



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**ESTUDO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE UMA
DESINTEGRINA RECOMBINANTE DO VENENO DA
SERPENTE *BOTHOPS ALTERNATUS*, DISBA-01,
SOBRE A MUSCULATURA DA PAREDE ABDOMINAL
APÓS INDUÇÃO DE HÉRNIA INCISIONAL EM RATOS**

Cláudio Ricardo de Oliveira

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Ciências, área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

2009

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

O48ee

Oliveira, Cláudio Ricardo de.

Estudo dos efeitos biológicos de uma desintegrina recombinante do veneno da serpente *Bothrops alternatus*, DisBa-01, sobre a musculatura da parede abdominal após indução de hérnia incisional em ratos / Cláudio Ricardo de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

79 f.


Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Hérnia. 2. Abdomen. 3. DisBa-01. I. Título.

CDD: 617.559 (20ª)

Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Convênio UFSCar/UNESP

Defesa de Dissertação de Claudio Ricardo de Oliveira

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo..... 

Profa. Dra. Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa..... 

Profa. Dra. Ana Marisa Chudzinski Tavassi..... 

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o Grande Arquiteto do Universo, por uma vida plena de riquezas espirituais, e pela paciência e misericórdia que nos acolhe todos os dias de nossas vidas.

A minha esposa Audrey Borghi e Silva, minha principal incentivadora, por acreditar em mim, fazer parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por ser exemplo de profissional e mulher.

Ao meu filho Matheus Borghi Ricardo, pelo amor, paciência, compreensão, que teve para que eu pudesse concluir este trabalho.

Aos meus pais Cláudio e Malvina, que me deram à vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, sem medo e cheio de esperanças.

A Prof^a Dr^a Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo, os maiores e mais sinceros agradecimentos, pela oportunidade de aprimorar minha formação, pelo incentivo, carinho, paciência, sabedoria e compreensão e pela sua confiança e orientação em todos os momentos.

A amiga Rita de Cássia Marqueti, por estar ao meu lado, abdicando muitas vezes de seus afazeres para a realização deste projeto.

A Estela SantAna, pelo apoio e amizade.

Aos colegas Daniel Mochiutti, José Aparecido Ferreira, Charles Chenwei Wang, Juciléia Barbosa Bezerra, Carmen Lucia Pontes, Márcia Regina Cominetti, Juliana Uema, Marcelo G. Paulino, pelo apoio recebido durante o mestrado.

A Prof^a. Dr^a. Keico Okino Nonaka, pelos ensinamentos técnicos e teóricos e por ter disponibilizado o Laboratório de Endocrinologia, onde realizamos todos os procedimentos cirúrgicos e coletas das amostras, para a realização deste projeto.

Prof^a. Dr^a. Marisa Narciso Fernandes pelo auxílio na elaboração das laminas.

Ao Sr. Sergio Dias, pelo apoio e atenção dispensada durante a realização dos procedimentos no Laboratório de Endocrinologia e Irene Guimarães (Bete).

A Dr^a Elizete Lopes Guilherme e ao Dr. Michel A. Kiota Moutinho, pela amizade e apoio técnico na indicação dos corantes, montagem das laminas e avaliação histológica do trabalho, sem a qual não teríamos realizado este estudo.

RESUMO

INTRODUÇÃO: a hérnia incisional (HI) é uma das complicações mais frequentes após laparotomia, causando altos índices de re-operações. Avanços nos materiais de suturas, nas orientações de incisões, nas técnicas de fechamento e do uso de próteses (telas), têm falhado para a eliminação desta complicação cirúrgica. Neste contexto, avanços no entendimento das alterações biológicas e estruturais do colágeno podem oferecer uma nova estratégia no tratamento da HI, uma vez que as desordens da matriz que induz a formação da hérnia primária provavelmente também prejudicam a cicatrização da ferida operatória nas laparotomias.

OBJETIVO: Investigar os efeitos da desintegrina recombinante DisBa-01, sobre o processo de cicatrização da musculatura da parede abdominal com hérnia incisional (HI) com relação a proliferação de fibroblastos, vasos e a atividade das metalopeptidases de matriz. A função das integrinas anti-subunidade α_2 e anti- $\alpha_V\beta_3$ foram investigadas pelo bloqueio de anticorpos.

MÉTODOS: Foi induzida a HI por secção da linha alba em 20 ratos Wistar, distribuídos em dois grupos: controle que recebeu a aplicação tópica de solução salina tamponada com fosfato (PBS), e DisBa-01 (0,5mg/Kg) dissolvida em PBS. Outros 10 ratos foram divididos em dois grupos: um recebeu anti- $\alpha_V\beta_3$ e outro anti-subunidade α_2 . Ao final, de 14 dias, os animais foram sacrificados e fragmentos do músculo dos 04 grupos foram armazenados em nitrogênio líquido para determinação de MMPs por zimografia. O restante dos fragmentos dos grupos controle e DisBa-01, foram fixados em formol a 10% em PBS (v/v). A densidade de vasos sanguíneos, células mononucleares, fibroblastos e de fibras colágenas foram estudadas por microscopia óptica em reticulina e Tricromo de Masson. Para análise dos dados foram aplicados testes paramétricos com nível crítico de 5%.

RESULTADOS: Todos os animais após indução cirúrgica desenvolveram HI. Entretanto, após 14 dias nos animais do grupo Controle houve persistência do anel herniário aberto e nos animais do grupo DisBa-01 foi observado a formação de membrana que ocluía todo o anel herniário. Foi observado aumento significativo das células mononucleares, fibroblastos, neovascularização e da atividade da MMP-2 no grupo DisBa-01 ($p < 0,05$). Houve aumento significativo da colagenização no grupo DisBa-01 em comparação ao controle. O grupo anti- $\alpha_V\beta_3$ produziu resultados similares a proteína DisBa-01 mas não no grupo bloqueado anti-subunidade α_2 .

CONCLUSÃO: Estes resultados indicam que a DisBa-01 promoveu proliferação vascular, celular fibroblástica e monocítica, e remodelamento da MEC. Adicionalmente, estes resultados fortemente indicam que a integrina $\alpha_V\beta_3$ tem importante função no controle da ferida cirúrgica e o bloqueio desta integrina pode ser uma interessante estratégia terapêutica nas condições de reparo tecidual, incluindo a HI.

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

ABSTRACT

INTRODUCTION: The incisional hernia (IH) is one of the most frequent complications after laparotomy, causing high rates of re-operations. Advances in suture material, in the guidelines for incisions, in the techniques of closure and use of dentures (screens), have failed in the elimination of this surgical complication. In this context, advances in the understanding of biological and structural changes of collagen may offer a new strategy in the treatment of IH, since the matrix disorders that induces the formation of primary hernia probably also affect the wound healing in laparotomies.

OBJECTIVE: To investigate the effect of a recombinant desintegrin (*DisBa-01*) on the abdominal muscle healing process with incisional hernia (IH) regarding the fibroblasts and vessels proliferation and matrix metalloproteinase activity as well. The role of α_2 and anti- $\alpha_v\beta_3$ integrins were investigated by antibody competition.

METHODS: IH was induced by sectioning of the midline in 20 Wistar rats, divided into two groups: control that received the topical application of phosphate buffered saline (PBS) and *DisBa-01* protein (0.5mg/Kg) dissolved in PBS. Another 10 rats were divided in two groups: one received anti- $\alpha_v\beta_3$ antibodies and the second anti- α_2 subunit antibodies. At the end of 14 days, the animals were sacrificed and muscle fragments were stored in liquid nitrogen for determination of MMPs by zymography. The remaining fragments of the control and *DisBa-01* groups were fixed in 10% formol in PBS (v/v). Blood vessels density, mononuclear cells, fibroblasts and collagen fibers were studied by optical microscopy in blue reticuline and Masson-trichrome. Data was analyzed by parametric tests were applied with critical level of 5%.

RESULTS: All animals after surgical induction developed IH. However, after 14 days the persistence of the opened hernial ring in the controls but not in the *DisBa-01* group. This protein induced the formation of a membrane that occluded the entire hernial ring. A significant increase in the number of mononuclear cells, fibroblasts, new vessels and MMP-2 activity was observed in *DisBa-01* group ($p < 0.05$). *DisBa-01* group significant increased the collagen content. Anti- $\alpha_v\beta_3$ integrin antibodies produced similar results but not anti- α_2 integrin blocking antibodies.

CONCLUSION: These results indicate that *DisBa-01* promoted vascular and fibroblastic cell proliferation and monocytic, and matrix remodeling. In addition, these results strongly indicate that $\alpha_v\beta_3$ integrin has an important role in the control of wound healing and the blocking of this integrin may be an interesting therapeutical strategy in tissue repair conditions, including IH.

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

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância

b-FGF: Fator de Crescimento Básico de Fibroblastos

CTGF: Fator de crescimento tipo tecido conectivo

kDa: Quilodauton (s) unidade de massa molecular

DP: Desvio Padrão

DDR: receptor de domínio discóide

DisBa-01: desintegrina de *Brotopus Alternatus*

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

FGF: fator de crescimento de fibroblastos

HE: Hematoxilina-eosina

HI: hérnia incisional

KGD: Seqüência Lisina-Glicina-Asparagina

MEC: membrana extra-celular

MGD: seqüência de aminoácidos molibdopterina guanina dinucleotídeo

MMPs: Metalopeptidases de matriz

mRNA: ácido ribonucléico mensageiro

NO: Oxido Nítrico

PDGF: fator de crescimento derivado das plaquetas

PBS: salina tamponada com fosfato

PMSF: Fenilmetilsulfonilflúor (inibidor de proteases)

PVDF: difluoreto de polivinilideno

q.s.p: quantidade suficiente para

RGD: seqüência de aminoácidos Arginina-Glicina-Aspartato presentes em desintegrinas e relacionado com a ligação com integrinas da subunidade β_3 .

TIMPs: inibidores teciduais das metalopeptidases de matriz

TGF- β : fator de crescimento de transformante β

TM: Tricrômio de Masson

TNF α : Fator de necrose tumoral alfa

SDS: duodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sodio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

VGF: Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Família das Metalopeptidases de Matriz.....	8
Tabela 2 - Substratos comuns das MMPs.....	9
Tabela 3 - Integrinas e seus ligantes	17
Tabela 4 - Análise qualitativa da proliferação vascular, mononucleares, fibroblastos e colágeno nos grupos estudados.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fases do processo de cicatrização: inflamatória, proliferativa e reparadora e atividade celular recrutada em cada uma das fases (Franz, 2008).....	5
Figura 2: exemplos de associação das subunidades α e β formando as integrinas.....	16
Figura 3: Seqüência tripeptídica RGD.....	19
Figura 4: Em A, o animal sobre suporte cirúrgico, após tricotomia abdominal e em B após incisão transversa em região abdominal.....	28
Figura 5: A: visualização pós-operatória da hérnia incisional induzida, com o abaulamento característico provocados pelo conteúdo abdominal herniado nos grupos controle; B: ausência de hérnias.....	29
Figura 6: A: formação de hérnia Incisional após indução cirúrgica; B: persistência do anel herniário aberto no grupo controle após 14 dias da indução da hérnia incisional, todas as características da hérnia incisional, confirmando os limites biológicos da laparotomia.....	38
Figura 7: A: Membrana presente somente no grupo DisBa-01 ocluindo o anel herniário; B: presença de aderências viscerais; C: anel herniário (todas as características da hérnia incisional).....	39
Figura 8: Desenvolvimento de HI em animais bloqueados com anticorpo anti- $\alpha_v\beta_3$. A: aderências firmes entre o tecido subcutâneo e a musculatura da parede abdominal; B: fechamento parcial do anel herniário por tecido de aspecto fibrítico; C: presença de pequena área membranosa.....	40
Figura 9: Desenvolvimento de HI em animais bloqueados com anticorpo anti- α_2 . A: persistência da hérnia incisional; B: aderências firmes entre o tecido subcutâneo e a musculatura da parede abdominal; C: presença do anel herniário parcialmente ocluído.....	40
Figura 10: imagens histológicas representativas dos grupos Controle e DisBa-01.....	42

