

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**ESTUDO DOS EFEITOS DO BLOQUEIO DA INTEGRINA  
 $\alpha_v\beta_3$  POR UMA DESINTEGRINA RGD RECOMBINANTE NA  
CICATRIZAÇÃO DE HÉRNIA INCISIONAL EM RATOS**

**Claudio Ricardo de Oliveira**

São Carlos - SP

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**ESTUDO DOS EFEITOS DO BLOQUEIO DA INTEGRINA  
 $\alpha_v\beta_3$  POR UMA DESINTEGRINA RGD RECOMBINANTE NA  
CICATRIZAÇÃO DE HÉRNIA INCISIONAL EM RATOS**

Cláudio Ricardo de Oliveira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração: Fisiologia.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

São Carlos - SP

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

O48eb Oliveira, Cláudio Ricardo de.  
Estudo dos efeitos do bloqueio da integrina  $\alpha_v\beta_3$  por uma desintegrina RGD recombinante na cicatrização de hérnia incisional em ratos / Cláudio Ricardo de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2014.  
81 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Hérnia. 2. Abdomen. 3. DisBa-01. 4. Cicatrização de feridas. 5. Ratos. I. Título.

CDD: 617.559 (20<sup>a</sup>)


Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

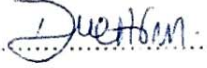
Tese de Doutorado de Claudio Ricardo de Oliveira

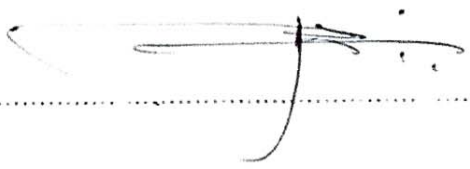
Dia 27/06/2014

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo.....

Prof. Dr. João Luiz Quagliotti Durigan.....

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leila Maria Beltramini.....

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dulce Helena Ferreira de Souza.....

Prof. Dr. José Tadeu Nunes Tamanini.....

## DEDICATÓRIA

*A minha amada esposa Audrey Borghi e Silua, minha incentivadora, por sempre acreditar em mim, pela paciência, ajuda e apoio para a conclusão do meu doutorado, por vezes deixando seus afazeres e tempo de descanso de lado para me auxiliar.*

*Aos meus filhos Matheus Borghi Ricardo e Isabela Borghi Ricardo, pelo amor, paciência, compreensão para que eu pudesse concluir este trabalho.*

*Aos meus pais Cláudio e Malvina, que sempre valorizaram o minha formação profissional e nunca mediram esforços para que eu pudesse concluir os meus estudos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pelas conquistas e pela paz espiritual, através da qual tenho conseguido alcançar meus objetivos de vida.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo, os maiores e mais sinceros agradecimentos, por esta oportunidade, pela amizade, carinho, paciência e orientação ao longo de todos estes anos, desta maneira aprimorando minha formação para seguir minha carreira docente.

A amiga Rita de Cássia Marqueti, mais uma vez por estar ao meu lado, pelo exemplo de persistência, determinação, coragem e competência.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Keico Okino Nonaka, por ter disponibilizado o Laboratório de Neuroendocrinologia, onde realizamos todos os procedimentos para a realização deste projeto.

Ao meu mais recente amigo, o Prof. Dr. Cezar Rangel Pestana, pela amizade e colaboração incondicional para a conclusão desta tese.

Ao Sr. Sergio Dias, pelo apoio durante a realização dos procedimentos no Laboratório de Neuroendocrinologia.

Ao Secretário do PPG de Ciências Fisiológicas, Alexandre Prata Vieira Chiva, pela atenção e colaboração, sempre a disposição.

## Resumo

**Introdução:** Hérnia incisional (HI) é considerada uma doença do tecido conjuntivo caracterizada pelo defeito no processo de cicatrização de feridas, e é encontrado após cirurgias abdominais em alta incidência. Estudos prévios tem mostrado que a desintegrina DisBa-01, que apresenta alta afinidade com a integrina  $\alpha_v\beta_3$ , possa ter ampla aplicação terapêutica e/ou laboratorial nas desordens relacionadas ao colágeno.

**Hipótese do estudo:** Considerando o papel regulador do receptor de vitronectina, a integrina  $\alpha_v\beta_3$ , na cicatrização de feridas, a hipótese de que o bloqueio desta integrina poderia modular a reparação tecidual.

**Objetivos:** Avaliar a DisBa-01 (uma desintegrina RGD-recombinante a partir veneno da *Bothrops alternatus*) como um bloqueador de integrina  $\alpha_v\beta_3$  na melhora da cicatrização da HI.

**Métodos:** HI foi induzida nos grupos Sham e DisBa-01. No grupo DisBa-01 foi administrada 3 doses distintas (0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg). Foram avaliados a histologia, zimografia e a expressão gênica de MMP-2, do colágeno tipo I e III, e do VEGF e *Western Blotting* par análise do colágeno.

**Resultados:** A indução da HI foi observada em todos os animais operados e após 14 dias nos animais do grupo Sham e no grupo DisBa-01, não apresentaram sinais visíveis de hérnia e observou-se a oclusão do anel herniário. O procedimento da cirurgia ativou significativamente a expressão de genes da MMP-2, bem como a sua atividade ( $P < 0.05$ ). A regulação de expressão do gene do colágeno I (col-I) e III (col-III) também foi observada, DisBa-01 diminuiu a expressão de col-I, mas não teve nenhum efeito sobre a expressão de col-III, enquanto expressão de VEGF foi suprimida após o 14º dia da cirurgia. Em contraste, DisBa-01 inibiu significativamente a expressão do gene de MMP-2 e a sua atividade ( $P < 0,05$ ). As análises de *Western Blotting*, evidenciaram a presença de colágeno tipo I (A1), nos 3 grupos, porém somente o grupo DisBa-01 diferiu estatisticamente do Controle ( $P < 0.05$ ). A espessura em mm da camada de colágeno em cada um dos animais no grupo controle apresentaram espessura reduzida. No entanto, grupo Sham e DisBa-01, houve aumento relativo em praticamente todos os animais estudados ( $P < 0,05$ ).

**Conclusão:** Estes resultados indicam que a integrina  $\alpha_v\beta_3$  desempenha um papel importante no controle da cicatrização de feridas e o seu bloqueio modula as condições de reparação de tecidos, incluindo HI. Esta informação pode ser especialmente útil para pacientes com recorrência de HI.

**Descritores:** •Hérnia ventral• Abdome •DisBa-01 •Cicatrização de feridas  
•Ratos.



## ABSTRACT

**Introduction:** Incisional hernia (IH) is considered a connective tissue disease characterized by defective wound healing process, and it is found in high incidence after abdominal surgeries. Previous studies have shown that DisBa-01 presents high-affinity to  $\alpha\beta3$ , which can have wide therapeutic application and/or laboratorial in disorders related to collagen.

**Hypothesis:** Considering the regulatory role of the vitronectin receptor, the  $\alpha\beta3$  integrin, in wound healing, we hypothesized that blocking this integrin would affect tissue repair.

**Objectives:** To evaluate the DisBa-01 (a desintegrin RGD-recombinant by snake venom of *Bothrops Alternatus*) as a blockage of  $\alpha\beta3$  integrin on improvement of HI healing.

**Methods:** IH was successfully induced in rats of Sham and DisBa-01 group. DisBa-01 group were treated with different doses (0.25; 0.5 and 1.0 mg/kg). A control group without surgery was included to analyze the surgery effects. Were evaluated the histology, zymography and gene expression of MMP-2, type I and III collagen and VEGF. Type 1A collagen were analysed by *Western Blotting*.

**Results:** After 14 days, the presence of IH and hernia ring were observed in all sham-operated animals; in contrast, 100% of animals treated with 0.25 and 1.0 mg/kg of Disba-01 did not present visible signals of hernia and showed closed hernia rings. The surgery procedure strongly activated MMP-2 gene expression as well as its activity ( $P < 0.05$ ). Up-regulation of collagen 1 (col-1) and 3 (col-3) gene expression was also observed, DisBa-01 reduced the expression of col-I, however, did not affect col-III, while VEGF expression was down regulated at day14. In contrast, DisBa-01 significantly inhibited MMP-2 gene expression and its activity. *Western Blotting* analysis revealed the presence of Type1A collagen in all groups, however only DisBa-01 differed statistically of Control group. The thickness of the collagen layer in each of

control group presented reduced. However, Sham and DisBa-01, there was a relative increase in all studied animals ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** These results indicate that  $\alpha\beta 3$  integrin has an important role in the control of wound healing and its blockade modulate repair conditions, including IH. This information may be especially helpful for patients with recurrent IH.

**Keywords:** •Ventral hernial •Abdomen •DisBa-01• Wound healing• Rats.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADNase:** deoxiribonuclease

**ANOVA:** Análise de variância

**β:** Beta

**CaCl<sub>2</sub>:** Cloreto de cálcio

**Col I:** colágeno tipo 1

**Col III:** colágeno tipo 3

**kDa:** Quilodauton (s) unidade de massa molecular

**DNA:** ácido deoxiribonucleico

**cDNA:** DNA complementar

**DP:** Desvio Padrão

**DisBa-01:** desintegrina de Brotopus Alternatus

**EDTA:** ácido etilenodiamino tetra-acético

**HE:** Hematoxilina-eosina

**HCl:** ácido clorídrico

**HI:** hérnia incisional

**MEC:** membrana extracelular

**MMPs:** Metalopeptidases de matriz

**NaNO<sub>3</sub>:** nitrato de sódio

**mRNA:** ácido ribonucléico mensageiro

**RNase:** ribonuclease

**PBS:** salina tamponada com fosfato

**PMSF:** Fenilmetilsulfonilflúor (inibidor de proteases)

**PVDF:** difluoreto de polivinilideno

**q.s.p:** quantidade suficiente para

**RGD:** sequencia de aminoácidos Arginina-Glicina-Aspartato presentes em desintegrinas e relacionado com a ligação com integrinas da subunidade  $\beta 3$ .

**SHAM:** algo que não é o que pretende ser; uma imitação

**TIMPs:** inibidores teciduais das metalopeptidases de matriz

**TGF-  $\beta$ :** fator de crescimento de transformante  $\beta$

**TM:** Tricrômio de Masson

**Tris-HCl:** hydroxymethyl-aminomethane hidrolidrico

**SDS:** duodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio

**SDS-PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida

**VEGF:** Fator de crescimento endotelial vascular

**VEGFR1:** Fator de crescimento endotelial vascular-receptor da tirosina quinase

**VEGFR2:** Fator de crescimento endotelial vascular-receptor da tirosina quinase

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> características das MMP-2, MMP-1, MMP-13 e MMP-9 e substratos de atuação.....	13
<b>Tabela 2 -</b> Correlação de MMP-2, MMP-1 e MMP-13, com diferentes tipos de hérnia.....	14
<b>Tabela 3:</b> Integrinas e seus ligantes.....	21
<b>Tabela 4:</b> Primers para PCR - tempo-real (RT-PCR).....	34
<b>Tabela 5:</b> Resultado do pós operatório e presença do anel herniário e formação da membrana, após 14 dias do experimento de todos os grupos.....	39

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Intensidade de carga músculo esquelético e as respostas adaptativas de matriz extracelular. Interação hipotética entre matriz extracelular, proteínas do citoesqueleto, e fibras musculares esqueléticas em resposta à carga excêntrica da contração da musculatura. Adaptado de Kjaer, 2004..... 05
- Figura 2:** Esboço da teoria da “mecanotransducao” e as forças mecânicas que atuam no reparo de laparotomia..... 06
- Figura 3:** Colágeno tipo I síntese e degradação. Representação esquemática das vias envolvidas na síntese do colagénio. Fatores de crescimento funcionam potencialmente como reguladores importantes na ativação do gene estão indicados. TGF- $\beta$  (Fator de Crescimento Transformador- $\beta$ ); IGF / IGF-BP (Fator de Crescimento tipo Insulina e as suas Proteínas de Ligação); IL (Interleucina); FGF (Fator de Crescimento de Fibroblastos); PG (Prostaglandina); VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular). Ativada por MAPK (Mitógeno Proteína Quinase) desempenha um papel regulador importante para a iniciação da sinalização do gene, e as Metaloproteinases de Matriz (MMPs) são importantes reguladores da degradação do colagénio em relação à carga mecânica..... 11
- Figura 4:** Inicialmente, as MMPs permanecem na forma latente (pro-MMP), são activadas por outras proteases que recortam uma parte pequena da molécula. Isto abre o centro ativo da molécula MMP e permite a ligação ao(s) substrato(s) da sua proteína. Outras células chamadas inibidores de tecido de metaloproteinases (TIMPs) podem inibir as MMPs ativadas e bloquear a ativação de pro-MMPs. .... 15
- Figura 5:** Resumo das principais vias pelas quais ocorrem as respostas celulares do tecido muscular in vivo no tecido conjuntivo

intramuscular (MICT). Vias de sinalização celular reagem com uma grande variedade de estímulos para aumentar a expressão das metaloproteinases (MMPs), os inibidores de tecidos de metaloproteinases (TIMP) e a síntese dos componentes da matriz, tais como o colagénio da proteína fibrosa. O MMP são expressas intracelularmente como enzimas latentes (pró-) e ativadas extracelularmente. O colágeno é expresso intracelularmente como pró-colágeno e modificado extracelularmente para permitir a agregação de moléculas em colágeno fibroso (fibrilogênese). Atividade de MMP na matriz extracelular é resultado do equilíbrio entre a quantidade de MMP ativada e o nível de inibição de TIMPs. Atividade das MMPs e a síntese de novos componentes da matriz determinam o remodelamento do MICT.

16

**Figura 6:** tecidos danificados atraem bactérias, que também produzem MMPs, a fim de consumir os nutrientes contidos nas células/tecidos. Os microrganismos também eliminam toxinas, através das quais aumentam a quantidade de leucócitos para a área da ferida. Os leucócitos tentam destruir as bactérias, causando danos graves nas células e tecidos saudáveis, originando o ciclo "vicioso", uma vez que as células danificadas sintetizam novamente mais MMPs.....

19

**Figura 7:** Sequencia tripeptídica RG.....

22

**Figura 8:** a) Trimestatin: primeira estrutura cristalina de uma desintegrina; Fujii et al, 2003. b) ligação DisBa-01 e  $\alpha_v\beta_3$ , c) modelo molecular tridimensional interface da DisBa-01 com  $\alpha_v\beta_3$ .....

23

**Figura 9:** Suporte para cirurgia experimental, material utilizado para indução da hérnia incisional nos animais.....

29

**Figura 10:** A: hérnia incisional presente em todos os animais dos grupos G2 e G3, após indução cirúrgica; B: para inspeção da ferida cirúrgica.....

30

**Figura 11:** coleta de amostras para zimografia / Western

Blotting.....	32
<b>Figura 12:</b> <b>A:</b> presença de hérnia incisional em todos os animais do grupo Sham e DisBa-01 após a indução cirúrgica todas as características da hérnia incisional; <b>B:</b> parede integra no grupo controle, <b>C:</b> anel herniario aberto grupo DisBa-01 – 0,5 mg.....	40
<b>Figura 13:</b> Sham: <b>A:</b> Membrana(M) tênue e frágil presente em todos os animais do grupo Sham ocluindo o anel herniário; <b>B:</b> limites do anel herniário (AH) ocluído pela membrana (M).....	40
<b>Figura 14:</b> animais tratados com DisBa-01. <b>A:</b> presença de retração cicatricial ferida operatória (RC) e oclusão do anel herniário por membrana aspecto fibrótico; <b>B:</b> fechamento do anel herniário por membrana resistente (M) de aspecto fibrótico (branco nacarado) resistente e limites do anel herniário (AH); <b>C:</b> Dissecção da parede abdominal evidenciando a presença da membrana aspecto fibrótico e limites do anel herniário.....	41
<b>Figura 15:</b> Expressão gênica de Colágeno I (A), MMP-2 (B), colágeno III (C), e VEGF (D) nos extratos da parede abdominal dos controles (sem IH), grupo de Sham, e dos grupos tratados com DisBa-01 0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg. Os dados são expressos em unidades arbitrárias. (ANOVA e teste de Tukey, P <0,05). Em a = diferença com grupo controle; b = diferença com grupo Sham; c = diferença com DisBa-01(0,25) e d = diferença com DisBa (0,50).....	42
<b>Figura 16:</b> Relação da expressão gênica do Colágeno I / Colágeno III nos extratos da parede abdominal dos controles (sem HI), grupo de Sham, e dos grupos tratados com DisBa-01 0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg. Os dados são expressos em unidades arbitrárias. (ANOVA e teste de Tukey, P <0,05). Em a = diferença com grupo controle; b = diferença com grupo Sham.....	43
<b>Figura 17:</b> <b>(A)</b> Atividade da MMP-2, de extratos da parede abdominal do controle e Sham (HI tratado com PBS), <b>(B)</b> tratados com DisBa-01 0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg por zimografia em gelatina. <b>(C)</b> A atividade da MMP-2, foi quantificada por densitometria de banda e expressa em unidades arbitrárias para as três formas de MMP-2	



(pro-MMP-2 (72 kDa), e intermediários de forma ativa (64kDa). Os valores são apresentados como a média $\pm$ 1DP (ANOVA e teste de Tukey, P <0,05). Em a = diferença com grupo controle; b = diferença com grupo Sham; c = diferença com DisBa-01(0,25).....	45
<b>Figura 18:</b> Análise histológica da camada de colágeno nos grupos controle, SHAM e DisBa-01, onde podem ser observadas as diferenças na espessura desta camada de colágeno. (Aumento de 40x).....	46
<b>Figura 19:</b> Análise histológica da camada de colágeno nos grupos controle, Sham e DisBa-01, onde podem ser observadas as diferenças na espessura desta camada de colágeno com zoom. (Aumento de 10x).....	47
<b>Figura 20:</b> Quantificação da camada de colágeno em mm para cada animal dos grupos controle, SHAM e DisBa-01 que foi determinada utilizando-se o sistema de pixels por meio do software Image J (National Institutes of Health - NIH, versão 1,47; USA).....	48
<b>Figura 21:</b> Quantificação da camada de colágeno em mm, entre os grupos controle, Sham e DisBa-01. a = diferenças entre o grupo Sham e Controle.....	49
<b>Figura 22:</b> Análises de Western Blotting para determinação de Colágeno tipo I (A1) a partir do extrato proteico músculo da parede abdominal, incluindo o anel herniário. Foram adicionados 30ug de amostra em cada poço para os animais controle (poço 1), Sham (poço 2) e tratados com DisBa-01 (poço 3). Actina foi utilizada como controle do carregamento. a = diferenças entre grupo DisBa-01 e Controle.....	50

<b>1) INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2) OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>3) MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1) Amostra.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2) Procedimentos Experimentais.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.1) Indução da Hérnia Incisional.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.2) Controle pós-operatório.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.3) Sacrifício dos animais e obtenção dos extratos de tecidos.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.3.1 Preparação das amostras de Proteínas e Western Blotting.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.3.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida SDS- PAGE.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3) Extração de RNA e PCR quantitativo.....</b>	<b>33</b>
<b>3.4) Análise Histológica.....</b>	<b>35</b>
<b>3.5) Análise Quantitativa do Colágeno.....</b>	<b>35</b>
<b>3.6) Determinação da atividade de MMP-2 por zimografia.....</b>	<b>36</b>
<b>3.7) Análises de Western Blotting.....</b>	<b>37</b>
<b>3.8) Análise Estatística dos Dados.....</b>	<b>38</b>
<b>4) RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>5) DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>6) LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>58</b>
<b>7) CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>8) REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>81</b>
<b>9.1. Aprovação do Comitê de ética em pesquisa com animais.....</b>	<b>81</b>

## **SUMÁRIO**

## 1) INTRODUÇÃO

Hérnia incisional (HI) ou ventral como podem ser denominadas, são aquelas que surgem após a laparotomia, sendo a complicação mais comum deste procedimento cirúrgico, caracterizando-se pelo afastamento progressivo das bordas músculo aponeuróticas incisadas, mantendo-se íntegros a pele e o peritônio parietal que, juntos, compõem o saco herniário, para onde migra o conteúdo abdominal, ocasionando o abaulamento da cicatriz (HOLZHEIMER e MANNICK, 2001).

Estudos prospectivos relatam a incidência de 11% de hérnia incisional após laparotomias, sendo esta a causa mais comum de reoperação (DUBAY et al, 2007). Nos Estados Unidos da América (EUA) são realizadas aproximadamente 200.000 cirurgias por ano para o tratamento desta patologia (NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTICS,1995/2007). No entanto revisões sistemáticas atualmente tem mostrado um aumento na incidência desta complicação da laparotomia, ocorrendo em 10% a 20% dos casos (SLATER et al, 2013).

Culbertson et al (2011) relatam que a incidência global de hérnia incisional seria de 11 a 16%, no entanto acreditam que estes dados sejam subestimados, pois de 8 a 29% das hérnias incisionais são assintomáticas e não são relatadas pelos portadores, portanto não seriam diagnosticadas e para isto necessitariam de um exame físico cuidadoso para o seu diagnóstico. Além disso, apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas e de novos materiais tais como o uso de malha (telas sintéticas) e cuidados ao paciente, a incidência de hérnia incisional não

apresentou uma alteração significativa nos últimos 75 anos, com altas taxas de recorrência, permanecendo como complicação frequente pós laparotomias (CULBERTSON et al, 2011).

Para explicar a alta incidência da hérnia incisional, é preciso compreender o mecanismo de formação da hérnia, que ocorre após a incisão e diérese dos planos da parede abdominal durante a realização da laparotomia, acarretando a perda da função e estrutura dos tecidos (FRANZ, 2008).

