–210, 1998.

MAKINO, S.; KUNIMOTO, K.; MURAOKA, Y.; MIZUSHIMA, Y.; KATAGIRI, K.; TOCHINO, Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. **Jikken Dobutsu.** v.29, p.1-13, 1980.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S.J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends Cell Biol.** v.15, p. 599-607, 2005.

MARTSON, M.; VILJANTO, J.; LAIPPALA, P.; SAUKKO, P. Connective tissue formation in subcutaneous cellulose sponge implants in the rat. The effect of the size and cellulose content of the implant. **Eur Surg Res.** v.30, p.419-425, 1998.

MARUYAMA, T.; TAKEI, I.; YANAGAWA, T.; TAKAHASHI, T.; ASABA, Y.; KATAOKA, K.; ISHII, T. Insulin autoantibodies in non-obese diabetic (NOD) mice and streptozotocin-induced diabetic mice. **Diabetes Res.** v.7, p.93-96. 1988.

MATHIEU, D.; LINKE, J-C.; WATTEL, F. Non-healing wounds. In: **Handbook on hyperbaric medicine**, Mathieu DE, editor. Netherlands: Springer, p.401-427, 2006.

MENGHINI, R.; UCCIOLI, L.; VAINIERI, E.; PECCHIOLI, C.; CASAGRANDE, V.; STOEHR, R. *et al.* Expression of tissue inhibitor of metalloprotease 3 is reduced in ischemic but not neuropathic ulcers from patients with type 2 diabetes *mellitus*. **Acta Diabetol.** v.50, p.907-910, 2013.

MENKE, M.N.; MENKE, N.B.; CECELIA H.; BOARDMAN, C.H.; ROBERT, F.; DIEGELMANN, R.F. Biologic therapeutics and molecular profiling to optimize wound healing. **Gynecol Oncol.** v.111, S87-91, 2008.

MONACO, J.L.; LAWRENCE, W.T. Acute wound healing an overview. **Clin Plast Surg**. v.30, p.1-12, 2003.

MORDES, J.P.; BORTELL, R.; BLANKENHORN, E.P.; ROSSINI, A.A.; GREINER, D.L. Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. **ILAR J**. v.45, 278-291, 2004.

NAKAYAMA, M.; NAGATA, M.; YASUDA, H.; ARISAWA, K.; KOTANI, R.; YAMADA, K.; *et al.* Fas/Fas Ligand Interactions Play an Essential Role in the Initiation of Murine Autoimmune Diabetes. **Diabetes**. v.51, p.1391-1397, 2002.

PEDRAZA, E.; BRADY, A.C.; FRAKER, C.A.; MOLANO, R.D.; SUKERT, S.; BERMAN, D.M. *et al.* Macroporous three-dimensional PDMS scaffolds for extrahepatic islet transplantation. **Cell Transplant**. v.22, p.1123-1135, 2013.

PEREIRA, N.B.; CAMPOS, P.P.; OVIEDO-SOCARRÁS, T.; PIMENTA, T.S.; PARREIRAS, P.M.; SILVA, S.S. Sponge implant in Swiss mice as a model for studying loxoscelism. **Toxicon**. v.59, p.672-679, 2012.

PHADNIS, S.M.; JOGLEKAR, M.V.; DALVI, M.P.; MUTHYALA, S.; NAIR, P.D.; GHASKADBI, S.M. *et al.* Human bone marrow-derived mesenchymal cells differentiate and mature into endocrine pancreatic lineage in vivo. **Cytotherapy**. v.13, p.279-293, 2011.

PIEPER, A.A.; VERMA, A.; ZHANG, J.; SNYDER, S.H. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. **Trends Pharmacol Sci**. v.20, p.171-181, 1999.

PIROLA, L.; BALCERCZYK, A.; OKABE, J.; EL-OSTA, A. Epigenetic phenomena linked to diabetic complications. **Nat Rev Endocrinol**. v.6, p.665-675, 2010.

POZZILLI, P.; SIGNORE, A.; WILLIAMS, A.J.; BEALES, P.E. NOD mouse colonies around the world – recent facts and figures. **Immunol Today**. v.14, p.193-196, 1993.

QUARANTA, P.; ANTONINI, S.; SPIGA, S.; MAZZANTI, B.; CURCIO, M.; *et al.* Co-Transplantation of Endothelial Progenitor Cells and Pancreatic Islets to Induce Long-

Lasting Normoglycemia in Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. **PLoS ONE**. v. 9, e94783, 2014.

RAHA, O.; CHOWDHURY, S.; DASGUPTA, S.; RAYCHAUDHURI, P.; SARKAR, B.N.; RAJU, P.V. *et al.* Approaches in type 1 diabetes research: A status report. **Int J Diab Dev Ctries**. v.29, p.85-101, 2009.

REN, J.; JIN, P.; WANG, E.; LIU, E.; HARLAN, D.M.; LI, X.; STRONCEK, D.F. Pancreatic islet cell therapy for type I diabetes: understanding the effects of glucose stimulation on islets in order to produce better islets for transplantation. **J Transl Med**. v.5, p.1-15, 2007.

RERUP, C.C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. **Pharmacol. Rev**. v.22, p.485-518, 1970.

ROBERTSON, R.P. Islet transplantation a decade later and strategies for filling a half-full glass. **Diabetes**. v.59, p.1285-1291, 2010.

ROBERTSON, R.P. Islet transplantation as a treatment for diabetes – A work in progress. **N Engl J Med**. v.350, p.694-705, 2004.

ROBERTSON, R.P.; DAVIS, C.; LARSEN, J.; STRATTA, R.; SUTHERLAND, D.E.R. Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. **Diabetes Care**. v.23, p.112-116, 2000.

ROINE, E.; BJORK, I.T.; OYEN, O. Targeting risk factors for impaired wound healing and wound complications after kidney transplantation. **Transplant Proc**. v.42, p.2542-2546. 2010.

RONCAROLO, M.G.; BATTAGLIA, M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. **Nat Rev Immunol**. v.7, p.585-598, 2007.

SALMINEN, K.K.; VUORINEN, T.; OIKARINEN, S.; HELMINEN, M.; SIMELL, S.; KNIP, M. *et al.* Isolation of enterovirus strains from children with preclinical Type 1 diabetes. **Diabet Med**. v.21, p.156-164, 2004.

SALVAY, D.M.; RIVES, C.B.; ZHANG, X.; CHEN, F.; KAUFMAN, D.B.; LOWE, W.L. Jr. *et al.* Extracellular matrix protein-coated scaffolds promote the reversal of diabetes after extrahepatic islet transplantation. **Transplantation**. v.85, p. 1456-1564, 2008.

SCHÄFFER, M.; BONGARTZ, M.; FISCHER, S.; PROKSCH, B.; VIEBAHN, R. Nitric oxide restores impaired healing in normoglycaemic diabetic rats. **J Wound Care**. v.16, p.311-316, 2007.

SCHILLING, J.A.; JOEL, W.; SHURLEY, H.M. Wound healing: a comparative study of the histochemical changes in granulation tissue contained in stainless steel wire mesh and polyvinyl sponge cylinders. **Surgery**. v.46, p.702-710, 1959.

SCHMID, H. New options in insulin therapy. **J Pediatr**. v.83, S146-154, 2007.

SEEBERGER, K.L.; DUFOUR, J.M.; SHAPIRO, A.M.; LAKEY, J.R.; RAJOTTE, R.V.; KORBUTT, G.S; Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium. **Lab Invest**. v.86, p.141-153, 2006.

SHESHALA, R.; PEH, K.K.; DARWIS, Y. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of insulin-loaded PLA-PEG microspheres for controlled parenteral drug delivery. **Drug Dev Ind Pharm**. v. 35 p. 1364-1374, 2009.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**. v.341, p.738-746, 1999.

STOJADINOVIC, A.; CARLSON, J.W.; SCHULTZ, G.S.; DAVIS, T.A.; ELSTER, E.A. Topical advances in wound care. **Gynecol Oncol**. v.111, S70-80, 2008.

STREIT, M.; VELASCO, P.; RICCARDI, L.; SPENCER, L., BROWN, L.F.; JANES, L. *et al.* Thrombospondin-1 suppresses wound healing and granulation tissue formation in the skin of transgenic mice. **EMBO J**. v.19, p.3272-3282. 2000.

STRONCEK, J.D.; BELL, N.; REICHERT, W.M. Instructional powerpoint presentations for cutaneous wound healing and tissue response to sutures. **J Biomed Mater Res A**. v.90, p.1230-1238, 2009.

SUTHERLAND, D.E.; GRUESSNER, R.W.; DUNN, D.L.; MATAS, A.J.; HUMAR, A.; KANDASWAMY, R. *et al.* Lessons learned from more than 1,000 pancreas transplants at a single institution. **Ann Surg.** v.233, p.463-501, 2001.

SYED, M.; JAVED, H.; YAKOOB, M.Y.; BHUTTA, Z.A. Effect of screening and management of diabetes during pregnancy on stillbirths. **BMC Public Health.** v.11, S2, 2011.

SZKUDELSKI T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the Rat pancreas. **Physiol Res.** v.50, p.536-546, 2001.

TEIXEIRA, A.S.; CALIARI, M.V.; ROCHA, O.A.; MACHADO, R.D.; ANDRADE, S.P. Aminoguanidine prevents impaired healing and deficient angiogenesis in diabetic rats. **Inflammation.** v.23, p.569-581,1999.

TROVATO, L.; DE FAZIO, R.; ANNUNZIATA, M.; SDEI, S.; FAVARO, E.; PONTI, R. *et al.* Pluripotent stem cells isolated from human amniotic fluid and differentiation into pancreatic beta-cells. **J Endocrinol Invest.** v.32, p.873-876, 2009.

TUCH, B.E.; GAO, S.Y.; LEES, J.G. Scaffolds for islets and stem cells differentiated into insulin-secreting cells. **Front Biosci.** v.19, p.126-138, 2014.

TUCH, B.E.; HUGHES, T.C.; EVANS, M.D. Encapsulated pancreatic progenitors derived from human embryonic stem cells as a therapy for insulin-dependent diabetes. **Diabetes Metab Res Rev.** v.27, p.928-932, 2011.

VOUILLARMET, J.; MAUCORT-BOULCH, D.; MICHON, P.; THIVOLET, C. Advanced glycation end products assessed by skin autofluorescence: a new marker of diabetic foot ulceration. **Diabetes Technol Ther.** v.15, p.601-605, 2013.

WALLIS, R.H.; WANG, K.; MARANDI, L.; HSIEH, E.; NING, T.; CHAO, G.Y. *et al.* (2009). Type 1 diabetes in the BB rat: a polygenic disease. **Diabetes.** v.58, p. 1007-1017, 2009

WAN, J.; XIA, L.; LIANG, W.; LIU, Y.; CAI, Q. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes delayed wound healing in diabetic rats. **J Diabetes Res.** 647107. 2013;

WAŚIKOWA, R.; BASIAK, A. Primary prevention of type 1 diabetes. Actual situation and perspectives. **Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.** v.18, p.147-152, 2012.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol Rev.** v.83, p.835-870, 2003.

WEST, I.C. Radicals and oxidative stress in diabetes. **Diabet Med.** v.7, p.171-180, 2000.

WILLIAMS, D.F. Definition in Biomaterials. Amsterdam Elsevier. **Progress in Biomedical Engineering.** Cap. 4. 1987

YANG, Y.; SANTAMARIA, P. Lessons on autoimmune diabetes from animal models. **Clin Sci (Lond).** v.110, p. 627-639, 2006.

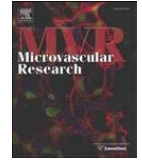
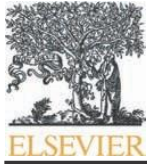
YOON, J.W.; JUN, H.S. Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes *mellitus*. **Ann N Y Acad Sci.** v.928, p.200-211, 2001.

ZHANG, L.; HONG, T.P.; HU, J.; LIU, Y.N.; WU, Y.H.; LI, L.S. Nestin-positive progenitor cells isolated from human fetal pancreas have phenotypic markers identical to mesenchymal stem cells. **World J Gastroenterol.** v.11, p.2906-2911, 2005.

ZHENG, J.M.; SONG, W.L.; TU, J.P.; FENG, G.; MO, C.B.; SHEN, Z.Y. Simultaneous pancreas-kidney transplantation in a single center: 10-year retrospective analysis. **Chin Med J.** v.124, p.683-686, 2011.

ZMUDA, E.J.; POWELL, C.A.; HAI, T. A method for murine islet isolation and subcapsular kidney transplantation. **J Vis Exp.** v.13, pii.2096, 2011.

CAPÍTULO I



Diabetes alters inflammation, angiogenesis, and fibrogenesis in intraperitoneal implants in rats



Teresa Oviedo-Socarrás^{a,b}, Anilton C. Vasconcelos^a, Irma X. Barbosa^{a,c}, Nubia B. Pereira^a,
Paula P. Campos^a, Silvia P. Andrade^{d,*}

^a Department of General Pathology - Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b University of Córdoba, Montería, Córdoba, Colombia

^c University of Tolima, Ibagué, Tolima, Colombia

^d Department of Physiology and Biophysics - Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, CEP 31270-901, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 25 February 2014

Available online 1 March 2014

ABSTRACT

The increased prevalence of diabetes worldwide is associated with increasing numbers of diabetic individuals receiving synthetic matrices and biomedical implants to repair and/or replace biological tissues. This therapeutic procedure invariably leads to adverse tissue healing (foreign body reaction), thus impairing the biomedical device function of subcutaneous implants. However, the influence of diabetes on abnormal tissue healing in intraperitoneal implants is unclear. We investigated key components of foreign body reactions in diabetic rats. Polyether-polyurethane sponge discs were placed intraperitoneally in rats previously injected with streptozotocin for induction of diabetes and in non-diabetic rats. Implants removed 10 days after implantation were assessed by determining the components of the fibrovascular tissue (angiogenesis, inflammation, and fibrogenesis). In implants from diabetic rats, fibrous capsule thickness and fibrovascular tissue infiltration (hematoxylin & eosin and picrosirius staining) were reduced in comparison with implants from non-diabetic rats. Hemoglobin (Hb) content (vascular index) and VEGF levels (pro-angiogenic cytokine) were increased after diabetes. However, the number of vessels (H&E and CD31-immunostaining) in the fibrovascular tissue from diabetic rats was decreased when compared with vessel numbers in implants from non-diabetic animals. Overall, all inflammatory parameters (macrophage accumulation-NAG activity; TNF- α and MCP-1 levels) increased in intraperitoneal implants after diabetes induction. The pro-fibrogenic cytokine (TGF β -1) increased after diabetes, but collagen deposition remained unaltered in the implants from diabetic rats. These important diabetes-related changes (increased levels of pro-inflammatory and angiogenic and fibrogenic cytokines) in peritoneal implant healing provide an insight into the mechanisms of the foreign body response in the diabetic environment in rats.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Wound healing in mammalian tissue is an essential biological response to tissue injury, responsible for maintaining of body integrity and function. Despite having obvious etiological and clinical distinctions, cutaneous or serosal injuries share common overlapping events (hemostasis, inflammation, proliferation, angiogenesis, and remodeling of the extracellular matrix). Thus, when disruption of blood vessels occurs after injury, a leakage of blood components into the wound space triggers a well-known pattern of events: platelet activation, clot formation, leukocyte recruitment, endothelial/mesothelial cell and fibroblast recruitment/activation. If the insult ceases, the cutaneous wound or peritoneal damage is repaired (Chegini, 2002; Singer and

Clark, 1999). While many phases of wound repair are common to various types of injury, a number of factors (systemic diseases, chronic inflammatory processes) can lead to healing deficiencies/alterations. In diabetes, for example, the integrity of many tissues is affected and healing of cutaneous tissue is impaired. The diabetes-associated healing impairment is characterized by a decreased inflammatory response, amount of fibrin, collagen synthesis, tensile strength, angiogenesis, and altered production of cytokines (Altavilla et al., 2001; Lerman et al., 2003; Marchant et al., 2009). Local inflammatory processes induced by implantation of biomaterials also lead to defective healing. Prolonged inflammatory signals at the site of the injury elicit fibrosis, formation of foreign body giant cells, and encapsulation of the device (Kyriakides and MacLauchlan, 2009). This adverse healing response has been shown to be present at distinct anatomical sites, including subcutaneous and intraperitoneal sites (Le et al., 2011; Mooney et al., 2010). In diabetic animals bearing subcutaneous implants,

* Corresponding author. Fax: +55 31 34092924.