Figura 11: Aumento da proliferação vascular induzida pela DisBa-01. Análise estatística da proliferação vascular entre o grupo controle e o grupo DisBa-01 (* p=0,0005).....	44
Figura 12: Aumento do número de células mononucleares, induzido pelo tratamento com DisBa-01. Análise estatística das células mononucleares entre o grupo controle e o grupo DisBa-01 (* p=0,02).....	44
Figura 13: Aumento do número de fibroblastos induzido pela DisBa-01 (* p=0,0009).....	45
Figura 14: Aumento do colágeno induzido pela DisBa-01 (* p=0,01).....	46
Figura 15: Análise morfológica do colágeno entre o grupo controle e o grupo DisBa-01 (*p=0,01).....	47
Figura 16: A) Atividade da MMP-2 induzida pela DisBa, anti- $\alpha_v\beta_3$ e anti- α_2 no 14º dia pós-operatório. (A e C) Atividade proteolítica em extrato de músculo abdominal por zimografia. (B e D) Intensidade da banda ativa da MMP-2 em unidades arbitrárias.	48
Figura 17: A) Análise proteica de extrato da membrana formada pela DisBa-01 por SDS-PAGE. B) tecido de referência com predominância de colágeno tipo I. (amostra de tendão).....	49
Figura 18: Amostras de extrato tecidual transferidas para membrana de PVDF e submetidas à sequenciamento amino-terminal. P: padrão; TC: tendão calcâneo; Memb: membrana abdominal.....	50
Figura 19: proposta de mecanismo de ação da DisBa-01.....	58

SUMARIO

1) INTRODUÇÃO.....	1
1.1) FISILOGIA DA CICATRIZAÇÃO.....	3
1.2) ANGIOGÊNESE.....	13
1.3) INTEGRINAS.....	15
1.4) DESINTEGRINAS.....	21
1.4.1) Desintegrina de <i>Bothrops alternatus</i>.....	23
2) OBJETIVOS.....	25
3) MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1) Amostra.....	26
3.2) Procedimentos Experimentais.....	27
3.2.1) Indução da Hérnia Incisional.....	27
3.2.2) Controle pós-operatório.....	29
3.2.3) Sacrifício dos animais e obtenção dos extratos de tecidos.....	29
3.2.3.1 Extração e análise de proteínas.....	30
3.2.3.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida SDS- PAGE.....	31
3.3) Análise Histológica.....	32
3.3.1) Análise Qualitativa.....	34
3.3.1.1) Proliferação Vascular.....	34
3.3.1.2) Células mononucleares.....	34
3.3.1.3) Proliferação fibroblástica.....	34
3.3.1.4) Colagenização.....	35
3.3.2) Análise Quantitativa do Colágeno.....	35
3.4) Determinação da atividade de MMPs por zimografia.....	35
3.5) Análise Estatística dos Dados.....	37
4) RESULTADOS.....	38
4.1) Análise Histológica.....	41
4.2) Análise Morfométrica do Colágeno.....	46

4.3) Análise da atividade de Metalopeptidases de matriz (MMPs).....	47
4.4) Análise dos componentes da membrana de oclusão da HI.....	48
5) DISCUSSÃO.....	51
6) CONCLUSÃO.....	62
7) REFERÊNCIAS.....	63

1) INTRODUÇÃO

As hérnias da parede abdominal que surgem após procedimentos cirúrgicos, ocorrem devido à perda da função e da estrutura tecidual dos músculos, tendões e aponeurose. Desta forma, a Hérnia incisional (HI) caracteriza-se pelo afastamento progressivo das bordas músculo-aponeuróticas incisadas, mantendo-se íntegros a pele, as fáscias musculares e o peritônio parietal que, juntos, compõem o saco herniário, para onde migra o conteúdo abdominal, ocasionando o abaulamento da cicatriz, sendo uma das mais freqüentes complicações da cirurgia abdominal, com incidência estimada de 2 a 11% após a laparotomia (Santora et al 1993; Urschel et al 1988; Schoetz et al 1988; Mudge & Hughes, 1985; Larson & Vandertoll, 1984; Houck et al, 1989; Yahchouchy-Chouillard et al, 2003).

No entanto, nos últimos 75 anos, a freqüência desta complicação após laparotomia não tem diminuído apreciavelmente (Carlson, 1997). A HI acarreta complicações graves tais como: encarceramento e estrangulamento e obstrução de alças intestinais (Luijendijk et al, 2000). De acordo com o Centro Nacional de Estatística de Saúde dos E.U.A., aproximadamente são realizadas 200.000 operações por ano, para reparo de hérnias incisionais abdominais (National Center for Health Statistics, 1995). Apesar da utilização de próteses (telas) representarem um avanço no reparo da HI por diminuir a taxa de recidiva, também surgiram complicações relacionadas a este procedimento, as quais são graves e de difícil tratamento, como as fístulas intestinais e a dor crônica (Losanoff et al, 2002). Além de desconfortável e antiestética, as próteses predis põem à insuficiência respiratória,

distrofias e úlceras de pele, bem como a atrofia e fibrose da musculatura abdominal (DuBay et al, 2007).

Ensaio clínico controlado têm demonstrado que a recorrência de HI foi alarmante, atingindo os percentuais de recidivas de 24% após reparo com tela e de 43% com sutura (Luijendijk et al, 2000; Burger et al, 2004). Entretanto, a recidiva de reparo com tela em pacientes portadores de HI foi significativamente menor (17%) do que o reparo com sutura (67%), segundo Burger et al, (2004) e Venclauskas et al, (2007). Contudo o reparo da HI com tela demonstrou aumento da elasticidade da parede abdominal, reduzindo a frequência na recorrência desta doença (DuBay et al, 2006).

O desenvolvimento da HI nos seis primeiros meses até 3 anos após a cirurgia inicial é de 80-95% (Mudge & Hughes, 1985; Read & Yonder, 1989), sendo que os fatores de risco são: o tipo de hérnia primária, diabetes mellitus (Pories, 1992), obesidade (Yale, 1989), incisão mediana infra-umbilical (Houck et al, 1989), infecção da ferida operatória (Keill et al 1973; Hesselink et al 1993; Niggebrugge et al 1999), doença pulmonar obstrutiva crônica, desnutrição, câncer, idade, insuficiência renal, e tratamento com esteróides (Sugerman et al 1996).

Adicionalmente, outros fatores como agentes citotóxicos, radioterapia e anticoagulantes orais, são fatores contribuintes para deiscência da sutura e infecções da ferida operatória (Hesselink et al 1993; Hugh, 1990; Niggebrugge et al 1995; Niggebrugge et al 1999). A icterícia obstrutiva é considerada por muitos como fator de risco para HI, pois evidências experimentais sugerem que há diminuição da

cicatrização da ferida operatória por impedir a fibroplasia e angiogênese (Armstrong et al, 1984; Bayer & Ellis, 1976).

1.1) FISILOGIA DA CICATRIZAÇÃO

O processo de cicatrização pode ser dividido em três fases: Inflamatória, Fibro-proliferação (formação da cicatriz) e Remodelamento (Figura 1).

Fase Inflamatória: caracterizada pelo processo inflamatório local com a presença de sinais típicos de 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 sitio da ferida operatória para o crescimento do novo tecido. Esta fase divide-se em três etapas: trombocítica, granulocítica e macrofágica.

- Etapa Trombocítica: caracterizada pela ativação da cascata de coagulação que faz com que o colágeno exposto promova aderência celular na superfície interna e externa do vaso sanguíneo. São liberadas substâncias vasoativas, quimiotáticos e plaquetários. Ocorre a formação de trombo, que juntamente com eritrócitos, fará a hemostasia das margens da ferida operatória.

- Etapa Granulocítica: caracterizada pela atuação dos polimorfonucleares, na incisão cirúrgica, liberando enzimas proteolíticas (ex: colagenases); efluxo de leucócitos e neutrófilos, com a função de fagocitar bactérias e tecido necrosado.

- Etapa Macrofágica: caracterizada pela atuação dos macrófagos, secretando fatores de crescimento que atuarão no reparo tecidual.

Fase de Fibro-proliferação, regeneração ou fibroblástica: caracterizada pela migração dos 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 dos fibroblastos, do aumento da força tensil e a 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 (Franz et al, 2008).

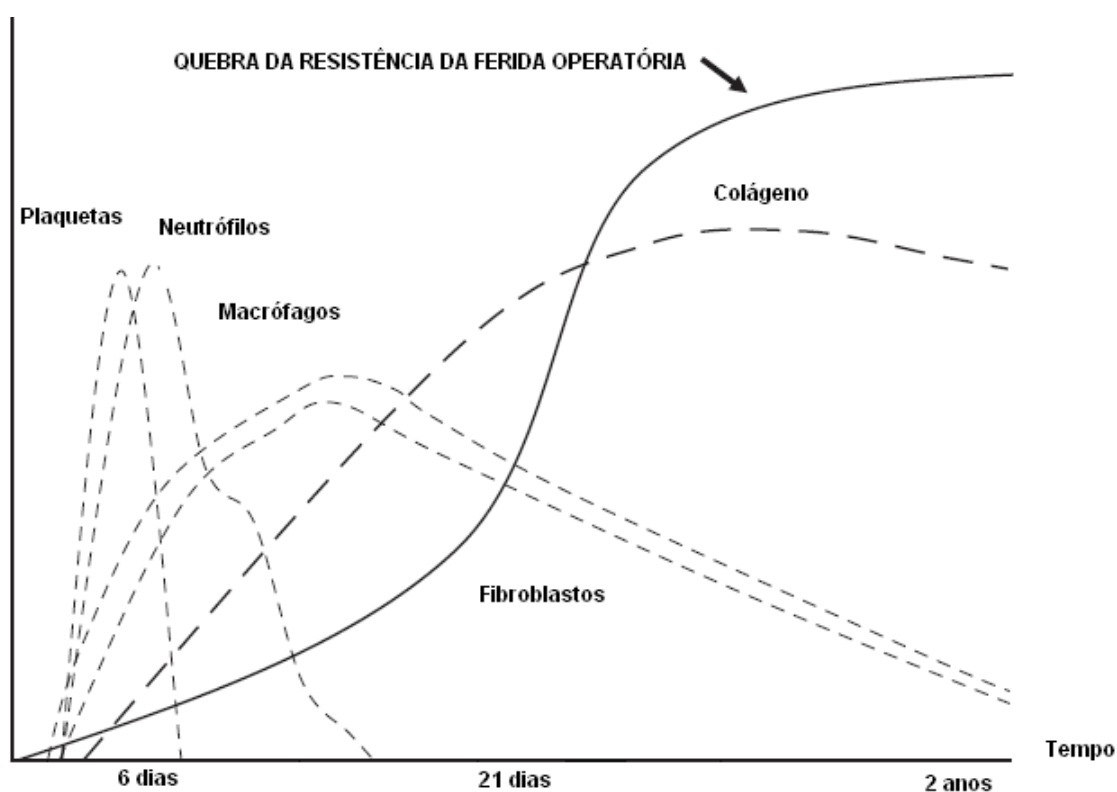


Figura 1: Fases do processo de cicatrização: inflamatória, proliferativa e reparadora e atividade celular recrutada em cada uma das fases (Franz, 2008).