Após a síntese da incisão na parede abdominal, espera-se que ocorra o processo de cicatrização da ferida operatória. Sabendo-se que as fases da cicatrização são: inflamação, fibroproliferação (formação de cicatriz) e remodelação da ferida, eventos que possam interferir em uma destas fases de cicatrização da ferida operatória, serão responsáveis pela formação da hérnia incisional, como exemplo: Infecção, isquemia, anti-inflamatórios esteróides (FRANZ, 2008).

Dubay et al (2007) citam que a falha na cicatrização da ferida operatória seria multifatorial, sendo um destes fatores a alteração da estrutura muscular da parede abdominal, estrutura esta que se encontra sob um equilíbrio dinâmico (formado pelos músculos do abdome) e que estaria alterada após a laparotomia.

O rompimento da linha alba, que é considerada anatomicamente um tendão, durante a laparotomia, resultaria na perda funcional deste equilíbrio de forças, apesar de mantido a integridade dos músculos retos abdominais, os músculos oblíquos interno e externo estariam tracionando a linha de sutura, dificultando a cicatrização, contribuindo para formação da hérnia incisional. Evidências

demonstram que a hérnia incisional e hérnias recorrentes estão associadas geralmente a uma falha da cicatrização da ferida operatória, e na grande maioria relacionadas à ruptura mecânica da linha de sutura da parede abdominal na fase inicial da cicatrização (FRANZ MG, 2008).

Por muito tempo o desenvolvimento da hérnia incisional tem sido atribuído à teoria da ruptura mecânica, relacionada aos tecidos moles (músculos e aponeurose). No entanto, o papel do colágeno no desenvolvimento e na recorrência da doença tem sido pesquisado como fator biológico, podendo explicar esta ruptura na linha de sutura, não sendo o fator mecânico o principal mecanismo na gênese desta disfunção (KLINGE et al, 2006). A hipótese para este fator biológico estaria em um mecanismo chamado de mecanotransdução, definida como a sinalização celular que ocorre em resposta a uma força mecânica resultando em respostas celulares para cicatrização da ferida operatória.

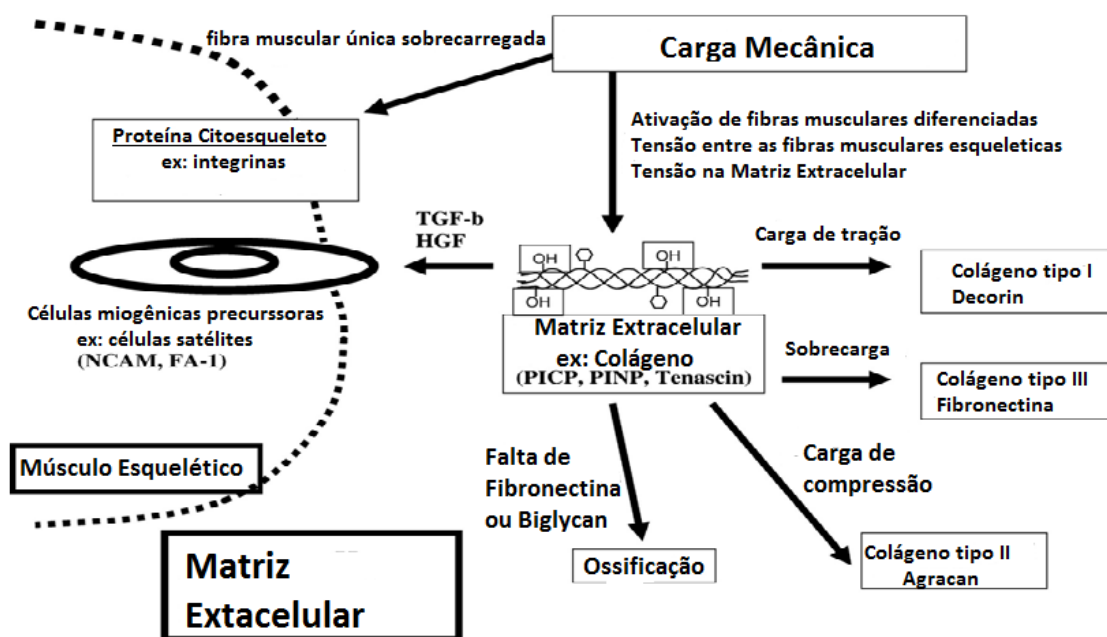
A mecanotransdução é um processo no qual as células ao receber em seu ambiente estímulos físicos traduz os mesmos em sinais bioquímicos, permitindo a transformação de forças físicas em uma resposta celular. Os estímulos recebidos pela célula podem ser qualquer força aplicada a parede celular, como o alongamento da membrana celular ou exposição a campos eletromagnéticos, por exemplo, (CULBERTSON et al, 2011).

Os estímulos mecânicos seriam detectados por proteínas mecanossensitivas que detectam a alteração da estrutura celular, incluindo os canais de íons ativados por estiramento na membrana da célula, receptores de adesão transmembranas

que ligam o citoesqueleto com a matriz extracelular (MEC) a outras células (ex: integrinas), proteínas (ex: sarcoméricas titina e miosina ) e receptores de superfície celular (Benavides Damm e Egli, 2014).

Na revisão de Salvini et al. (2012), foi demonstrado que os componentes da matriz extracelular estimulados pela força mecânica e as integrinas localizadas na membrana das fibras musculares detectam esta tensão e sinalizam para o interior da fibra muscular ativando assim diversas proteínas alterando a transcrição dos genes musculoespecíficos que atuam na tradução de proteínas no citoplasma causando uma série de alterações intracelulares como o aumento da síntese proteica e da força muscular.

Kjaer (2004) também esclarece sobre as respostas adaptativas de proteínas do citoesqueleto e componentes da MEC relacionadas a cargas mecânicas. O mecanismo de uma sinalização estaria relacionado a fatores de crescimento liberados na MEC após o estímulo mecânico. Dentre os fatores de crescimento propostos está o fator de crescimento hepatocítico (HGF) que se encontra no músculo não lesado, que seria estimulado pela ação das citocinas (Figura1).

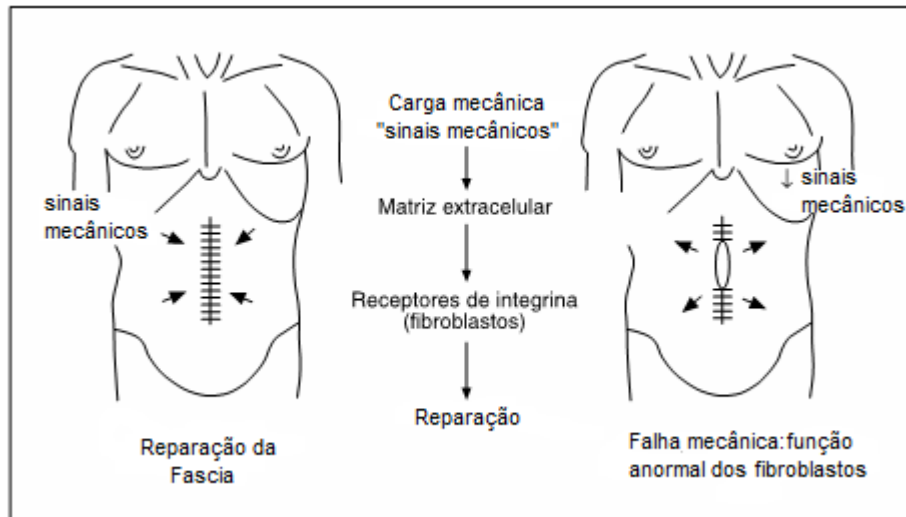


**Figura 1:** Intensidade de carga músculo esquelético e as respostas adaptativas de matriz extracelular. Interação hipotética entre matriz extracelular, proteínas do citoesqueleto, e fibras musculares esqueléticas em resposta à carga excêntrica da contração da musculatura. Adaptado de Kajaer, 2004.

Sendo assim, a tensão mecânica desencadeia a sinalização para reparação ou regeneração de células em muitos desses tecidos. A parede abdominal é submetida a uma pressão intermitente e constante provocada, por exemplo, pela respiração, tosse.

Sendo a parede abdominal dependente desta tensão mecânica para sinalizar, acredita-se que isto ocorra através de vias de mecanotransdução (Figura 2) que ativariam os fibroblastos da ferida operatória induzindo o alinhamento de muitos tipos de células e da organização dos fibroblastos e fibras de colágeno na aponeurose abdominal normal, desempenhando papel essencial no reparo, sintetizando fatores de crescimento utilizados na produção e remodelação da

matriz extracelular para contração da ferida e posterior cicatrização (CULBERTSON et al, 2011).



**Figura 2:** Esboço da teoria da “mecanotransducao” e as forças mecânicas que atuam no reparo de laparotomia. Bellón e Durán, 2008.

O colágeno é a proteína mais comum no reino animal, correspondendo a 30% do total de proteínas do corpo humano, proporcionando aos tecidos: força, integridade e estrutura; sendo o colágeno tipo I predominante (mais de 90% do colágeno total em mamíferos), estando presente nos ligamentos, tendões e aponeuroses.

Ja o colágeno tipo III predomina em tecidos com certo grau de elasticidade, incluindo a pele, músculos, aponeurose e ligamentos, em recém-nascidos e na fase inicial da cicatrização de feridas cirúrgicas (Diegelmann, 2001). Assim, este tipo de colágeno é frequentemente encontrado associado ao colágeno tipo I em diferentes proporções em aponeuroses e tecidos em cicatrização, reforçando a relação direta



entre a recorrência de hérnia e as doenças que acometem a matriz do colágeno (Fachinelli et al, 2007; CALVI et al, 2012).

A presença de colágeno tipo I e III nos tecidos foram confirmadas por testes com anticorpos monoclonais anticolágeno, em aponeuroses e tecidos de cicatrização, isto de acordo com alguns autores tem uma relação direta entre hérnia inguinal recidivadas e distúrbios na matriz de colágeno. Outra evidência desta relação, com alto nível de coincidência foi o achado entre hérnia incisional e aneurisma de aorta abdominal e a possível deficiência de colágeno (FACHINELLI e TRINDADE, 2007).

O estudo dos tipos de fibras de colágeno e seus subtipos tem sido importante para o diagnóstico de muitas doenças. O colágeno encontrado na musculatura tem papel importante na transmissão de forças resultantes da contração e participa do processo de reparação dos tecidos, como descrito anteriormente, por ser um componente importante dos músculos e aponeurose, proporcionando resistência aos tecidos (CALVI et al, 2012).

Atualmente, já foram descritos mais de 19 tipos de colágeno, sendo os tipos I, II e III os mais estudados. Colágeno dos tipos I, III, IV e V são encontrados nos músculos estriados, mas apenas os tipos I e III são encontrados na aponeurose (membrana fibrosa, branca, resistente, que envolve os músculos ou os uni com as partes que movem) (Stedman Medical Dictionary, 1979).

Observações confirmam esta hipótese de uma desordem no metabolismo do colágeno nos pacientes com hérnia incisional, pois foi verificada a redução

significativa da relação de colágeno tipo I / III, tanto na pele quanto na aponeurose dos pacientes com hérnia incisional ou recidivada (ROSCH et al, 2003).

Outras doenças colagenosas como o Latirismo e Síndrome de Ehlers-Danlos também predispõe a formação de hérnia. Desta forma alterações na síntese de colágeno reduzindo ou aumentando a atividade das proteases na ferida operatória levariam à degradação do colágeno, resultando em desequilíbrio da homeostase desta proteína. A redução nos níveis de colágeno na ferida operatória diminui a resistência à tração, e aumenta o risco de formação da hérnia incisional (FRANZ, 2008).

Apesar da identificação dos vários tipos de colágeno, ainda não está bem compreendido o seu papel nas funções estruturais nos diferentes tecidos, principalmente nos músculos. Porém, o colágeno presente na musculatura estriada tem participação na conexão das fibras musculares para assegurar o alinhamento destas, determinando os resultados da resistência à tração, em decorrências de interações físicas e químicas com componentes estruturais da matriz extracelular (CALVI et al, 2012).

Segundo FRANZ, 2008, as fases de regeneração tecidual podem ser divididas em três:

**Fase Inflamatória:** caracterizada pelo processo inflamatório local com a presença de sinais típicos: dor, rubor, calor e edema, e pode estar associada à perda da função local, iniciando-se no momento que ocorre a lesão tecidual e

prolongando-se por um período de três a seis dias, com objetivo de preparar o sítio da ferida operatória para o crescimento do novo tecido.

**Fase de Fibro-proliferação**, regeneração ou fibroblástica: caracterizada pela migração de fibroblastos podendo se estender por aproximadamente três semanas, influenciada por fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, remodelamento da matriz extracelular que ocorre devido à deposição de colágeno, fibronectina e outros componentes protéicos, visando ao final à promoção da re-epitelização (cicatrização).

**Fase de Remodelamento** ou remodelação: caracterizada pelas transformações que ocorrem no tecido cicatricial, devido à diminuição progressiva da vascularização e de fibroblastos, aumento da força tensil e reorientação das fibras de colágeno, tornando a cicatriz mais plana e macia, iniciando-se por volta da terceira semana após a ocorrência da ferida e podendo durar até dois anos

A síntese de colágeno é realizada principalmente pelos fibroblastos, sendo estes responsáveis pela recuperação e resistência à ruptura da ferida operatória. Estão presentes principalmente na fase de proliferação, sendo perceptível um aumento dos números de fibroblastos nesta fase, acreditando-se que este aumento seja influenciado por mediadores inflamatórios e fatores de crescimento. A ação dos fibroblastos é importante no desenvolvimento da matriz extracelular, e esta relação entre reparação da matriz extracelular e ativação dos fibroblastos tem sido descrita em estudos relacionados (FRANZ, 2008).

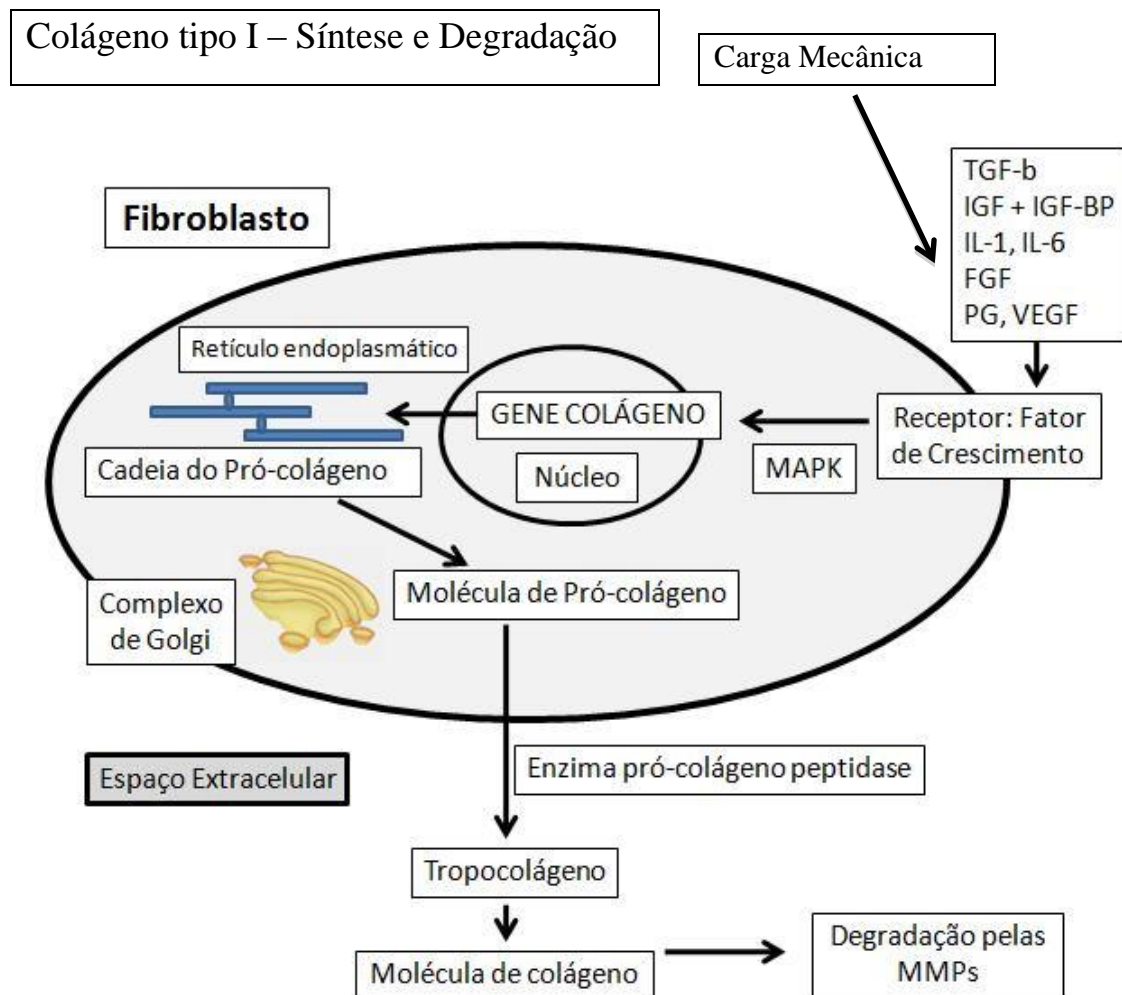
A hipótese de distúrbio no processo de cicatrização de feridas está relacionada a alterações no metabolismo do colágeno, predispondo à formação de hérnia e recidiva.

Estudos em pacientes com hérnia demonstraram disposição irregular das fibras desta proteína, bem como distúrbios na hidroxilação do colágeno alterando a estrutura desta proteína, resultando em aumento na elasticidade dos tecidos (Klinge e Mertens, 2006).

Em pacientes com hérnia incisional, primária ou recorrente, evidenciou-se alteração na proporção da expressão gênica de colágeno tipo I / III, observando-se uma diminuição desta relação devido ao aumento do colágeno tipo III.

Após a análise da matriz extracelular destes pacientes com HI, a alteração da relação colágeno tipo I / III pode estar associada a alterações na síntese de colágeno ou no processo de degradação desta proteína, este último relacionado com as metaloproteinases de matriz, como relatado por Bellón et al. (2001) na formação de hérnia inguinal direta (JANSEN et al, 2006; BELLON et al, 2001).

O estudo de Kajaer (2004) também relaciona a atividade das MMPs na regulação da MEC e com a degradação do colágeno pela MMP-2, pois nos indivíduos com miopatias inflamatórias foi constatado a superexpressão de MMP-2 e MMP-9, aumentando a degradação da MEC e na cultura de fibroblastos à atividade das MMP-2 e MMP-9 sobre o colágeno tipo I foi bloqueado pela dexametasona (figura 3).



**Figura 3:** Colágeno tipo I síntese e degradação. Representação esquemática das vias envolvidas na síntese do colágeno. Fatores de crescimento funcionam potencialmente como reguladores importantes na ativação do gene estão indicados. TGF- $\beta$  (Fator de Crescimento Transformador- $\beta$ ); IGF / IGF-BP (Fator de Crescimento tipo Insulina e as suas Proteínas de Ligação); IL (Interleucina); FGF (Fator de Crescimento de Fibroblastos); PG (Prostaglandina); VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular). Ativada por MAPK (Mitógeno Proteína Quinase) desempenha um papel regulador importante para a iniciação da sinalização do gene, e as Metaloproteinases de Matriz (MMPs) são importantes reguladores da degradação do colágeno em relação à carga mecânica. Adaptado de Kajaer, 2004.

Os estudos já comprovaram que o colágeno é a principal substância da matriz extracelular e seu papel principal é contribuir para a resistência à tração no processo de remodelamento dos tecidos. O colágeno tipo I é representado por

fibras maduras e mais estáveis, sendo o colágeno tipo III uma isoforma imatura, presente em maior concentração na matriz extracelular de pacientes com hérnias incisional e inguinal (ANTONIOU et al, 2009).

Como citado anteriormente, alterações na proporção de colágeno tipo I/tipo III nos pacientes com hérnias, podem ser atribuídas a um defeito primário na síntese desta proteína ou de uma expressão alterada ocasionada por degradação excessiva da matriz extracelular. As metaloproteinases de matriz (MMPs) são as enzimas mais importantes envolvidas na degradação da matriz extracelular (ANTONIOU et al, 2009).

Estas enzimas constituem uma família de metaloproteinases dependentes de zinco e cálcio para realizarem suas funções, tendo atuação extracelular, atividade de endopeptidase e inúmeros efeitos biológicos funcionais, tais como a regulação do crescimento celular, apoptose, efeitos na angiogênese, entre outros. Sua origem está nas células inflamatórias e mesenquimais, tais como neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e sua expressão modulada por fatores de crescimento, entre eles as citocinas e hormônios, tais como o fator de crescimento de transformação ( $TGF-\beta_1$ ), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), interleucinas, norepinefrina e estrogênio (ANTONIOU et al, 2009).

Devido a esta atividade colagenolítica (tabela 1) de algumas MMPs, atuando na degradação do colágeno da matriz extracelular, a associação destas enzimas com a fisiopatologia da hérnia incisional ou da parede abdominal tem sido observada (ANTONIOU et al, 2009)

Bellón e Durán, 2008 ratificam a atividade das MMPs na regulação da MEC, onde estas enzimas tem participação importante no processo cicatricial, pois

quando a expressão das MMPs esta elevada ocorre dificuldade de cicatrização, como observado em pacientes portadores de Diabetes Mellitus onde foi constatado aumento da expressão de MMP-2 nos fibroblastos da pele destes indivíduos.