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

granulation tissue and connective tissue ingrowth were reduced (Gerritsen et al., 2000; Thomson et al., 2010). However, we found no study that has investigated the influence of diabetes on key components (inflammation, angiogenesis and fibrosis) of this adverse tissue healing (peritoneal fibrosis and adhesion) after peritoneal damage or implantation of a medical device.

Here, we proposed to apply a model of peritoneal fibroproliferation induced by implantation of a synthetic matrix to characterize the effects of diabetes in healing implants (intraperitoneal foreign body reaction) in rats. In this model, the implants have been shown to adhere firmly to visceral organs (liver and/or intestines), forming an adhesion-like structure in which the assessment of relevant components of the fibrovascular tissue (angiogenesis, inflammatory cell recruitment/activation, extracellular matrix deposition) could be determined (Araújo et al., 2011; Mendes et al., 2007, 2009). Our findings have demonstrated for the first time important diabetes-related differences in the formation of fibrovascular tissue induced by a synthetic matrix located in the peritoneal cavity. Understanding the influence of diabetes on host reaction to a foreign body is critical in the development of implantable biomaterials and in the management of this reaction in healing processes within the abdominal cavity.

Materials and methods

Animals

The use of animals and procedures in the present study were approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFGM). We used male Wistar laboratory rats, weighing 300–350 g provided by Centro de Bioterismo (CEBIO) of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). The animals were housed in polypropylene cages inside a well-ventilated room, provided with chow pellets and water ad libitum and maintained under a 12-hour light/dark cycle. All animal procedures were in accordance with the standards set forth in the guidelines for the care and use of experimental animals by our local Institutional Animal Welfare Committee.

Induction of diabetes mellitus

Streptozotocin (STZ) was obtained from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. STZ was dissolved in a 10 mM citrate buffer (pH 4.5) and always prepared for immediate use within 5 to 10 min. STZ doses were determined according to the body weight of animals and were administered intravenously in a single injection of 60 mg/kg. The blood glucose level was measured before injecting STZ and subsequently every 4 days with On Call® Plus Blood Glucose Meter (ACON Laboratories, Inc.). Animals whose blood glucose level exceeded 200 mg/dl after treatment were considered diabetic.

Preparation of sponge discs and implantation

Polyether-polyurethane sponge discs, 5 mm thick × 12 mm diameter (Vitafoam Ltd, Manchester, U.K.) were used as the matrix for fibrovascular tissue growth. The sponge discs were soaked overnight in 70% ethanol and sterilized by boiling in distilled water for 30 min before the implantation surgery.

Thirteen days after STZ injection in the diabetic groups, all animals were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (60 mg/kg and 10 mg/kg, respectively). The abdominal hair was shaved and the skin wiped with 70% ethanol. The sponge discs were aseptically implanted inside the abdominal cavity through a 1 cm long ventral midline incision in the line alba of the abdomen, respectively. The incisions were closed with silk braided nonabsorbable suture. At 10 days postimplantation (23 days after induction of diabetes), the animals were anesthetized with ketamine and xylazine and later

killed by cervical dislocation. The sponge discs were carefully dissected from adherent tissue, removed and weighed. They were then processed as described below for the various assays.

Histological staining, immunohistochemistry, and morphometric analysis

The sponge implants from both groups (non-diabetic and diabetic) were fixed in 10% buffered formalin (pH 7.4) and processed for paraffin embedding. Sections with 5 mm thickness were stained with hematoxylin/eosin (H&E) and processed for light microscopic studies. Picrosirius-red staining followed by polarized-light microscopy was used to visualize and determine collagen fibers. Immunohistochemistry (IHC) reactions for the detection of endothelial cells/blood vessels were performed using the monoclonal antibody clone CD 31 (Fitzgerald MA, USA). Tissue sections (5 μm) were dewaxed and antigen retrieval was performed in citrate buffer (pH 6). The slides were boiled in citrate buffer for 25 min at 95 °C and then cooled for 1 h in the same buffer. Sections were incubated for 5 min in 3% hydrogen peroxide to quench the endogenous tissue peroxidase. Nonspecific binding was blocked by using normal goat serum for 10 min (1:10 in phosphate-buffered saline) with 1% bovine serum albumin (in phosphate-buffered saline). The sections were then immunostained with monoclonal antibody to CD31 (1:40 dilution, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) for 60 min at room temperature. After washing in Tris-HCl buffer, sections were incubated for 30 min at room temperature with biotinylated Link Universal Streptavidin-HRP (Dako; Carpinteria, CA, USA). The reactions were revealed by applying 3,3'-diaminobenzidine in chromogen solution (DAB) (Dako; Carpinteria, CA, USA). The sections were counterstained with hematoxylin and mounted in Permount (Fisher Scientific; NJ, USA). Immunostaining was performed manually, and the spleen was used as a positive control. Negative controls were carried out with omission of the primary antibody, resulting in no detectable staining. The expression of these proteins was evaluated on the basis of extent of cytoplasmic immunolabeling in endothelial cells forming lumen in six high-power fields, regardless of staining intensity (×400). The area of total collagen, capsule thickness and blood vessels were measured morphometrically.

To perform morphometric analysis of the number of blood vessels, images of cross sections obtained from 35 fields (132.043 μm²/field) were captured with a planapochromatic objective (40×) in light microscopy (final magnification = 400×). For collagen analysis and wall thickness, images were obtained from three representative fields at 20× (Final magnification = 200×).

The images were digitized through a JVC TK-1270/JCB micro-camera and transferred to an analyzer (software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Inc.). A countable vessel was defined as a structure with a lumen that may or may not contain red blood cells.

Tissue extraction and measurement of hemoglobin (Hb)

The vascularization in the sponge implants was evaluated indirectly by the amount of Hb in the tissue detected by the Drabkin method. This method has been modified and used to determine angiogenesis in various experimental models and tissues, including the sponge implant model (Araújo et al., 2011; Campos et al., 2008; Mendes et al., 2009). All implants were individually homogenized (Tekmar TR-10, Cincinnati, OH) in 5 mL of Drabkin reagent (Labtest, São Paulo, Brazil) and centrifuged at 12,000 rpm for 20 min. The supernatants were filtered through 0.22 mm filter (Millipore, São Paulo, Brazil). Hb concentration in the samples was determined spectrophotometrically by measuring absorbance at 540 nm using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader and comparing against a standard curve of Hb. The content of Hb in the implant sponge was expressed as μg Hb/mg of wet tissue.

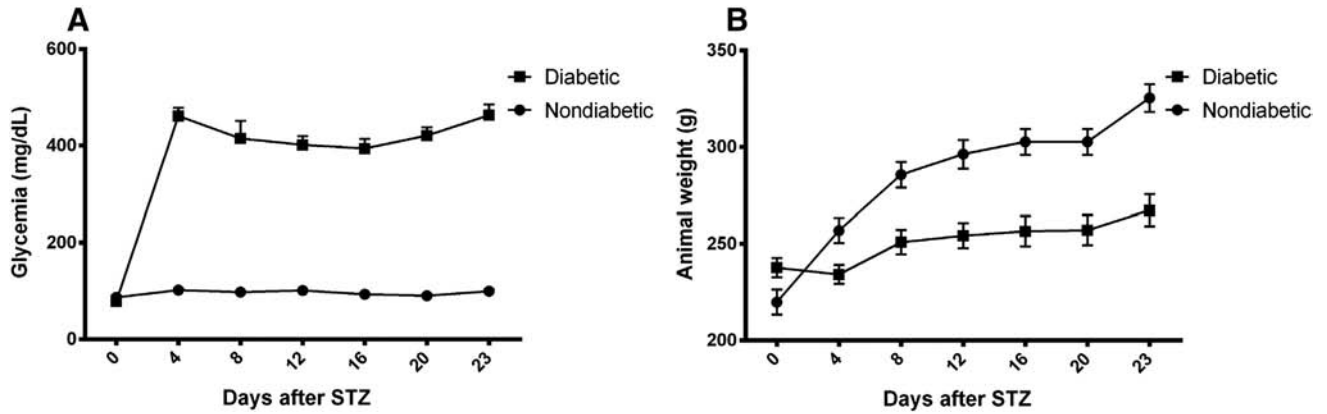


Fig. 1. Glycemic levels and body weight of non-diabetic and diabetic animals. A significant increase in blood glucose level (A) and decrease in body weight (B) was observed after streptozotocin (STZ) injection in rats compared with non-diabetic rats during the entire experiment. Data are expressed as means \pm SEM, from 11 animals in each group. *Significant difference between non-diabetic and diabetic; P \leq 0.05. Student's t-test.

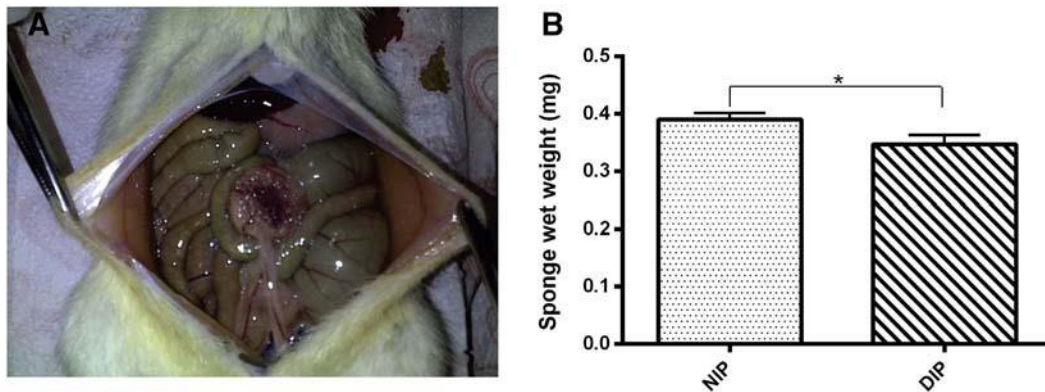


Fig. 2. Representative photograph of intraperitoneal implant in situ in rat (A) and wet weight values of implants from diabetic and non-diabetic animals removed 10 days postimplantation (B). Data are expressed as means \pm SEM from groups of 11 animals. *Significant difference between non-diabetic and diabetic; P \leq 0.05; Student's t-test. NIP, non-diabetic implant; DIP, diabetic implant.

Determination of myeloperoxidase (MPO) activity

Neutrophil infiltration in the implants was measured indirectly by assaying MPO activity as previously described (Campos et al., 2008; Ferreira et al., 2004; Mendes et al., 2007). After using the sponge implant for measurement of Hb, as indicated above, a part of the pellet was weighed and homogenized in 2 mL of pH 4.7 phosphate buffer (0.1 M NaCl, 0.02 M Na₃PO₄, 0.015 M NaEDTA, pH 4.7), and centrifuged at 12,000 \times g for 15 min. The pellet was re-suspended in

0.05 M sodium phosphate buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexa-1,6-bisdecyltrimethylammonium bromide (HTAB, Sigma). Later, the suspensions were freeze-thawed three times using liquid nitrogen and centrifuged at 10,000 \times g for 10 min. MPO activity in the supernatant samples was evaluated by quantifying the change in absorbance (optical density, OD) at 450 nm using tetramethylbenzidine (1.6 mM) and H₂O₂ (0.3 mM). The reaction was finished by adding of 50 μ l of H₂SO₄ (4 M). Results were expressed as a change in OD/mg of wet tissue.

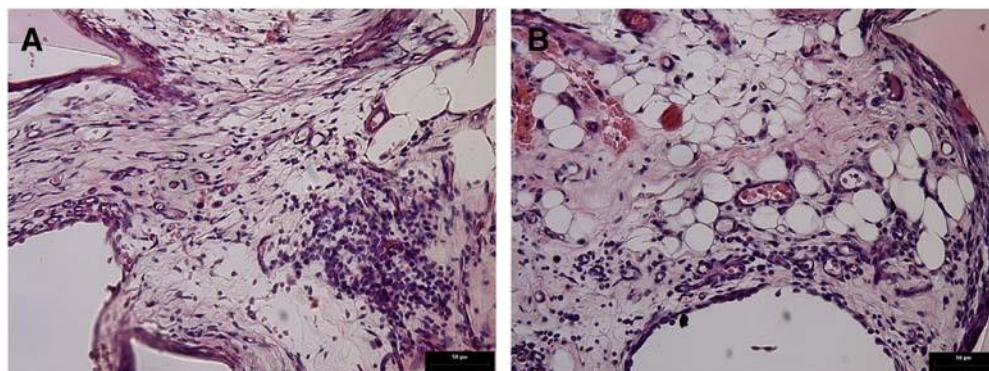


Fig. 3. Representative histological sections (5 μ m, stained with H&E) of fibrovascular tissue in 10-day old implants from non-diabetic (A) and diabetic rats (B). The pores of the sponge matrix, seen as triangular shapes, are composed of spindle-shaped fibroblasts, microvessels and inflammatory infiltrate. However, cellularity was less in implants of diabetic rats and microvessels were more dilated; bar 50 μ m.