A despeito de numerosos fatores de riscos, já citados, o conhecimento da causa do desenvolvimento de hérnias primárias ou incisionais parece ser de natureza biológica (Trindade & Trindade, 2007). O aparecimento tardio de HI e as altas taxas de recidiva após correção cirúrgica implicam fortemente na presença de desordens do tecido conectivo, sugerindo assim importante função na gênese desta patologia (Klinge et al, 1999). Inicialmente o mecanismo proposto para explicar o desenvolvimento das hérnias primárias e incisionais, foi o metabolismo anormal do colágeno (Peacock, 1984), pois um colágeno anormal foi detectado em biopsia de pele, realizadas em pontos distantes do sitio herniário, sustentando o mecanismo de

formação das hérnias. Essa idéia é também amparada pelo fato de que doenças como as Síndromes de Marfan e Ehlers-Damlos (cútis elástica), a osteogênese imperfecta, luxação congênita do quadril, estão associados com processos herniários (Yahchouchy-Chouillard et al, 2003).

Além dos fatores de riscos mencionados relacionados ao surgimento da HI, a perda da arquitetura da cicatrização normal na laparotomia pode selecionar uma população de indivíduos acometida pela presença anormal da cicatrização pelos fibroblastos, como ocorre nas feridas crônicas (Dubay et al, 2005; Franz et al, 2001) podendo resultar na expressão anormal da estrutura do colágeno e explicando assim a alta incidência de recidivas de HI.

Uma vez que a integridade dos tecidos está na dependência do balanço entre a síntese e a degradação da matriz extracelular, e que a arquitetura destes tecidos poderá ser alterada por defeitos ou mudanças estruturais do tecido conectivo, acarretando alterações nas suas propriedades mecânicas e contribuindo para o processo de formação da hérnia (Bellón et al, 2001). Si et al, (2002), observaram uma síntese alterada do colágeno tipo I e III, em culturas de fibroblastos da pele sugerindo assim uma desordem no metabolismo do colágeno em pacientes com hérnia recorrente. Estes resultados são importantes uma vez que contribuem para o entendimento dos resultados insatisfatórios do reparo da hérnia incisional.

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 tipo I predominante (mais de 90% do colágeno total

em adultos). O tipo III predomina em recém nascidos e na fase inicial da cicatrização de feridas cirúrgicas (Diegelmann, 2001). Assim, estes tipos de colágeno são freqüentemente encontrados em aponeuroses e tecidos em cicatrização, reforçando a relação direta entre a recorrência de hérnia e as doenças que acometem a matriz do colágeno (Bruce et al, 1994; Kumar et al, 2004; Aaronson et al, 2004). Recente estudo indicou relação entre hérnia incisional e reduzida quantidade de colágeno tipo I (Fachinelli & Trindade, 2007).

O padrão de expressão de certos tipos de colágeno e certas disfunções de enzimas tem sido objeto de alguns estudos (Wagh et al, 1974). As metalopeptidases de matriz (MMPs) representam um grupo de enzimas que atuam na degradação e contribuem para o “turnover” da matriz extracelular atuando sobre determinados tipos de colágeno estando portanto envolvidas na ligação cruzada e maturação de novas fibras colágenas sintetizadas (Witte et al, 1998). Sua função tem sido estudada tanto nos processos fisiológicos quanto nos estados patológicos.

As MMPs constituem uma família de enzimas dependentes do zinco e cálcio para realizarem suas funções. Possuem uma seqüência homóloga extensa e são bem caracterizadas e específicas quanto ao substrato sobre o qual atuam e são os principais mediadores no remodelamento da matriz extracelular, tendo papel importante no desenvolvimento, morfogênese e reparo tecidual (Kuzuya & Iguchi, 2003).

Tabela 1 – Família das Metalopeptidases de Matriz

MMP	Nome comum
Colagenases	MMP-1 Colagenase-1
	MMP-8 Colagenase-2
	MMP-13 Colagenase-3
	MMP-18 Colagenase-4
Gelatinases	MMP-2 Gelatinase A
	MMP-9 Gelatinase B
Estromelisinias	MMP-3 Estromelisina-1
	MMP-10 Estromelisina-2
	MMP-11 Estromelisina-3
MMPs tipo-Membrana	MMP-14 MT1-MMP
	MMP-15 MT2-MMP
	MMP-16 MT3-MMP
	MMP-17 MT4-MMP
	MMP-24 MT5-MMP
	MMP-25 MT6-MMP
Outras MMPs	MMP-7 Matrelisina-1
	MMP-12 Metaloelastase
	MMP-19 Enamelisina
	MMP-20 Matrelisina-2
	MMP-26

Fonte: STERNLICHT; WERB, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. v.17, 2001

Tabela 2 - Substratos comuns das MMPs

MMP	1	2	3	7	8	9	10	11	12	13	14	16	18	19	26
Proteínas MEC:															
Agrecam	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+				
Colágeno I	+	+	-	+	+	-			+	+	+		+	+	-
Colágeno II	+				+	-				+	+				-
Colágeno III	+	+	+	-	+	-	+			+	+	+			
Colágeno IV	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-				+	+
Colágeno V	-	+	+	-	-	+	+			-					
Colágeno VI	-	-	-			-				+					
Colágeno VII	+	+	+												
Colágeno VIII	+														
Colágeno IX	-	-	+							+					
Colágeno X	+	+	+	-						+					
Colágeno XI	+	+	+			+				-					
Colágeno XIV	-		-	-		+				+					
Decorin	-	+	+	+		+									
Elastina	-	+	+	+		+	+		+						-
Entactin/Nidogen	+	+	+	+					+		+				
Fibillin		+	+			+			+	+	+				
Fibronectina	+	+	+	+	-	-	+		+	+	+	+		+	+
Fibulins		+		+											
Gelatina I	+	+	+	+		+	+		+	+	+			+	+
IGFBPs	+	+	+					+							
Laminina	+	+	+	+		+		-	+		+				-

Fonte: STERNLICHT; WERB, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. v.17, 2001

Convencionalmente as MMPs são classificadas como: colagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinases e as MMPs ligadas à membrana (MT-MMP). Todas as MMPs possuem uma seqüência N- terminal ou pró-domínio, um pró-peptídeo que é removido durante a sua ativação, conservando assim o domínio catalítico. Com exceção da matrilizina, todas as MMPs contêm um domínio tipo-vitronectina/hemopexina e um domínio dobradiça que conecta o domínio tipo-hemopexina e catalítico (Kuzuya & Iguchi, 2003). Muitas MMPs são secretadas como precursores latentes (zymogenes) que são proteoliticamente ativados no espaço extracelular, com exceção da MMP-11 e MT1-MMP.

No entanto, o aumento da atividade proteolítica destas enzimas pode ocasionar enfraquecimento da estrutura tecidual, tendo como exemplos a super-expressão de MMP-2 nos fibroblastos de portadores de hérnia inguinal direta e a da MMP-13 nos pacientes com hérnia inguinal recidivada (Bellón et al, 2001; Zheng et al, 2002). Entretanto, estudos como estes são observacionais, e ainda não deixam claro se o aumento da expressão das MMPs leva à formação de hérnia inguinal. (Franz, 2008).

A atividade das MMPs no espaço extracelular é especificamente controlada pelos inibidores teciduais de metalopeptidases (TIMPs) os quais se ligam fortemente ao sítio catalítico, conservando o zinco. As famílias dos TIMPs consistem de 4 tipos estruturalmente relacionados (TIMP 1, 2, 3 e 4), Existe um certo grau de especificidade na atividade dos diferentes TIMPs em relação a família das MMPs.

Assim sabemos que o TIMP-1 inibe potentemente a atividade da maioria das MMPs, com exceção da MMP-2 e MT1-MMP, que o TIMP-2 é um potente inibidor da maioria das MMPs, exceto a MMP-9. Além disso, o TIMP-2 pode formar um complexo com a MT1-MMP na membrana celular, o que possivelmente desempenha um papel regulador na atividade proteolítica da MMP-2. Já o TIMP-3, que é insolúvel e liga-se a MEC, tem a sua ação vinculada as MMP-1, -2, -3, -9 e -13.

O TIMP-4 inibe MMP-1, -3, -7, e -9 e demonstra um elevado nível de expressão em no miocárdio. Desta forma o papel do TIMPs é claramente importante no prevenção da degradação excessiva matriz por MMPs (Creemers et al, 2001).

Diversos estudos associam a hérnia incisional com metabolismo do colágeno, demonstrando o aumento do colágeno tipo III e dos níveis de MMP na matriz tecidual da ferida operatória (Rosch et al, 2003; Klinge et al, 1999, Klinge et al, 2000). Observou-se que a relação entre mRNA de colágeno tipo I/ tipo III está diminuída nos portadores de hérnia incisional, após dosagens feitas de amostras do anel herniário e da pele destes pacientes, (Klinge et al, 1999). Este efeito foi ocasionado pelo aumento relativo do colágeno tipo III, sendo este estudo convincente da presença de defeito genético do colágeno nos pacientes que desenvolvem HI.

Adicionalmente, outras proteínas relacionadas à formação do colágeno estão envolvidas na modulação deste sistema: colágeno tipo V, receptor de domínio discóide (DDR) 2, fator de crescimento tipo tecido conectivo (CTGF) e tenascina (Rosch et al, 2003). O colágeno tipo V controla a fibrinogênese por limitar a agregação do colágeno I/III e o colágeno II. (Linsenmayer et al 1993; Marchant et al, 1996; Andrikopoulos et al, 1995). A família DDR compreende receptores de colágeno altamente expressos em tecidos humanos (Alves et al, 1995), sendo que os receptores tipo DDR2 estão localizados nas células mesenquimais e são primariamente ativados por fibras de colágeno do tipo I, associadas com o aumento da atividade de MMP-1 e podendo assim ser responsáveis pela degradação do colágeno (Olaso et al, 2002; Vogel et al, 1997).

O CTGF tem papel na promoção da angiogênese, na proliferação e síntese de colágeno e é expresso em numerosas desordens fibróticas (Frazier et al, 1996; Shimo et al, 1999; Shi-wen et al, 2000). Já a tenascina é da família de glicoproteínas (TN-C, TN-R, TN-W, TN-X e TN-Y) e são expressas no desenvolvimento

embrionário. No entanto, na fase adulta estas moléculas são re-expressas durante processos de remodelamento semelhantes à cicatrização de feridas e involução de tecidos (Mackie, 1997; Jones & Jones, 2000). A tenascina tem sua síntese estimulada pela desnaturação do colágeno do tipo I pelas MMPs (Jones & Jones, 2000). Desta forma, estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar a possível relação entre as proteínas relacionadas ao metabolismo do colágeno em pacientes com hérnia (Rosch et al, 2003; Klinge et al, 2006).

Por outro lado, fatores de crescimento tecidual são uma importante classe de peptídeos sinalizadores do reparo dos tecidos, regulados durante a fase lenta da cicatrização de feridas (Robson et al, 1998), que estimulam a angiogênese, proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno (Hunt et al, 1984; Debus et al, 2000; Vogt et al, 2000). O fator de crescimento proliferativo tipo fator de crescimento de transformante β (TGF- β) aumenta após 5 a 7 dias na fase aguda da ferida (Cromack et al, 1987).

O TGF- β e o colágeno são sabidamente fatores de aceleração do processo cicatricial, auxiliando na recuperação da força tensora na lesão da derme e incisão da fáscia (Mustoe et al, 1987; Franz et al, 1999). Neste sentido, Franz et al, (2001) observaram que o tratamento da incisão da parede abdominal com TGF β_2 preveniu o desenvolvimento de hérnia incisional no rato, estimulando os macrófagos da fáscia e a quimiotaxia de fibroblastos bem como a produção de colágeno na ferida aguda. Em contraste, a administração local de TGF- β_1 não aumentou a força da parede abdominal após 6 semanas de administração local.