Tabela 1: características das MMP-2, MMP-1, MMP-13 e MMP-9 e substratos de atuação:

Matrix metalloproteinase	Genetic location	Classification	Substrates
MMP-2	16q13	Gelatinase	Collagen type I Collagen type II Collagen type III Collagen type IV Collagen type V Collagen type IX Fibronectin Elastin Laminin Aggrecan
MMP-1	11q22-q23	Collagenase	Collagen type I Collagen type II Collagen type III Fibronectin
MMP-13	11q22.3	Collagenase	Collagen type I Collagen type II Collagen type III
MMP-9	20q11.2-q13.1	Gelatinase	Collagen type IV Elastin Plasminogen Laminin Aggrecan

Fonte: Antoniou et al., 2009.

Na tabela 1 a MMP-2, conhecida como gelatinase A, atua na degradação dos colágenos tipos I, III, IV, V entre outros, presentes na matriz extracelular e por evidências atuais sugerindo que é a enzima mais importante na fisiopatologia da hérnia inguinal direta, uma vez que seus níveis estão aumentados na fáscia

transversal de pacientes com hérnia inguinal direta, quando comparados com os pacientes com hérnia indireta (tabela 2) (Antoniou et al, 2009).

**Tabela 2** - Correlação de MMP-2, MMP-1 e MMP-13, com diferentes tipos de hérnia.

Matriz metaloproteinase	Inguinal direta	Inguinal indireta	inguinal recorrente	incisional
MMP-2	+++	±	*	±
MMP-1	—	—	+	±
MMP-13	*	*	+	*

\* Dados insuficientes  
± Dados controversos

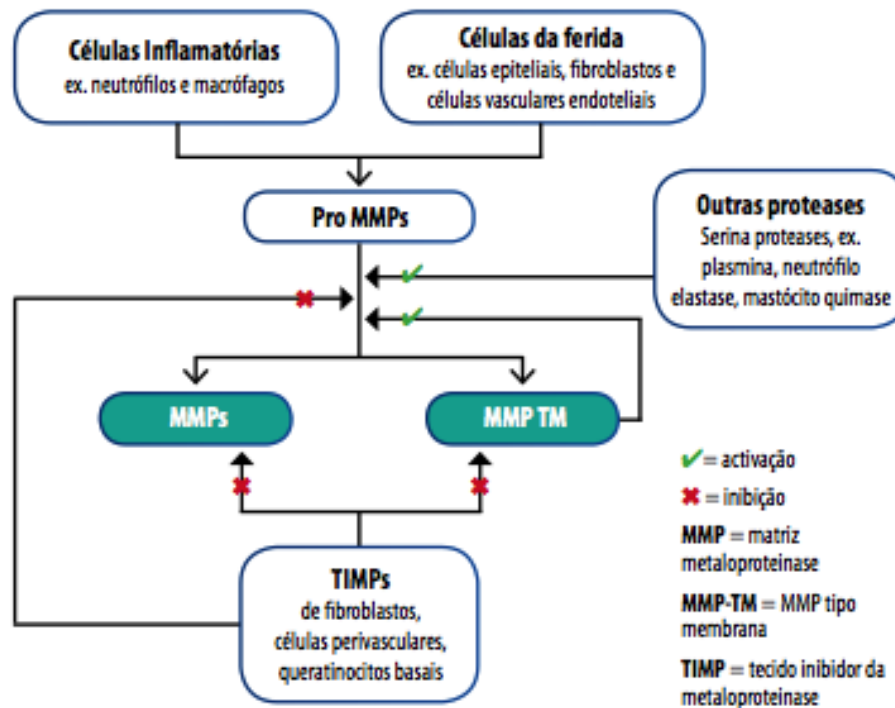
Fonte: Antoniou et al., 2009.

A regulação da atividade das MMP é controlada em vários níveis, tais como a regulação da transcrição, tradução, ativação de zimogênios e inibição das enzimas ativas por inibidores específicos, principalmente inibidores teciduais das MMPs os TIMPs (Gentian e Jaworski, 2005), ilustrada na figura 4.

Além disso, a redução simultânea de TIMP-2 na fáscia transversal destes mesmos pacientes portadores de hérnia inguinal direta corrobora com a teoria de diferentes mecanismos para os dois tipos de hérnia inguinal. Esta teoria é reforçada por outro estudo onde se verificou também o aumento significativo dos níveis sanguíneos da MMP-2 nos pacientes com hérnia inguinal direta ou inguinal recorrente em comparação com portadores de hérnia inguinal indireta primária. O



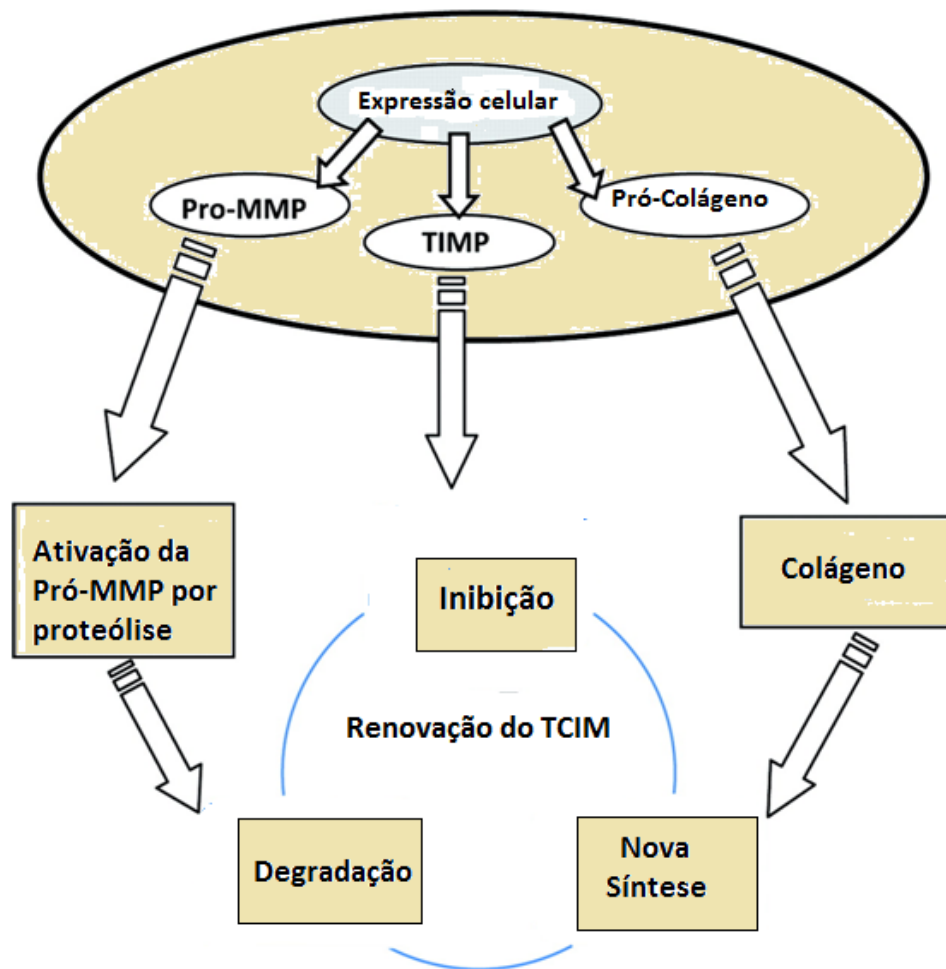
mecanismo de ação da MMP-2 na formação da hérnia inguinal não está muito claro, podendo ocorrer duas situações: o desenvolvimento da hérnia estimularia a produção de MMP-2 ou o aumento da expressão de MMP-2 predispõe a formação da hérnia (ANTONIOU et al, 2009).



**Figura 4:** Inicialmente, as MMPs permanecem na forma latente (pro-MMP), são ativadas por outras proteases que recortam uma parte pequena da molécula. Isto abre o centro ativo da molécula MMP e permite a ligação ao(s) substrato(s) da sua proteína. Outras células chamadas inibidores de tecido de metaloproteinases (TIMPs) podem inibir as MMPs ativadas e bloquear a ativação de pro-MMPs. (Fonte: [www.woundsinternational.com/volume1/Edição\\_1/Novembro2009](http://www.woundsinternational.com/volume1/Edição_1/Novembro2009)).

No estudo de Purslow et al, (2011), também relaciona a homeostase da MEC pela MMPs, pelo sua importante função na degradação e remodelação da matriz extracelular, sendo sua atividade enzimática extracelular modulada por Inibidores de Tecidos das Metaloproteinases (TIMPs). A Figura 5 resume os possíveis papéis da MMP, TIMPs e expressão de colágeno por células de músculo

esquelético e as suas modificações extracelulares no ciclo de renovação do Tecido conjuntivo Intra Muscular (figura 5).



**Figura 5:** Resumo das principais vias pelas quais ocorrem as respostas celulares do tecido muscular in vivo no tecido conjuntivo intramuscular (MICT). Vias de sinalização celular reagem com uma grande variedade de estímulos para aumentar a expressão das metaloproteinasas (MMPs), os inibidores de tecidos de metaloproteinasas (TIMP) e a síntese dos componentes da matriz, tais como o colágeno da proteína fibrosa. O MMP são expressas intracelularmente como enzimas latentes (pró-) e ativadas extracelularmente. O colágeno é expresso intracelularmente como pró-colágeno e modificado extracelularmente para permitir a agregação de moléculas em colágeno fibroso (fibrilogênese). Atividade de MMP na matriz extracelular é resultado do equilíbrio entre a quantidade de MMP ativada e o nível de inibição de TIMPs. Atividade das MMPs e a síntese de novos componentes da matriz determinam o remodelamento do MICT. ( Purslow et al, 2011)

Salameh et al, em 2007, encontraram em amostras de fásia de portadores de hérnia incisional, aumento da expressão de MMP-2, enquanto a de MMP-1 foi semelhante ao grupo controle, sugerindo uma provável relação entre MMP-2 e a

ocorrência de hérnia incisional. Também foi verificado o papel da MMP-9 na cicatrização de feridas e na angiogênese, como já citado anteriormente sobre a participação das MMPs na patogênese do aneurisma da aorta abdominal e da correlação confirmada desta patologia com hérnia inguinal primária; porém a associação da MMP-9 e hérnia abdominal ainda não foi adequadamente esclarecida.

Béllon e col. (2001) realizaram um estudo sobre a atuação da MMP-9 na fisiopatologia da hérnia, uma vez que esta e outras enzimas são secretadas principalmente pelos neutrófilos, macrófagos e outras células presentes na resposta inflamatória, no entanto a MMP-9 não foi detectada no meio de cultura de fibroblastos retirados da aponeurose destes indivíduos.

Antoniou e col. (2009) descrevem uma possível relação da MMP-9 no desenvolvimento da hérnia inguinal uma vez que se observou uma superexpressão de MMP-9 na fáscia transversal dos pacientes portadores de hérnia inguinal em relação ao controle, corroborando para a participação da MMP-9 no desenvolvimento desta patologia.

Como descrito anteriormente, os estudos relacionam o desenvolvimento da hérnia incisional com vários fatores tais como: a falha mecânica, como citamos a mecanotransdução, fatores biológicos como a relação do colágeno tipo I /III e a expressão das MMPs, sendo que este último tem o seu equilíbrio influenciado pelos inibidores de tecido da MMPs, ou seja, os TIMPs que participam ativamente da função e manutenção da matriz extracelular.

Com a realização da laparotomia, fatores são liberados no sítio cirúrgico, como as citocinas, que atuam regulando as MMPs/TIMPs, importantes para a

recuperação e cicatrização da ferida operatória uma vez que atuam diretamente na matriz extracelular. Porém se a resposta (sinalização) inflamatória for prolongada, isto poderá acarretar o comprometimento da cicatrização da ferida operatória predispondo a formação da hérnia incisional (GUILLEN-MARTI et al, 2009).

Independentemente das causas que afetam a capacidade de cicatrização da ferida operatória, estas geralmente compartilham muitas características bioquímicas, tais como: marcadores inflamatórios elevados; elevados níveis de proteases incluindo MMPs; atividade diminuída dos fatores de crescimento e número reduzido de células na ferida (CHEN E ROGERS, 2004).

Estas características resultam em um ambiente desfavorável para o processo de cicatrização da ferida onde o novo tecido e os fatores de crescimento são degradados dificultando a proliferação e o remodelamento necessários para a cicatrização, como se este processo estivesse “inativo” na fase inflamatória da cicatrização, podendo permanecer meses ou até mesmo anos (FALANGA et al, 1994).

Esta situação pode ser claramente observada na imagem de um ciclo vicioso designado como Circulo de Cullen, como ilustrado na figura 6:



**Figura 6:** tecidos danificados atraem bactérias, que também produzem MMPs, a fim de consumir os nutrientes contidos nas células/tecidos. Os microrganismos também eliminam toxinas, através das quais aumentam a quantidade de leucócitos para a área da ferida. Os leucócitos tentam destruir as bactérias, causando danos graves nas células e tecidos saudáveis, originando o ciclo "vicioso", uma vez que as células danificadas sintetizam novamente mais MMPs.  
(Fonte: [www.woundsinternational.com/volume1/Edição 1/Novembro2009](http://www.woundsinternational.com/volume1/Edição 1/Novembro2009)).

Na hérnia incisional observamos tanto o comprometimento da aponeurose quanto dos músculos (esquelético) abdominais, desta maneira a hipótese para tal ocorrência seria a presença persistente de fatores inflamatórios atuando nestes músculos (sensíveis a estímulos pró-inflamatórios), levando a perda de tecido muscular, sendo este responsável pela complacência da parede abdominal, contribuindo assim para a formação de hérnia abdominal (Lipman et al, 2008).

Mas para que esta resposta inflamatória ocorra nos tecidos, mais especificamente na matriz extracelular, é necessária a adesão das células à vizinhança das matrizes extracelulares determinando o seu formato, a sua função celular adequada e a integridade do tecido. Receptores de adesão presentes na superfície celular contribuem para o ancoramento das células, para a sinalização do tráfego celular e a diferenciação celular.

Dentre os receptores de citoadesão que se encontram na superfície celular existem quatro classes principais envolvidos nas interações célula-célula e célula-matriz: as caderinas, as selectinas, a superfamília de receptores de imunoglobulinas e as integrinas (Ruoslahti e Pierschbacher, 1987; Romanov et al, 1997), indispensáveis para a adesão célula-célula e célula com a matriz extracelular.

As integrinas, responsáveis pela adesão celular e também pela regulação da angiogênese e da homeostasia vascular, contribui para interação física com a matriz extracelular necessária para a adesão, migração e posicionamento celulares e a indução de eventos sinalizadores essenciais para a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (GOULD et al, 1990).

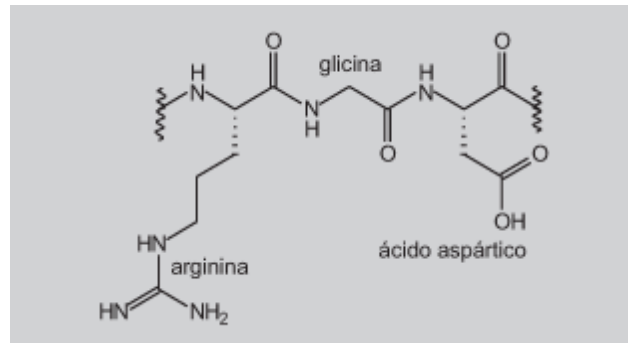
As integrinas são uma família de glicoproteínas transmembrana heterodiméricas, consistindo de duas sub-unidades  $\alpha$  (150 a 180 KD) e  $\beta$  (~90 KD), associadas não-covalentemente. Atualmente, são conhecidos dezoito tipos de subunidades  $\alpha$  e oito tipos de subunidades  $\beta$  que, combinadas, constituem pelo menos 24 integrinas já descritas (Xiong *et al.*, 2001; Tucker, 2002; Becchetti A. & Arcangeli A.,2010), na tabela 3 estão demonstrados alguns exemplos destas integrinas e seus ligantes.

**Tabela 3:** Integrinas e seus ligantes.

<b>H. sapiens Integrinas</b>	<b>Ligantes</b>	
$\alpha 3\beta 1$ $\alpha 6\beta 1$ $\alpha 7\beta 1$	LN; TSP LN; ADAMs LN	<b>RECEPTORES LAMININA</b>
$\alpha 6\beta 4$	LN	
$\alpha 1\beta 1$	CO; LN	<b>RECEPTORES</b>
$\alpha 2\beta 1$	CO; LN; MMP1	<b>COLAGENO</b>
$\alpha 10\beta 1$	CO	<b>FIBRILAR</b>
$\alpha 11\beta 1$	CO	
$\alpha 5\beta 1$ $\alpha 8\beta 1$ $\alpha v\beta 1$	FN; ADAMs FN; NN; TN; LAP FN; VN; LAP	<b>RECEPTORES RGD</b>
$\alpha v\beta 3$	FN; VN; VWF; OP; TN; BSP; TSP; <i>CD31</i> ; ADAMs; MMP2	
$\alpha 11b\beta 3$	FN; VN; FG; VWF; CD40L; prothrombin	
$\alpha v\beta 5$	VN; BSP; LAP	
$\alpha v\beta 6$	FN; TN; LAP	
$\alpha v\beta 8$	FN; CO; LN; LAP	
$\alpha 4\beta 1$	FN; OP; <i>VCAM</i>	
$\alpha 9\beta 1$	TN; OP; LN; CO; <i>VCAM</i> ; ADAMs	
$\alpha 4\beta 7$	FN; <i>VCAM</i> ; <i>MadCAM</i>	<b>INTEGRINAS</b>
$\alpha E\beta 7$	<i>E-cadherin</i>	<b>LEUCOCITOS-ESPECIFICOS</b>
$\alpha D\beta 2$	<i>ICAM3</i> ; <i>VCAM</i>	
$\alpha L\beta 2$	<i>ICAM1-5</i>	
$\alpha M\beta 2$	<i>ICAM1</i> ; <i>VCAM</i> ; FG; iC3b	
$\alpha X\beta 2$	FG; iC3b	

ADAM: proteína com domínio metaloprotease e similar a desintegrina; BSP: siálicos proteína óssea; CO:colageno(s); FG:fibrinogenio; FN: fibronectina; iC3b: componente complementar Inativados 3b; ICAM: molécula de adesão intercelular; LAP:TGFb latente associado proteína; LN:laminina(s); MadCAM:molécula de adesão de célula mucosa; MMP: metaloprotease de matriz; NN:nefronectina; OP: osteopontina; TG: tigrin; TN:tenascin; TSP: trombospondina; VCAM:molécula de adesão de células vascular; VN: vitronectina; VWF: Fator de von Willebrand. Interações envolvendo adesões intercelulares estão indicadas em itálico (Fonte: Madame Curie Bioscience Database, 2009).

Estas glicoproteínas possuem um sítio de reconhecimento comum denominado motivo RGD (Figura 7), que se trata de uma sequência tripeptídica contendo arginina-glicina-acido aspártico.

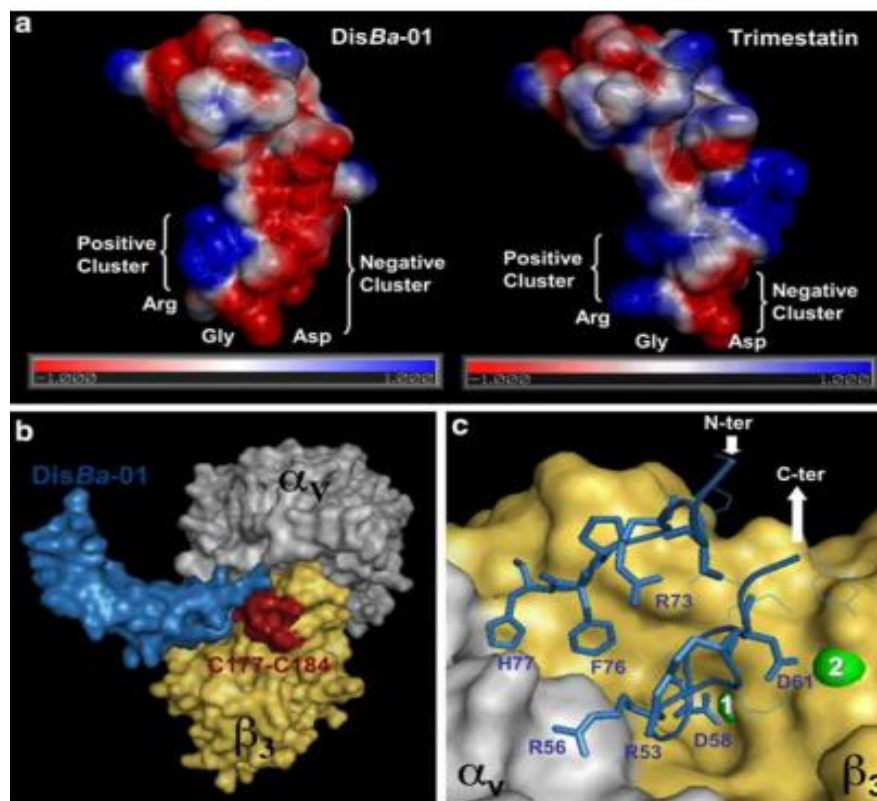


**Figura 7:** Sequencia tripeptídica RGD.

Foram descrito resultados contrastantes sobre a atuação da integrina  $\alpha_v\beta_3$  no processo de reparo tecidual, uma vez que a expressão desta integrina estaria aumentada em células relacionadas com os processos de reparo tais como plaquetas, macrófagos, células endoteliais ativadas e fibroblastos. Observou-se também que os inibidores da integrina  $\alpha_v\beta_3$  diminuía o tecido de granulação e a angiogênese, sugerindo que esta seria importante para o reparo tecidual (Reynolds et al., 2005).