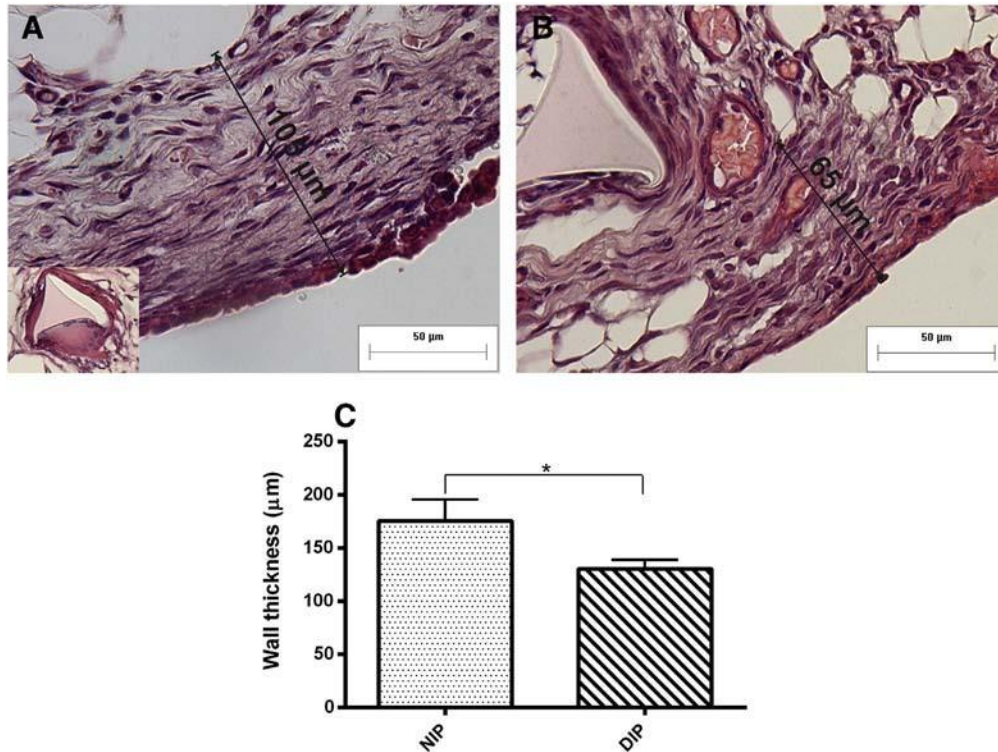


Fig. 4. Representative histological sections and analysis of wall thickness of 10-day old implants from non-diabetic (A) and diabetic (B) rats (H&E staining). Data are expressed as means \pm SEM from 27 measurements/group. *Significant difference between non-diabetic and diabetic; P b 0.05. Student's t-test. (C) NIP, non-diabetic implant; DIP, diabetic implant. Inset—foreign body giant cell; bar 50 μ m.

Determination of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) activity

The extent of mononuclear cells in the sponge implants was quantitated by measuring the levels of the lysosomal enzyme, N-acetyl-glucosaminidase (NAG) present in high levels in activated macrophages (Campos et al., 2008; Ferreira et al., 2004; Mendes et al., 2007). The implants were homogenized in 2 mL NaCl solution (0.9% w/v) containing 0.1% v/v Triton X-100 (Promega, Madison, WI) and centrifuged at 3000 rpm; 10 min at 4 °C. One hundred microliters of the supernatant was incubated for 10 min with 100 μ L of p-nitrophenyl-N-acetyl-b-D-glucosaminide (Sigma, Saint Louis, MO) prepared in citrate/phosphate buffer (0.1 M citric acid, 0.1 M Na₂HPO₄; pH 4.5) with a final concentration of 2.24 mM. The reaction was terminated by adding of 100 μ L of 0.2 M glycine buffer (pH 10.6). Hydrolysis of the substrate was determined by the color absorption at 400 nm. A

standard curve was constructed with p-nitrophenol (0–500 nmol/ml) and NAG activity was expressed as a change in nmol/mg of wet tissue.

Measurement of VEGF, TNF- α , MCP-1 and TGF- β 1 content of the sponge implants

Implants were homogenized in PBS pH 7.4 containing 0.05% Tween and centrifuged at 10,000 \times g for 30 min. The cytokines VEGF, TNF- α , MCP-1 and TGF- β 1 were measured in 100 μ L of the supernatant using Immunoassay Kits (R and D Systems, USA) and following the manufacturer's protocol. Dilutions of 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 horse-radish peroxidase-conjugated polyclonal antibody, also against the cytokine. After washing to remove any unbound antibody-enzyme

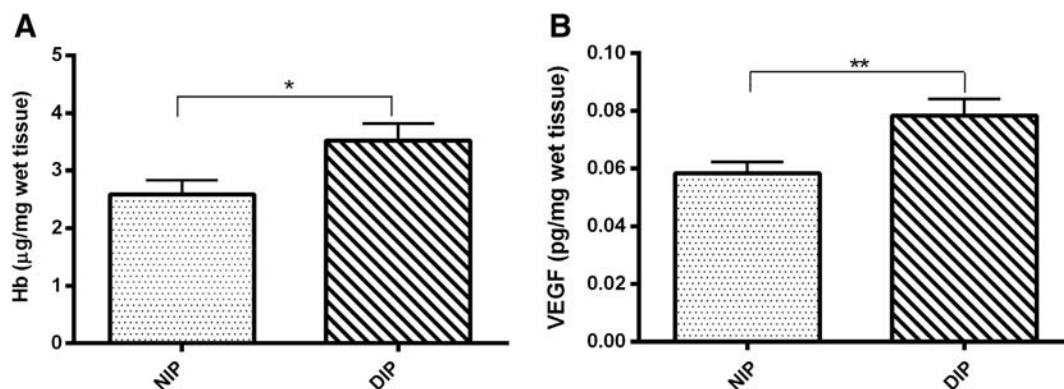


Fig. 5. Hemoglobin content (A) and VEGF levels (B) in 10-day old implants from non-diabetic and diabetic rats. Both angiogenic markers were increased after diabetes induction. Values shown are expressed as mean \pm SEM from 11 animals in each group. *Significant difference between non-diabetic and diabetic; P b 0.05. Student's t-test. NIP, non-diabetic implant; DIP, diabetic implant.

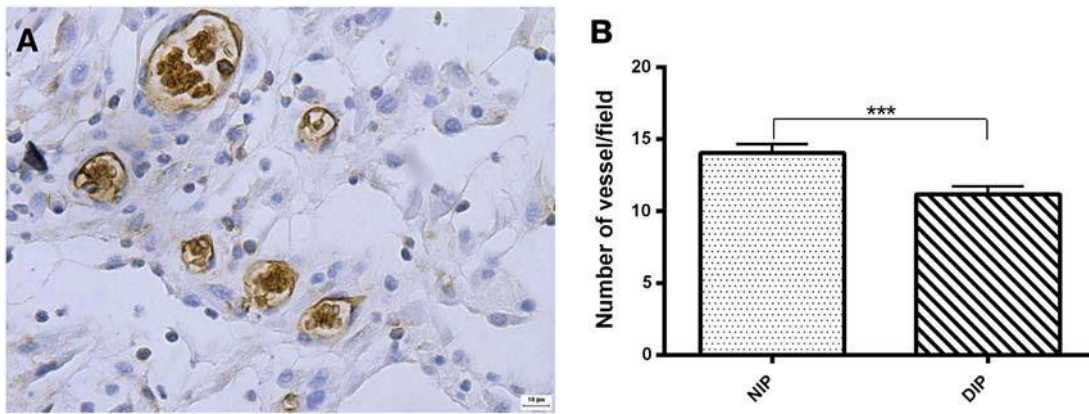


Fig. 6. Vascularization in 10-day old implants of non-diabetic and diabetic rats. CD31-immunostained sections (A). Morphometric analysis showed decreased number of vessels in implants from diabetic compared with non-diabetic rats (B). Values shown are expressed as mean \pm SEM from 105 fields/group; 3 animals in each group. *Significant difference between non-diabetic and diabetic; P b 0.05. Student's t-test. NIP, non-diabetic implant; DIP, diabetic implant.

reagent, a substrate solution (50 μ L of a 1:1 solution of hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine 10 mg/ml in DMSO) was added to the wells. The color development was stopped after 20 min incubation, with 2 N sulfuric acid (50 μ L) and the intensity of the color was measured at 540 nm on a spectrophotometer (E max – Molecular Devices). Standards were 0.5- \log_{10} dilutions of recombinant murine cytokines from 7.5 pg/ml to 1000 pg/ml (100 μ L). The results were expressed as a picogram of cytokine/mg of wet tissue.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SEM. The assumptions of normality and homoscedasticity were determined for subsequent statistical

analysis. Comparisons between two groups (non-diabetic and diabetic groups) were performed using Student's t-test for unpaired groups. P b 0.05 was considered significant.

Results

A single intravenous injection of streptozotocin (60 mg/kg) rendered the rats diabetic with blood glucose levels at 425.8 ± 12 mg/dl 5 days after the treatment, which remained unaltered for the entire experimental period (23 days). The body weight of diabetic animals was affected by the diabetogenic treatment. At the beginning of the experiment, the mean weight of the animals was 229 ± 4.4 g. Twenty-three days after the diabetogenic treatment, the animals

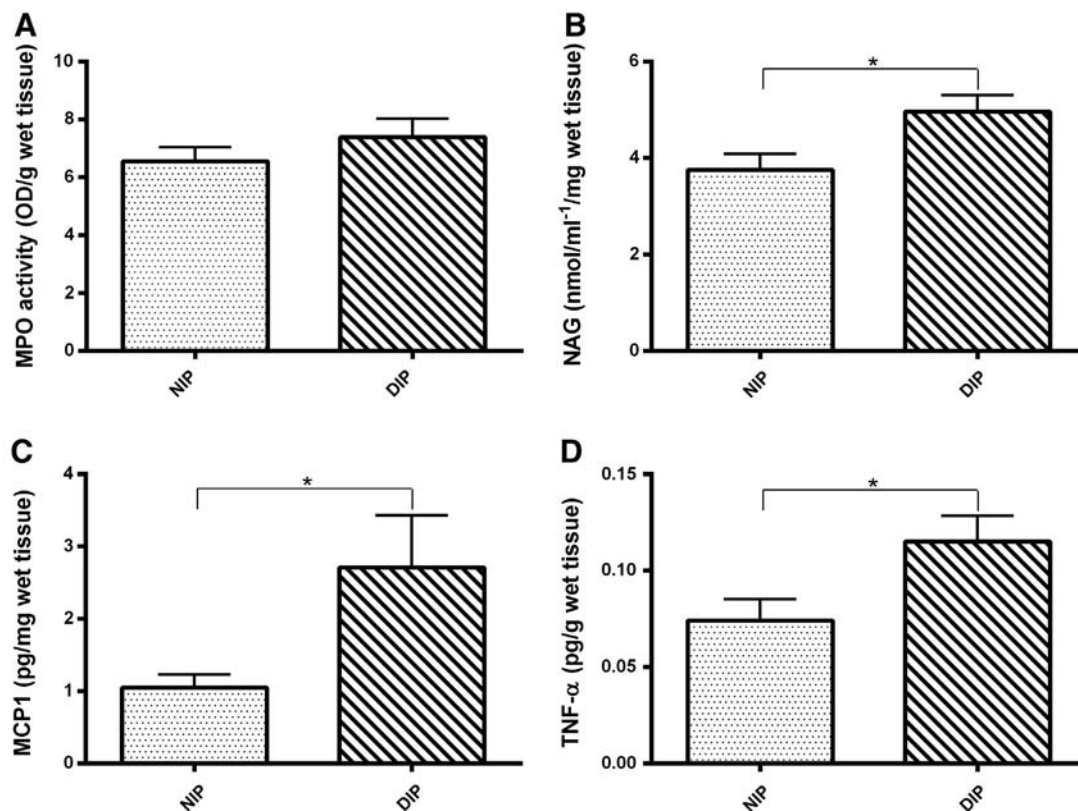


Fig. 7. Markers of inflammation in 10-day old implants from non-diabetic (A) and diabetic (B) rats. An overall increase in the inflammatory reaction was observed after diabetes induction. (MPO – myeloperoxidase (A); NAG – n-acetyl- β -D-glucosaminidase (B); MCP-1 (C) and TNF- α (D). Values shown are expressed as mean \pm SEM from 11 animals in each group. *Significant difference between non-diabetic and diabetic; P b 0.05. Student's t-test. NIP, non-diabetic implant; DIP, diabetic implant.

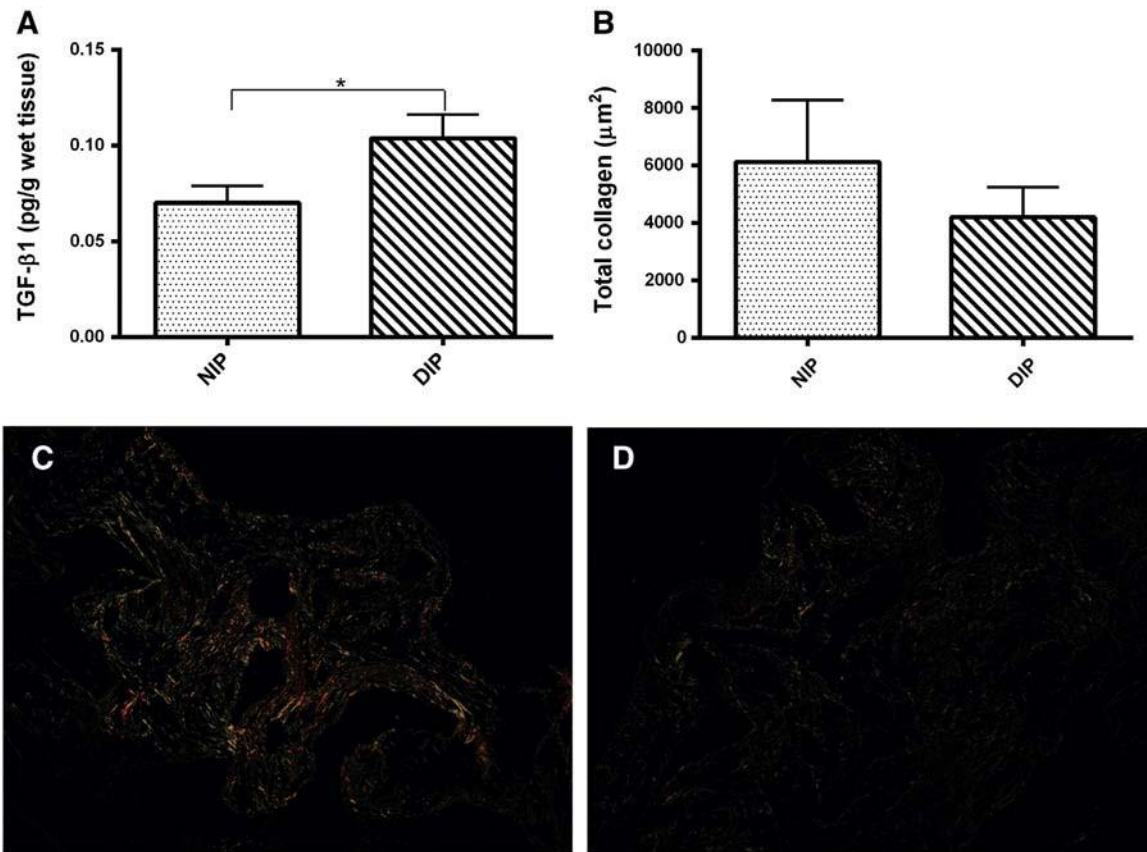


Fig. 8. Markers of fibrogenesis in 10-day old implants from non-diabetic and diabetic rats. The levels of TGFβ1 were increased in implants of diabetic rats compared with that of non-diabetic (A). The amount of collagen, B) was similar in both groups, but after diabetes green collagen (type 3) was predominant in the implants. Representative histological sections (5 μm; picrosirius-red staining) of implants from non-diabetic and diabetic rats showing distinct types of collagen in both implants (C and D). Values shown are expressed as mean ± SEM from 6 animals in each group. *Significant difference between non-diabetic and diabetic; P b 0.05. Student's t-test. NIP, non-diabetic implant; DIP, diabetic implant.

weighed 267 ± 8.3 g and the control animals gained 96.3 g (325 ± 7) (Figs. 1A and B).