Adicionalmente, fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) têm demonstrado a habilidade de estimular a angiogênese e a fibroproliferação na derme (Montesano et al, 1986). O tratamento da incisão na aponeurose abdominal com polímero de FGFb diminuiu significativamente a incidência de hérnia incisional e a frequência de recorrência após reparo cirúrgico (DuBay et al, 2004).

Segundo Franz (2008) a síntese e degradação do colágeno seriam realizadas pelos fibroblastos, e que alterações nas funções destas células teriam papel importante na gênese de doenças do colágeno, sendo provavelmente a causa das hérnias primárias e fator importante na formação da HI.

1.2) ANGIOGÊNESE

A angiogênese é um mecanismo que consiste no desenvolvimento e crescimento de vasos sanguíneos a partir de outros pré-existentes. É um processo dinâmico, que acompanha o indivíduo desde o período embrionário até à vida adulta. É importante não só em condições fisiológicas, como também patológicas e é estimulada pelos fatores VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), FGF (fator de crescimento dos fibroblastos), TGF- β (*transforming growth factor*), PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas), interleucina-8 e angiopoietina1. Como inibidor da angiogênese destacam-se a angiopoietina2 (quando há ausência de VEGF), interferon, interleucina-4, inibidores das metalopeptidases de matriz, angiostatina, endostatina, trombospondina, fator plaquetário IV e protamina (Buschmann & Schaper, 1999; Jussila & Alitalo, 2002).

Dependendo das exigências necessárias, a formação de novos vasos sanguíneos é possível por 3 mecanismos: vasculogênese, arteriogênese e

angiogênese. A vasculogênese ocorre apenas na fase embrionária e consiste na formação de vasos sanguíneos a partir de células endoteliais progenitoras (células mesenquimatosas). Existe uma fase de diferenciação de angioblastos em ilhotas sanguíneas que se fundem e originam os plexos capilares primitivos. Após este primeiro processo morfogênico do desenvolvimento vascular, segue-se a angiogênese onde há remodelação e expansão da rede capilar primitiva em vasos de calibres variados, que coincide com o início da atividade do coração (Buschmann & Schaper, 1999; Jussila & Alitalo, 2002).

Teoricamente, a vasculogênese precede a angiogênese, porém, os dois processos desenrolam-se paralelamente. Os tecidos cujas origens embrionárias são a ectoderme e a mesoderme (rim, cérebro) sofrem angiogênese. Por outro lado, a vasculogênese tem lugar nos tecidos derivados da endoderme (pulmão, pâncreas, baço, coração, grandes vasos sanguíneos) (Jussila & Alitalo, 2002). Desta forma, a arteriogênese é facilmente compreendida quando ocorre a oclusão de uma artéria de considerável calibre. Nestes casos, colaterais arteriolares já existentes são recrutadas de forma a atenuar os efeitos deletérios de tal evento.

Entre os reguladores da angiogênese podem salientar-se os efeitos estimulantes do óxido nítrico (NO), hipóxia, hormônios sexuais e o etanol. Por outro lado, a idade, a hipertensão e a hiperglicemia inibem a angiogênese (Buschmann & Schaper, 1999). A sua regulação depende, além dos fatores e situações mencionados, da interação entre componentes da matriz extracelular (MEC), moléculas de adesão e forças mecânicas. Quando o balanço homeostático desaparece, surgem situações de déficit ou excesso de vascularização.

A isquemia, ocasionada pelo déficit de vascularização na fase inicial do processo cicatricial acarreta a deiscência da ferida operatória, formando um reparo tecidual frágil, confirmando assim um importante mecanismo de formação da HI, como demonstrados em outros estudos (Pollock et al,1989).

1.3) INTEGRINAS

As maiorias das células expressam algum tipo de aderência durante as suas vidas, o que permite a migração, organização e ancoragem final de tipos específicos para a criação de um modelo complexo de cada um dos tecidos existentes.

A adesão das células à vizinhança das matrizes extracelulares determina o seu formato, mantém a função celular adequada e a integridade do tecido. A matriz extracelular também auxilia o ancoramento das células, sinaliza o tráfego celular e dirige a diferenciação celular. O controle do comportamento celular parece originar em resposta às interações célula-matriz. As proteínas adesivas da matriz não apenas promovem a adesão celular como também estimulam a migração celular (Ruoslahti, Pierschbacher, 1987).

Existem quatro classes principais de receptores celulares envolvidos nas interações célula-célula e célula-matriz: caderinas, selectinas, superfamília de receptores de imunoglobulinas e integrinas (Ruoslahti, Pierschbacher, 1987; ROMANOV et al, 1997), estando as integrinas relacionadas ao presente estudo.

As integrinas são macromoléculas mediadoras da adesão celular e reguladoras da angiogênese e da homeostasia vasculares. Fornecem 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. As integrinas são uma família de glicoproteínas transmembrana heterodiméricas, consistindo de duas sub-unidades α (150 a 180 KD) e β (~90 KD), associadas não-covalentemente. Atualmente, são conhecidos dezoito tipos de subunidades α e oito tipos de subunidades β que, combinadas, constituem pelo menos 24 integrinas (figura 2) já descritas (Xiong *et al.*, 2001; Tucker, 2002).

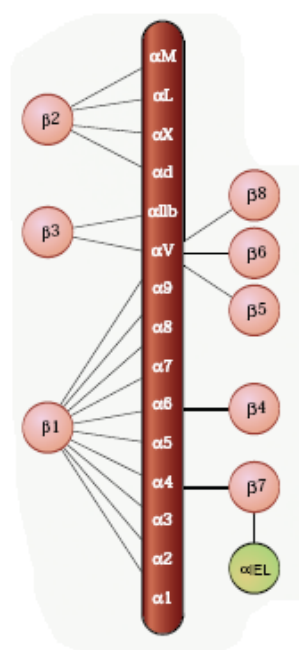


Figura 2: exemplos de associação das subunidades α e β formando as integrinas. (Fonte: Matrix Biology - Integrins & Other Adhesion Molecules Chemicon International S/A, 2006).

Tabela 3: Integrinas e seus ligantes

H. sapiens Integrinas	Ligantes	
$\alpha 3\beta 1$ $\alpha 6\beta 1$ $\alpha 7\beta 1$	LN; TSP LN; <i>ADAMs</i> LN	RECEPTORES LAMININA
$\alpha 6\beta 4$	LN	
$\alpha 1\beta 1$	CO; LN	RECEPTORES COLAGENO FIBRILAR
$\alpha 2\beta 1$	CO; LN; MMP1	
$\alpha 10\beta 1$	CO	
$\alpha 11\beta 1$	CO	
$\alpha 5\beta 1$ $\alpha 8\beta 1$ $\alpha v\beta 1$	FN; <i>ADAMs</i> FN; NN; TN; LAP FN; VN; LAP	RECEPTORES RGD
$\alpha v\beta 3$	FN; VN; VWF; OP; TN; BSP; TSP; <i>CD31</i> ; <i>ADAMs</i> ; 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> ; <i>ADAMs</i>	
$\alpha 4\beta 7$	FN; <i>VCAM</i> ; <i>MadCAM</i>	INTEGRINAS LEUCOCITOS-ESPECÍFICOS
$\alpha E\beta 7$	<i>E-cadherin</i>	
$\alpha D\beta 2$	<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 metalopeptidase e similar a desintegrina; BSP: siálicos proteína óssa; CO: colágeno(s); FG: fibrinogênio; FN: fibronectina; iC3b: componente complementar Inativados 3b; ICAM: molécula de adesão intercelular; LAP: TGFb (fator de transformação fibroblastos) latente associado proteína; LN: laminina(s); MadCAM: molécula de adesão de célula mucosa; MMP: metalopeptidase 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).

Como os outros receptores, as integrinas transmitem sinais tanto para o interior da célula (chamada sinalização “de fora para dentro”, *outside in*), como para o exterior (*inside out*), por meio dos domínios citoplasmáticos. Os domínios da subunidade β conectam-se a filamentos de actina do citoesqueleto por meio de proteínas intracelulares como talina, vinculina e α -actinina (ROMANOV et al, 1997).

Nesse processo, regulam a organização do citoesqueleto, ativam cascatas de quinases sinalizadoras e modulam o ciclo celular. Algumas integrinas são expressas constitutivamente, ou seja, são produzidas normalmente pelo organismo em condições fisiológicas. Outras, entretanto, possuem regulação diferenciada e respondem a estados de ativação das células, por exemplo, por citocinas angiogênicas [VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular), bFGF (Fator de Crescimento Básico de Fibroblastos)] (Xiong et al., 2001; Brooks, 1996).

Esta regulação da atividade “de dentro para fora” protege o hospedeiro da adesão patológica mediada pela integrina. Tanto a sinalização “de fora para dentro” quanto à “de dentro para fora” estão associadas a alterações conformacionais distintas no segmento extracelular das integrinas. Estas mudanças variam com o tipo e natureza do ligante e são moduladas por cátions divalentes (Xiong et al., 2001).

As proteínas adesivas, embora estruturalmente diferentes, requerem seqüências de reconhecimento aproximadamente semelhantes para se ligarem às integrinas. Essas proteínas possuem em comum um resíduo de ácido aspártico ou de ácido glutâmico exposto, geralmente, em dobras estendidas e flexíveis. Das seqüências de aminoácidos que contêm ácido aspártico capazes de se ligarem às integrinas, a mais freqüente e mais estudada delas é a seqüência arginina-glicina-

ácido aspártico (Arg-Gly-Asp ou RGD) (Figura 3), também conhecida como “sítio universal de reconhecimento celular” (ROMANOV et al, 1997; Xiong et al., 2002).

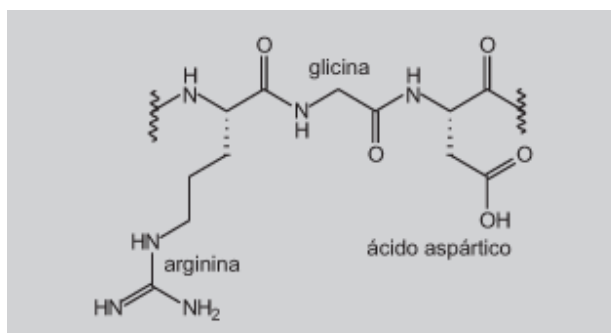


Figura 3: Seqüência tripeptídica RGD.

Várias proteínas adesivas, como laminina, fibronectina, vitronectina, fibrinogênio e colágeno, contêm a seqüência RGD e podem ter sua interação com as integrinas inibida por antagonistas desses ligantes (ROMANOV et al, 1997; Ruoslahti, Pierschbacher, 1987), denominados genericamente antagonistas da seqüência RGD ou, também, antagonistas de integrinas. A seletividade destas proteínas adesivas às várias integrinas é bastante diversa.

Este fato pode ser explicado pela existência de sítios de ligação adicionais e pelas diferentes conformações que a seqüência RGD pode apresentar nas diferentes estruturas protéicas (ROMANOV et al, 1997; Brooks, 1996).

A seqüência RGD é a base para o desenvolvimento de antagonistas de integrinas. Até meados da década de 1990, as buscas por análogos da seqüência RGD foram direcionadas para antagonistas da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ potentes, seletivos e com elevada biodisponibilidade oral. Foram obtidos antagonistas não-peptídicos valiosos, contribuindo para o tratamento de doenças tromboembólicas, uma vez que

a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ é o receptor de fibrinogênio em plaquetas e seu bloqueio impede a ativação plaquetária.