Atualmente são conhecidas moléculas de baixa massa molecular, contendo motivo RGD, rico em cisteína isolados de veneno de víboras, que são potentes inibidores de integrinas, por apresentarem alta afinidade de ligação com estas moléculas. Analogamente aos anticorpos monoclonais, estes peptídeos ricos em cisteína são os inibidores mais potentes de integrina conhecidos e foram denominados de Desintegrinas (Figura 8) (Gould et al, 1990).





**Figura 8:** a) Trimestatin: primeira estrutura cristalina de uma desintegrina; Fujii et al, 2003. b) ligação DisBa-01 e  $\alpha_v\beta_3$ . c) modelo molecular tridimensional interface da DisBa-01 com  $\alpha_v\beta_3$ , Ramos et al, 2008.

O trimestatin a primeira estrutura cristalina de uma desintegrina relatada, encontrado no veneno de serpente, possui em número de voltas e laçadas formando um núcleo rígido estabilizado por seis ligações dissulfureto. A disposição da sequência RGD em forma de gancho, posiciona as cadeias laterais de Arg e Asp em sentidos opostos, este modelo de acoplamento utilizando a estrutura de cristal da integrina  $\alpha_v\beta_3$  sugere que a Arg se liga ao domínio de hélice, e a Asp ao domínio pA, indicando que a região do terminal C seria outro local potencial de ligação com os receptores de integrina, proporcionando compreensão da elevada afinidade e seletividade da desintegrina para os receptores de integrina (Fujii et al, 2003).

Podemos relatar o isolamento e produção de uma desintegrina RGD recombinante, a DisBa-01 (Genbank n. AY259516) da víbora brasileira *Bothrops alternatus* (Ramos et al, 2008). A DisBa-01 é uma proteína de 78 resíduos com um motivo adesivo RGD. A proteína recombinante é produzida em fusão com um peptídeo contendo 6 resíduos de His e tem um peso molecular de 11.637 Da deduzido por espectrometria de massa.

A DisBa-01 (uma fusão recombinante His-tag RGD), inibiu tanto a angiogênese como a metástase de pulmão de melanoma B16F10 em camundongos nude, apresenta alta afinidade com  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , inibindo a agregação plaquetária induzida por ADP, trombina e fibrinogênio *in vitro*, inibe também o tempo de oclusão trombótica e de sangramento *in vivo* (Ramos et al., 2008; Kauskot et al, 2008).

Recentemente, foi demonstrado que DisBa-01 inibe a migração de células tumorais *in vitro*, diminui a expressão de VEGF e dos seus receptores nas células endoteliais, mas não em fibroblastos ou células tumorais. Além disso, esta desintegrina modula atividades das MMP 2 e 9, sendo este o primeiro relato de tais atividades para este bloqueador de integrina, evidenciando novas perspectivas para conhecer o papel da integrina  $\alpha_v\beta_3$  no microambiente tumoral (Ramos et al., 2008).

Os resultados observados no estudo de Ramos et al, (2008), sugerem uma relação desta desintegrina (DisBa-01) com integrinas como a  $\alpha_{IIb}\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_3$ , motivando o prosseguimento de estudos, visando a aplicação terapêutica e/ou laboratorial da DisBa-01 em outras desordens relacionadas ao colágeno,

proliferação celular e no processo de angiogênese em diferentes condições clínicas.

Na dissertação de Mestrado, nosso estudo evidenciou que a DisBa-01, inibiu o desenvolvimento da HI no modelo experimental em ratos através da formação de uma película e a análise desta apresentava colágeno na sua composição, o que foi confirmado por sequenciamento de uma das bandas majoritárias, sendo a sequência GEQGPAGS comparada com o banco de dados, resultando que a estrutura era de colágeno tipo I. Outro dado observado na Dissertação de Mestrado foi o resultado do bloqueio da integrina  $\alpha_V\beta_3$ , por anti-corpos anti- $\alpha_V\beta_3$ , na cicatrização nos animais estudados.

Considerando que a hérnia incisional está intimamente relacionada a tais mecanismos, justifica-se a elaboração deste estudo, objetivando avaliar os efeitos da DisBa-01 sobre as alterações provocadas pela indução de hérnia incisional em ratos.

## 2) OBJETIVOS

### **Geral:**

Avaliar o bloqueio da integrina  $\alpha_v\beta_3$  pela DisBa-01 na melhora da cicatrização de hérnia incisional.

### **Específicos:**

- 1) Avaliar os efeitos da DisBa-01 em diferentes doses no reparo de HI.
- 2) Avaliar os efeitos da DisBa-01 em diferentes doses, na expressão gênica de MMP-2, no colágeno tipo I e III, no VEGF.
- 3) Avaliar as alterações histológicas nos tecidos pelo uso da DisBa-01.

### 3) MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1) Amostra

Neste projeto de pesquisa foram estudados 30 ratos, albinos, *Wistar*, machos, com idade entre 3 a 4 meses, com peso  $\pm$  250g/animal, fornecidos pelo Biotério central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética na experimentação animal da UFSCar, parecer nº 001/2008, protocolo nº 001/2008.

Os animais foram alojados no Laboratório de Neuroendocrinologia no Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar e acondicionados em gaiolas de polipropileno. Foram alimentados com ração peletizada da marca pró-biotério para roedores e água *ad libitum*, e submetidos a ciclo fotoperiódico claro/escuro de 12hs cada, e sob temperatura controlada entre 22° e 24°C. Inicialmente foram pareados por peso, e randomicamente distribuídos para um dos 5 grupos (6 animais/grupo) descritos a seguir: Controle; Sham; DisBa-01(0,25mg/kg); DisBa-01(0,5mg/kg) e DisBa-01(1,0mg/kg).

A DisBa-01 recombinante foi produzida a partir de uma fração do mRNA purificada da glândula de *Bothrops alternatus*, (Ramos et al, 2008). A região codificada corresponde a uma desintegrina média (78 resíduos de aminoácidos), com um motivo adesivo RGD (Genbank n. AY259516). A proteína de fusão His-Tag produzida em *E. coli* é uma proteína 12 kDa, como estimado por espectrometria de massa e SDS-PAGE.

## **3.2) Procedimentos Experimentais**

### **3.2.1) Indução da Hérnia Incisional**

Todos os animais, exceto o Grupo Controle, foram sedados com éter etílico colocados em decúbito dorsal, e imobilizados sobre suporte para cirurgia experimental. No abdome foram realizadas a tricotomia manual e descontaminação com álcool a 70%.

Para induzir a HI mediana, todos os animais, exceto o Grupo Controle, foram submetidos a uma incisão transversa no abdome, suprapúbica, com cabo de bisturi nº 3 e lâmina nº 15, de aproximadamente 15 mm de comprimento, interessando a pele e a tela subcutânea, (Figura 9) através da quais estas foram separadas do plano muscular por dissecção romba, com tesoura, em direção cranial e a cada lado da linha mediana. A seguir, a linha alba e o peritônio parietal foram seccionados numa extensão de 30mm, mantendo-se íntegra a pele suprajacente.



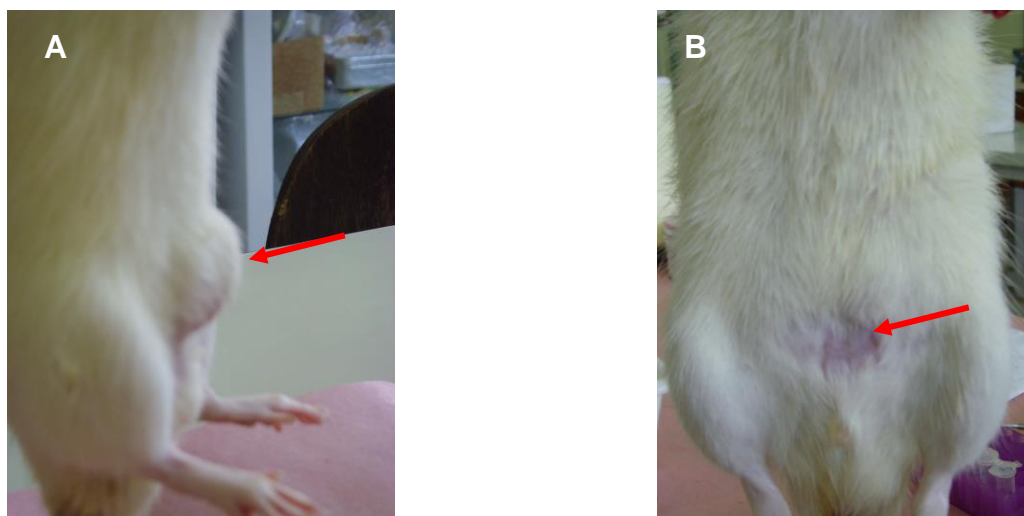
**Figura 9:** Suporte para cirurgia experimental, material utilizado para indução da hérnia incisional nos animais.

O Grupo Sham recebeu 1 ml PBS por aplicação tópica por pipeta automática nas bordas da musculatura da parede abdominal, o Grupo DisBa-01 recebeu aplicação tópica por pipeta automática de 1ml de solução DisBa-01 a 0,25mg/Kg / 0,5mg/Kg / 1,0mg/Kg respectivamente, nas bordas da musculatura da parede abdominal, sendo aproximadamente 0,11mg/animal de DisBa-01. As doses de DisBa-01 foram diferentes, para observarmos se haveria efeito dose dependente.

Estas soluções permaneceram previamente por 30 minutos sob ultravioleta (UV). A incisão cutânea foi suturada com pontos separados de catagute 3.0 simples (Paulo et al, 1997) e higienizada com água oxigenada e álcool a 70%. Os animais foram devolvidos para as gaiolas e observados até recuperação dos movimentos normais.

### 3.2.2) Controle pós-operatório

No pós-operatório, os animais de cada grupo foram examinados, diariamente, exceto o Grupo Controle, para inspeção da ferida cirúrgica e constatação da HI, colocando-se o animal na posição vertical e verificando o abaulamento característico na região abdominal, até o final do período de observação que foi de 14 dias, conforme ilustrado na figura 10, sendo que um animal do Grupo DisBa-01(1,0mg/kg) foi a óbito, ficando este grupo com 4 animais.



**Figura 10:** **A:** Hérnia incisional presente em todos os animais dos grupos G2 e G3, após indução cirúrgica; **B:** para inspeção da ferida cirúrgica.

### 3.2.3) Sacrifício dos animais e obtenção dos extratos de tecidos

Após 14 dias da indução da HI, todos os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação utilizando-se uma guilhotina. Após dissecação da pele, foi



seccionado um fragmento da parede abdominal, incluindo o peritônio, englobando toda a área do anel herniário. Nesse bloco, encontrava-se o tecido cicatricial.

Foram seccionados fragmentos (figura 11) englobando o anel herniário dos Grupos Sham, DisBa-01 - 0,25mg/Kg / 0,5mg/Kg / 1,0mg/Kg, respectivamente, que foram utilizados para a determinação da atividade de MMPs por zimografia. Esses fragmentos foram, então, imediatamente congelados por meio de imersão em nitrogênio líquido, armazenados em tubos de criogenia e posteriormente guardados em freezer a uma temperatura aproximada de  $-80^{\circ}\text{C}$  até a sua análise.

Após, o restante dos fragmentos obtidos da parede abdominal foram fixados em Formol tamponado a 10% (água destilada 900 ml, Formol 100 ml, monobásico sódio fosfato 4,0g, dibásico sódio fosfato 6,5). A fixação paralisa o metabolismo celular e preserva as estruturas do tecido para os tratamentos posteriores. Além disso, evita a autólise celular, impede a proliferação de microrganismos, leva ao endurecimento do tecido para que resista aos tratamentos posteriores. Este fixador ocasionou o mínimo de dano ao tecido e de artefatos.

### **3.2.3.1 Preparação das amostras de Proteínas e Western Blotting**

Amostras de tecido coletadas dos animais (Figura 11) foram imediatamente depositadas em nitrogênio líquido e em seguida congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . No dia do experimento, para cada mg de tecido foram adicionados 25 $\mu\text{L}$  de tampão de extração (cloreto de guanidina 4M, acetato de Sódio 50 mM, EDTA 50 mM, pH 5,8 e 1mM PMSF). As amostras foram mantidas por 24h neste tampão. Após este

tempo, as amostras foram precipitadas com tampão acetato-etanol da seguinte forma: para 50 $\mu$ L de extrato foi adicionado 100 $\mu$ L de tampão acetato 1M, pH 7,4 contendo 1.350 $\mu$ L de etanol absoluto (volume final = 1,5mL).

Em seguida as soluções foram misturadas e a amostra foi mantida durante a noite toda em freezer (-20°C). No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas (4 min, 8000rpm, temperatura ambiente), e o precipitado foi seco em estufa (37°C) e em seguida ressuspendido em tampão de amostra para SDS-PAGE.



**Figura 11:** coleta de amostras para zimografia / Western Blotting.

### 3.2.3.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE

As amostras de tecido foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE, Laemmli, 1970). As amostras foram aplicadas em um gel de empilhamento de 5% de poliacrilamida e gel de resolução de 10% e submetidas à eletroforese com corrente elétrica de 15

mA e voltagem até 125V, durante aproximadamente uma hora e meia. As bandas protéicas foram reveladas incubando-se os géis em solução corante contendo 0,25% de *Comassie Brilliant Blue R-250* (BioRad) dissolvidos em 50% isopropanol e 10% ácido acético, e solução descorante de 10% ácido acético e 10% de metanol.

O tampão de amostra consistiu de Tris-HCl (0,125 M pH6,8), dodecil sulfato de sódio (SDS – 4%), azul de bromofenol (0,025%), glicerol (20%) e o agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol (concentração final 0,1M). A massa molecular aparente da proteína de interesse foi estimada utilizando-se padrões de massa molecular conhecidos, na faixa de 15-220kDa (*Benchmark Protein Ladder* – Gibco).

### **3.3) Extração de RNA e PCR quantitativo**

Aproximadamente 100 mg de amostras de tecidos congelados foram homogeneizados em reagente de Trizol ( Invitrogen Corporation , Califórnia , EUA ) de acordo com as instruções do fabricante . A pureza e o rendimento de RNA total foram determinados medindo-se a absorbância de alíquotas a 260 nm e 280 nm e a 260 e 230 nm. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose (2 %).

A quantidade de 1  $\mu$ g do RNA total de cada amostra foi tratado com ADNase I (Invitrogen Corporation Califórnia, EUA) para remover a contaminação de DNA genómico e a transcrição reversa foi realizada com a M-MLV de transcriptase reversa (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). Por PCR em tempo real (CFX96 Tempo real Sistema C1000 térmica, Bio -Rad), 20ng de cDNA foram

utilizados no sistema de volume de 12,25 µl contendo SsoFast™ EvaGreen® Supermix EVAGreen (Bio- Rad), primers (Tabela 4) e RNase livre de água.

Uma curva padrão de cDNA de tecidos de rato foi executado em duplicado. Todas as reações foram realizadas em duplicado. As quantidades relativas de RNA foram calculadas utilizando o método comparativo Ct. O programa de ciclo térmico foi de 95°C durante 30s, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15s, 57 - 61°C durante 30s e 72°C durante 30s. A expressão de todos os genes foi normalizada para P0 proteína ribossomal grande (RPLP0) expressão.

**Tabela 4:** Primers para PCR - tempo-real (RT-PCR).

<b>RNAm</b>	<b>número de acesso</b>	<b>Sense primer</b>	<b>Antisense primer</b>
<b>COL I A1</b>	NM_053304.1	ATCAGCCCAAACCCCAAGGAGA	CGCAGGAAGGTCAGCTGGATAG
<b>COL III A1</b>	NM_032085.1	TGATGGGATCCAATGAGGGAGA	GAGTCTCATGGCCTTGCGTGTTT
<b>MMP-2</b>	NM_031054.2	CTGGGTTTACCCCTGATGTCC	AACCGGGGTCCATTTTCTTCTTT
<b>VEGF-A</b>	NM_001110334.1	CCACGACAGAAGGGGAGCAGAA	GGAAGATGTCCACCAGGGTCTCAA
<b>RPLP0</b>	NM_022402.2	AGGGTCCTGGCTTTGTCTGTGG	AGCTGCAGGAGCAGCAGTGG

COL I e COL III (colágeno I e colágeno III, respectivamente); MMP-2 (matriz metallopeptidase 2); VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) e RPLP0 (proteína ribossomal grande P0).

### **3.4) Análise Histológica**

Após a devida fixação dos tecidos em formol tamponado a 10%, foram realizados cortes transversais atingindo toda a espessura do fragmento e eleitos dois cortes para serem colocados em cassetes histológicos.

O material foi processado rotineiramente para exame histológico em processador automático de tecidos Lupe® modelo PT03 (histotécnico), obedecendo aos tempos determinados automaticamente pelo equipamento. As lâminas foram montadas utilizando-se verniz vitral e posteriormente avaliadas em microscópio óptico Nikon Eclipse. Dos dois cortes de cada amostra foi então eleito um corte, no qual foram realizadas as colorações pelo Tricrômio de Masson (TM) através da utilização do Histokit Erviegas®, para colágeno e músculo, sendo colágeno corado em azul e músculo corado em vermelho.

### **3.5) Análise Quantitativa do Colágeno**

A quantificação do colágeno foi determinada utilizando-se o sistema de pixels por meio do software Image J (National Institutes of Health - NIH, versão 1,47; USA).

### 3.6) Determinação da atividade de MMP-2 por zimografia

O extrato tecidual foi testado para verificar a presença de atividade de proteases através da técnica de zimografia, conforme descrito por CLEUTJENS (1995). As amostras de fragmento da parede abdominal e anel herniário foram incubadas com 2ml tampão de extração [10 mM de ácido cacodílico (pH 5,0), 0,15 M NaNO<sub>3</sub> e 0,01% de Triton X-100] a 4 °C, em agitação contínua, por um período de 24 horas. Após este tempo o tampão de extração foi coletado por centrifugação (10 minutos, 4°C em 13000 rpm). As amostras dos grupos controle, Sham e DisBa-01 foram concentradas de maneira que cada poço do gel de zimografia continha 10 µg de proteína. Foi adicionado em todas as amostras 10 µl de tampão de amostra sem β-mercaptoetanol (agente redutor). As amostras foram resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS 10% e gelatina na concentração final de 1mg/ml. Após a corrida, o gel foi lavado uma 2 vezes durante 20 minutos em solução 2,5% de Triton X-100 para remoção do SDS. O gel foi incubado no tampão de substrato (Tris-HCl 50mM pH 8,0, CaCl<sub>2</sub> mM e NaN<sub>3</sub> 0,02%), a 37 °C, durante 20 horas. Após este tempo, foi corado com Coomassie Blue Brilliant R-250 (Bio-Rad) por 30 minutos, descorado com ácido acético: metanol: água (1:4:5) para visualização das áreas de atividade. Os géis foram fotografados por uma câmera Canon G6 Power Shot 7.1 mega pixels (Virginia, USA) e as medias da intensidade das bandas ativas foram mensuradas usando o software Gene Tools. Os géis foram preparados em uma mesma remessa, corridos ao mesmo tempo, fotografados e revelados nas mesmas condições.

### 3.7) Análises de Western Blotting

A quantidade de 200 mg de músculo da parede abdominal, incluindo o anel herniário onde encontrava-se o tecido cicatricial, foi homogeneizada em 3 ciclos de 20 segundos no homogeneizador de tecidos FastPrep<sup>®</sup>-24 (MP Biomedicals) em tampão fosfato de lise contendo Tris 10mM, pH 7,5, NaCl 10mM, EDTA 0,1mM, Triton X-100 0,5%, NaN<sub>3</sub> 0,02% e PMSF 0,2mM dissolvido em DMSO.

A concentração proteica foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA) utilizando a albumina de soro bovino como padrão. As amostras foram diluídas em solução redutora contendo Tris-HCl 0,0625 mM pH 6,8, 20% glicerol, azul de bromofenol 0,02% e 2% β-Mercaptoetanol. A separação das amostras foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE em tampão de corrida contendo Tris-HCl 25mM pH 8,3, SDS 0,1% e glicina 192mM a 100V durante 90 minutos. As proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) em solução tampão contendo Tris-HCl 25mM, glicina 192mM, metanol 20% e SDS 0,025% à 350mM durante 90 minutos. O bloqueio dos antígenos inespecíficos foi realizado em solução tampão TBS-T com leite desnatado 5% durante 60 minutos. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários de cabra anti-COL I (A1) diluição 1:1.000, overnight à 4°C, lavadas por solução tampão TBS-T por 3 vezes durante 5 minutos sob agitação e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário (Anticorpo de cabra e de coelho anti-IgG de rato) diluição 1:5.000, por 120 minutos. Após incubação, a membrana foi lavada por solução tampão TBS-T por mais 3 vezes e a

imunodeteccção realizada por quimioluminescência com o kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Health Care Life Sciences) e reveladas em fotodocumentador ChemiDoc XRS System (Bio Rad).

### **3.8) Análise Estatística dos Dados**

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP). Após o teste de normalidade de *Komogorov-Smirnov*, utilizaram-se os testes t não pareado (intergrupos) para os testes qualitativos. A média e o erro padrão foram calculados para os dados quantitativos. A significância para três ou mais variáveis foi determinada por análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ( $p \leq 0,05$ ) e os softwares utilizados foram o *Instat Graphpade* e o programa *Statistical Package for the Social Sciences*<sup>TM</sup> (SPSS – IBM, version 10.0.1, 1999).