Gross appearance and histological examination of sponge implants

Macroscopically, no signs of rejection were observed at the site of implantation in diabetic and non-diabetic rats. Representative images of intraperitoneal implants revealed that the synthetic matrix was integrated to the surrounding tissue forming an adhesion-like tissue between the intestine and the implant (Fig. 2A). The wet weight of the implants decreased after diabetes (Fig. 2B). Histological sections of intraperitoneal implants of diabetic and non-diabetic rats evidenced the induction of a fibrovascular response, causing the synthetic sponge matrix to be filled with fibrovascular tissue (H&E staining). The granulation tissue was composed of spindle-shaped fibroblasts, microvessels, and dense inflammatory infiltrate (Figs. 3A and B). In implants from diabetic rats, decreased cellularity was seen (Fig. 3B). Because fibrous capsule formation is a hallmark of foreign body reaction, we measured this parameter in implants from diabetic and non-diabetic animals. The thickness of the capsule in implants of non-diabetic rats was 175.8 ± 20 μm, after diabetes it was reduced to 130.8 ± 8 μm (Figs. 4A-C).

Measurement of angiogenesis

Quantitative measurement of angiogenesis was performed by hemoglobin content, VEGF levels and by the number of vessels (H&E stained and CD31-immunostained sections). Diabetogenic treatment was able to increase the amount of hemoglobin and VEGF levels

intra-implant in comparison with the values of implants from non-diabetic animals (Figs. 5A and B). Conversely, the number of vessels was decreased in implants from diabetic rats when compared with that of non-diabetic animals (Figs. 6A and B).

Inflammation in sponge implants

Several measurements of the inflammatory component of the implants (inflammatory enzyme activities and pro-inflammatory cytokines) were performed. As shown in Figs. 7A-D, there were diabetes-related differences in leukocyte recruitment/activation in these parameters in 10-day old implants. In implants from diabetic rats, NAG activity, TNF-α and MCP-1 levels were increased when compared with the implants from non-diabetic rats.

Measurement of TGFβ1 levels and total collagen deposition

Fibrogenesis is an important mechanism of wound healing and this was measured by the cytokine TGF-β1 levels and total area of collagen (μm²) in the sponge implants (picrosirius staining). A significant increase in TGF-β1 levels intra-implant was observed after diabetes in comparison with the levels in implants from non-diabetic rats. Although collagen deposition decreased in implants from diabetic rats, the drop did not reach statistical significance (Figs. 8A-D).

Discussion

We have studied the influence of diabetes on intraperitoneal injury induced by implantation of synthetic matrix in rats. Implantation of

medical devices has been widely used to repair and/or replace biological tissues but, invariably, a collagenous fibrous capsule confines the implanted device, preventing it from interacting with surrounding tissues. This unwanted reaction compromises the efficiency of the im- planted material leading to device failure (Kyriakides and Bornstein, 2003; Le et al., 2011; Morais et al., 2010). Much has been reported on the skin healing deficiencies in diabetes, but information is scarce on internal wound healing parameters in individuals with this condition (Le et al., 2011). By studying the inflammatory, angiogenic, and fibro- genic components of the tissue induced by polyether-polyurethane implants located intraperitoneally, we have been able to disclose that the diabetic environment greatly altered the healing response (foreign body reaction) in most of the parameters that were analyzed.

Fibroproliferative tissue infiltration (wet weight, fibrous capsule formation, and cellularity) was decreased by diabetes. In one study that investigated subcutaneous implants in diabetic baboons, reduced granulation tissue formation was observed (Gerritsen et al., 2000; Thomson et al., 2010). However, we are not aware of any systematic study that evaluated intraperitoneal implant healing in diabetes. It has been pointed out that studies that focus on the diabetic response to biomedical devices are essential to improving implant performance in these individuals since, in this medical condition, tissue replacement/implantation is likely to occur (Le et al., 2011).

Decreased numbers of vessels were observed in implants from dia- betic rats (H&E stained sections and in CD31-immunostained sections) when compared with implants from non-diabetic rats, contrasted with an increased amount of Hb and VEGF levels in the former implants. Decreased angiogenesis has been demonstrated in cutaneous wound healing in diabetes and in subcutaneous implants of diabetic rats and was associated with decreased levels of VEGF (Altavilla et al., 2001; Teixeira et al., 1999). However, rather than decreasing, the VEGF levels in our implants increased. Thus, it is likely that the high amount of Hb resulted from the VEGF's well-known vasodilator effect. It may be relevant to point out that the significant activation of macrophages (NAG activity) of the peritoneal implants may have contributed to increased production of this growth factor, since these activated cells produce a number of molecules, including VEGF (Miao et al., 2012; Raggi et al., 2013).

We measured four markers of inflammation (MPO, NAG, and two cytokines, TNF- α and MCP-1), which were generally augmented by diabetes. Interestingly, deficient inflammation is a normal response in dermal tissue in diabetes (Gimeno et al., 2003; Gu et al., 2013). Thus, in- creased inflammation observed in intraperitoneal implants from diabet- ic animals is a novel finding. However, an increase in inflammatory cells (40%) when compared with subcutaneous devices was seen around the percutaneous implants from diabetic animals (Gerritsen et al., 2000). Therefore, the inflammatory process in the diabetic environment differs among tissues at distinct anatomical locations.

Stromal fibrovascular tissue is regulated by complex interactions of pro and anti-fibrogenic proteins within the inflammatory tissue. TGF- β 1 is a key pro-fibrogenic cytokine that induces differentiation of fibroblasts into myofibroblasts which, in turn, synthesize collagen (Bonniaud et al., 2005; Leask and Abraham, 2004). We found increased levels of TGF- β 1 and altered maturation of collagen in intraperitoneal implants after diabetes. It is possible that an increased pro-fibrogenic cytokine level was an attempt to stimulate intraperitoneal implants to improve collagen deposition/type in the implant compartment.

Our findings show for the first time that intraperitoneal implantation of synthetic matrix in diabetic rats modifies the adverse intraperitoneal healing response (foreign body reaction)

observed in non-diabetic animals. This was evidenced by increased inflammation and cytokine production, decreased angiogenesis, and by affecting collagen matura- tion intra-implant. These results may be relevant in the development of implantable biomaterials and the management of this reaction in the abdominal cavity's healing processes in a diabetic environment.

Acknowledgments

This work was supported by Grants from, CAPES, CNPq, FAPEMIG-Brazil.

References

- Altavilla, S., Saitta, A., Cucinotta, D., et al., 2001. Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* 50, 667-674.
- Araújo, F.A., Rocha, M.A., Ferreira, M.A., et al., 2011. Implant-induced intraperitoneal inflammatory angiogenesis is attenuated by fluvastatin. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 38, 262-268.
- Bonniaud, P., Margetts, P.J., Ask, K., et al., 2005. TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *J. Immunol.* 175, 5390-5395.
- Campos, P.P., Baakhe, Y.S., Andrade, S.P., 2008. Mechanisms of wound healing responses in lupus-prone New Zealand white mouse strain. *Wound Repair Regen.* 16, 416-424.
- Chegini, N., 2002. Peritoneal molecular environment, adhesion formation and clinical implication. *Front. Biosci.* 7, e91-e115.
- Ferreira, M.A., Barcelos, L.S., Campos, P.P., et al., 2004. Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO). *Br. J. Pharmacol.* 141, 1185-1192.
- Gerritsen, M., Lutterman, J.A., Jansen, J.A., 2000. The influence of impaired wound healing on the tissue reaction to percutaneous devices using titanium fiber mesh anchorage. *J. Biomed. Mater. Res.* 52, 135-141.
- Gimeno, M.J., García-Esteo, F., García-Hondurilla, N., et al., 2003. A novel controlled drug-delivery system for growth hormone applied to healing skin wounds in diabetic rats. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 14, 821-835.
- Gu, X.Y., Shen, S.E., Huang, C.F., et al., 2013. Effect of activated autologous monocytes/macrophages on wound healing in a rodent model of experimental diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 102, 53-59.
- Kyriakides, T.R., Bornstein, P., 2003. Matricellular proteins as modulators of wound healing and the foreign body response. *Thromb. Haemost.* 90, 986-992.
- Kyriakides, T.R., Maclauchlan, S., 2009. The role of thrombospondins in wound healing, ischemia, and the foreign body reaction. *J. Cell. Commun. Signal.* 3, 215-225.
- Le, N.N., Rose, M.B., Levinson, H., et al., 2011. Implant healing in experimental animal models of diabetes. *J. Diabetes Sci. Technol.* 5, 605-618.
- Leask, A., Abraham, D.J., 2004. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 18, 816-827.
- Lerman, O.Z., Galiano, R.D., Armour, M., et al., 2003. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblasts: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, response to hypoxia. *Am. J. Pathol.* 162, 303-312.
- Marchant Jr., M.H., Viens, N.A., Cook, C., et al., 2009. The impact of glycemic control and diabetes mellitus on perioperative outcomes after total joint arthroplasty. *J. Bone Joint Surg. Am.* 91, 1621-1629.
- Mendes, J.B., Campos, P.P., Ferreira, M.A., et al., 2007. Host response to sponge implants differs between subcutaneous and intraperitoneal sites in mice. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 83, 408-415.
- Mendes, J.B., Rocha, M.A., Araújo, F.A., et al., 2009. Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. *Microvasc. Res.* 78, 265-271.
- Miao, M., Niu, Y., Xie, T., et al., 2012. Diabetes impaired wound healing and altered macrophage activation: a possible pathophysiologic correlation. *Wound Repair Regen.* 20, 203-213.
- Mooney, J.E., Rolfe, B.E., Osborne, G.W., et al., 2010. Cellular plasticity of inflammatory myeloid cells in the peritoneal foreign body response. *Am. J. Pathol.* 176, 369-380.
- Morais, J.M., Papadimitrakopoulos, F., Burgess, D.J., 2010. Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response. *AAPS J.* 12, 188-196.
- Raggi, F., Blengio, F., Eva, A., et al., 2013. Identification of CD300a as a new hypoxia-inducible gene and a regulator of CCL20 and VEGF production by human monocytes and macrophages. *Innate Immun.* <http://dx.doi.org/10.1177/1753425913507095> ([Epub ahead of print]).
- Singer, A.J., Clark, R.A., 1999. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 341, 738-746.
- Teixeira, A.S., Caliar, M.V., Rocha, O.A., et al., 1999. Aminoguanidine prevents impaired healing and deficient angiogenesis in diabetic rats. *Inflammation* 23, 569-581.
- Thomson, S.E., McLennan, S.V., Hennessy, A., 2010. A novel primate model of delayed wound healing in diabetes: dysregulation of connective tissue growth factor. *Diabetologia* 53, 572-583.

CAPÍTULO II

Title: Foreign Body Response to Subcutaneous Implants in Diabetic Rats

Running title: Foreign body response in diabetes

Teresa Oviedo-Socarrás^{1,2}, Anilton C. Vasconcelos¹, Paula C. Campos¹, Nubia B. Pereira¹, Jessica P.C. Souza¹, Silvia P. Andrade^{3*}

¹Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Brazil; ²Department of Livestock Sciences, University of Córdoba, Colombia; ³Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Mailing address. Dr. Silvia P. Andrade. Federal University of Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel.: 55+31+34092958, Fax: +55 31 34092924.

E-mail: andrades@icb.ufmg.br.

Abstract

Implantation of synthetic matrices and biomedical devices in diabetic individuals has become a common procedure to repair and/or replace biological tissues. However, an adverse foreign body reaction that invariably occurs adjacent to implant devices impairing their function is poorly characterized in the diabetic environment. We investigated the influence of this condition on the abnormal tissue healing response in implants placed subcutaneously in normglycemic and streptozotocin-induced diabetes in rats. In polyether-polyurethane sponge discs removed 10 days after implantation, the components of the fibrovascular tissue (angiogenesis, inflammation, fibrogenesis, and apoptosis) were assessed. Intra-implant levels of hemoglobin and vascular endothelial growth factor were not different after diabetes when compared with normglycemic counterparts. However, there were a lower number of vessels in the fibrovascular tissue from diabetic rats when compared with vessel numbers in implants from non-diabetic animals. Overall, the inflammatory parameters (neutrophil accumulation - myeloperoxidase activity, tumor necrosis factor alpha, and monocyte chemotactic protein-1 levels and mast cell counting) increased in subcutaneous implants after diabetes induction. However, macrophage activation (N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity) was lower in implants from diabetic rats when compared with those from normoglycemic animals. All fibrogenic markers (transforming growth factor beta 1 levels, collagen deposition, fibrous capsule thickness, and foreign body giant cells) decreased after diabetes, whereas apoptosis (TUNEL) increased. Our results showing that hyperglycemia down regulates the main features of the foreign body reaction induced by subcutaneous implants in rats may be relevant in understanding biomaterial integration and performance in diabetes.

Key words: angiogenesis; diabetes; foreign body response; implants; inflammation.

Introduction

The foreign body response refers to the non-specific immune response to implanted foreign materials [1-2]. It results from persistent inflammatory stimuli, such as the presence of implant devices in which a series of cellular alterations such as continuous inflammation are mediated by the various cell lineages. In this inflamed environment, macrophages, lymphocytes, mast cells, and their granular products contribute to the formation of foreign body giant cells (multinucleated fused macrophages) and the development of a dense layer of fibrotic connective tissue which is detrimental to the implants' function, safety, and biocompatibility [1-4]. In an experimental model of foreign body reaction induced by polyether-polyurethane sponge implants in normoglycemic animals, we have characterized a series of overlapping events, such as leukocyte/mast cell recruitment, angiogenesis, fibrogenesis, apoptosis, and the formation of foreign body giant cells [5-6]. All these features that vary in intensity and severity depending on the nature of the implanted material, characterize the host response to foreign materials in a number of different studies [4,7]. Thus, while much is known about the foreign body reaction to indwelling medical devices in normoglycemic experimental animals, there is little information on the diabetic body's response to injury inflicted by internal implants [8]. This is despite the fact that complications associated with the diabetes often require implantable devices such as glucose sensors, orthopedic implants, catheter, vascular grafts, drug-eluting stents, artificial organs, biosensors, scaffolds for tissue engineering, heart valves, and others [9]. In one study involving diabetic baboons bearing polystyrene subcutaneous implants, the inflammatory cell response, granulation tissue, and connective tissue ingrowth were shown to be reduced [10]. Similarly, delayed in matrix maturation and angiogenesis and higher numbers of inflammatory cells in titanium fiber mesh were seen around percutaneous implants in diabetic rabbits [11].