Com o progresso dessas pesquisas e as descobertas sobre a importância da angiogênese para o crescimento e a metástase tumoral, grandes esforços passaram a ser feitos também na obtenção de antagonistas seletivos da integrina $\alpha_v\beta_3$, o principal receptor de vitronectina (Gladson, 1996). Já foram descritos vários inibidores desta integrina com efeitos diretos na prevenção da metástase, crescimento e angiogênese tumoral. Dois se encontram em triagem clínica para o câncer, o anticorpo monoclonal humanizado para $\alpha_v\beta_3$ (VitaxinTM, desenvolvido pelo Scripps Research Institute) (Eskens et al., 2003; Raguse et al., 2003) e o peptideomimético da seqüência RGD sintético, cíclico (L-arginil-glicil-L-aspartil-Dfenilalanil-N-metil-L-valil), (cilengitida, 8, desenvolvido pela Merck KGaA). (Tucker, 2002; Liekens, De Clercq, Neyts, 2001; Burke, Denardo, 2001)

Diversos ciclopeptídeos baseados na seqüência RGD foram sintetizados e suas atividades *in vitro* frente às integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$ foram avaliadas: 1 (Aumailley et al., 1991; Dechansreiter et al., 1999), 2 e 3 (Peishoff et al., 1992), 4 (Pfaff et al., 1994), 5, 6, e 7 (Burgess, Lim, Mousa, 1996), 8 (Dechansreiter et al., 1999), 9 (Casiraghi et al., 2005) e 10 (Belvesi et al., 2006).

A obtenção destes peptídeos cíclicos forneceu grandes contribuições para a investigação da seletividade dos antagonistas de integrinas e têm sido desenvolvidos com a finalidade de promover recursos terapêuticos direcionados para o tratamento do câncer, semelhantes aos anticorpos para a integrina α_v , a qual é expressa durante a angiogênese pelas células endoteliais (Mitjans et al., 1995).

Resultados experimentais utilizando integrinas indicam que doenças como neoplasias, doenças cardiovasculares, doença arterial periférica, osteoporose, doenças inflamatórias, são potencialmente tratáveis pela inibição de integrinas (Marcinkiewicz et al., 1997; Chiang, Swain E Huang, 1994; Beviglia, Stewart e Niewiarowski, 1995; Yeh, Peng e Huang, 1998; Fisher et al., 1993).

Resultados contrastantes foram encontrados sobre o papel da integrina $\alpha_v\beta_3$ no processo de reparo tecidual. A expressão desta integrina está aumentada em células envolvidas em processos de reparo tais como plaquetas, macrófagos, células endoteliais ativadas e fibroblastos. Inibidores da integrina $\alpha_v\beta_3$ diminuem o tecido de granulação e a angiogênese, sugerindo que esta integrina seja importante para o reparo tecidual (Reynolds et al., 2005). No entanto, estes mesmos autores relatam que camundongos nocauteados para a integrina β_3 apresentam re-epitelização acelerada, com aumento da sinalização mediada por TGF- β_1 (Reynolds et al., 2005).

1.4) DESINTEGRINAS

As desintegrinas são proteínas, que foram descritas pela primeira vez em 1990 (GOULD et al., 1990), como um grupo de polipeptídios (49-84aa), não enzimáticos, com alto conteúdo de resíduos de cisteínas (GOULD et al., 1990; MCLANE et al., 2004) e que possuem um padrão de pontes dissulfeto muito conservado. Estas proteínas são derivadas de venenos de serpente, e suas formas livres seriam liberadas de precursores maiores que contem um domínio com atividade metalopeptidase, conhecidos como metalopeptidases de veneno de serpente (SVMPs, Snake Venom Metalloproteases). As desintegrinas possuem uma estrutura de importância fundamental que é uma volta saliente (*loop*) situada entre 2

fitas β , mantida por pontes de dissulfeto e quando se rompem, abolem a ligação à integrinas (MCLANE et al., 1998).

De acordo com o tamanho da cadeia polipeptídica e o número de pontes dissulfeto, as desintegrinas podem ser agrupadas em cinco classes:

(1) as desintegrinas pequenas formadas por 49-51 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto. Exemplos destas desintegrinas são a echistatina, eristocophina, eristostatina e ocellatusina (Calvete *et al.*, 1992; Bauer *et al.*, 1993).

(2) As desintegrinas de tamanho médio, compostas de aproximadamente 70 resíduos de aminoácidos e seis pontes dissulfeto. A grande maioria das desintegrinas pertence a esta classe e seus membros possuem a seqüência adesiva RGD (desintegrinas RGD). Exemplos de desintegrinas desta classe incluem a trigramina, kistrina, flavoridina, albolabrina, entre outras (Adler *et al.*, 1991; Calvete *et al.*, 1992; Bauer *et al.*, 1993).

(3) As desintegrinas maiores são compostas de cerca de 84 resíduos de aminoácidos e sete pontes dissulfeto como a bitistatina (Calvete *et al.*, 1997) e a salmosina (Park *et al.*, 1998).

(4) As desintegrinas-like, formadas por aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos e com 16 resíduos de cisteína envolvidos na formação de oito pontes dissulfeto (Jia *et al.*, 1996; McLane *et al.*, 1998; Calvete *et al.*, 2000). Estas desintegrinas não possuem a seqüência RGD em sua estrutura, sendo chamadas de desintegrinas-like.

(5) As desintegrinas diméricas formadas por homo ou heterodímeros, tais como a contortostatina (Tripathi *et al.*, 1994), EC3 (Marcinkiewicz *et al.*, 1999a), EMF10 (Marcinkiewicz *et al.*, 1999b), entre outras.

Estudos indicam que as interações com as integrinas estariam diretamente relacionadas com o motivo R/K-G-D (Arg/Lys-Gly-Asp) comumente encontrado no ápice da volta e a região C-terminal dessas toxinas (desintegrinas) (MARCINKIEWICZ et al., 1997). Porém, existem desintegrinas ainda com outros motivos adesivos tais como KTS, MLD-, MGD-, MVD-, VGD ou WGD (Juárez, et al, 2008).

Já a classe das desintegrinas-*like* não apresenta a seqüência RGD, KGD ou MGD, possuem um padrão diferente de pontes dissulfeto, e um domínio C-terminal adicional rico em cisteínas. A seqüência D/ECD parece estar envolvida no processo adesivo, interage com a integrina $\alpha_2\beta_1$, que é um dos principais receptores de colágeno tipo I, importante receptor de adesão celular (Paine et al., 1992).

1.4.1) Desintegrina de *Bothrops alternatus* (DisBa-01)

Da glândula venenífera de um espécime de *Bothrops alternatus*, foram extraídos ácidos ribonucléicos mensageiros (mRNAs) e utilizando a tecnologia do DNA recombinante foi obtida a desintegrina recombinante DisBa-01, com massa molecular de 12 kDa e 6 pontes dissulfeto, produzida de forma heteróloga em bactérias e facilmente purificada. Sendo uma desintegrina RGD dependente, atua sobre as integrinas $\alpha_V\beta_3$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$, inibindo a proliferação de células endoteliais de capilares de derme, inibe a adesão a vitronectina e, reduz significativamente a implantação de metástases pulmonares de melanoma B16F10 (Ramos et al., 2008). A DisBa-01 além de inibir também a agregação plaquetária induzida por ADP, trombina e fibrinogênio *in vitro*, diminuiu o tempo de oclusão trombótica e prolongou o sangramento *in vivo*.

Os resultados obtidos com este estudo (Ramos et al, 2008) sugerem uma relação desta desintegrina com integrinas como a $\alpha_{11b}\beta_3$ 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. 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

Avaliar os efeitos da *DisBa-01* sobre a musculatura da parede abdominal após indução de hérnia incisional em ratos, na proliferação vascular, celular, na colagenização e no remodelamento da MEC.

Verificar se o bloqueio da integrina $\alpha v\beta 3$ por esta desintegrina afetaria o processo de reparo tecidual após indução da HI.

Verificar o bloqueio da subunidade α_2 sobre a cicatrização da hérnia incisional, em relação ao *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, 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 n° 001/2008, protocolo n° 001/2008.

Os animais foram alojados no Laboratório de Neuroendocrinologia no Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar e acondicionados em gaiolas de polipropileno, com capacidade para quatro animais cada uma, sendo divididos em dois grupos: G1 – controle e G2 – DisBa.

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 2 grupos descritos a seguir: G1 – grupo controle (n = 10); G2 – grupo DisBa-01 (n = 10)

A DisBa-01 recombinante foi produzida a partir de uma fração do mRNA purificada da glândula de *Bothrops alternatus* espécime como descrita recentemente (Ramos et al, 2008). A região codificada corresponde a uma desintegrina média (78 resíduos de aminoácidos), com um motivo RGD adesivo.

A proteína fusão His-Tag produzida em *E. coli* é uma proteína 12 kDa, como estimado por espectrometria de massa e SDS-PAGE e mostrou seqüência similar a uma variedade de membros da família das desintegrinas.

Posteriormente, foram realizados mais dois grupos experimentais denominados de G3 (anti- $\alpha_V\beta_3$) e G4 (anti- α_2). Os anticorpos bloqueadores de integrinas utilizados foram: anti- $\alpha_V\beta_3$ (MAB1976), da Chemicon (E.U.A.) e anti-subunidade α_2 (MAB1233), da B & D (E.U.A.).

3.2) Procedimentos Experimentais

3.2.1) Indução da Hérnia Incisional

Os animais de ambos G1 e G2 foram sedados com éter etílico colocados em decúbito dorsal horizontal, e imobilizados sobre suporte para cirurgia experimental. No abdome foram realizadas a tricotomia manual e descontaminação com álcool a 70%.

Com a finalidade de induzir a HI mediana, todos os animais foram submetidos a uma incisão no abdome, transversa, suprapúbica, com bisturi n° 3 e lâmina n° 15, de aproximadamente 15 mm de comprimento, interessando a pele e a tela subcutânea, através da quais estas foram separadas do plano muscular por dissecação roma, 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.

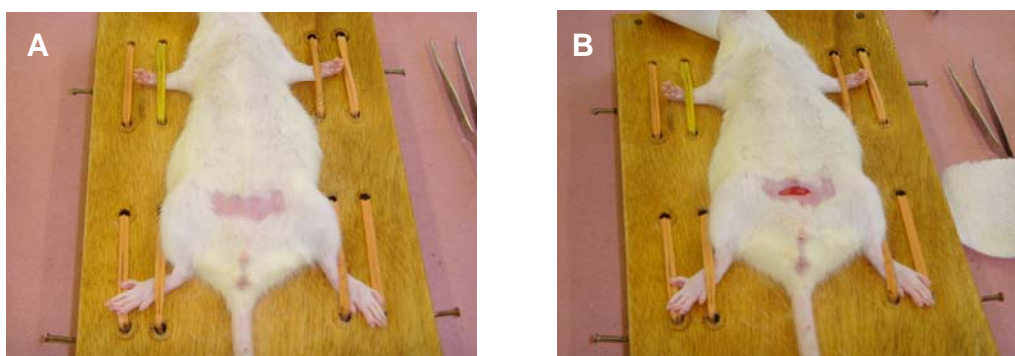


Figura 4: A, animal sobre suporte cirúrgico, após tricotomia abdominal e em B após incisão transversa em região abdominal para dissicção do plano muscular e indução da hérnia incisional de 30mm de comprimento em todos os animais.