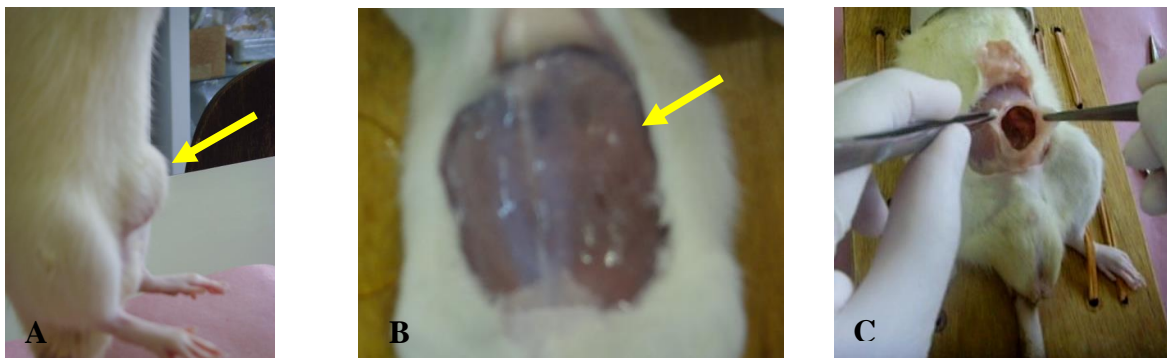
#### 4) RESULTADOS

Após a indução cirúrgica todos os animais, Grupo Sham e DisBa-01, exceto o grupo controle, formaram hérnia incisional (tabela 5).

**Tabela 5:** Resultado do pós operatório e presença do anel herniário e formação da membrana, após 14 dias do experimento de todos os grupos.

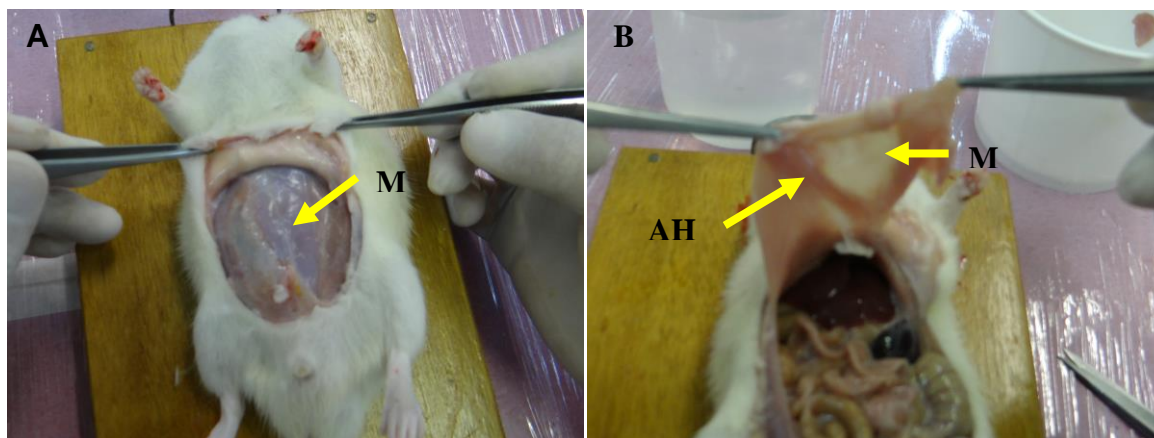
<b>Grupo</b>	<b>Hérnia Dia 1</b>	<b>Anel Herniário Dia 14</b>	<b>Presença de membrana Dia 14</b>
<b>Controle</b>	0/6	0/6	0/6
<b>Sham</b>	6/6	6/6	6/6
<b>DisBa 0.25 mg</b>	6/6	6/6	6/6
<b>DisBa 0.5 mg</b>	6/6	6/6	3/6
<b>DisBa 1.0 mg</b>	6/6	6/6	6/6

A progressão da HI foi acompanhada de avaliação periódica do animal, traduzida pelo abaulamento característico do abdome conforme mostrado na Figura 12. No 14º dia, após o sacrifício dos mesmos para a retirada de fragmento do músculo da parede abdominal, foi possível observar a parede íntegra em todos os animais do grupo controle.



**Figura 12:** **A:** presença de hérnia incisional em todos os animais do grupo Sham e DisBa-01 após a indução cirúrgica todas as características da hérnia incisional; **B:** parede íntegra no grupo controle, **C:** anel herniário aberto grupo DisBa-01 – 0,5 mg.

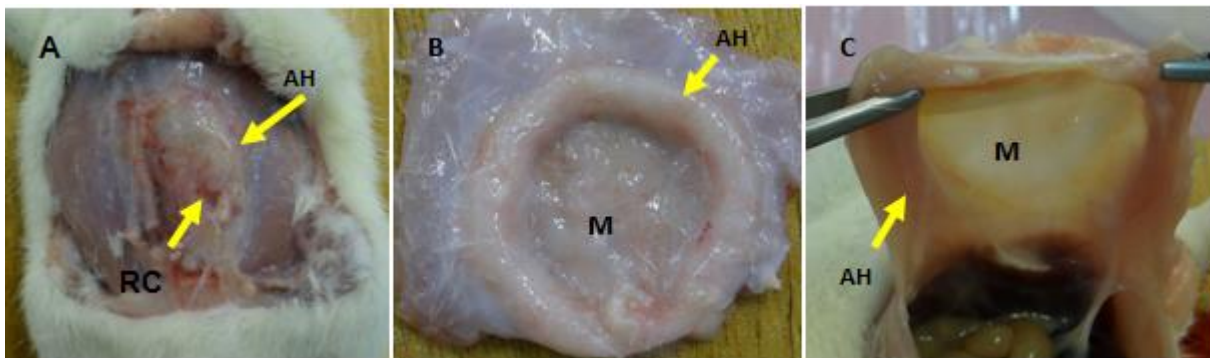
No grupo Sham, após o sacrifício dos animais no 14º dia, para a retirada de fragmento do músculo da parede abdominal, foi observada em todos os animais a presença de uma membrana tênue que ocluía todo o anel herniário, transparente e frágil conforme ilustrado na figura 13.



**Figura 13:** Sham: **A:** Membrana(M) tênue e frágil presente em todos os animais do grupo Sham ocluindo o anel herniário; **B:** limites do anel herniário (AH) ocluído pela membrana (M).

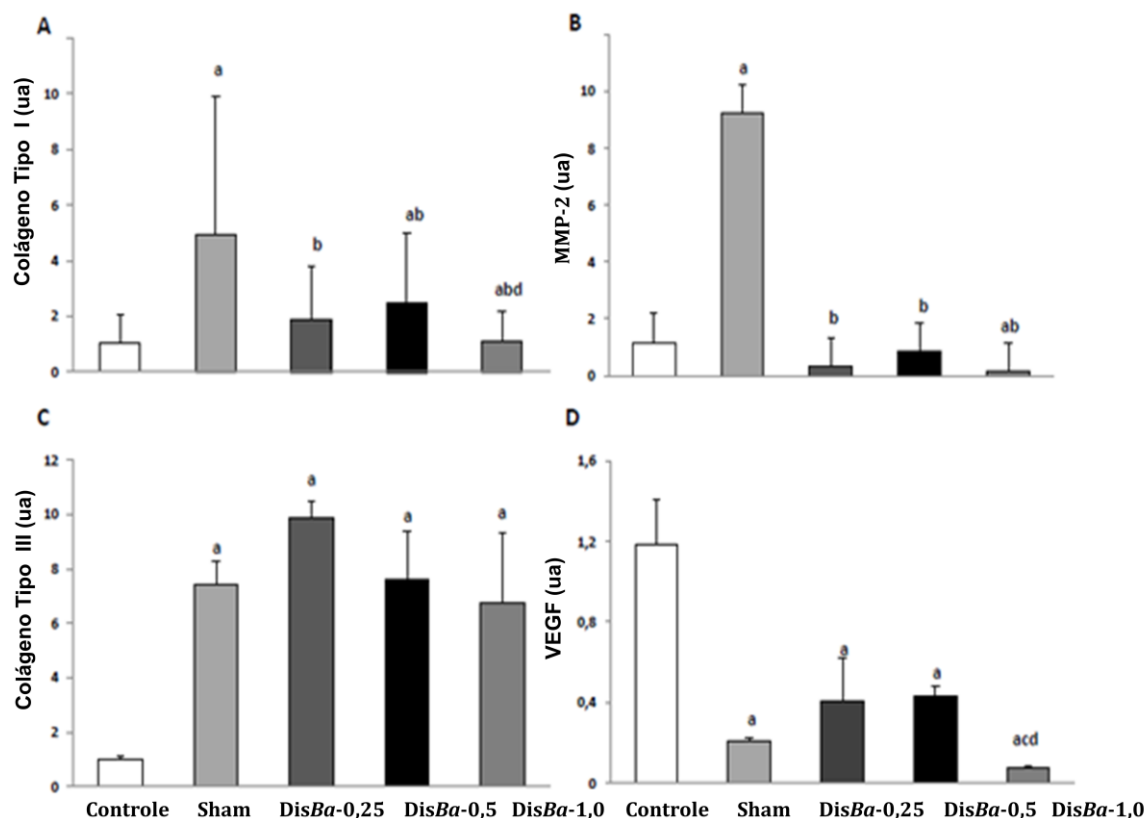
No grupo DisBa-01 – 1mg/kg, após o sacrifício dos animais no 14º dia, foi observada a presença de membrana branco nacarada, espessa e resistente a manipulação, aspecto fibrótico, ocluindo todo o anel herniário e também a presença

de retração cicatricial, a qual não foi observada nos grupos DisBa-01- 0,25 e 0.50 mg/kg. (figura 14).



**Figura 14:** animais tratados com DisBa-01. **A:** presença de retração cicatricial ferida operatória (RC) e oclusão do anel herniário por membrana aspecto fibrótico; **B:** fechamento do anel herniário por membrana resistente (M) de aspecto fibrótico (branco nacarado) resistente e limites do anel herniário (AH); **C:** Dissecção da parede abdominal evidenciando a presença da membrana aspecto fibrótico e limites do anel herniário.

A seguir, na figura 15, estão apresentados os resultados da análise da expressão gênica do colágeno I, colágeno III, VEGF e MMP-2 entre os grupos estudados.



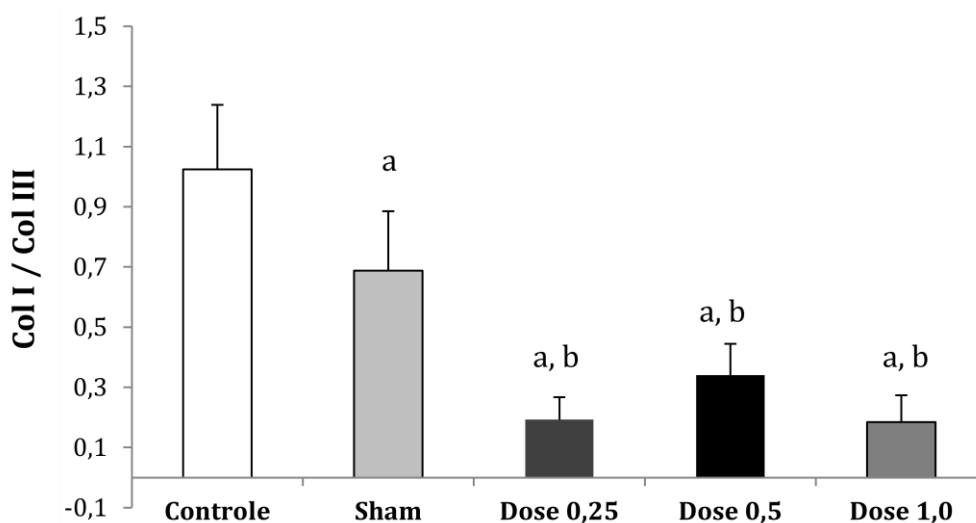
**Figura 15:** Expressão gênica de Colágeno I (A), MMP-2 (B), colágeno III (C), e VEGF (D) nos extratos da parede abdominal dos controles (sem IH), grupo de Sham, e dos grupos tratados com DisBa-01 0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg. Os dados são expressos em unidades arbitrárias. (ANOVA e teste de Tukey,  $P < 0,05$ ). Em a = diferença com grupo controle; b = diferença com grupo Sham; c = diferença com DisBa-01(0,25) e d = diferença com DisBa (0,50).

Como pode ser observado na figura 15, o grupo Sham aumentou significativamente o colágeno I e III quando comparado com o grupo controle (Figura 15A e 15C, respectivamente,  $P < 0,05$ ). No entanto, o grupo DisBa-01 não afetou a expressão de colágeno III, uma vez que em todos os grupos, os valores não foram significativamente diferentes dos animais do grupo Sham (Figura 15C). Porém observamos que, em relação ao colágeno I, o grupo Sham teve aumento em relação ao grupo controle; o grupo DisBa-01 (0,5 e 1,0 mg/kg) também apresentou aumento em relação ao controle e foi menor em relação ao Sham.

A indução de IH fortemente ativou a expressão de MMP-2, mas este efeito foi completamente inibido pela DisBa-01 em todas as doses testadas (Figura 15B). A dose mais elevada da desintegrina DisBa-01 produziu níveis de MMP-2 abaixo do grupo controle ( $P < 0,05$ ).

Além disso, a expressão de VEGF foi severamente diminuída pela cirurgia após 14 dias. (Figura 15D). A DisBa-01 na dose de 1,0 mg/kg intensificou o efeito negativo em relação ao grupo Sham na expressão do gene de VEGF, enquanto as doses mais baixas não causaram efeito semelhante.

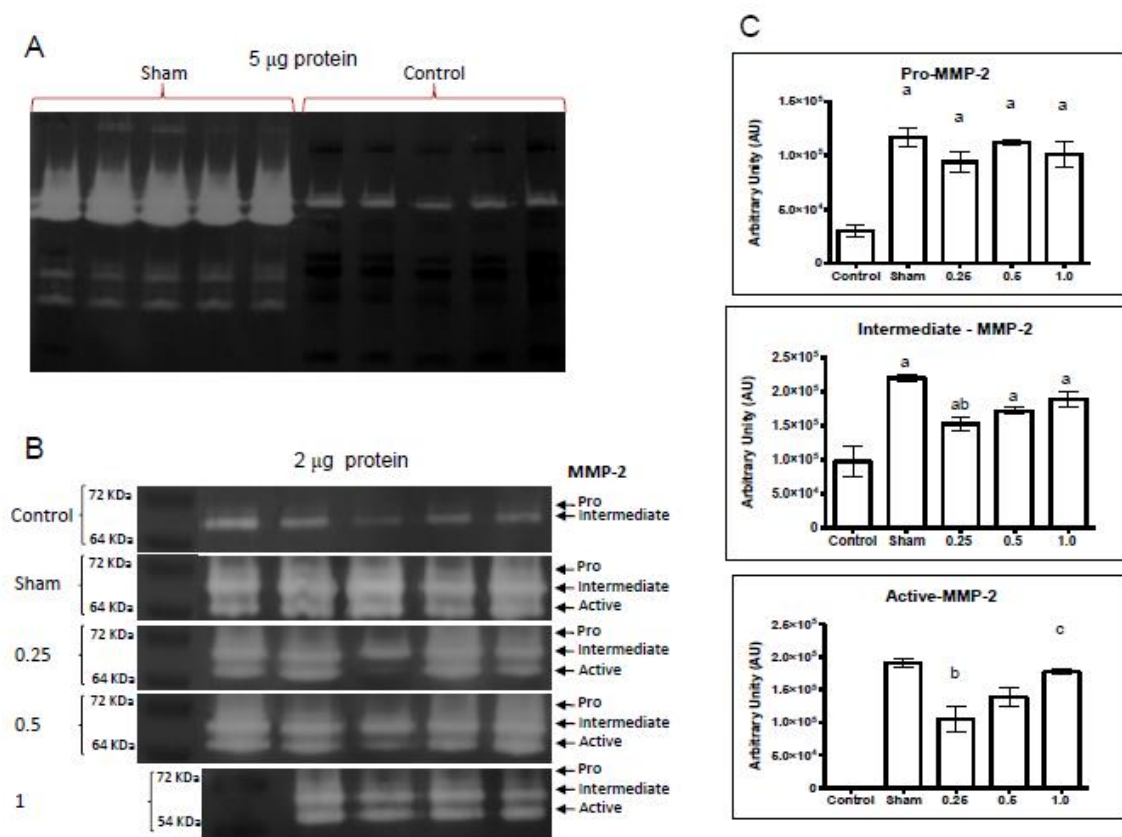
A figura 16 mostra a relação da expressão de colágeno I com colágeno III (Col I / Col III).



**Figura 16:** Relação da expressão gênica do Colágeno I / Colágeno III nos extratos da parede abdominal dos controles (sem HI), grupo de Sham, e dos grupos tratados com DisBa-01 0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg. Os dados são expressos em unidades arbitrárias. (ANOVA e teste de Tukey,  $P < 0,05$ ). Em a = diferença com grupo controle; b = diferença com grupo Sham.

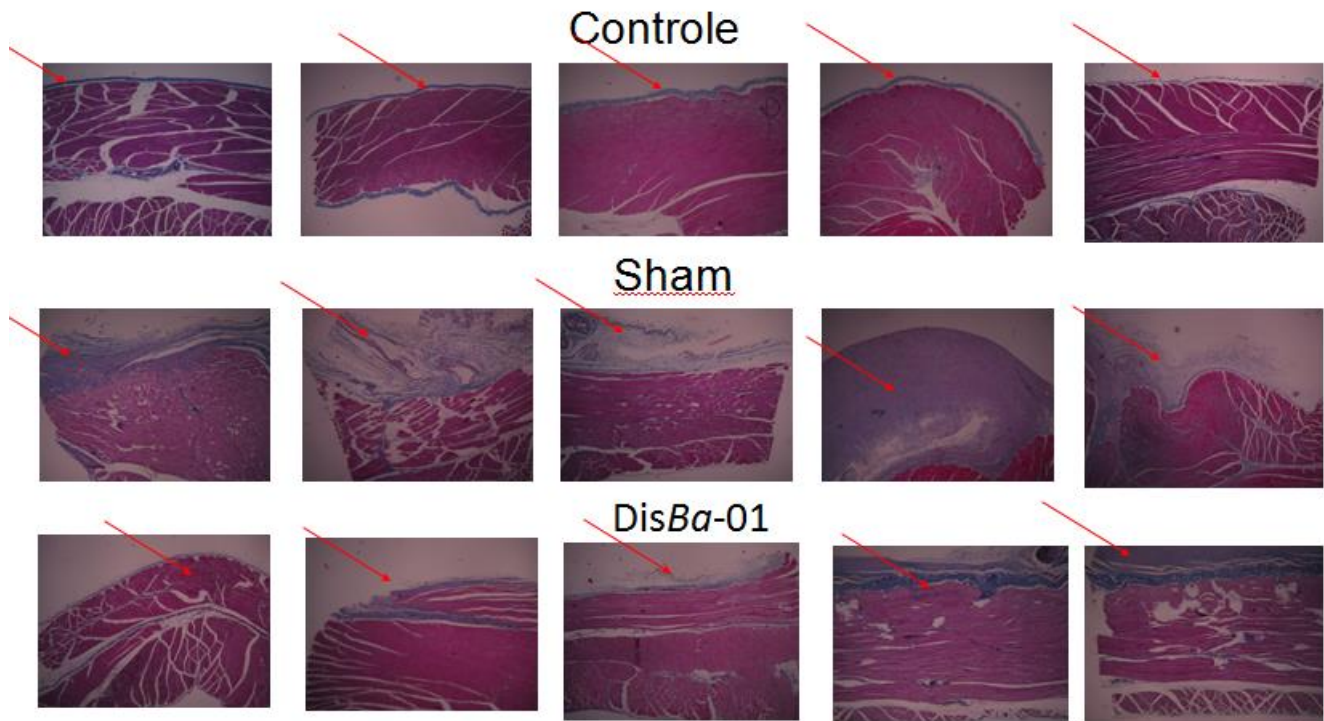
Na figura 16, observamos que a relação do Colágeno I / Colágeno III no grupo controle foi próxima a 1.0 onde, na figura 15, tanto Col I como Col III eram pouco expressos para este mesmo grupo. Entretanto, o grupo Sham apresentou maior relação da expressão destas proteínas em comparação ao grupo controle e grupo *DisBa-01*, sem diferenças entre as doses.

O processo de cirurgia ativou fortemente as três formas (pró, intermediária e ativa) de MMP-2 demonstradas por zimografia em géis de gelatina (Figura 17A e B). A atividade das bandas correspondentes a enzima pró (72 kDa), a enzima ativa e intermediária (64kDa) foram identificadas pela sua massa molecular em SDS-PAGE e quantificadas por densitometria (Figura 17B-C). Em contraste, apenas vestígios de atividade correspondente à banda intermédia foi encontrado nos controles não operados (Figura 17 A e C). Curiosamente, a *DisBa-01* não afetou a atividade da enzima pró, ou a forma intermediária, com a única exceção de que a dosagem de 0,25 mg/kg, diminuiu a MMP-2 na forma intermédia. No entanto, a *DisBa-01* inibiu a ativação de MMP-2 de uma maneira inversa dependente da dose, em que a dose mais baixa produziu a maior inibição (Figura 17C).



**Figura 17:** (A) Atividade da MMP-2, de extratos da parede abdominal do controle e Sham (HI tratado com PBS), (B) tratados com DisBa-01 0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg por zimografia em gelatina. (C) A atividade da MMP-2, foi quantificada por densitometria de banda e expressa em unidades arbitrárias para as três formas de MMP-2 (pro-MMP-2 (72 kDa), e intermediários de forma ativa (64kDa). Os valores são apresentados como a média  $\pm$  1DP (ANOVA e teste de Tukey,  $P < 0,05$ ). Em a = diferença com grupo controle; b = diferença com grupo Sham; c = diferença com DisBa-01(0,25).