However, the prevalence of diabetes and the potential number of individuals that will need indwelling medical devices warrant further investigation to determine to what extent the diabetes state modifies the features of foreign body reaction. Therefore, we investigated the influence of hyperglycemia in the inflammatory cells recruitment/activation, neovascularization, apoptosis, foreign body giant cell, and fibrous capsule induced by synthetic matrix implanted subcutaneously in rats. We have shown that the pattern of the reaction to the synthetic polyether-polyurethane matrix differs in important ways between diabetic and non-diabetic rats.

Materials and Methods

Ethics Statement

The use of animals and procedures for this study was approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation (CETEA) of Federal University of Minas Gerais, (protocol number 176/11). All surgery was performed under ketamine and xylazine anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

Animals

We used male Wistar laboratory rats weighing 300-350 g provided by Centro de Bioterismo (CEBIO) of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). The animals were housed in polypropylene cages inside a well-ventilated room, provided with chow pellets and water *ad libitum* and maintained under a 12-hour light/dark cycle. All animal procedures were in accordance with the standards set forth in the guidelines for the care and use of experimental animals by our local Institutional Animal Welfare Committee.

Induction of Diabetes *Mellitus*

Streptozotocin (STZ) was obtained from Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA. STZ was dissolved in 10 mM citrate buffer (pH 4.5) and always prepared for immediate use within 5 to 10 min. STZ doses were determined according to the animals' body weight and were administered intravenously in a single 60-mg/kg injection. The blood glucose level was measured before injection and subsequently every 4 days with On Call® Plus Blood Glucose Meter (ACON Laboratories, Inc. San Diego CA, USA). Animals whose blood glucose level exceeded 200 mg/dl after treatment were considered diabetic.

Preparation of sponge discs and implantation.

Polyether–polyurethane sponge discs, 5mm thick x 12mm diameter (Vitafoam Ltd, Manchester, U.K.) were used as the matrix for fibrovascular tissue growth. The sponge discs were soaked overnight in 70% ethanol and sterilized by boiling in distilled water for 30 min prior to the implantation surgery.

Thirteen days after STZ injection in the diabetic groups, all animals were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (60 mg/kg and 10 mg/kg, respectively). The dorsal hair was shaved and the exposed skin wiped with 70% ethanol. The sponge discs were aseptically implanted into a subcutaneous pouch through a 1 cm long dorsal mid-line incision. The incisions were closed with a silk braided nonabsorbable suture.

At 10 days post implantation (23 days after diabetes induction), the animals were anesthetized with ketamine and xylazine and later killed by cervical dislocation. The sponge discs were carefully dissected from the adherent tissue, removed, and weighed. They were then processed as described below and subjected to several assays.

Tissue extraction and hemoglobin (Hb) measurement

Sponge implant vascularization was evaluated indirectly by the amount of Hb in the tissue detected by the Drabkin method. This method has been modified and used to determine angiogenesis in various experimental models and tissues, including the sponge implant model [6,12-13]. All implants were individually homogenized (Tekmar TR-10, Cincinnati, OH) in 5 mL of Drabkin reagent (Labtest, São Paulo, Brazil) and centrifuged at 12.000 rpm for 20 min. The supernatants were filtered through a 0.22 mm filter (Millipore, São Paulo, Brazil). Hb concentration in the samples was determined spectrophotometrically by measuring absorbance at 540nm using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader and compared against a standard Hb curve. The Hb content in the implant sponge was expressed as $\mu\text{g Hb/mg}$ of wet tissue.

Determination of myeloperoxidase (MPO) activity

Neutrophil infiltration in the implants was measured indirectly by assaying MPO activity as previously described [14]. After using the sponge implant for Hb measurement, a part of the pellet was weighed and homogenized in 2 mL of pH 4.7 phosphate buffer (0.1 M NaCl, 0.02 M Na_3PO_4 , 0.015 M NaEDTA, pH 4.7), and centrifuged at 12,000 x g for 15 min. The pellet was resuspended in 0.05M sodium phosphate buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexa-1,6-bisdecyltrimethylammonium bromide (HTAB, Sigma Chemical Co., USA). Afterwards, the suspensions were freeze-thawed three times using liquid nitrogen and centrifuged at 10,000 x g for 10 min. MPO activity in the supernatant samples was evaluated by quantifying the change in absorbance (optical density, OD) at 450 nm using tetramethylbenzidine (1.6 mM) and H_2O_2 (0.3 mM). The reaction was ended by adding 50 μl of H_2SO_4 (4M). Results were expressed as a change in OD/mg of wet tissue.

Determination of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) activity

The extent of mononuclear cells in the sponge implants was quantitated by measuring the levels of the lysosomal enzyme, N-acetyl-glucosaminidase (NAG), present in high levels in activated macrophages [12,15-16]. The implants were homogenized in 2 mL NaCl solution (0.9% w/v) containing 0.1% v/v Triton X-100 (Promega, Madison, WI) and centrifuged at 3000 rpm; 10 min at 4°C. One hundred μ l of the supernatant was incubated for 10 min with 100 μ l of p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (Sigma, Saint Louis, MO) prepared in citrate/phosphate buffer (0.1 M citric acid, 0.1 M Na₂HPO₄; pH 4.5) with a final concentration of 2.24 mM. The reaction was terminated by the adding 100 μ l of 0.2 M glycine buffer (pH 10.6). Hydrolysis of the substrate was determined by the color absorption at 400 nm. A standard curve was constructed with *p*-nitrophenol (0-500 nmol/ml) and NAG activity was expressed as a change in nmol/mg of wet tissue.

Measurement of VEGF, TNF- α , MCP-1, and TGF- β 1 content of the sponge implants

Implants were homogenized in PBS pH 7.4 containing 0.05% Tween and centrifuged at 10,000 x *g* for 30 min. The cytokines vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), and Transforming growth factor beta (TGF- β 1) were measured in 100 μ l of the supernatant using Immunoassay Kits (R and D Systems, USA) and following the manufacturer's protocol. Dilutions of cell-free supernatants were added to ELISA plates coated with a specific murine monoclonal antibody against cytokine, followed by adding a second horseradish peroxidase-conjugated polyclonal antibody against cytokine. After washing to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution (50 μ L of a 1:1 solution of hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine 10mg/ml in DMSO) was added to the wells. Color development was stopped after 20 min incubation with 2N sulphuric acid (50 μ L) and color intensity was

measured at 540 nm on a spectrophotometer (E max – Molecular Devices). Standards were 0.5-log₁₀ dilutions of recombinant murine cytokines from 7.5 pg/ml to 1000 pg/ml (100 µl). The results were expressed as picogram of cytokine/mg of wet tissue.

Histological staining, immunohistochemistry, and morphometric analysis.

The sponge implants from both groups (non-diabetic and diabetic) were fixed in 10% buffered formalin, pH 7.4, and processed for paraffin embedding. Sections with a thickness of 5 mm were stained with hematoxylin/eosin (H&E) and Dominici for light microscopic studies. Picrosirius-red staining followed by polarized-light microscopy was used to visualize and identify collagen fibers. The presence of apoptosis was investigated by TUNEL (TdT mediated dUTP nick end labeling) in histological sections, with a thickness of 5 µm, using a commercial kit (TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Cat QIA33; Calbiochem, San Diego, CA, USA) to identify cells in apoptosis in marked terminal fragments of DNA (portion 3'-OH), associated with the characteristically fragmented nuclear DNA, allowing the morphological identification of cells undergoing apoptosis. The method was applied according to the manufacturer's instructions.

Immunohistochemistry (IHC) reactions for the detection of endothelial cells/blood vessels were performed using the monoclonal antibody clone CD 31, (Fitzgerald MA, USA). Tissue sections (5 µm) were dewaxed and antigens retrieved from the citrate buffer (pH 6). The slides were boiled in the citrate buffer for 25 minutes at 95°C and then cooled for 1 hour in the same buffer. Sections were incubated for 5 min in 3% hydrogen peroxide to quench endogenous tissue peroxidase. Nonspecific binding was blocked by using normal goat serum for 10 minutes (1:10 in phosphate-buffered saline) with 1% bovine serum albumin (in phosphate-buffered saline). The sections were then immunostained with monoclonal antibody to CD31 (1:40 dilution, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) for 60 min at room

temperature. After washing in Tris–HCl buffer, sections were incubated for 30 min at room temperature with biotinylated Link Universal Streptavidin- HRP (Dako; Carpinteria, CA, USA). The reactions were revealed by applying 3,3'-diaminobenzidine in chromogen solution (DAB) (Dako; Carpinteria, CA, USA). The sections were counterstained with hematoxylin and mounted in Permount (Fisher Scientific; NJ, USA). Immunostaining was performed manually, and the spleen was used as a positive control. Negative controls were carried out by omitting the primary antibody, resulting in no detectable staining. The expression of these proteins was evaluated on the basis of the extent of cytoplasmic immunolabeling in endothelial cells forming lumen in six high-power fields, regardless of staining intensity ($\times 400$).

The number of blood vessels and giant cells, area of total collagen, capsule thickness, and number of mast cells and apoptotic cells were evaluated morphometrically. To perform the morphometric analysis, images of cross sections were obtained from 35 fields for the number of blood vessels, and 20 fields for the number of mast cells, apoptotic cells, and giant cells. The images were captured with a planapochromatic objective (40x) in light microscopy (final magnification = 400x). For collagen analysis and wall thickness, images were obtained from three representative fields at 20x (final magnification = 200x). The images were digitized through a JVC TK-1270/JCB microcamera and transferred to an analyzer (software Image-Pro Plus 4.5, Media Cybernetics, Inc. Silver Spring, MD, USA). A countable vessel was defined as a structure with a lumen whether or not it contained red blood cells.

Statistics

Results are presented as mean \pm SEM. The assumptions of normality and homoscedasticity were determined for subsequent statistical analysis. Comparisons between the two groups (non-diabetic and diabetic groups) were made using Student's t-test or Mann-Whitney for

unpaired groups. $P < 0.05$ was considered significant. Analysis of the data was carried out using the GraphPad Prism program 6.0 version (La Jolla, CA, USA).

Results

A single intravenous injection of streptozotocin (STZ) (60 mg/kg) rendered the rats diabetic with blood glucose levels at 425.8 ± 12 mg/dl five days after the treatment, which remained unaltered for the entire experimental period (23 days). The body weight of diabetic animals was affected by the diabetogenic treatment. At the beginning of the experiment, the mean weight of the animals was 229 ± 4.4 g. Twenty-three days after the diabetogenic treatment, the animals weighed 267 ± 8.3 g and the control animals gained 96.3 g (325 ± 7) (Table 1). Macroscopically, no signs of rejection were observed at the implantation site in diabetic and non-diabetic rats.

Histological examination of sponge implants

In histological sections of the implants (H&E), the synthetic matrix induced the formation of a fibrovascular tissue that differed in important ways between implants from diabetic and non-diabetic rats. In normglycemic rats, the granulation tissue that filled the subcutaneous matrix was composed of spindle-shaped fibroblasts, microvessels, and a dense inflammatory infiltrate containing macrophages, neutrophils, and foreign body giant cells embedded in an extracellular matrix. However, in implants from diabetic rats, the connective tissue was immature with little matrix deposition. A lower number of blood vessels and cellularity was observed when compared with implants from non-diabetic animals. One striking difference between both implants was the vasodilation observed in the microvasculature in the hyperglycemic environment when compared with that in normglycemic rats (Fig. 1A-H).

Measurement of angiogenesis

The diabetogenic treatment did not alter the amount of Hb in the implant or the levels of VEGF (a potent proangiogenic factor). However, the number of vessels, as determined in H&E stained sections and confirmed by CD31- immunostained sections, were lower in implants from diabetic rats (Fig. 2A-D).

Inflammation in sponge implants

Several measurements of the inflammatory component of the implants (inflammatory enzyme activities and pro-inflammatory cytokines and mast cell index) were made. As shown in Fig. 3A-D, there were diabetes-related differences in leukocyte recruitment/activation in these parameters in 10-day old implants. In subcutaneous implants from non-diabetic rats, MPO activity, TNF- α , and MCP-1 levels were lower when compared with the values in implants from diabetic animals. NAG activity was higher in implants from non-diabetic animals than in diabetic rats. An increased number of mast cells (Dominici staining) was detected in implants from diabetic rats when compared with the number in implants from normoglycemic animals (Fig. 3E). Representative photomicrographs of mast cells in both groups are shown in Fig. 3F and 3G.

Measurement of TGF β 1 levels and total collagen deposition

Fibrogenesis as an important wound healing and repair mechanism was measured by the cytokine TGF- β 1 levels and total area of collagen (μm^2) in the sponge implants (Picrossirius staining). A significant decrease in both parameters was observed in implants from diabetic when compared with that from non-diabetic rats (Fig. 4A – D).

Apoptosis in sponge implants

In sponge sections stained with TUNEL, the number of positive cells was clearly higher in implants from diabetic rats than it was in normoglycemic rats (Fig. 5A). Representative photomicrograph of apoptotic cells are presented in Fig. 5B and 5C. Dark-brown TUNEL positive nuclei with other morphological features of cellular death (apoptotic bodies, cellular shrinkage, and condensed chromatin) are clearly marked.

Histological examination of the implant fibrous capsule and foreign body giant cells

One of the most striking differences between the implants from normglycemic and hyperglycemic animals was the thickness of the capsule. In implants from non-diabetic rats, the thickness was $294.5 \pm 18.5 \mu\text{m}$ versus $169.4 \pm 10.8 \mu\text{m}$ in implants from diabetic animals (Fig. 6A-C). Similarly, a decrease in the number of foreign body giant cells in implants from diabetic animals was observed when compared with those from non-diabetic animals (Fig. 6D-F).

Discussion

Implantation of devices or biomaterials triggers a series of host reactions at the injury site that include interactions material/tissue, provisional matrix formation, acute and chronic inflammation, granulation tissue development, foreign body reaction, and fibrosis and fibrous capsule development [2,7]. Invariably, this foreign body reaction affects the implanted material's efficiency, leading to device failure [4,8,17]. Much of the knowledge on this adverse healing following biomaterial implantation has come from normglycemic individuals, despite the fact that complications associated with diabetes often requires implantable devices such as glucose sensors, orthopedic implants, catheter, vascular grafts, drug-eluting stents, artificial organs, biosensors, scaffolds for tissue engineering, and heart

valves in diabetic individuals [9]. By studying the inflammatory, angiogenic, apoptotic, and fibrogenic components of the foreign body response induced by subcutaneous polyether-polyurethane implants in rats, we have been able to identify a number of diabetes-related alterations of this reaction within and around the synthetic matrix.