O G1 recebeu 1 ml PBS por aplicação tópica por pipeta automática nas bordas da musculatura da parede abdominal e o G2 recebeu aplicação tópica por pipeta automática de 1ml de solução a 0,5mg/Kg, nas bordas da musculatura da parede abdominal, sendo aproximadamente 0,11mg/animal de DisBa-01. O G3 recebeu aplicação tópica por pipeta automática de 0,5ml de anti- $\alpha_v\beta_3$ (7 μ g/ml) nas bordas da musculatura da parede abdominal e o G4 recebeu aplicação tópica por pipeta automática de 0,5ml de anti-subunidade α_2 (10 μ g/ml) nas bordas da musculatura da parede abdominal.

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

3.2.2) Controle pós-operatório

No pós-operatório, os animais de cada grupo foram examinados, diariamente, para inspeção da ferida cirúrgica e constatação da HI, colocando-se o animal na posição vertical e verificando o abaulamento característico na região abdominal presente até o final do período de observação que foi de 14 dias. Aqueles que morrerem ou apresentaram complicações do sítio operado, que não a HI, foram excluídos do experimento, conforme ilustrado na figura 5.

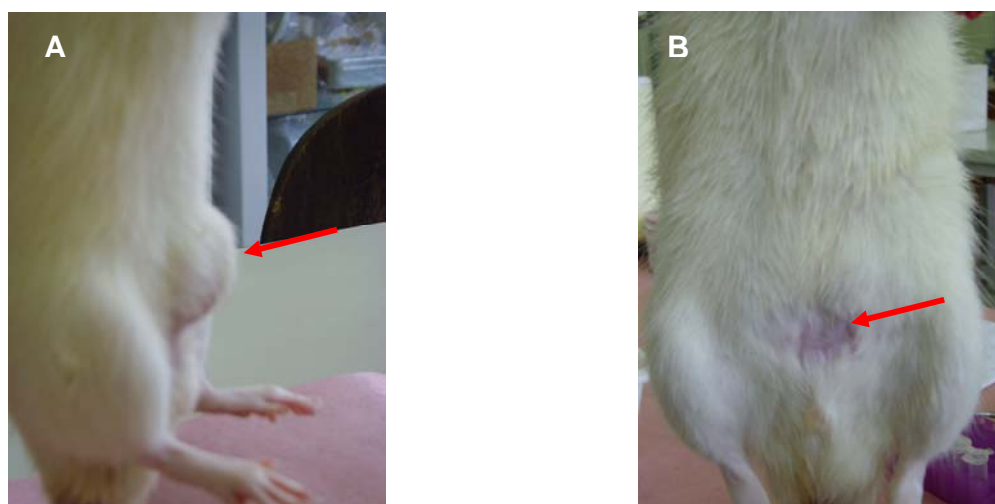


Figura 5: **A:** hérnia incisional persistente em todos os animais do grupo controle após 14 dias da indução cirúrgica; **B:** ausência de hérnia incisional em todos os animais tratados com a DisBa-01, após 14 dias da indução cirúrgica.

3.2.3) Sacrifício dos animais e obtenção dos extratos de tecidos

Após 14 dias da indução da HI, 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 ou a hérnia incisional.

Foram seccionados fragmentos englobando o anel herniário do G2 (DisBa-01) 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°C até a sua análise.

Após, o restante dos fragmentos obtidos da parede abdominal foram fixados em Formol tamponado a 10% (água destilada 900,0 ml, Formol 100,0 ml, monobásico sódio fosfato 4,0 g, 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 microorganismos, 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 Extração e análise de proteínas

Amostras de tecido coletadas dos animais foram imediatamente depositadas em nitrogênio líquido e em seguida congeladas a -80°C . No dia do experimento, para cada mg de tecido foram adicionados 25 μL 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 μL de extrato foi adicionado 100 μL de tampão acetato 1M, pH 7,4 contendo 1.350 μL de etanol absoluto (volume final = 1,5mL).

Em seguida as soluções foram misturadas e a amostra foi mantida *overnight* 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.

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 β -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).

Após corrida em SDS-PAGE (7,5%), as amostras foram transferidas para uma membrana de PVDF (difluoreto de polivinilideno). As bandas mais expressivas foram cortadas da membrana e enviadas para sequenciamento em um seqüenciador automático de proteínas PPSQ 23A (Shimadzu).

3.3) 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 abaixo discriminados.

CUBAS	REAGENTES	TEMPO DE IMERSÃO
Copo becker 1	Álcool 95% (formol)	1:00 hora;
Copo becker 2	Álcool 95%	1:00 hora;
Copo becker 3	Álcool 95%	1:00 hora;
Copo becker 4	Álcool absoluto	1:00 hora;
Copo becker 5	Álcool absoluto	1:00 hora;
Copo becker 6	Xilol	1:00 hora;
Copo becker 7	Xilol	1:00 hora;
Copo becker 8	Xilol	1:00 hora;
Estufa 1	Parafina	1:30 horas;
Estufa 2	Parafina	1:30 horas;

Após o processamento descrito acima foi realizada a inclusão do material em parafina, utilizando o equipamento para Banho Histológico Modelo BH05. O material nos blocos de parafina foi cortado em 5 µm de espessura e colocado em lâminas histológicas para posterior processo de coloração. Inicialmente foi realizada a coloração pela técnica de hematoxilina e eosina, conforme descrito abaixo:

01-	Xilol	5 minutos
02-	Xilol	5 minutos
03-	Álcool absoluto	2 minutos
04-	Álcool 95%	2 minutos
05-	Álcool 80%	2 minutos
06-	Álcool 70%	1 minuto
07-	Água corrente	Lavar
08-	Hematoxilina	20-40 segundos
09-	Água corrente	lavar
10-	Água de amônia	imersão até azular
11-	Água corrente	lavar
12-	Eosina	1-2 minutos
13-	Álcool 70%	rapidamente
14-	Álcool 80%	rapidamente
15-	Álcool 90%	rapidamente
16-	Álcool absoluto	5 minutos
17-	Álcool absoluto	5 minutos
18-	Xilol	5 minutos
19-	Xilol	5 minutos

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:

- coloração para fibras elásticas e musculares pelo Tricrômio de Masson (TM) com azul de anilina através da utilização do Histokit Erviegas®;
- coloração para fibras reticulares pela Reticulina através da utilização do Histokit Erviegas®.

A intensidade dos achados de HE e TM foi analisada segundo os seguintes critérios:

3.3.1) Análise Qualitativa

3.3.1.1) Proliferação Vascular – foi considerada ausente (0), quando não se evidenciavam vasos no corte histológico; discreta (I), quando foram visualizados poucos vasos esparsamente situados, de forma isolada no contexto; moderada (II), quando aparecerem com maior freqüência e dispersos no campo óptico; e acentuada (III), quando evidenciados com grande freqüência, dispostos em todo o contexto.

3.3.1.2) Células mononucleares – foram classificadas em ausente (0), quando estas células não foram visualizadas no campo óptico; discreta (I), quando foram evidenciadas de forma isolada, possibilitando distinguir áreas livres de infiltrado; moderada (II), quando apareceram com maior freqüência, constituindo agregados densos, mas possibilitando visualizar áreas livres de infiltrado; e acentuada (III), quando as células foram evidenciadas com grande freqüência, constituindo agregados densos e justapostas, sem áreas livres de infiltrados.

3.3.1.3) Proliferação fibroblástica – foi classificada em ausente (0), quando não foi evidenciada a proliferação de fibroblastos; discreta (I), quando houve esparsos fibroblastos proliferados em meio a tecido conjuntivo frouxo; moderada, (II) quando houve moderada quantidade de fibroblastos proliferados, constituindo pequenos feixes celulares multi-direcionalmente; e intensa (III), quando houve grande quantidade de fibroblastos proliferados constituindo agregados compactos de células arrançadas multi-direcionalmente.

3.3.1.4) Colagenização – classificada como ausente (0), quando não houve fibras colágenas depositadas; discreta (I), quando a deposição de fibras colágenas formou pequena quantidade, caracterizada por fibras depositadas em meio aos fibroblastos proliferados; moderada (II) quando a deposição de colágeno formou feixes de fibras eosinofílicas, espessas, intercalados com áreas de tecido conjuntivo frouxo e fibroblastos proliferados; e intensa (III), quando houve grande deposição de fibras colágenas, constituindo feixes de fibras eosinofílicas espessas, compactamente arranjadas em meio a fibroblastos proliferados e sem áreas de tecido conjuntivo frouxo.

3.3.2) Análise Quantitativa do Colágeno

A quantificação do colágeno foi determinada pela densidade das estruturas citadas, nas amostras do saco herniário por meio de morfometria de contagem de pontos. Utilizou-se um microscópio óptico (Olympus CBA), acoplado a uma câmera de vídeo (SV MicroSound Vision) e um retículo sobreposto à imagem do campo microscópico, projetada em monitor de 15 polegadas. Analisaram-se 15 campos aleatórios, para cada subgrupo, obtendo-se o valor médio dessas medidas. A área-teste do retículo foi de $0,0625\text{mm}^2$, para a quantificação das fibras colágenas, com objetiva 40x a 50%.

3.4) Determinação da atividade de MMPs 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 2 ml tampão de extração [10 mM de ácido cacodílico (pH 5,0), 0,15 M NaNO_3 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 e DisBa-01 foram concentradas de maneira que cada poço do gel de zimografia continha 10 μg de proteína, enquanto que, as amostras dos grupos anti- $\alpha\text{V}\beta 3$ e anti- $\alpha 2$ foram concentradas em 2 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_2 mM e NaN_3 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.

3.5) 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*TM (SPSS – IBM, version 10.0.1, 1999).

4) RESULTADOS

O peso do G1 (Controle) foi de 269 ± 38 g e do G2 (DisBa-01) foi de 254 ± 24 g, quatro animais do grupo controle morreram no pós-operatório após indução da hérnia incisional e 1 do grupo DisBa-01.

Após a indução cirúrgica todos os animais formaram hérnia incisional. A progressão da HI foi acompanhada de avaliação periódica do animal, conforme mostrado na Figura 6A. No 14º dia, após o sacrifício dos mesmos para a retirada de fragmento do músculo da parede abdominal, foi possível observar em todos os animais do grupo controle (6/10) a persistência do anel herniário aberto (figura 6 B) por onde ocorre a herniação das vísceras abdominais, traduzida pelo abaulamento característico do abdome (Fig. 6A).

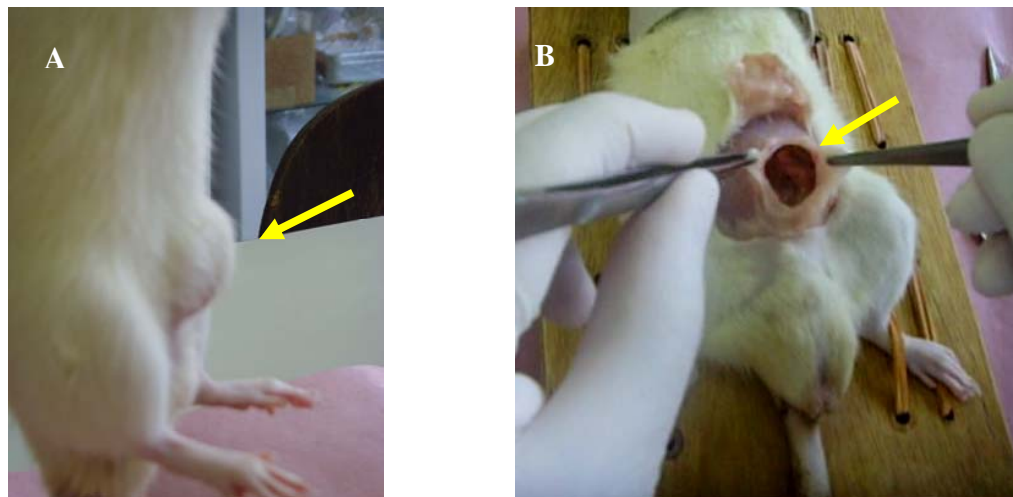


Figura 6: **A:** persistência de hérnia incisional em todos os animais do grupo controle após 14 dias da indução cirúrgica; **B:** persistência do anel herniário aberto no grupo controle todas as características da hérnia incisional presentes, confirmando os limites biológicos da laparotomia após 14 dias da indução da hérnia incisional.