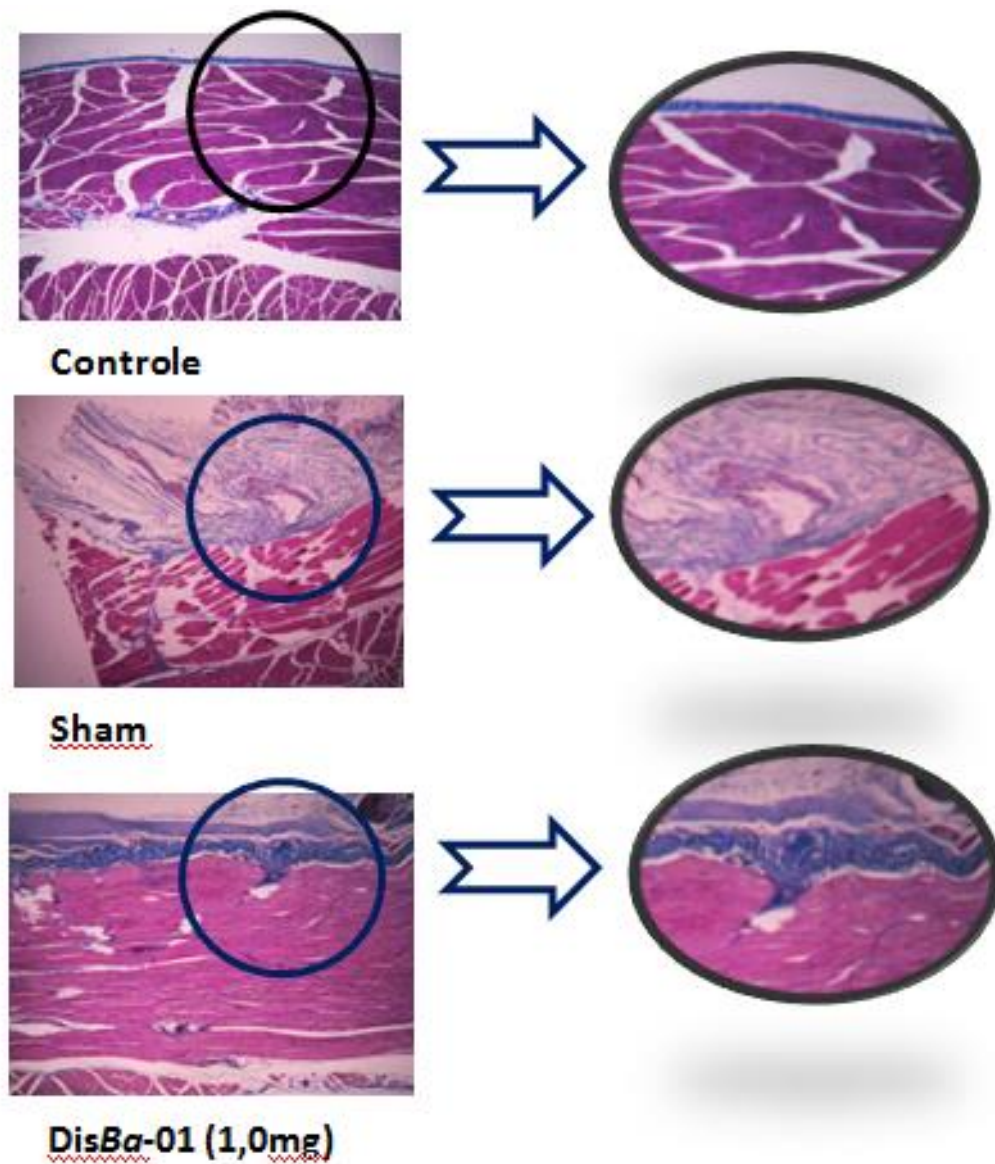
Na figura 18, estão apresentados os resultados da análise quantitativa de colágeno nos grupos: Controle, Sham (PBS) e DisBa-01 (1mg/kg).



**Figura 18:** Análise histológica da camada de colágeno nos grupos controle, SHAM e DisBa-01, onde podem ser observadas as diferenças na espessura desta camada de colágeno. (Aumento de 40x).

Como pode ser observado na figura 18, no grupo controle apresentou uma camada de menor espessura de colágeno em relação aos grupos Sham e DisBa-01, porém a disposição do colágeno do grupo Sham tem aspecto desorganizado e aparentemente em maior quantidade, enquanto no grupo DisBa-01 o colágeno apresenta-se de forma organizada porém com aspecto de fibras menos espessas do que o grupo Sham, sendo que para melhor visualização destes resultados, demonstramos abaixo na figura 19 com aumento de 10x.

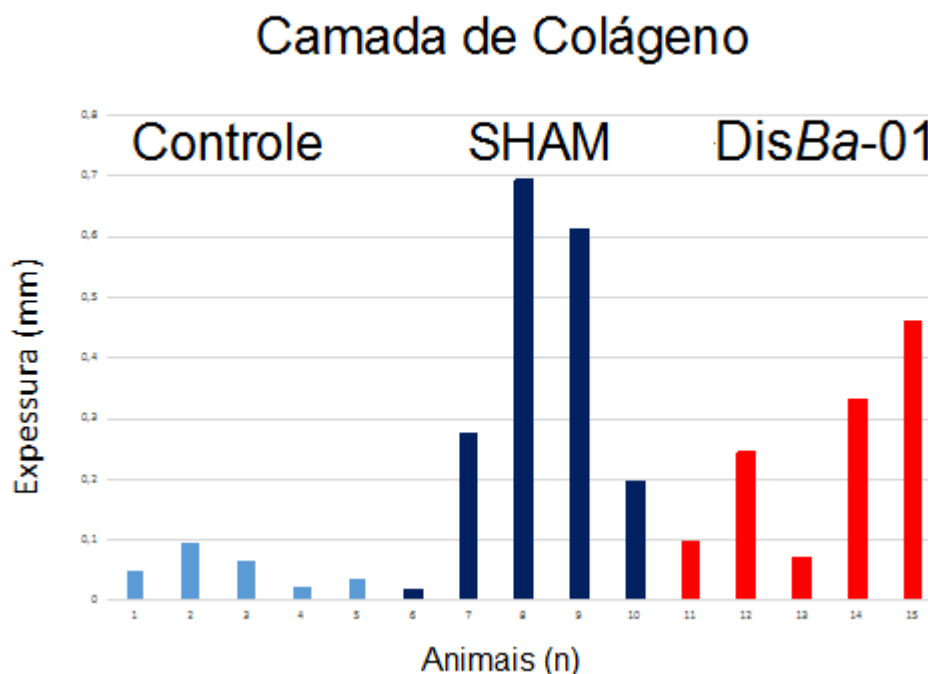




**Figura 19:** Análise histológica da camada de colágeno nos grupos controle, Sham e DisBa-01, onde podem ser observadas as diferenças na espessura desta camada de colágeno com zoom. (Aumento de 10x).

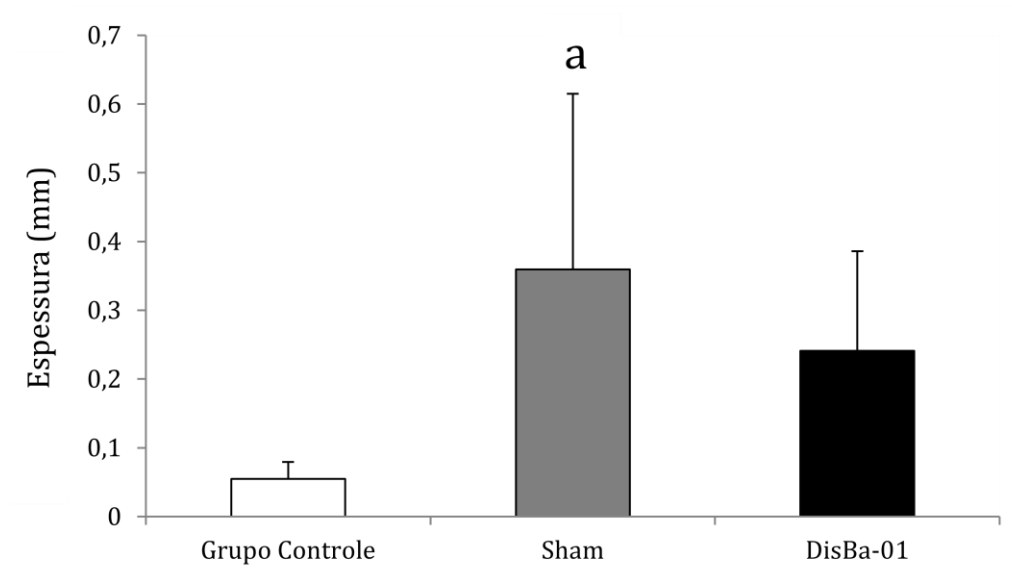
Na figura 19, com aumento de 10x, observamos as diferenças da distribuição e organização das fibras de colágeno nos grupos, onde no grupo

DisBa-01 a disposição das fibras esta mais organizada e compactas em comparação ao grupo Sham.



**Figura 20:** Quantificação da camada de colágeno em mm para cada animal dos grupos controle, SHAM e DisBa-01 que foi determinada utilizando-se o sistema de pixels por meio do software Image J (National Institutes of Health - NIH, versão 1,47; USA).

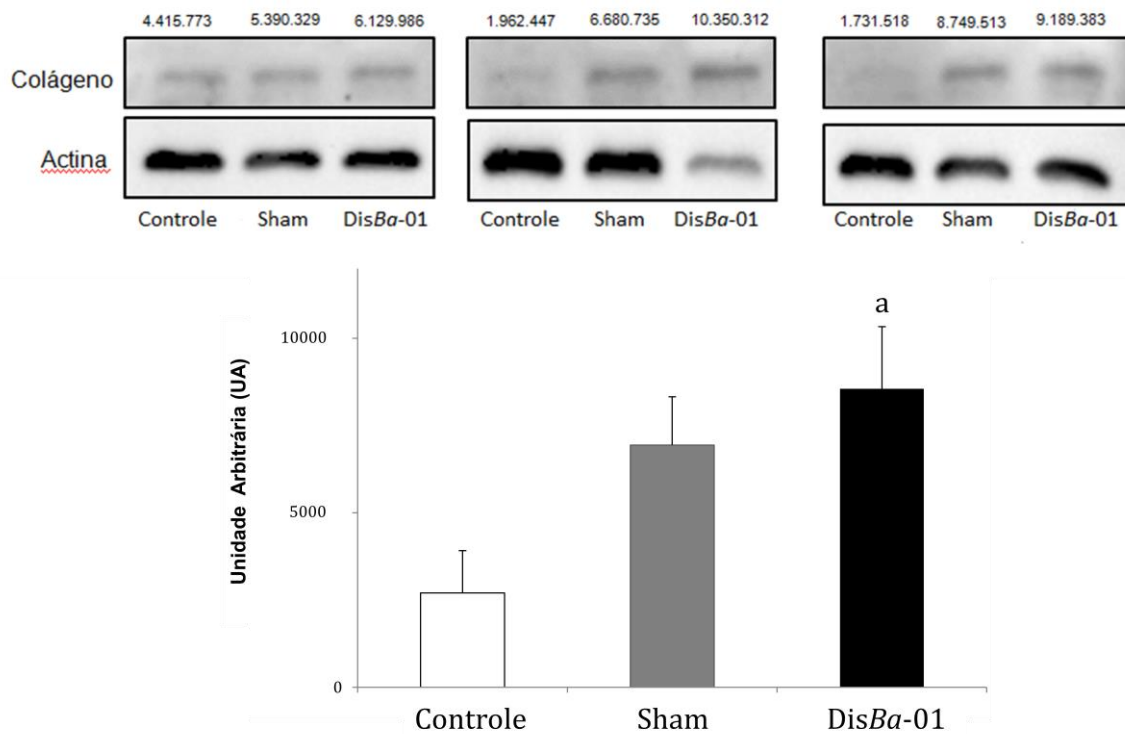
Quando visualizamos a espessura em mm da camada de colágeno em cada um dos animais (figura 20) foi possível constatar que no grupo controle, todos os animais apresentaram espessura reduzida. No entanto, grupo Sham e DisBa-01, houve aumento relativo em praticamente todos os animais estudados. A seguir, na figura 21, estão apresentados os resultados estatísticos da espessura (mm) do colágeno entre os grupos.



**Figura 21:** Quantificação da camada de colágeno em mm, entre os grupos controle, Sham e DisBa-01. a = diferenças entre o grupo Sham e Controle.

Na figura 21, observamos que o grupo Sham apresentou maior espessura da camada de colágeno, em comparação ao grupo controle.

Na figura 22, estão apresentados os resultados das análises de Western Blotting para determinação de Colágeno tipo I (A1), nos grupos: Controle, Sham (PBS) e DisBa-01 (1mg/kg).



**Figura 22:** Análises de Western Blotting para determinação de Colágeno tipo I (A1) a partir do extrato proteico músculo da parede abdominal, incluindo o anel herniário. Foram adicionados 30ug de amostra em cada poço para os animais controle (poço 1), Sham (poço 2) e tratados com DisBa-01 (poço 3). Actina foi utilizada como controle do carregamento. a = diferenças entre grupo DisBa-01 e Controle.

As análises de Western Blotting, evidenciaram a presença de colágeno tipo I (A1), nos 3 grupos, porém somente o grupo DisBa-01 diferiu estatisticamente do Controle ( $P < 0.05$ ).

## 5) DISCUSSÃO

O modelo experimental de HI usado aqui foi considerado 100 % eficiente, uma vez todos os animais operados desenvolveram hérnia após o período experimental de 14 dias. Dubay et al (2004) relataram uma incidência de 80 % de HI em um modelo muito semelhante, mas a observação foi efetuada no 28° dia, o que poderia explicar a diferença entre os resultados.

Em relação a análise macroscópica, no presente estudo foi evidente e formação de uma membrana que ocluía o anel herniário em todos os ratos do grupo *DisBa-01* (0,25 e 1,0), exceto em 3 animais do grupo *DisBa-01* em doses 0,5 mg/kg, após 14 dias da cirurgia. Em nosso estudo prévio, com doses menores (0,11mg/kg), observamos que os ratos também desenvolveram o mesmo anel herniário, porém com espessura relativamente mais delgada e com menor retração cicatricial (Oliveira, 2009). Neste sentido, o presente estudo foi elaborado no sentido de verificar a presença da mesma membrana em diferentes doses de *DisBa-01*, no sentido de avaliar se o mesmo resultado seria reproduzido, além de ampliar o estudo dose-resposta.

Embora seja difícil avaliar macroscopicamente os efeitos das diferentes doses, propomos como ensaio original a avaliação de fatores gênicos, histológicos, da expressão de MMP bem como a expressão de colágeno nos tecidos, com o objetivo de ampliar o entendimento dos mecanismos responsáveis pela formação desta membrana. Considerando que o colágeno se constitui em um principal

marcador no reparo tecidual, no presente estudo, buscando explorar as análises de expressão dos colágenos I e III nos tecidos dos animais tratados com DisBa-01, comparando com o grupo controle (sem cirurgia) e Sham (com cirurgia).

No presente estudo, mostramos que a expressão gênica do colágeno tipo III foi amplamente expressado pela cirurgia (figura 15C). Entretanto, o colágeno tipo I (Figura 15A) foi significativamente expressado no grupo Sham (cirurgia) em comparação ao controle. No entanto, o grupo DisBa-01 (em todas as doses) evidenciou menor expressão em comparação ao grupo Sham e controle. Somente a dose 1,0 de DisBa-01 foi diferente da dose 0,5. Neste contexto, especulamos que após 14 dias de reparo tecidual, a expressão do colágeno tipo I já tenha ocorrido no grupo DisBa-01, fato que foi mais marcante nas doses mais elevadas de DisBa-01. Um provável mecanismo que possa explicar nossos achados é que, pelo fato da DisBa-01 bloquear a integrina  $\alpha_v\beta_3$ , que é o ligante da MMP-2 (Purslow et al, 2011), que atua na degradação do colágeno tipo I, assim estaria contribuindo para o bloqueio da expressão desta protease (vias de sinalização celular).

O colágeno é o componente principal do MEC e a principal proteína envolvida na resistência à tração. O colágeno tipo I é a forma madura e estável, enquanto o colágeno III é considerado uma forma imatura, sendo encontrado em maior quantidade em pacientes com HI (OLIVEIRA, 2009). A relação col I/col III geralmente é diminuída em pacientes com HI recorrente e esse efeito pode ser atribuído a qualquer deficiência da síntese de colágeno ou ativação anormal de MMPs (KLINGE et al, 1999). Em humanos, um recente estudo mostrou que a relação reduzida de Colágeno I / Colágeno III naqueles pacientes portadores de HI

recidivante (Calaluce et al, 2013). Em nosso estudo, a relação reduzida no grupo *DisBa-01* em contraste ao grupo Sham (figura 16) possa ser devido ao fato de que após 14 dias a sua maior expressão já tenha ocorrido, entretanto, um estudo que avalie esta relação em diferente tempos de cirurgia poderiam confirmar tais achados.

Uma das observações mais marcantes no presente estudo foi a forte ativação da MMP-2 nos animais do Sham (Figura 15), sugerindo, assim, a degradação acelerada do tecido para este grupo. Quando ativadas, as MMPs podem degradar componentes da matriz extracelular com a posterior liberação de fatores de crescimento, incluindo aqueles envolvidos na angiogênese (WHITE et al, 2007). Estas enzimas podem também participar na sinalização de receptores celulares, portanto, regulam a atividade das células. A MMP -2 também podem ser ativada por colagênio I e fibronectina. Em estudo prévio, a ativação da MMP-2 por colagênio fibrilar foi reduzida em linhagem de células que superexpressaram  $\beta_3$  e em células de câncer de mama humano (VAN HINSBERGH et al, 2006). Contudo, o mecanismo molecular desta inibição não é completamente compreendido até o momento.

Em contraste, no presente estudo, no grupo *DisBa-01*, observamos que houve redução significativa em comparação ao grupo Sham, sendo que a dose 1,0 produziu menor expressão da MMP-2. Sob condições fisiológicas normais (Purslow et al, 2011), a homeostase da MEC é explicada pelo equilíbrio da ativação e inibição das MMPs, as quais apresentam importante função na degradação e remodelação da matriz extracelular. A superexpressão do grupo Sham em

contraste com os demais grupos, pode ser explicada pela quebra da homeostase, devido a liberação de citocinas que estimulam a expressão de MMP-2 desta no tecido estudado (Antoniou et al, 2009). Por outro lado, apesar do estímulo da cirurgia no grupo *DisBa-01*, ocorreu maior inibição expressão de MMP-2 na dose 1,0, que pode ser explicada pelo bloqueio da a integrina  $\alpha_v\beta_3$ , que é o ligante desta protease ao substrato da MEC (Selistre-de-Araujo et al, 2010).

No presente estudo, apresentamos novas evidências para o papel da integrina  $\alpha_v\beta_3$  e atividade da MMP-2. O uso de um antagonista específico da integrina  $\alpha_v\beta_3$ , tal como *DisBa-01* inibiu completamente a expressão do gene de MMP-2 e, parcialmente, diminuiu sua atividade também. Estes resultados sugerem que a integrina  $\alpha_v\beta_3$  pode ser um novo alvo para o tratamento terapêutico de HI .

Curiosamente, a expressão de VEGF foi suprimida aos 14 dias para todos os grupos operados. Contudo, o grupo *DisBa-01* não inibiu a expressão do VEGF como o esperado, apenas na dose mais elevada (dose 1,0). Tais achados não puderam ser explicados no presente estudo, pois não foi possível avaliar as diferentes fases do processo de cicatrização. Contudo, em outro estudo de nosso grupo (Sant'Ana et al, 2008) demonstraram que a alternagina-C (ALT-C) e ALT-C PEP, um peptídeo derivado de sua sequência, foram capazes de induzir a angiogênese em feridas de pele de rato. A ALT-C e ALT-C PEP induziu a formação de novos vasos e modulou a expressão de fatores de crescimento, principalmente VEGF e FGF1. Naquele estudo, a expressão aumentada do VEGF pôde ser detectada até 7 dias após a lesão, concluindo que houve maior estimulação de angiogênese em feridas neste período de tempo. Assim, estes resultados podem



explicar parcialmente nossos achados, supondo que 14 dias após HI e tratamento com DisBa-01 inibiu fortemente a expressão de VEGF em células endoteliais, mas não em fibroblastos in vitro (MONTENEGRO et al, 2012).

No estudo de Ramos et al, (2008), a integrina  $\alpha_v\beta_3$  expressa nas células endoteliais tem um importante papel na angiogênese de tumores e metástases através de interações adesivas, pois em muitos modelos animais, utilizando-se anticorpos ou peptídeos RGD ocorreu o bloqueio da  $\alpha_v\beta_3$ , inibindo a formação de vasos sanguíneos, uma vez que esta integrina  $\alpha_v\beta_3$  se relaciona com o receptor de bFGF na migração endotelial e adesão na presença de bFGF. Neste estudo, a DisBa-01 reduziu a angiogênese suprimindo a adesão celular mediada pela  $\alpha_v\beta_3$  com as proteínas da MEC, incluindo a vitronectina.