In the descriptive histologic analysis of the implants from diabetic animals, a less mature and less dense extracellular matrix with fewer, but more dilated blood vessels (H&E stained sections and in CD31-immunostained sections) was observed in contrast with implants from non-diabetic rats. This result is consistent with reduced amounts of collagen and impaired angiogenesis in cutaneous wound healing and soft-tissue around implanted devices in diabetes [10-11,18-19]. However, Hb content and VEGF levels (angiogenic markers) in implants from diabetic rats were not altered in our experiments. This apparent discrepancy between a decreased number of vessels in implants from diabetic animals and no change in hemoglobin content may be explained by the increased vasodilatation observed in the histological sections of implants from the same group. Vascular dysfunctions, such as increased permeability, vasodilatation, and structural changes, are well established abnormalities in the diabetic state in experimental animal and human microvasculature [10,20-21]. Because we have shown an increased number of mast cells in implants from diabetic animals when compared with that from normglycemic rats, it is possible that the histamine's well-known vasodilator effect may have contributed to maintaining the Hb content in both implants, despite the smaller number of blood vessels in implants from diabetic rats.

The inflammatory components of the skin wound's microenvironment in diabetes is altered in several aspects, including abnormal cellular infiltration, cytokine production, and protease release [2,22-23]. However, less is known about the inflammatory component of internal injury following device implantation in diabetes [8]. We measured four inflammation markers

(MPO and NAG activities and two cytokines, TNF- α and MCP-1 levels), in 10-day old implants from both groups of animals. We have also determined the number of mast cells within the fibrovascular tissue in the implants. All parameters, except for NAG activity (macrophage activation), were higher in implants from diabetic rats when compared with those from non-diabetic animals. We did not expect to find that, in implants from diabetic rats, the levels of MCP-1 (relevant chemoattractant chemokine) did not parallel NAG activity as previously demonstrated [24]. One possible explanation for this discrepancy is that, in the hyperglycemic environment, macrophages may be defective in their response to the chemoattractant stimulus. Alternatively, MCP-1 production and macrophage recruitment in the foreign body reaction may differ between internal and skin injuries. Apart from this, our findings are in accordance with the notion of an altered inflammatory microenvironment in diabetic skin wounds and this concept is extended to the foreign body reaction in rats. To same extent, our results are also in agreement with the studies performed in subcutaneous and percutaneous implants from diabetic baboons and rabbits, in which persistent infiltration of neutrophils and a reduced number of macrophages were observed in internal wounds [10-11]. These changes have occurred together with changes in chemokine and growth factor expression (increase levels of MCP-1 and TNF- α). An increased production of the same inflammatory cytokines was observed in the wounds of type-1 diabetic patients [25]. In the excisional skin wound mice model of type 1 and 2 diabetes, increased TNF- α levels were reported and proposed to account for fibroblast apoptosis, which, in turn, resulted in a failure to produce sufficient matrix deposition at the injury site [26]. In our findings, TNF- α levels and the apoptotic index were also higher in the internal fibrovascular tissue in diabetes. These may be one possible explanation for the decreased levels of TGB- β 1 production, collagen deposition, fibrous capsule formation and number of foreign body giant cells found in implants from diabetic rats compared with that from normoglycemic animals. In fact, it has

been proposed that processes that interfere with sufficient number of cells involved in the various phases of repair, such as fibroblast apoptosis, impair wound healing [26-28].

Numerous reports indicate that encapsulation is influenced by several factors, including properties of the biomaterial, biomaterial porosity, surface texture, and implantation site [29]. In fact, our observation of the events following intraperitoneal (i.p.) implantation of sponge discs in diabetic rats showed increased levels of angiogenic (VEGF) and fibrogenic (TGF- β 1) cytokines and an increase in macrophage accumulation [30] which are in contrast with the findings from subcutaneous implants in the hyperglycemic environment. Nevertheless, the outcome of our experiments was an attenuated fibrogenic response in both intraperitoneal and subcutaneous implants in diabetic animals.

The main findings that have emerged from our work were that the changes observed in the foreign body reaction induced by synthetic implants in diabetic rats shared similarities with those seen in cutaneous tissue reported in the literature (decreased collagen deposition, disturbed inflammatory infiltrate, decreased angiogenesis, and increased apoptosis) in diabetic animals. More importantly, fibrous capsule formation and presence of foreign body giant cells, the typical features of the foreign body reaction, were attenuated in the hyperglycemic environment. These findings may be critical in developing strategies that may improve the performance and function of implanted biomaterials in diabetes.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES, CNPq, FAPEMIG (Brazil).

Competing Interests

The authors declare that there is no competing or financial interest.

References

1. Anderson JM, McNally AK (2011) Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions. *Semin Immunopathol* 33: 221-233. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21271251>
2. Luttkhuizen DT, Harmsen MC, Van Luyn MJ (2006) Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. *Tissue Eng* 12: 1955-1970. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16889525>
3. Wynn TA (2007) Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 117: 524-529. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17332879>
4. Morais JM, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ (2010) Biomaterials/tissue interactions: Possible solutions to overcome foreign body response. *The AAPS Journal* 12: 188-196. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20143194>
5. Campos PP, Andrade SP, Moro L, Ferreira MA, Vasconcelos AC (2006) Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. *Histol Histopathol* 21: 1263-1270. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16977576>
6. Mendes JB, Rocha MA, Araújo FA, Moura SA, Ferreira MA, et al. (2009) Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. *Microvascular Research* 78: 265-271. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19732781>
7. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT (2008) Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 20: 86–100. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18162407>
8. Le NN, Rose MB, Levinson H, Klitzman B (2011) Implant healing in experimental animal models of diabetes. *J Diabetes Sci Technol* 5: 605-618. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722576>
9. Onuki Y, Bhardwaj U, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ (2008) A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response. *J Diabetes Sci Technol* 2: 1003-1015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19885290>
10. Thomson SE, McLennan SV, Hennessy A, Boughton P, Bonner J, et al. (2010) A novel primate model of delayed wound healing in diabetes: dysregulation of connective

tissue growth factor. *Diabetologia* 53: 572-583.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20091023>

11. Gerritsen M, Lutterman JA, Jansen JA (2000) A percutaneous device to study glucose kinetics in subcutaneous tissue fluid. *J Mater Sci Mater Med* 11: 499-503.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15348000>
12. Campos PP, Bakhle YS, Andrade SP (2008) Mechanisms of wound healing responses in lupus-prone New Zealand White mouse strain. *Wound Repair Regen* 16: 416-424.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18471260>
13. Araújo FA, Rocha MA, Ferreira MA, Campos PP, Capettini LS, et al. (2011) Implant-induced intraperitoneal inflammatory angiogenesis is attenuated by fluvastatin. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 38: 262-268. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21309808>
14. Bailey PJ (1988) Sponge implants as models. *Methods Enzymol.*162: 327–334.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3226313>
15. Ferreira MA, Barcelos LS, Campos PP, Vasconcelos AC, Teixeira MM, et al. (2004) Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO). *Br J Pharmacol* 141: 1185-1192. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15023865>
16. Mendes JB, Campos PP, Ferreira MA, Bakhle YS, Andrade SP. (2007) Host response to sponge implants differs between subcutaneous and intraperitoneal sites in mice. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 83: 408-415.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17415768>
17. Kyriakides TR, Bornstein P (2003) Matricellular proteins as modulators of wound healing and the foreign body response. *Thromb Haemost* 90: 986-992.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14652628>
18. Altavilla D, Saitta A, Cucinotta D, Galeano M, Deodato B, et al. (2001) Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* 50: 667-674. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11246889>
19. Brem H, Tomic-Canic M (2007) Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest* 117: 1219-1222. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17476353>
20. Kilzer P, Chang K, Marvel J, Rowold E, Jaudes P (1985) Albumin permeation of new vessels is increased in diabetic rats. *Diabetes* 34: 333-6.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2579004>

21. Kahn AM, Seidel CL, Allen JC, O'Neil RG, Shelat H, et al. (1993) Insulin reduces contraction and intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle. *Hypertension* 22: 735-742. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8225533>
22. Blakytyn R, Jude E (2006) The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med* 23: 594-608. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16759300>
23. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot (2005) *Lancet* 366: 1736-1743. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16291068>
24. Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Bröcker EB, et al. (1998) Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol* 153: 1849-1860. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9846975>
25. Chatzigeorgiou A, Harokopos V, Mylona-Karagianni C, Tsouvalas E, Aidinis V, et al. (2010) The pattern of inflammatory/anti-inflammatory cytokines and chemokines in type 1 diabetic patients over time. *Ann Med* 42: 426-438. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20568978>
26. Siqueira MF, Li J, Chehab L, Desta T, Chino T, et al. (2010) Impaired wound healing in mouse models of diabetes is mediated by TNF- α dysregulation and associated with enhanced activation of forkhead box O1 (FOXO1). *Diabetologia* 53: 378-388. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19902175>
27. Darby IA, Bisucci T, Hewitson TD, MacLellan DG (1997) Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 191-200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9076954>
28. Rai NK, Suryabhan, Ansari M, Kumar M, Shukla VK, et al. (2005) Effect of glycaemic control on apoptosis in diabetic wounds. *J Wound Care* 14: 277-281. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15974415>
29. Mikos AG, McIntire LV, Anderson JM, Babensee JE. Host response to tissue engineered devices. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 33: 111-139. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837656>
30. Oviedo-Socarrás T, Vasconcelos AC, Barbosa IX, Pereira NB, Campos PP, et al. (2014) Diabetes alters inflammation, angiogenesis, and fibrogenesis in intraperitoneal implants in rats. *Microvasc Res* 93: 23-29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24594441>

Titles and Legends to Figures

Figure 1. Histological analysis of 10-day old implants from non-diabetic and diabetic rats. Representative histological sections stained with H&E of fibrovascular tissue from diabetic (A) and non diabetic (B) rats. The pores of the sponge matrix, seen as triangular shapes, is composed of microvessels (C), spindle-shaped fibroblasts (D) and inflammatory infiltrate consisting of neutrophils (E), macrophages (F), and foreign body giant cells (G). Dilated microvessels and low cellularity were characteristics of implants from diabetic rats (H). Data are expressed as means \pm SEM. *Significant difference between non-diabetic and diabetic; $p < 0.05$; Mann-Whitney test. NSC, non-diabetic implant; DSC, diabetic implant; scale bar, 50 μm .

Figure 2. Vascularization in 10-day old implants from non-diabetic and diabetic rats. Hemoglobin content (A) and VEGF levels (B), both angiogenic markers, were not altered after diabetes induction. Morphometric analysis showed a decreased number of blood vessels in implants from diabetic as compared with non-diabetic rats (C). Representative CD31-immunostained section shows the newly formed vascular structures (D). Values shown are expressed as mean \pm SEM. *Significant difference between non-diabetic and diabetic; $p < 0.05$. Student's t-test. NSC, non-diabetic implant; DSC, diabetic implant; scale bar, 25 μm .

Figure 3. Markers of inflammation in 10-day old implants from non-diabetic and diabetic rats. Neutrophils and macrophages recruited to the implant were determined through MPO and NAG activities, respectively. An increase in MPO activity (A) and decreased in NAG activity (B) were observed after diabetes induction, indicating a persistence of acute inflammatory response and delay in the chronic response. An increase in other inflammatory indicators MCP-1 (C), TNF- α (D), and mast cell index (E) was observed. Representative histological images stained with Dominicci show mast cells in implants from non-diabetic (F) and diabetic rats (G). Values shown are expressed as mean \pm SEM. *Significant difference between non-diabetic and diabetic; $p < 0.05$. Student's t-test and Mann-Whitney test. NSC, non-diabetic implant; DSC, diabetic implant; scale bar, 50 μm .

Figure 4. Markers of fibrogenesis in 10-day old implants from non-diabetic and diabetic rats. The amount of collagen (A) and levels of TGF β 1 (B) were increased in implants of non-diabetic rats as compared with that of diabetic rats. Representative histological sections (Picrossiurus-red staining) of implants from both groups of animals show distinct types of collagen in the implants (C) and (D). Values shown are expressed as mean \pm SEM. *Significant difference between non-diabetic and diabetic; $p < 0.05$. Student's t-test. NSC, non-diabetic implant; DSC, diabetic implant; scale bar, 200 μ m.

Figure 5. Pattern of apoptosis in 10-day old implants from non-diabetic and diabetic rats. Apoptotic index was increased in implants from diabetic rats as compared with non-diabetic rats (A). Values shown are expressed as mean \pm SEM. *Significant difference between non-diabetic and diabetic rats; $p < 0.05$. Mann-Whitney test. NSC, non-diabetic implant; DSC, diabetic implant; scale bar, 25 μ m. Representative histological sections (TUNEL staining) of the fibrovascular tissue induced by sponge implants at 10 post implantation show apoptotic cells in non-diabetic (B) and diabetic rats (C).

Figure 6. Histological characteristics of implant fibrous capsule. Representative histological sections of fibrous capsule in 10-day old implants from non-diabetic (A) and diabetic rats (B) (H&E staining) scale bar, 100 μ m. Wall thickness was decreased after diabetes induction (C). Values shown are expressed as mean \pm SEM. *Significant difference between non-diabetic and diabetic; $p < 0.05$. Student's t-test. Furthermore, the number foreign body giant cells was equally reduced in implants from diabetic rats (D). Values shown are expressed as mean \pm SEM. *Significant difference between non-diabetic and diabetic; $p < 0.05$. Mann-Whitney test. Representative histological sections of foreign body giant cells in 10-day old implants from non-diabetic (E) and diabetic rats (F) (H&E staining); scale bar, 25 μ m. NSC, non-diabetic implant; DSC, diabetic implant.

Table 1. Blood glucose level and animal weight in non-diabetic and diabetic rats during the study.