No grupo DisBa-01 (9/10), após o sacrifício dos animais no 14º dia, para a retirada de fragmento do músculo da parede abdominal, foi observada a presença de uma membrana que ocluía todo o anel herniário e que não permitia a herniação do conteúdo abdominal, além da presença de aderências intra-abdominais que não ocorreram no grupo controle conforme ilustrado na figura 7.

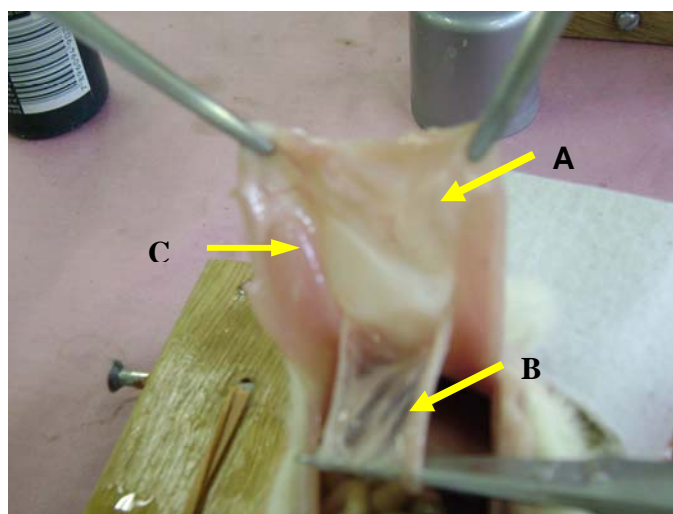


Figura 7: A: Membrana presente em todos os animais do grupo DisBa-01 ocluindo o anel herniário; B: aderências peritoniais; C: limites do anel herniário ocluído pela membrana.

No grupo G3 (anti- $\alpha_v\beta_3$), após o sacrifício dos animais no 14º dia, para a retirada de fragmento do músculo da parede abdominal, foi observada a presença de aderências firmes entre o tecido subcutâneo e a musculatura, assim como o fechamento parcial do anel herniário por tecido de aspecto fibrotico (retração da musculatura) e presença de pequena área membranosa conforme ilustrado na figura 8. Não houve a formação de uma membrana como observado nos animais do G2.

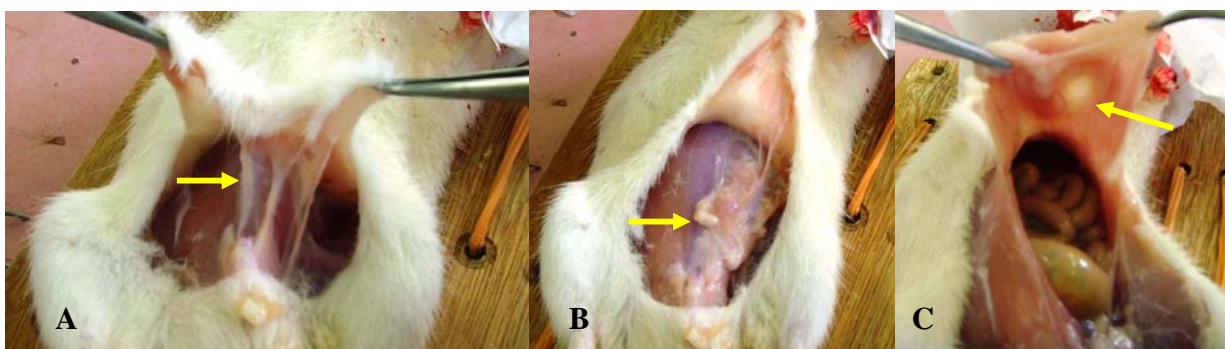


Figura 8: animais tratados com anticorpo anti- $\alpha_v\beta_3$. **A:** aderências firmes entre o tecido subcutâneo e a musculatura da parede abdominal; **B:** fechamento parcial do anel herniário por tecido de aspecto fibrótico; **C:** presença de pequena área membranosa.

No grupo G4 (anti-subunidade α_2), após o sacrifício dos animais no 14º dia, para a retirada de fragmento do músculo da parede abdominal, foi observada a persistência da hérnia incisional, de aderências firmes entre o tecido subcutâneo e a musculatura, e persistência do anel herniário, conforme ilustrado na figura 9.

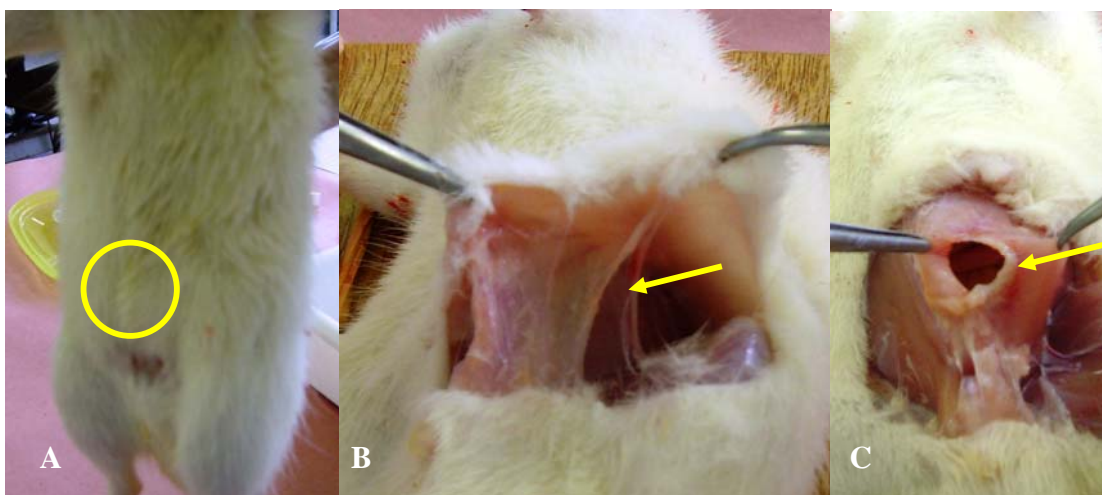


Figura 9: animais tratados com anticorpo anti-subunidade α_2 . **A:** persistência da hérnia incisional após 14 dias; **B:** aderências firmes entre o tecido subcutâneo e a musculatura da parede abdominal; **C:** presença do anel herniário após 14 dias da indução cirúrgica.

4.1) Análise Histológica

Na tabela 3 estão apresentados os resultados da análise qualitativa da proliferação vascular, mononucleares, fibroblastos e colágeno nos grupos estudados.

Tabela 4. Análise qualitativa da proliferação vascular, mononucleares, fibroblastos e colágeno nos grupos estudados.

	Controle (n=6)		Disba- 01 (n=9)	
	Classe 0/II/III	Classe Predominante %	Classe 0/II/III	Classe Predominante %
Vascular	5I / 1II	I (83,3)	9II	II (100)
Mononucleares	5I / 1II	I (83,3)	3I / 6II	II (66,6)
Fibroblastos	6I	I (100)	2II / 7III	III (87,8)
Colágeno	3I / 3II	II (50)	1II / 8III	III (89,9)

Como pode ser observado na tabela 3, o grupo DisBa-01 foi caracterizado por apresentar predomínio de maior numero de vasos (100% com classe II), maior predomínio de células mononucleares (66,6% com classe II) e maior numero de fibroblastos (87,8% com classe III) em comparação ao controle. Além disso, a colagenização foi mais homogênea para este grupo (89,9% com classe II) em comparação a 50% do grupo controle com classe II).

A seguir, na figura 10, serão apresentadas imagens histológicas representativas dos grupos Controle e DisBa-01.

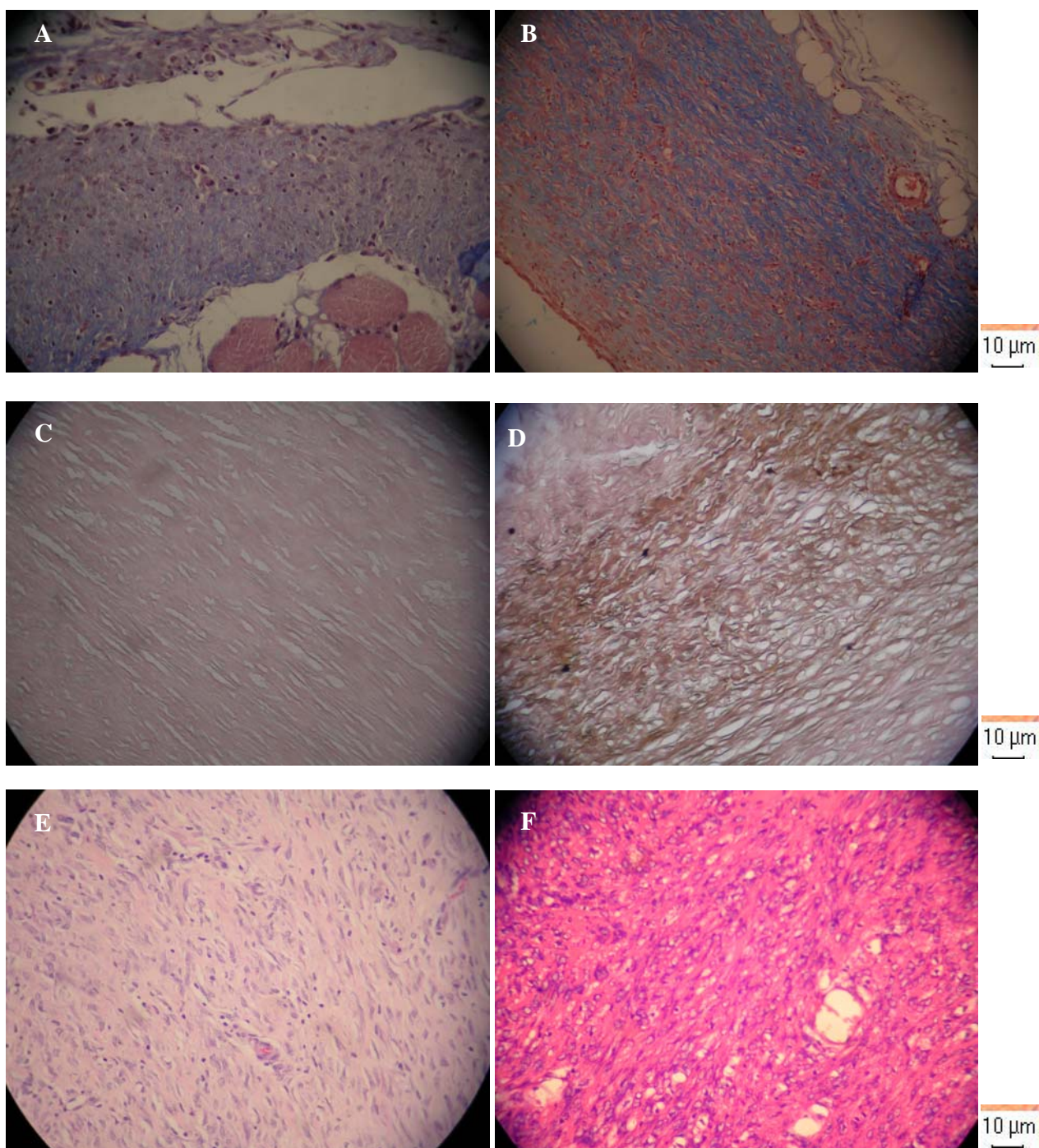


Figura 10: Grupo Controle: A, C, E, G e I.; Grupo DisBa-01: B, D, F, H e J. Em B aumento das fibras colágenas no grupo DisBa-01 em relação ao grupo controle A (corante Tricrômio de Masson 200x); em D aumento das fibras reticulares (colágeno) no grupo DisBa-01 em relação ao grupo controle C (corante Reticulina 400x), em F proliferação de fibroblastos no grupo DisBa-01 em relação ao grupo controle E (corante HE 200X),