Em outro estudo, os níveis de VEGF no fluido drenado da ferida operatória foram maiores nos pacientes submetidos à correção de tela de polipropileno do que os encontrados em pacientes que foram submetidos à sutura convencional (KARAYIANNAKIS et al, 2003). No entanto, os níveis de VEGF nestes dois estudos foram analisados por meio de imunoensaio e, portanto, a disponibilidade do VEGF poderia ser devido à ativação de MMPs pela cirurgia. De qualquer forma, a presença de outros fatores angiogênicos que o VEGF deve ser determinada para uma melhor compreensão da angiogênese do tecido cicatricial.

No presente estudo, por se constituir de primeira investigação sobre os efeitos da DisBa-01 no reparo cicatricial, não encontramos outros achados publicados que pudessem comparar os efeitos desta desintegrina na expressão de

MMP-02, VEGF ou outros marcadores de sinalização de reparo em feridas. No entanto, um estudo com outra desintegrina, Durigan et al, (2008) observaram que Alternagina C (ALT-C) reduziu a expressão de MMP-2 e a atividade gelatinolítica em músculos lesionados, concluindo que a ALT-C não melhorou o processo de regeneração muscular em ratos. Este estudo (Durigan et al, 2008) mostrou que a ALT-C mudou a homeostase das proteínas da MEC durante a fase de regeneração muscular.

Portanto, os dados apresentados neste manuscrito ampliam a compreensão atual da integrina  $\alpha_v\beta_3$  no reparo da ferida cirúrgica após indução de HI. No entanto, futuros estudos que abordam a contribuição da integrina  $\alpha_v\beta_3$  em diferentes fases de cicatrização da feridas merecem ser analisadas.

Tal fato pode ser constatado quando observamos a análise histológica das amostras dos novos grupos (figura 18, 19 e 20), onde o grupo Sham e DisBa-01–1,0mg/kg, demonstraram camada mais espessa em mm em relação ao grupo controle (figura 21). Entretanto, na análise estatística, a espessura do colágeno no grupo Sham foi maior que o controle, sem diferenças entre os grupos DisBa-01 e controle. Na análise histológica, pode-se observar macroscopicamente que a camada de colágeno do grupo Sham apresentava as fibras de colágeno de forma desorganizada, formando uma camada espessa, enquanto a camada de fibras de colágeno do grupo DisBa-01 – 1,0mg/kg apresentava fibras mais compactas e organizadas. Conforme pode ser observado pelos resultados do Western Blotting, a quantidade de colágeno I – A1 foi significativamente maior no grupo DisBa-01 (figura 22). Tais achados se constituem em primeira investigação dos efeitos da

DisBa-01 no remodelamento tecidual após HI. Estudos prévios de nosso grupo com a desintegrina Alternagina C (ALT-C) demonstrou que o tratamento de animais com lesões de pele produziu aumento de fibroblastos, maior deposição de colágeno e acelerou o processo inflamatório. Tais achados corroboram com o presente estudo, indicando que as desintegrinas podem ser estratégias terapêuticas promissoras na melhora processo de cicatrização (Sant'Ana et al, 2011).

## 6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo apresenta algumas limitações que merecem ser elencadas. O tempo das fases de cicatrização poderiam auxiliar a melhor interpretação dos achados, considerando tempos de 3, 7, 14 e 21 dias, podendo explorar de forma mais detalhada as análises de expressão gênica, histologia e wester blotting. Contudo, tais design exigiriam grande quantidade de animais e recursos, além da dificuldade de disponibilidade da *DisBa-01*, pois a produção desta proteína em nosso laboratório ainda é pequena.

Outra limitação de nosso estudo foi comprovar se realmente esta atividade da *DisBa-01* na HI poderia ser confirmada através do uso de uma *DisBa-01* mutante RGD. Portanto, tais investigações podem ser confirmadas em ensaios futuros.

Finalmente, uma limitação de nosso estudo foi a ausência de provas como a biomecânica da membrana e a realização do proteoma, as quais poderiam confirmar a características e resistência. Estas análises podem ser realizadas em ensaios futuros de nosso laboratório, auxiliando na compreensão das propriedades deste novo tecido e sua aplicação terapêutica.

## 7) CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a *DisBa-01*, uma desintegrina tipo RGD bloqueadora da integrina  $\alpha_v\beta_3$ , inibiu o desenvolvimento de HI em ratos após 14 dias do processo cicatricial, através dos seguintes mecanismos:

a) formação de uma membrana resistente, mais evidente ectoscopicamente, principalmente do grupo *DisBa-01* / 1,0 mg, contendo camada de colágeno observada através da análise histológica, que ocluiu o anel herniário;

b) a *DisBa-01* inibiu completamente a expressão do gene de MMP-2 e, parcialmente, diminuiu sua atividade, sobretudo na dose 1 mg, reforçando o papel da integrina  $\alpha_v\beta_3$  e a atividade MMP-2 no remodelamento da MEC;

c) A *DisBa-01* não inibiu a expressão do VEGF, como o esperado, apenas na dose 1 mg, contrapondo resultados observados anteriormente da inibição da expressão de VEGF em células endoteliais, mas não em fibroblastos in vitro;

d) A *DisBa-01*, após 14 dias, produziu maior organização das fibras de colágeno, a qual pode ser explicada pelo aumento do colágeno I-A1, por meio da análise de Western Blotting.

A participação da integrina  $\alpha_v\beta_3$  é importante no reparo tecidual, uma vez que o bloqueio de suas atividades pela *DisBa-01* melhorou o processo de cicatrização da hérnia incisional nos animais estudados.

## 8) REFERÊNCIAS

- AARONSON SA, ALLARD MF, RUBIN E. Rubin's pathology, 4th edn. **Williams & Wilkins**, Baltimore, MD, p 1408, 2004.
- ADLER M, LAZARUS RA, DENNIS MS, WAGNER G. Solution structure of kistrin, a potent platelet aggregation inhibitor and GP IIb-IIIa antagonist. **Science**. 26;253(5018):445-8, 1991.
- ALVES F, VOGEL W, MOSSIE K, MILLAUER B, HÖFLER H, ULLRICH A. Distinct structural characteristics of discoidin I subfamily receptor tyrosine kinases and complementary expression in human cancer. **Oncogene** 2;10(3):609-18, 1995.
- ANDRIKOPOULOS K, LIU X, KEENE DR, JAENISCH R, RAMIREZ F. Targeted mutation in the col5a2 gene reveals a regulatory role for type V collagen during matrix assembly. **Nat Genet**. 9(1):31-6, 1995.
- ANTONIOU SA, ANTONIOU GA, GRANDERATH FA, SIMOPOULOS C. The role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of abdominal wall hernias. **Eur J Clin Invest**. 39(11):953-9, 2009.
- Araújo, RVS et al. Metaloproteinases: Aspectos Fisiopatológicos Sistêmicos e sua Importância na Cicatrização. R. Ci. md. biol., Salvador. 2011, v.10, n.1, p.89-93
- ARMSTRONG CP, DIXON JM, DUFFY SW, ELTON RA, DAVIES GC. Wound healing in obstructive jaundice. **Br J Surg**. 71(4):267-70, 1984.
- AUMAILLEY M, GURRATH M, MÜLLER G, CALVETE J, TIMPL R, KESSLER H. Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. **FEBS Lett**. 7;291(1):50-4, 1991.

- ASAHI M, WANG X, MORI T, SUMII T, JUNG JC, MOSKOWITZ MA, et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood–brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. **J Neurosci** 21:7724–7732, 2001.
- BAUER M, SUN Y, DEGENHARDT C, KOZIKOWSKI B. Assignment of all four disulfide bridges in echistatin. **J Protein Chem.** 12(6):759-64, 1993.
- BAYER I, ELLIS H. Jaundice and wound healing: an experimental study. **Br J Surg.** 63(5):392-6, 1976.
- BECCHETTI A. & ARCANGELI A. (2010) Integrins and Ion Channels: Molecular Complexes and Signaling. <http://www.landesbioscience.com/curie/chapter/4014/>
- BENAVIDES DAMM T, EGLI M. Calcium's Role in Mechanotransduction during Muscle Development. **Cell Physiol Biochem.**,33(2):249-72, 2014.
- BELLÓN JM, DURÁN HJ. Factores biológicos implicados en la génesis de la hernia incisional. **Cir Esp.** 83(1):3-7, 2008.
- BELLÓN JM, BAJO A, GA-HONDUVILLA N, GIMENO MJ, PASCUAL G, GUERRERO A. Fibroblasts from the transversalis fascia of young patients with direct inguinal hernias show constitutive MMP-2 overexpression. **Ann Surg.** 233(2):287-91, 2001.
- BELVISI L, RICCIONI T, MARCELLINI M, VESCI L, CHIARUCCI I, EFRATI D, et al. Biological and molecular properties of a new alpha(v)beta3/alpha(v)beta5 integrin antagonist. **Mol Cancer Ther.** 4(11):1670-80, 2005.
- BEVIGLIA L, STEWART GJ, NIEWIAROWSKI S. Effect of four disintegrins on the adhesive and metastatic properties of B16F10 melanoma cells in a murine model. **Oncol Res.** 7(1):7-20, 1995.

- BJÖRKLUND M, KOIVUNEN E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. **Biochim Biophys Acta.** 25;1755(1):37-69, 2005.
- BORRIRUKWANIT K1, LAFLEUR MA, MERCURI FA, BLICK T, PRICE JT, FRIDMAN R, PEREIRA JJ, LEARDKAMONKARN V, THOMPSON EW. The type I collagen induction of MT1-MMP-mediated MMP-2 activation is repressed by alphaVbeta3 integrin in human breast cancer cells. **Matrix Biol.** 26(4):291-305, 2007.
- BREW K, DINAKARPANDIAN D, NAGASE H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Review. **Biochim Biophys Acta.** 7;1477(1-2):267-83, 2000.
- BRASILEIRO FILHO G. **Bigliolo Patologia Geral.** 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 75-80.
- BROOKS PC. Role of integrins in angiogenesis. Review. **Eur J Cancer.** 32A(14):2423-9, 1996.
- BRUCE A. Molecular biology of the cell. 3<sup>rd</sup> edn. **Garland**, New York. 1994.
- BURGER JW, LUIJENDIJK RW, HOP WC, HALM JA, VERDAASDONK EG, JEEKEL J. Long-term follow-up of a randomized controlled trial of suture versus mesh repair of incisional hernia. **Ann Surg.** 240(4):578-83, 2004.
- BURGESS K, LIM D, MOUSA SA. Synthesis and solution conformation of cyclo[RGDRGD]: a cyclic peptide with selectivity for the alpha V beta 3 receptor. **J Med Chem.** 25;39(22):4520-6, 2000.
- BURKE PA, DENARDO SJ. Antiangiogenic agents and their promising potential in combined therapy. **Crit Rev Oncol Hematol.** 39(1-2):155-71, 2001.



- BUSCHMANN I, SCHAPER W. Arteriogenesis versus angiogenesis: two mechanisms of vessel growth. **News Physiol Sci** 14: 121-125, 1999.
- Calaluze R1, Davis JW, Bachman SL, Gubin MM, Brown JA, Magee JD, Loy TS, Ramshaw BJ, Atasoy U. Incisional hernia recurrence through genomic profiling: a pilot study. **Hernia**. 2013 Apr;17(2):193-202.
- CALVETE JJ, SCHAFFER W, MANN K, HENSCHEN A, GONZALEZ-RODRIGUEZ J. Localization of the cross-linking sites of RGD and KQAGDV peptides to the isolated fibrinogen receptor, the human platelet integrin glycoprotein IIb/IIIa. Influence of peptide length. **Eur J Biochem**. 15;206(3):759-65, 1992.
- CALVI EN, NAHAS FX, BARBOSA MV, CALIL JA, IHARA SS, SILVA MDE S, FRANCO MF, FERREIRA LM. An experimental model for the study of collagen fibers in skeletal muscle. **Acta Cir Bras**. 27(10):681-6, 2012.
- CARLSON MA. Acute wound failure. **Surg Clin North Am**. 77(3):607-36, 1997.
- CARMELI E, MOAS M, REZNICK AZ, COLEMAN R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. **Muscle Nerve**, 29; 191-197, 2004.
- CASIRAGHI G, RASSU G, AUZZAS L, BURREDDU P, GAETANI E, BATTISTINI L, et al. Grafting aminocyclopentane carboxylic acids onto the RGD tripeptide sequence generates low nanomolar  $\alpha V\beta 3/\alpha V\beta 5$  integrin dual binders. **J Med Chem**. 48(24):7675-87, 2005.
- CLEUTJENS JP, KANDALA JC, GUARDA E, GUNTAKA RV, WEBER KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. **J Mol Cell Cardiol**. 27(6):1281-92, 1995.

- CHANG C, WERB Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. Review. **Trends Cell Biol.** 11(11):S37-43, 2001.
- CHEN WY, ROGERS AA. Recent insights into the causes of chronic leg ulceration in venous diseases and implications on other types of chronic wounds. **Wound Repair Regen;** 15(4): 434-49, 2007.
- CHIANG HS, PENG HC, HUANG TF. Characterization of integrin expression and regulation on SW-480 human colon adenocarcinoma cells and the effect of rhodostomin on basal and upregulated tumor cell adhesion. **Biochim Biophys Acta.** 30;1224(3):506-16, 1994.
- CROMACK DT, SPORN MB, ROBERTS AB, MERINO MJ, DART LL, NORTON JA. Transforming growth factor beta levels in rat wound chambers. **J Surg Res.** 42(6):622-8, 1987.
- CULBERTSON EJ, XING, L, WEN, Y, FRANZ MG. Loss of Mechanical Strain Impairs Abdominal Wall Fibroblast Proliferation, Orientation and Collagen Contraction Function. **Surgery.** 150(3): 410–417, 2011.
- DEBUS ES, SCHMIDT K, ZIEGLER UE, THIEDE A. The role of growth factors in wound healing. Review. **Zentralbl Chir.** 125 Suppl 1:49-55, 2000.
- DECHANTSREITER MA, PLANKER E, MATHÄ B, LOHOF E, HÖLZEMANN G, JONCZYK A, et al. N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective alpha(V)beta(3) integrin antagonists. **J Med Chem.** 12;42(16):3033-40, 1999.
- DE DEYNE PG. Application of passive stretch and its implications for muscle fibers. **Phys Ther.** 81(2):819-27, 2001.
- DIEGELMANN RF. Collagen metabolism. **Wounds** 13(5): 177-182, 2001.

- DI VITA G, PATTI R, D'AGOSTINO P, ARCOLEO F, CARUSO G, ARCARA M, et al. Serum VEGF and b-FGF profiles after tension-free or conventional hernioplasty. **Langenbecks Arch Surg.** 390(6):528-33, 2005.
- DUBAY DA, CHOI W, URBANCHEK MG, WANG X, ADAMSON B, DENNIS RG, et al. Incisional herniation induces decreased abdominal wall compliance via oblique muscle atrophy and fibrosis. **Ann Surg.** 245(1):140-6, 2007.
- DUBAY DA, WANG X, ADAMSON B, KUZON WM JR, DENNIS RG, FRANZ MG. Mesh incisional herniorrhaphy increases abdominal wall elastic properties: a mechanism for decreased hernia recurrences in comparison with suture repair. **Surgery** 140(1):14-24, 2006.
- DUBAY DA, WANG X, ADAMSON BS, et al. Progressive fascial wound failure impairs subsequent abdominal wall repairs: a new animal model of incisional hernia formation. **Surgery** 137(4):463–71, 2005.
- DUBAY DA, WANG X, KUHN MA, ROBSON MC, FRANZ MG. The prevention of incisional hernia formation using a delayed-release polymer of basic fibroblast growth factor. **Ann Surg.** 240(1):179-86, 2004.
- DURIGAN JL1, PEVIANI SM, RUSSO TL, DELFINO GB, RIBEIRO JU, COMINETTI MR, SELISTRE-DE-ARAUJO HS, SALVINI TF. Effects of alternagin-C from *Bothrops alternatus* on gene expression and activity of metalloproteinases in regenerating skeletal muscle. **Toxicon.** 2008 Nov;52(6):687-94.
- ESKENS F. New targets and innovative strategies in cancer treatment: a short course for clinicians. **I Drugs.** 6(3):207-10, 2003.

- FACHINELLI A, MACIEL TRINDADE MR. Qualitative and quantitative evaluation of total and types I and III collagens in patients with ventral hernias. **Langenbecks Arch Surg.** 392(4):459-64, 2007.
- FALANGA V, GRINNELL F, GILCHREST B, et al. Workshop on the pathogenesis of chronic wounds. **J Invest Dermatol**; 102(2): 125-27, 1994.
- FISHER JE, CAULFIELD MP, SATO M, QUARTUCCIO HA, GOULD RJ, GARSKY VM, et al. Inhibition of osteoclastic bone resorption in vivo by echistatin, an "arginyl-glycyl-aspartyl" (RGD)-containing protein. **Endocrinology.** 132(3):1411-3, 1993.
- FRANZ MG, KUHN MA, NGUYEN K, WANG X, KO F, WRIGHT TE, et al. Transforming growth factor  $\beta_2$  lowers the incidence of incisional hernias. **J Surg Res.** 97:109-16, 2001.
- FRANZ MG, SMITH PD, WACHTEL TL, et al. Fascial incisions heal faster than skin: a new model of abdominal wall repair. **Surgery** 129(2):203–8, 2001.
- FRANZ MG, KUHN MA, NGUYEN K, WANG X, KO F, WRIGHT TE, et al. Transforming growth factor  $\beta_2$  lowers the incidence of incisional hernias. **J Surg Res.** 15;97(2):109-16, 2001.
- FRANZ MG, SMITH PD, WRIGHT TE, KO F AND ROBSON MC. Fascial healing exceeds skin: A novel model of abdominal wall repair. **Surg.** 50: 604, 1999.
- FRANZ MG. The biology of hernia formation. **Surg Clin North Am.** 88(1):1-15, 2008.
- FRAZIER K, WILLIAMS S, KOTHAPALLI D, KLAPPER H, GROTENDORST GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. **J Invest Dermatol.** 107(3):404-11, 1996.

- FUJII Y, OKUDA D, FUJIMOTO Z, HORII K, MORITA T, MIZUNO H. Crystal structure of trimestatin, a disintegrin containing a cell adhesion recognition motif RGD. **J Mol Biol.** 2003 Oct 3;332(5):1115-22.
- GLADSON CL. Expression of integrin alpha v beta 3 in small blood vessels of glioblastoma tumors. **J Neuropathol Exp Neurol.** 55(11):1143-9, 1996.
- GOULD RJ, POLOKOFF MA, FIEDMAN PA, HUANG TF, HOLT JC, COOK JJ, et al. Desintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from snake venoms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 195: 168-171, 1990.
- GUILLEN-MARTI J, DIAZ R, QUILES MT, LOPEZ-CANO M, VILALLONGA R, HUGUET P, RAMON-Y-CAJAL S, SANCHEZ-NIUBO A, REVENTÓS J, ARMENGOL M, ARBOS MA. MMPs/TIMPs and inflammatory signalling deregulation in human incisional hernia tissues. **J Cell Mol Med.** 13(11-12):4432-43, 2009.
- HESSELINK VJ, LUIJENDIJK RW, DE WILT JH, HEIDE R, JEEKEL J. An evaluation of risk factors in incisional hernia recurrence. **Surg Gynecol Obstet.** 176(3):228-34, 1993.
- HOLZHEIMER RG, MANNICK JA. **Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented**, 2001.
- HOUCK JP, RYPINS EB, SARFEH IJ, JULER GL, SHIMODA KJ. Repair of incisional hernia. **Surg Gynecol Obstet.** 169(5):397-9, 1989.
- HUGH TB. Abdominal wound dehiscence. **Aust N Z J Surg.** 60(3):153-5, 1990.
- HUNT TK, KNIGHTON DR, THAKRAL KK, GOODSON WH 3rd, Andrews WS. Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen

synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. **Surgery**. 96(1):48-54, 1984.

LYNEN JANSEN P, ROSCH R, REZVANI M, MERTENS PR, JUNGE K, JANSEN M, KLINGE U. Hernia fibroblasts lack beta-estradiol-induced alterations of collagen gene expression. **BMC Cell Biol**. 29;7:36, 2006.

JIA LG, SHIMOKAWA K, BJARNASON JB, FOX JW. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. Review. **Toxicon**. 34(11-12):1269-76, 1996.

JONES FS, JONES PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. Review. **Dev Dyn**. 218(2):235-59, 2000.

JUÁREZ, P., COMAS, I., GONZÁLEZ-CANDELAS, F., CALVETE, J.J. Evolution of snake venom disintegrins by positive Darwinian selection. **Mol. Biol. Evol**. 25, 2391-2407, 2008.

JUSSILA L, ALITALO K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. **Physiol Rev** 82:673-700, 2002.

KJAER M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiol Rev**. 2004 Apr;84(2):649-98.

KARAYIANNAKIS AJ, BOLANAKI H, SYRIGOS KN, ASIMAKOPOULOS B, POLYCHRONIDIS A, ANAGNOSTOULIS S, SIMOPOULOS C. Serum vascular endothelial growth factor levels in pancreatic cancer patients correlate with advanced and metastatic disease and poor prognosis. **Cancer Lett**. 194(1):119-24, 2003.