		Non-diabetic (n=11)	Diabetic (n=12)	ANOVA
Blood glucose level (mg/dL) (mean ± SEM)	0th day	86.64±3.4	78.67±1.7	-
	23th days	99.45±3.4	462.6±22.1	< 0,0001
Animal weight (g) (mean ± SEM)	0th day	219.8±6.5	237.7±4.9	-
	23th days	325.4±7.2	267.3±8.3	< 0,0001

Figure 1

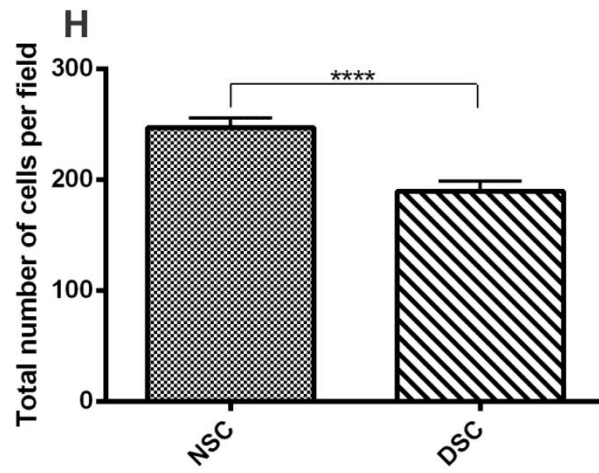
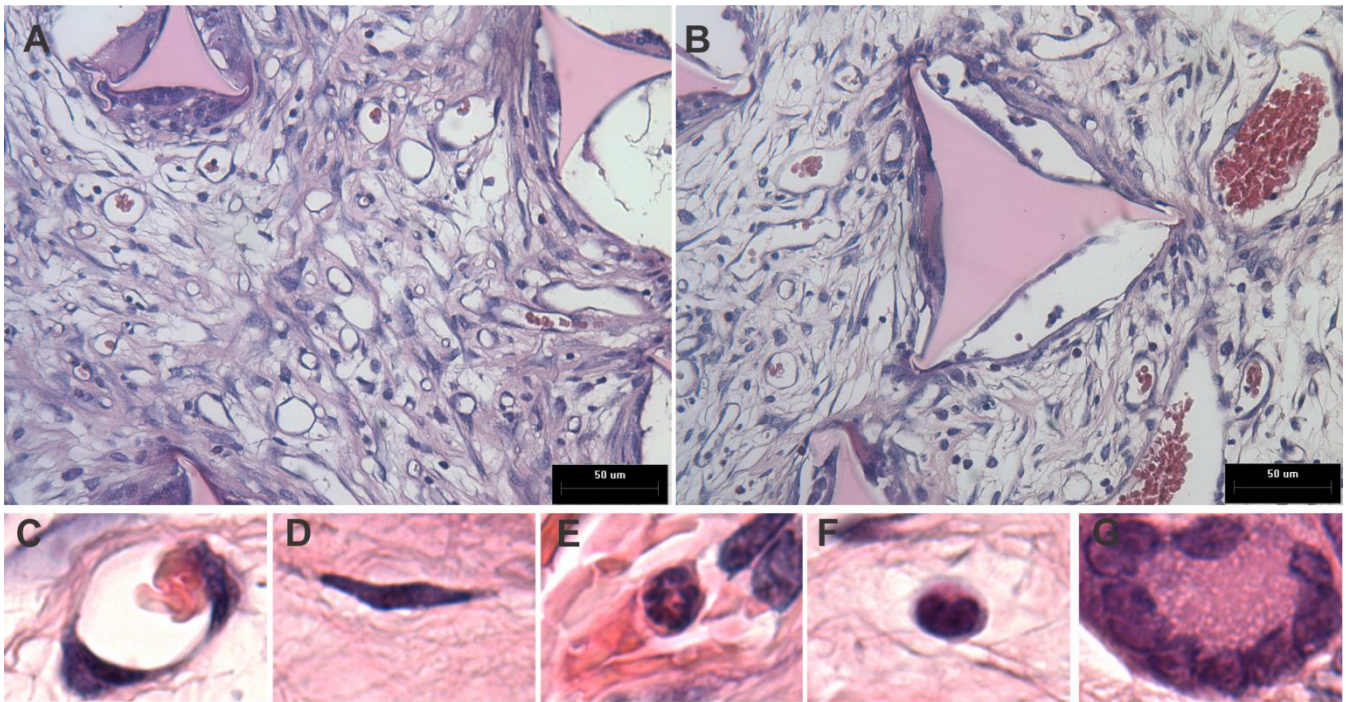


Figure 2

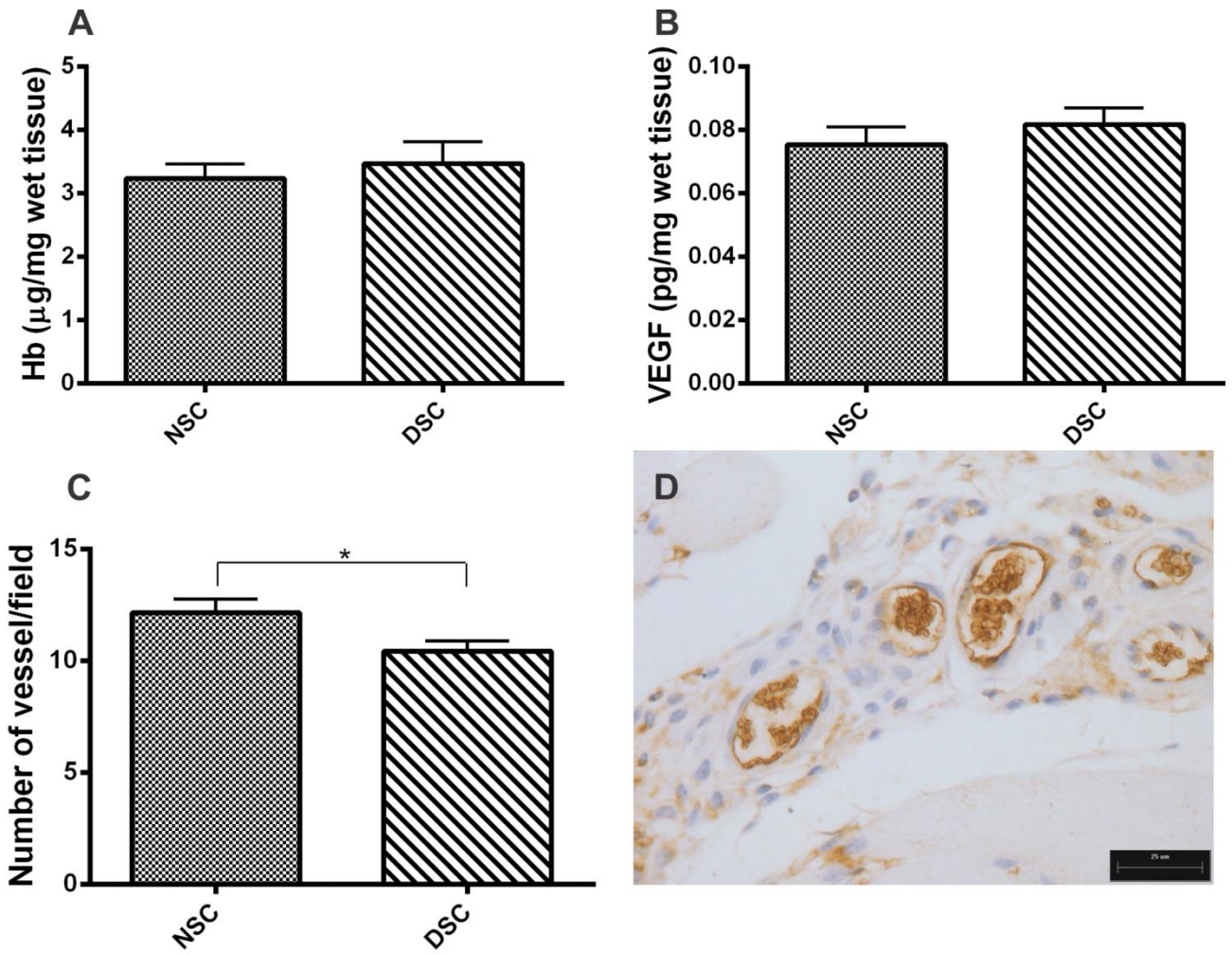


Figure 3

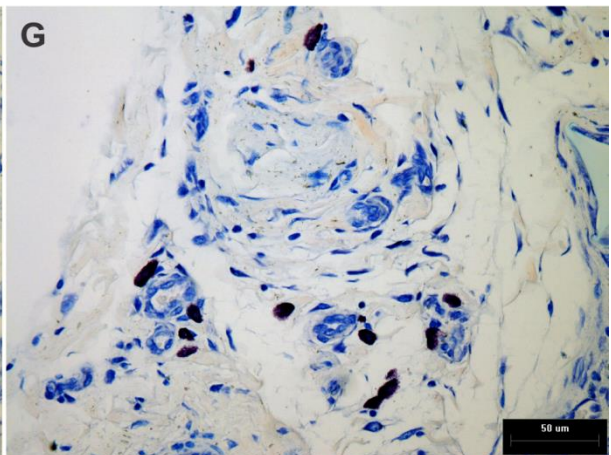
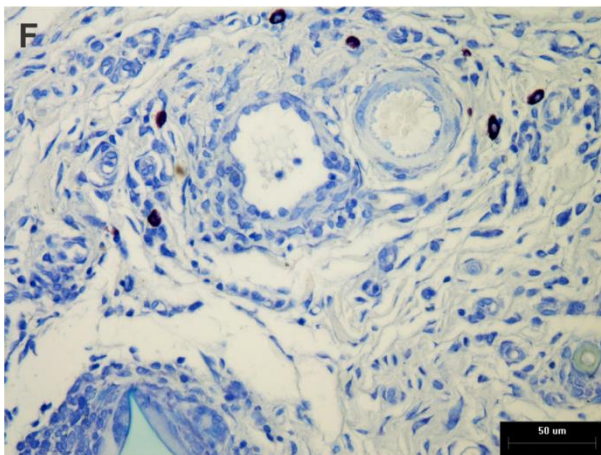
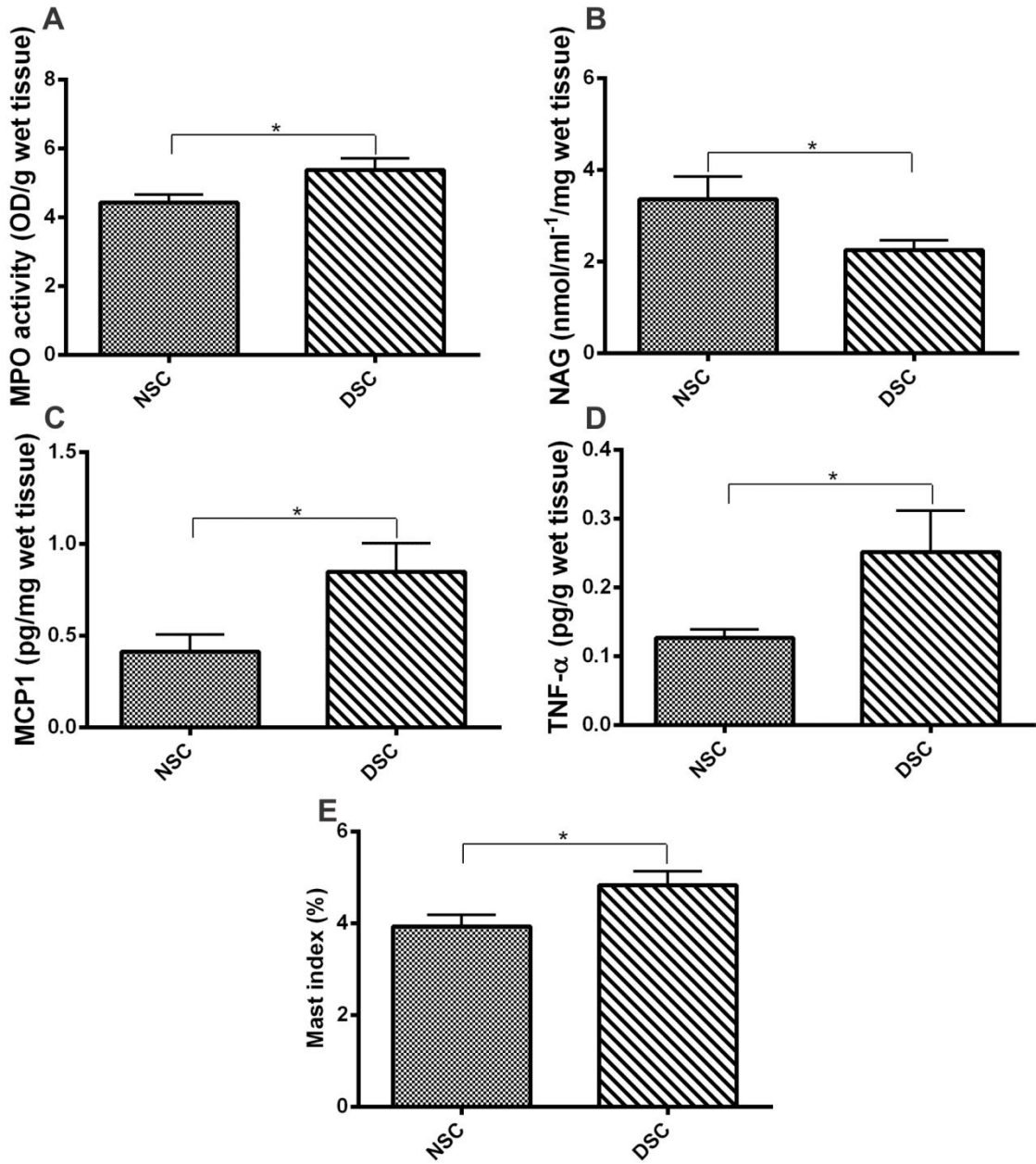


Figure 4

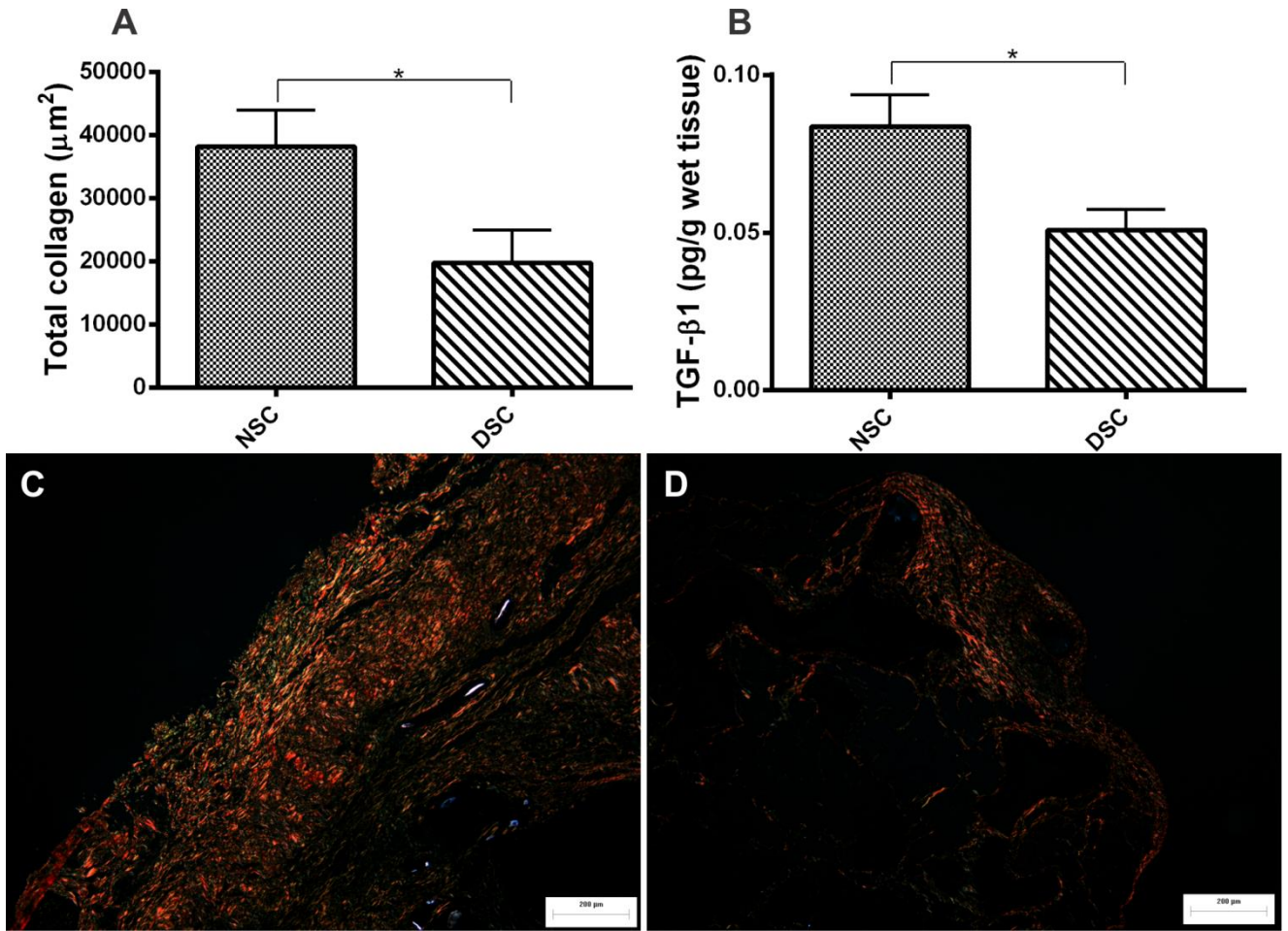


Figure 5

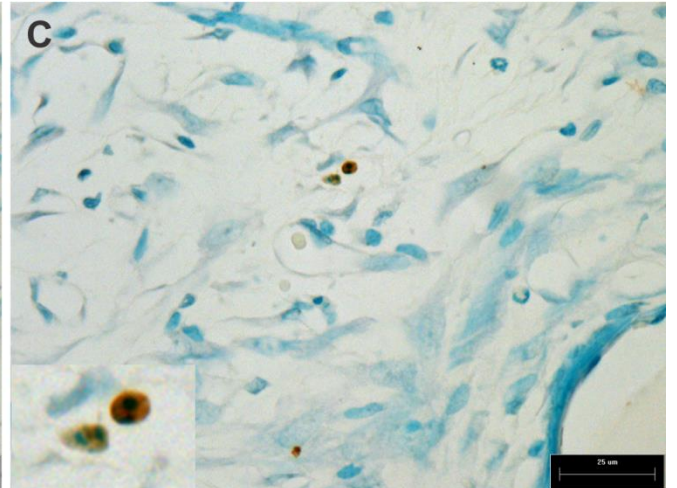
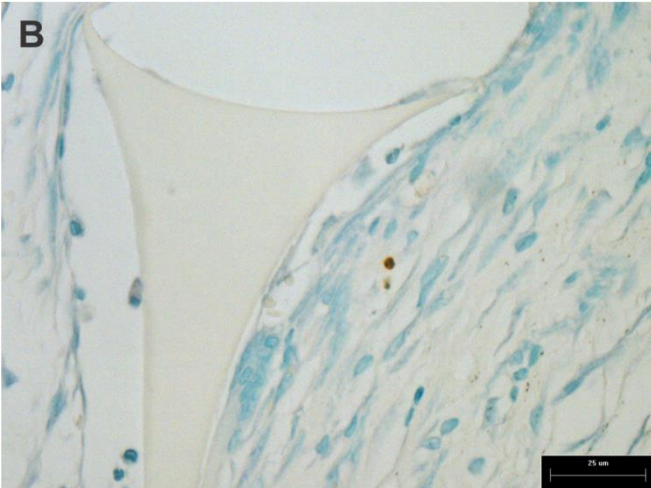
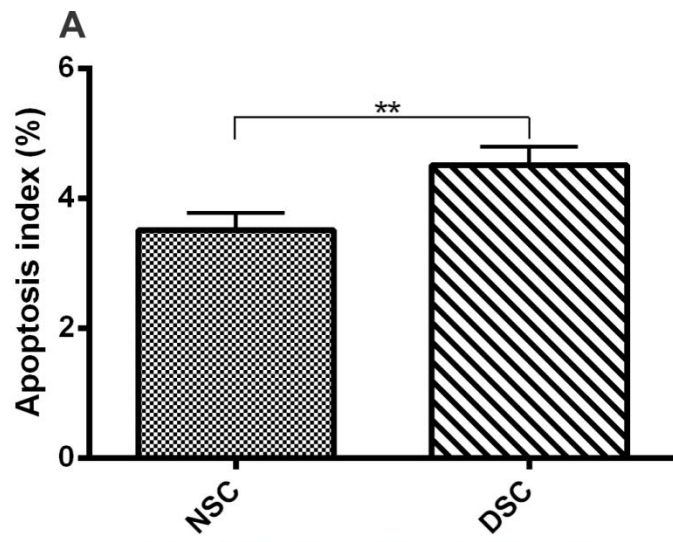
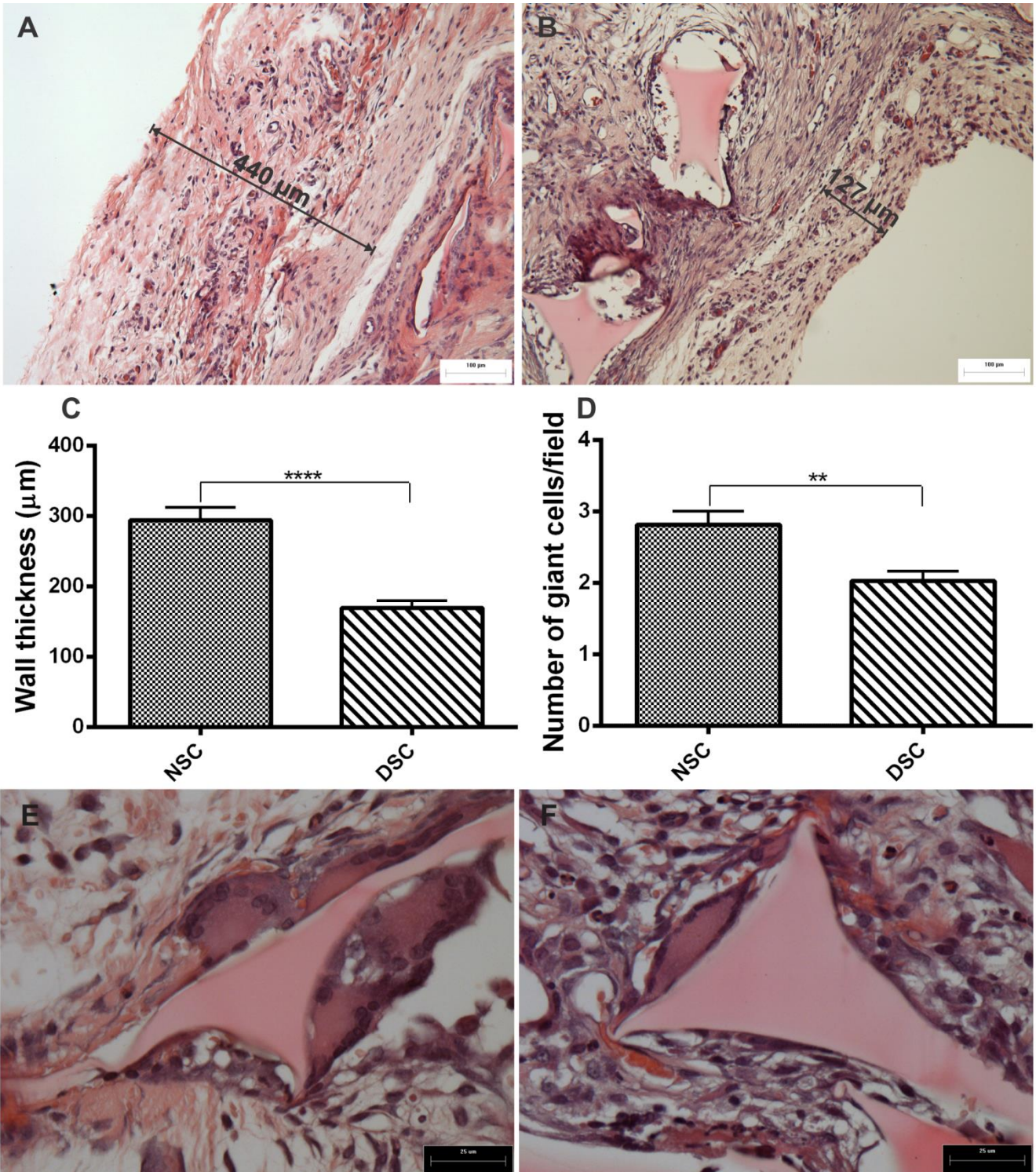


Figure 6



CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Diabetes *mellitus* tipo 1 é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia decorrente de alterações na produção da insulina. As complicações crônicas do diabetes caracterizadas pelo desenvolvimento de doença microvascular que afeta a retina, o glomérulo renal e nervos periféricos, bem como a doença macrovascular aterosclerótica, são as principais responsáveis pela morbidade e mortalidade de pacientes diabéticos. Além disso, complicações relacionadas com o processo de reparo de feridas em indivíduos diabéticos são responsáveis por lesões teciduais persistentes que podem levar a amputação e a necessidade de substituição de tecidos e órgãos.

Nos últimos anos, uma grande variedade de dispositivos biomédicos (sistema de infusão contínua de drogas como a insulina, órgãos artificiais, biossensores, cateteres, arcabouços para engenharia de tecidos, válvulas do coração) têm sido desenvolvidos para a implantação em pacientes. No entanto, após a implantação de tais dispositivos, o corpo desencadeia uma série de eventos que culmina com a reação de corpo estranho (composta de macrófagos e células gigantes de corpo estranho) que é a fase final das respostas inflamatória e cicatrização ante estes dispositivos. Estas reações podem resultar em diminuída eficácia do dispositivo implantado impedindo-o de interagir com os tecidos circundantes.

Os indivíduos acometidos por diabetes *mellitus* tipo 1 são candidatos ao uso de diversos implantes, no entanto, a condição hiperglicêmica pode afetar a resposta tipo corpo estranho ante estes dispositivos biomédicos, assim, há necessidade de

caracterizar esta resposta em diferentes compartimentos anatômicos com vistas a aprimorar a biocompatibilidade de dispositivos implantáveis em diabéticos, já que não há suficiente informação sobre os eventos que acontecem após o implante desses dispositivos, por tanto o foco deste trabalho foi determinar essa resposta.

A esponja de polieter-poliuretano é um dispositivo que pode ser facilmente esterilizado e implantado para estudar a cicatrização de feridas internas. A esponja estimula uma reação caracterizada inicialmente pelo infiltrado de células inflamatórias, semelhante a uma reação tipo corpo estranho em torno de um material de sutura em uma ferida cutânea. Após a resposta inflamatória, os fibroblastos e as células endoteliais infiltram a matriz da esponja formando um tecido fibrovascular equivalente ao que ocorre no processo normal de reparo. Por conseguinte, a inserção desta esponja cria uma ferida padronizada que pode ser facilmente recuperada para analisar o conteúdo da lesão. Embora este modelo não seja o mesmo de uma ferida criada por incisão ou excisão, a sequência de eventos é muito semelhante.

Estudou-se a influência do diabetes sobre a lesão interna (subcutânea e intraperitoneal) induzida pela implantação de matrizes sintéticas em ratos e caracterizamos a reação tipo corpo estranho quanto aos parâmetros inflamatório, angiogênico e fibrogênico da resposta. Nossos resultados mostraram que o diabetes altera estes parâmetros tanto em implantes intraperitoneais quanto subcutâneos. A resposta inflamatória foi mais intensa nos implantes intraperitoneais comparados aos do subcutâneo, no entanto, no subcutâneo especificamente, o número de células gigantes tipo corpo estranho foi diminuído no grupo diabético. A angiogênese não

teve diferença entre ambos os sítios anatômicos de diabéticos, embora em normoglicêmicos a angiogênese fosse maior em implantes intraperitoneais. A fibrogênese foi mais acentuada em implantes subcutâneos, contudo essa resposta foi duas vezes menor em diabéticos quando comparado com não diabéticos, os parâmetros de fibrogênese (colágeno total e espessura da capsula) não tiveram diferença nos implantes intraperitoneais.

Fica evidente que o padrão da reação tipo corpo estranho à matriz sintética de implantes de polieter-poliuretano difere entre ratos normoglicêmicos e hiperglicêmicos. Estes achados podem ser relevantes no entendimento da interação/integração entre biomaterial e tecido no estado diabético.

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 176/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Transplante de ilhotas de Langerhans em esponjas de poliéster poliuretano em ratos com diabetes melito tipo linduzida**", que tem como responsável(is) **Anilton Cesar Vasconcelos**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **9/ 11/2011**.

Este certificado expira-se em **9/ 11/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 176/2011**, related to the project entitled "**Transplantation of islets of Langerhans in polyester polyurethane sponges in rats with induced type 1 diabetes mellitus**", under the supervisors of **Anilton Cesar Vasconcelos**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **November 9, 2011**.

This certificate expires in **November 9, 2016**.

Belo Horizonte, 11 de Novembro de 2011.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

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

(Mod.Cert. v1.0)

ANEXO B

De: "PLOS ONE" <no-reply@editorialmanager.com>

Data: 9 de maio de 2014 08:33:37 BRT

Para: "Paula Peixoto Campos" <paulapet2003@yahoo.com.br>

Assunto: **Submission Confirmation for Foreign body response to subcutaneous implants in diabetic rats - [EMID:ee4f5b8e148f6588]**

Responder A: "PLOS ONE" <plosone@plos.org>

PONE-D-14-20800

Foreign body response to subcutaneous implants in diabetic rats

PLOS ONE

Dear Professor Campos,

Thank you for submitting your manuscript entitled "Foreign body response to subcutaneous implants in diabetic rats" to PLOS ONE. Your assigned manuscript number is PONE-D-14-20800.

We will now begin processing your manuscript and may contact you if we require any further information. You will receive an update once your manuscript passes our in-house technical check; you can also check the status of your manuscript by logging into your account at <http://pone.edmgr.com/>.

Please visit EveryONE (<http://blogs.plos.org/everyone>), the PLOS ONE community blog for our published authors and readers, to find out what the journal is thinking, changing and doing.

If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript, please contactplosone@plos.org.

Thank you for your support of PLOS ONE.

Kind regards,
PLOS ONE

ANEXO C



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

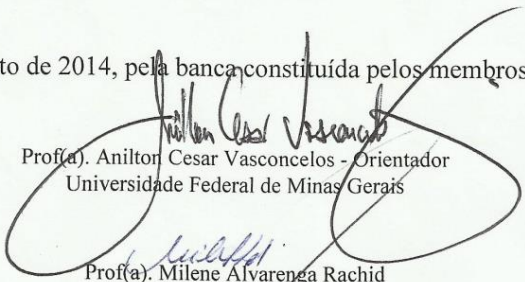
FOLHA DE APROVAÇÃO


**INFLUÊNCIA DO DIABETES TIPO 1 NO REPARO DE LESÕES
INTRAPERITONEAIS E SUBCUTÂNEAS EM RATOS WISTAR**


TERESA DE JESUS OVIEDO SOCARRAS


Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA GERAL.


Aprovada em 01 de agosto de 2014, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Anilton Cesar Vasconcelos - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof(a). Milene Alvarenga Rachid
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof(a). Ricardo Gonçalves
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof(a). Marlene Isabel Vargas Vitoria
Universidade Federal de Viçosa


Prof(a). Paulo Eduardo Alencar de Souza
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Belo Horizonte, 1 de agosto de 2014.