- KAUSKOT A, COMINETTI MR, RAMOS OH, BECHYNE I, RENARD JM, HOYLAERTS MF, et al. Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from *Bothrops alternatus*. **Front Biosci.** 13:6604-16, 2008.
- KEILL RH, KEITZER WF, NICHOLS WK, HENZEL J, DEWEESE MS. Abdominal wound dehiscence. **Arch Surg.** 106(4):573-7, 1973.
- KIM GW, GASCHE Y, GRZESCHIK S, COPIN JC, MAIER CM, CHAN PH (2003) Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood– brain barrier disruption? **J Neurosci** 23:8733– 8742, 2003
- KLINGE U, BINNEBÖSEL M, MERTENS PR. Are collagens the culprits in the development of incisional and inguinal hernia disease? Review. **Hernia.** 10(6):472-7, 2006.
- KLINGE U, ZHENG H, SI Z, SCHUMPELICK V, BHARDWAJ RS, MUYS L, et al. Expression of the extracellular matrix proteins collagen I, collagen III and fibronectin and matrix metalloproteinase-1 and -13 in the skin of patients with inguinal hernia. **Eur Surg Res.** 31(6):480-90, 1999.
- KLINGE U, ZHENG H, SI ZY, et al. Synthesis of type I and III collagen, expression of fibronectin and matrix metalloproteinases–1 and–13 in hernial sac of patients with inguinal hernia. **Int J Surg Investig** 1(3):219–27, 1999.
- KRAMPERT M, KUENZLE S, THAI SN, LEE N, IRUELA-ARISPE ML, WERNER S. ADAMTS1 proteinase is up-regulated in wounded skin and regulates migration of fibroblasts and endothelial cells. **J Biol Chem.** 280(25):23844-52, 2005.
- KUMAR V, FAUSTO N, ABBAS A. (eds) (2004) Robbins & Cotran pathologic basis of disease, 7th edn. **Saunders**, Philadelphia, p 1552.

- KUZUYA M, KANDA S, SASAKI T, TAMAYA-MORI N, CHENG XW, ITOH T, et al. Deficiency of gelatinase a suppresses smooth muscle cell invasion and development of experimental intimal hyperplasia. **Circulation**. 16;108(11):1375-81, 2003.
- LARSON GM, VANDERTOLL DJ. Approaches to repair of ventral hernia and full-thickness losses of the abdominal wall. **Surg Clin North Am**. 64(2):335-49, 1984
- LIEKENS S, DE CLERCQ E, NEYTS J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. Review. **Biochem Pharmacol**. 61(3):253-70, 2001.
- LINSENMAYER TF, GIBNEY E, IGOE F, GORDON MK, FITCH JM, FESSLER LI, et al. Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken alpha 1(V) NH2-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. **J Cell Biol**. 121(5):1181-9, 1993.
- LLURI G, JAWORSKI DM. Regulation of TIMP-2, MT1-MMP, and MMP-2 expression during C2C12 differentiation. **Muscle Nerve**. 32(4):492-9, 2005
- LOSANOFF JE, RICHMAN BW, JONES JW. Entero-colocutaneous fistula: a late consequence of polypropylene mesh abdominal wall repair: case report and review of the literature. **Hernia**. 6:144-7, 2002.
- LIPMAN J, MEDALIE D, ROSEN MJ. Staged repair of massive incisional hernias with loss of abdominal domain: a novel approach. **Am J Surg**. 2008 Jan; 195(1):84-8.
- LUIJENDIJK RW, HOP WC, VAN DEN TOL MP, DE LANGE DC, BRAAKSMA MM, IJZERMANS JN, et al. A comparison of suture repair with mesh repair for incisional hernia **N Engl J Med**. 343(6):392-8, 2000.



MACKIE EJ. Molecules in focus: tenascin-C. Review. **Int J Biochem Cell Biol.** 29(10):1133-7, 1997.

Matrix Biology - Integrins & Other Adhesion Molecules. **Chemicon International S/A**, 2006.

MARCINKIEWICZ C, CALVETE JJ, MARCINKIEWICZ MM, RAIDA M, VIJAY-KUMAR S, HUANG Z, et al. EC3, a novel heterodimeric disintegrin from *Echis carinatus* venom, inhibits alpha4 and alpha5 integrins in an RGD-independent manner. **J Biol Chem.** 274(18):12468-73, 1999.

MARCINKIEWICZ C, CALVETE JJ, VIJAY-KUMAR S, MARCINKIEWICZ MM, RAIDA M, SCHICK P, et al. Structural and functional characterization of EMF10, a heterodimeric disintegrin from *Eristocophis macmahoni* venom that selectively inhibits alpha 5 beta 1 integrin. **Biochemistry.** 5;38(40):13302-9, 1999.

MARCINKIEWICZ C, VIJAY-KUMAR S, MCLANE MA, NIEWIAROWSKI S. Significance of RGD loop and C-terminal domain of echistatin for recognition of alphaIIb beta3 and alpha(v) beta3 integrins and expression of ligand-induced binding site. **Blood.** 90(4):1565-75, 1997.

MARCHANT JK, HAHN RA, LINSENMAYER TF, BIRK DE. Reduction of type V collagen using a dominant-negative strategy alters the regulation of fibrillogenesis and results in the loss of corneal-specific fibril morphology. **J Cell Biol.** 135(5):1415-26, 1996.

MATRISIAN LM. The matrix-degrading metalloproteinases. **BioEssays** 14:455–463, 1992.

- MCLANE MA, MARCINKIEWICZ C, VIJAY-KUMAR S, WIERZBICKA-PATYNOWSKI I, NIEWIAROWSKI S. Viper venom disintegrins and related molecules. Review. **Proc Soc Exp Biol Med**. 219(2):109-19, 1998.
- MCLANE MA, SANCHEZ EE, WONG A, PAQUETTE-STRAUB C, PEREZ JC. Disintegrins. **Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord**. 4(4):327-55, 2004.
- MEDEIROS AC, DANTAS FILHO AM, ROCHA KFB, AZEVÊDO IM, MACÊDO FYB. Ação do fator de crescimento de fibroblasto básico na cicatrização da aponeurose abdominal de ratos. **Acta Cir Bras** 18: 2003–5, 2003.
- MEDEIROS AC, BARRETO H, GARCIA OS. Vascularização dos tendões planos do abdome. Estudo experimental. **Rev Col Bras Cir** 8: 274-277, 1981.
- MICHAEL G. FRANZ, M.D. The Biology of Hernia Formation **Surg Clin North Am**. 88(1): 1–15, 2008.
- MITJANS F, SANDER D, ADAN J, SUTTER A, MARTINEZ JM, JÄGGLE CS, et al. An anti-alpha v-integrin antibody that blocks integrin function inhibits the development of a human melanoma in nude mice. **J Cell Sci**. 108 (Pt 8):2825-38, 1995.
- MONTENEGRO CF1, SALLA-PONTES CL, RIBEIRO JU, MACHADO AZ, RAMOS RF, FIGUEIREDO CC, MORANDI V, SELISTRE-DE-ARAUJO HS. BIOCHIMIE. Blocking  $\alpha\beta 3$  integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Biochimie**. 94(8):1812-20, 2012.
- MONTESANO R, VASSALLI JD, BAIRD A, GUILLEMIN R, ORCI L. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 83(19):7297-301, 1986.

- MORGAN K, REYNOLDS I, TURNER SL. Genetic control of the immune response to collagen by the major histocompatibility complex in the rat: I. Humoral responses to bovine and chick type II collagen. **Matrix**. 12(1):50-5, 1992.
- MUDGE M, HUGHES LE. Incisional hernia: a 10 year prospective study of incidence and attitudes. **Br J Surg**. 72(1):70-1, 1985.
- MUSTOE TA, PIERCE GF, THOMASON A, GRAMATES P, SPORN MB, DEUEL TF. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. **Science**. 237(4820):1333-6, 1987.
- NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTICS. Detailed diagnosis and procedures. **National Hospital Discharge Survey**. Series 13 n° 122, 1995.
- NIGGEBRUGGE AH, HANSEN BE, TRIMBOS JB, VAN DE VELDE CJ, ZWAVELING A. Mechanical factors influencing the incidence of burst abdomen. **Eur J Surg**. 161(9):655-61, 1995.
- NIGGEBRUGGE AH, TRIMBOS JB, HERMANS J, STEUP WH, VAN DE VELDE CJ. Influence of abdominal-wound closure technique on complications after surgery: a randomised study. **Lancet**. 8;353(9164):1563-7, 1999.
- OLIVEIRA CR. Estudo dos efeitos biológicos de uma desintegrina recombinante do veneno de serpente *Bothrops alternatus*, DisBa-01, sobre a musculatura da parede abdominal após indução de hérnia incisional em ratos. **Dissertação de Mestrado**, 2008.
- OLASO E, LABRADOR JP, WANG L, IKEDA K, ENG FJ, KLEIN R, et al. Discoidin domain receptor 2 regulates fibroblast proliferation and migration through the extracellular matrix in association with transcriptional activation of matrix metalloproteinase-2. **J Biol Chem**. 277(5):3606-13, 2002.

- PAINE MJ, DESMOND HP, THEAKSTON **RD**, CRAMPTON JM Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from Bothrops jararaca venom. Insights into the disintegrin gene family. **J Biol Chem.** 267(32):22869-76, 1992.
- PARK D, KANG I, KIM H, CHUNG K, KIM DS, YUN Y. Cloning and characterization of novel disintegrins from Agkistrodon halys venom. **Mol Cells.** 8(5):578-84, 1998.
- PAULO DNS, PEREIRA FEL, MATA RF, DAUAD FRD, PAULO ICAL. Experimental models of longitudinal abdominal incisional hernia in rats. **Acta Cir Bras** 12:231-4, 1997.
- PEACOCK J. Fascia and muscle. In: Peacock J. **Wound repair.** 3<sup>rd</sup> edition. Philadelphia: W.B. Saunders; p. 332–62, 1984.
- PEISHOFF CE, ALI FE, BEAN JW, CALVO R, D'AMBROSIO CA, EGGLESTON DS, et al. Investigation of conformational specificity at GPIIb/IIIa: evaluation of conformationally constrained RGD peptides. **J Med Chem.** 35(21):3962-9, 1992.
- PFAFF M, MCLANE MA, BEVIGLIA L, NIEWIAROWSKI S, TIMPL R. Comparison of disintegrins with limited variation in the RGD loop in their binding to purified integrins alpha IIb beta 3, alpha V beta 3 and alpha 5 beta 1 and in cell adhesion inhibition. **Cell Adhes Commun.** 2(6):491-501, 1994.
- POLLOCK AV, EVANS M. Early prediction of late incisional hernias. **Br J Surg** 76:953–4, 1989.
- PLOWDEN J, RENSHAW-HOELSCHER M, ENGLEMAN C, et al. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. **Aging Cell:** 3(4): 161-67, 2004.

PORIES WJ, MACDONALD KG JR, FLICKINGER EG, DOHM GL, SINHA MK, BARAKAT HA, H J MAY, P KHAZANIE, M S SWANSON, E MORGAN. Is type II diabetes mellitus (NIDDM) a surgical disease? **Ann Surg.** 215(6):633-42, 1992.

PROCKOP DJ, KIVIRIKKO KI, TUDERMAN L, Guzman NA. The biosynthesis of collagen and its disorders. **NEJM** 301:13–23, 1979.

PURSLOW, P.P.; ARCHILE-CONTRERAS, A.C.; CHA, M.C. Manipulating meat tenderness by increasing the turnover of intramuscular connective tissue. **Journal of Animal Science**, v.90, p.950-959, 2012.

RAMOS OH, KAUSKOT A, COMINETTI MR, BECHYNE I, SALLA PONTES CL, CHAREYRE F, MANENT J, VASSY R, GIOVANNINI M, LEGRAND C, SELISTRE-DE-ARAÚJO HS, CRÉPIN M, BONNEFOY A. A novel alpha(v)beta (3)-blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clin Exp Metastasis.** 25(1):53-64, 2008.

RAGUSE TL, LAI JR, GELLMAN SH. Environment-independent 14-helix formation in short beta-peptides: striking a balance between shape control and functional diversity. **J Am Chem Soc.** 125(19):5592-3, 2003.

READ RC, YODER G. Recent trends in the management of incisional herniation. **Arch Surg.** 124(4):485-8, 1989.

REYNOLDS LE, CONTI FJ, LUCAS M, GROSE R, ROBINSON S, STONE M, et al. Accelerated re-epithelialization in beta3-integrin-deficient- mice is associated with enhanced TGF-beta1 signaling. **Nat Med.** 11(2):167-74, 2005.

RICHES DWH. Macrophage involvement in wound repair, remodeling and fibrosis. In: Clark RAF, editor. The cellular and molecular biology of wound healing. 2<sup>nd</sup> edition. New York: **Plenum Press**; p. 95-141, 1995.

- ROBSON MC, MUSTOE TA, HUNT TK. The future of recombinant growth factors in wound healing. **Am J Surg**. 176(2A Suppl):80S-82S, 1998.
- ROBSON MC, HILL DP, WOODSKE ME, et al. Wound healing trajectories as predictors of effectiveness of therapeutic agents. **Arch Surg** 135:773–7, 2000.
- ROMANOV V, NOIRI E, CZERWINSKI G, FINSINGER D, KESSLER H, GOLIGORSKY MS. Two novel probes reveal tubular and vascular Arg-Gly-Asp (RGD) binding sites in the ischemic rat kidney. **Kidney Int**. 52(1):93-102, 1997.
- ROSCH R, JUNGE K, KNOPS M, LYNEN P, KLINGE U, SCHUMPELICK V. Analysis of collagen-interacting proteins in patients with incisional hernias. **Langenbecks Arch Surg**. 387(11-12):427-32, 2003.
- ROSENBERG GA, ESTRADA EY, DENCOFF JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. **Stroke** 29:2189 –2195, 1998.
- RUOSLAHTI E, SUZUKI S, HAYMAN EG, ILL CR, PIERSCHBACHER MD. Purification and characterization of vitronectin. **Methods Enzymol** 144:430-7, 1987.
- SANT'ANA EM1, GOUVÊA CM, NAKAIE CR, SELISTRE-DE-ARAÚJO HS. Angiogenesis and growth factor modulation induced by alternagin C, a snake venom disintegrin-like, cysteine-rich protein on a rat skin wound model. **Arch Biochem Biophys**. 2008 Nov 1;479(1):20-7.
- SANT'ANA EM1, GOUVÊA CM, DURIGAN JL, COMINETTI MR, PIMENTEL ER, SELISTRE-DE-ARAÚJO HS. Rat skin wound healing induced by alternagin-C, a disintegrin-like, Cys-rich protein from *Bothrops alternatus* venom. **Int Wound J**. 2011 Jun;8(3):245-52.

- SANTORA TA, ROSLYN JJ. Incisional hérnia **Surg Clin North Am.** 73(3):557-70, 1993.
- SCHOETZ DJ JR, COLLER JA, VEIDENHEIMER MC. Closure of abdominal wounds with polydioxanone. A prospective study. **Arch Surg.** 123(1):72-4, 1988.
- SALVINI TF, DURIGAN JLQ, PEVIANI SM, RUSSO TL. Effects of electrical stimulation and stretching on the adaptation of denervated skeletal muscle: implications for physical therapy. **Rev Bras Fisioter.** 16(3):175-83, 2012.
- SELISTRE-DE-ARAUJO HS, PONTES CL, MONTENEGRO CF, MARTIN AC. Snake venom disintegrins and cell migration. **Toxins** (Basel). 2010 Nov;2(11):2606-21.
- SIMÕES MJ, CABRAL ACV, BOYACIYAN K, KULAY JÚNIOR L, SASSO WS. Aspectos ultraestruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. **Rev Paul Med** 104(3):132-5, 1986.
- SHIMO T, NAKANISHI T, NISHIDA T, ASANO M, KANYAMA M, KUBOKI T, et al. Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells in vitro, and angiogenesis in vivo. **J Biochem.** 126(1):137-45, 1999.
- SHI-WEN X, PENNINGTON D, HOLMES A, LEASK A, BRADHAM D, BEAUCHAMP JR, et al. Autocrine overexpression of CTGF maintains fibrosis: RDA analysis of fibrosis genes in systemic sclerosis. **Exp Cell Res.** 259(1):213-24, 2000.
- SI Z, BHARDWAJ R, ROSCH R, MERTENS PR, KLOSTERHALFEN B, KLINGE U. Impaired balance of type I and type III procollagen mRNA in cultured fibroblasts of patients with incisional hernia. **Surgery.** 131(3):324-31, 2002.

- SLATER NJ, VAN DER KOLK M, HENDRIKS T, VAN GOOR H, BLEICHRODT RP. Biologic grafts for ventral hernia repair: a systematic review. **Am J Surg.** 205(2):220-30, 2013.
- SUGERMAN HJ, KELLUM JM JR, REINES HD, DEMARIA EJ, NEWSOME HH, LOWRY JW. Greater risk of incisional hernia with morbidly obese than steroid-dependent patients and low recurrence with prefascial polypropylene mesh. **Am J Surg.** 171(1):80-4, 1996.
- SMIGIELSKI J, KOŁOMECKI K, ZIEMNIAK P, DROZDA R, AMSOLIK M, KUZDAK K: Degradation of Collagen by Metalloproteinase 2 in Patients with Abdominal Hernias. **Eur Surg Res** 42:118-121, 2009.
- STEDNAM MEDICAL DICTIONARY. Williams & Wolkins Company. Baltimore, Md 21202, USA, 1979.
- STERNLICHT MD, WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Review. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 17:463-516, 2001.
- SZABO KA, ABLIN RJ, SINGH G. Matrix metalloproteinases and immune response. **Clin. Appl. Immun. Rev** 4, 295-319, 2004.
- TRIKHA M, DE CLERCK YA, MARKLAND FS. Contortrostatin, a snake venom disintegrin, inhibits beta 1 integrin-mediated human metastatic melanoma cell adhesion and blocks experimental metastasis. **Cancer Res.** 15; 54(18):4993-8, 1994.
- TRINDADE EN, TRINDADE MR. The use of mesh and collagen in incisional hernias. **Hernia.** 11(1):83-4, 2007.
- TUCKER GC. Inhibitors of integrins. Review. **Curr Opin Pharmacol.** 2(4):394-402, 2002.



- URSCHEL JD, SCOTT PG, WILLIAMS HT. Etiology of late developing incisional hernias--the possible role of mechanical stress. **Med Hypotheses**. 25(1):31-4, 1988.
- VAN HINSBERGH VW, KOOLWIJK P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res*. 78(2):203-12, 2008.
- VAN HINSBERGH VW, ENGELSE MA, QUAX PH. Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 26(4):716-28, 2006.
- VENCLAUSKAS L, SILANSKAITE J, KANISAUSKAITE J, KIUDELIS M. Long-term results of incisional hernia treatment. **Medicina** 43(11):855-60, 2007.
- VOGEL W, GISH GD, ALVES F, PAWSON T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. **Mol Cell**. 1(1):13-23, 1997.
- VOGT PM, DRÜCKE D, MÜHLBERGER T, HOMANN HH, STEINAU HU. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. Review. **Zentralbl Chir**. 125 Suppl 1:65-8, 2000.
- XIONG YM, ZHANG L. Structure-function of the putative I-domain within the integrin beta 2 subunit. **J Biol Chem**. 276(22):19340-9, 2001.
- XIONG YM, HAAS TA, ZHANG L. Identification of functional segments within the beta2I-domain of integrin alphaMbeta2. **J Biol Chem**. 277(48):46639-44, 2002.
- WAGH PV, LEVERICH AP, SUN CN, WHITE HJ, READ RC Direct inguinal herniation in men: a disease of collagen. **J Surg Res**. 17(6):425-33, 1974.

WITTE MB, THORNTON FJ, KIYAMA T, EFRON DT, SCHULZ GS, MOLDAWER LL, et al. Metalloproteinase inhibitors and wound healing: a novel enhancer of wound strength. **Surgery**. 124(2):464-70, 1998.

WHITE B1, OSIER C, GLETSU N, JEANSONNE L, BAGHAI M, SHERMAN M, SMITH CD, RAMSHAW B, LIN E. Abnormal primary tissue collagen composition in the skin of recurrent incisional hernia patients. **Am Surg**. 73(12):1254-8, 2007.

YAHCHOUCHY-CHOUILLARD E, AURA T, PICONE O, ETIENNE JC, FINGERHUT A. Incisional hernias. I. Related risk factors. Review. **Dig Surg**. 20(1):3-9, 2003.

YALE CE. Gastric surgery for morbid obesity. Complications and long-term weight control. **Arch Surg**. 124(8):941-6, 1989.

YEH CH, PENG HC, HUANG TF. Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by acting as integrin alphavbeta3 antagonist and inducing apoptosis. **Blood**. 1;92(9):3268-76, 1998.

YONG VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. **Nat Rev Neurosci** 6:931-944, 2005.

ZHENG H, SI Z, KASPERK R, et al. Recurrent inguinal hernia: disease of the collagen matrix? **World J Surg** 26(4):401-8, 2002.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Aprovação do Comitê de ética em pesquisa com animais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110  
Fax: (016) 3361.3176  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[propp@power.ufscar.br](mailto:propp@power.ufscar.br) - [www.propp.ufscar.br](http://www.propp.ufscar.br)

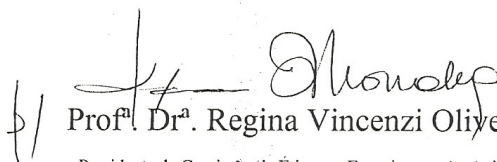
---

#### Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal nº 034/2008

Protocolo nº 001/2008

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 23ª. Reunião, ocorrida em 19/08/2008, considerando os documentos acrescentados pelos pesquisadores deliberou: O projeto Estudos dos efeitos biológicos de uma desintegrina recombinante do veneno de serpente *Bothrops alternatus*, DisBa-01, sobre a musculatura da parede abdominal após indução de hérnia incisional em ratos, elaborado por Cláudio Ricardo de Oliveira, Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, Rita de Cássia Marquetti, Carmen Lucia Salla Pontes e Sergio Dias, está **APROVADO**.

São Carlos, 20 de agosto de 2008.

  
Prof.ª Dr.ª Regina Vincenzi Oliveira  
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Em exercício