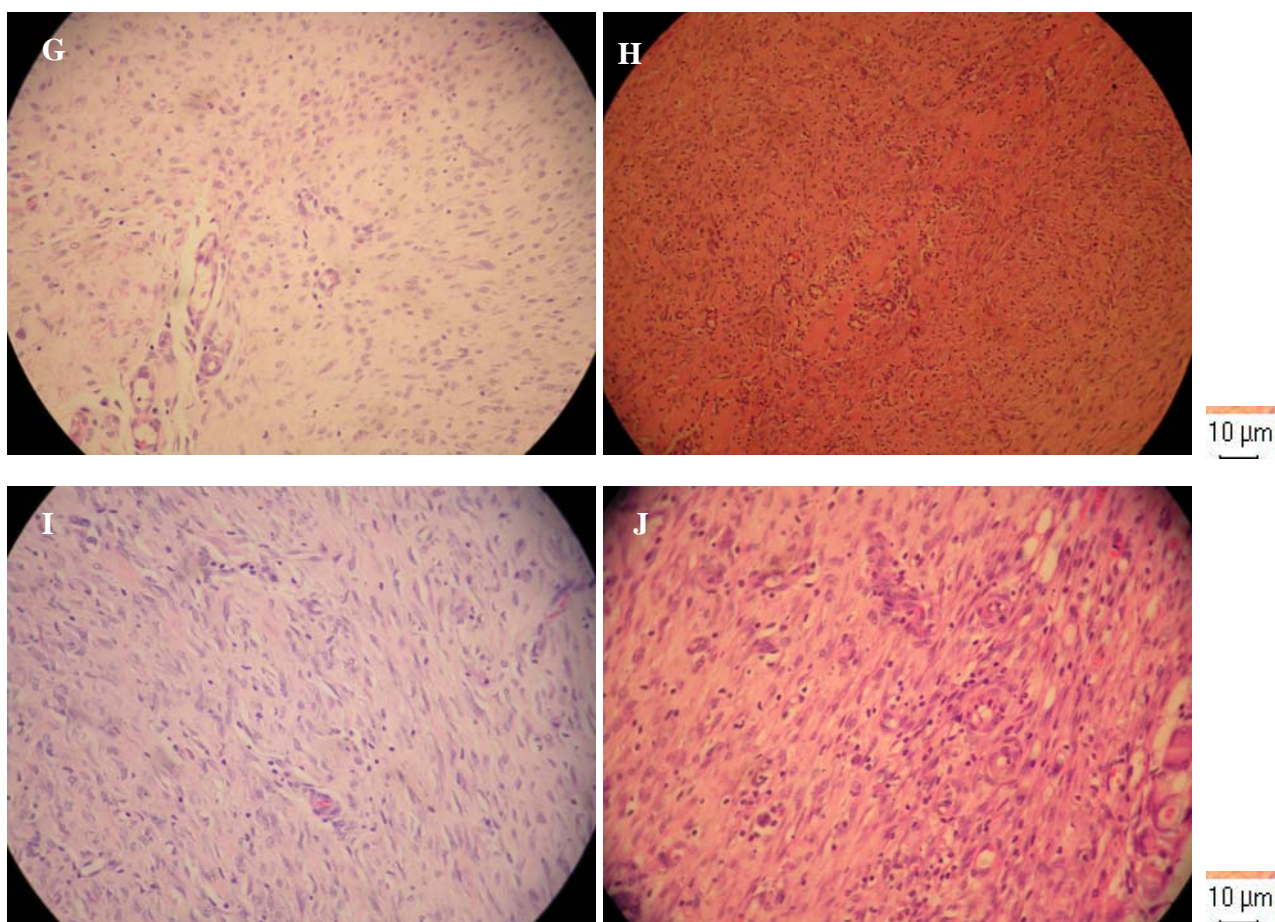


Figura 10: Em H proliferação vascular no grupo DisBa-01 em relação ao grupo controle G (corante HE 400X), J aumento do infiltrado mononuclear n grupo DisBa-01 em relação ao cgrupo controle I (corante HE 400x). Note que no grupo DisBa-01 houve aumento de fibras colágenas, reticulares, proliferação vascular, de células mononucleares e de fibroblastos em relação ao grupo controle.

Ainda, na análise quantitativa, foram estatisticamente expressos os valores de 0-3 como dados absolutos, representados a seguir, nas figuras 11 a 14.

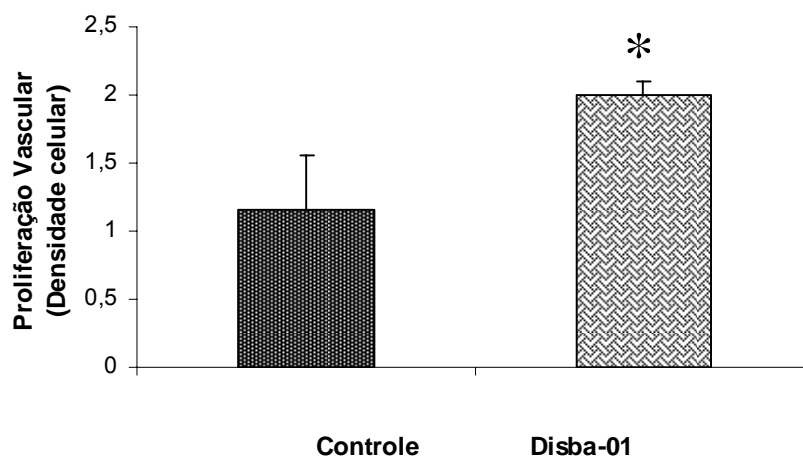


Figura 11: Aumento da proliferação vascular induzida pela DisBa-01. Análise estatística da proliferação vascular entre o grupo controle e o grupo DisBa-01 (* $p=0,0005$).

Como pode ser observada na figura 11, a DisBa-01 produziu aumento significativo da proliferação vascular, quando comparado ao grupo controle.

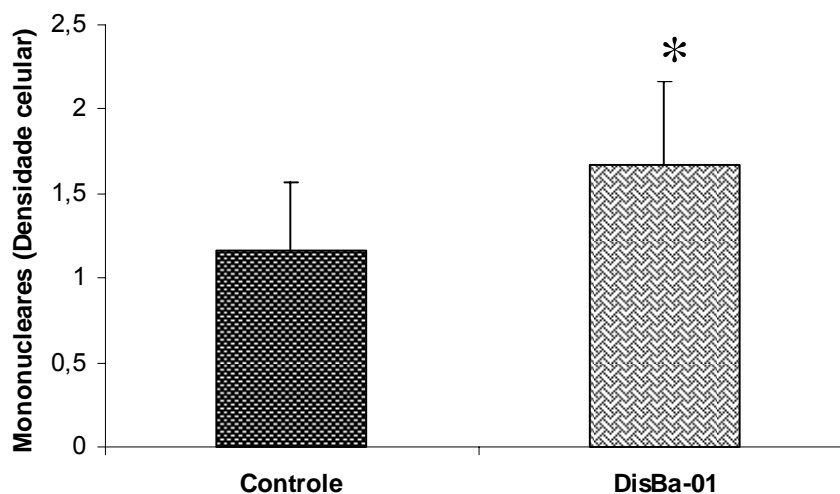


Figura 12: Aumento do número de células mononucleares, induzido pelo tratamento com DisBa-01. Análise estatística das células mononucleares entre o grupo controle e o grupo DisBa-01 (* $p=0,02$).

Como pode ser observada na figura 12 a *DisBa-01* produziu aumento significativo das células mononucleares quando comparado ao grupo controle.

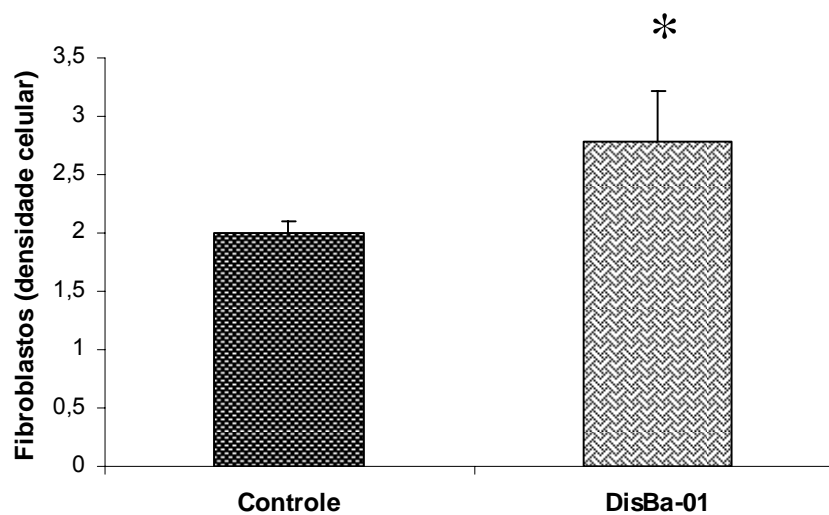


Figura 13: Aumento do número de fibroblastos induzido pela *DisBa-01* (* $p=0,0009$).

Como pode ser observada na figura 13, a *DisBa-01* produziu aumento significativo dos fibroblastos quando comparado ao grupo controle.

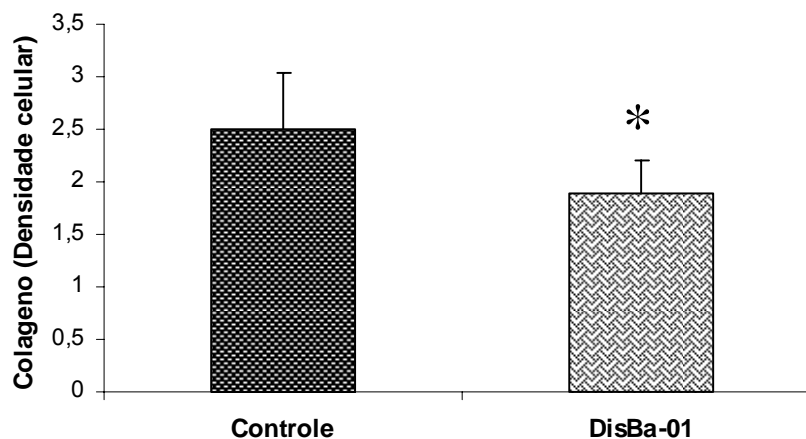


Figura 14: Aumento das fibras colágenas induzido pela DisBa-01 (* $p=0,05$).

Com relação ao colágeno, a DisBa-01 produziu aumento significativo quando comparado ao grupo controle (Figura 14).

4.2) Análise Morfométrica do Colágeno

A seguir, na figura 14, estão apresentados os resultados da análise do colágeno entre os grupos estudados. Como pode ser observado, a DisBa-01 aumentou significativamente a produção do colágeno quando comparado ao grupo controle (Figura 15).

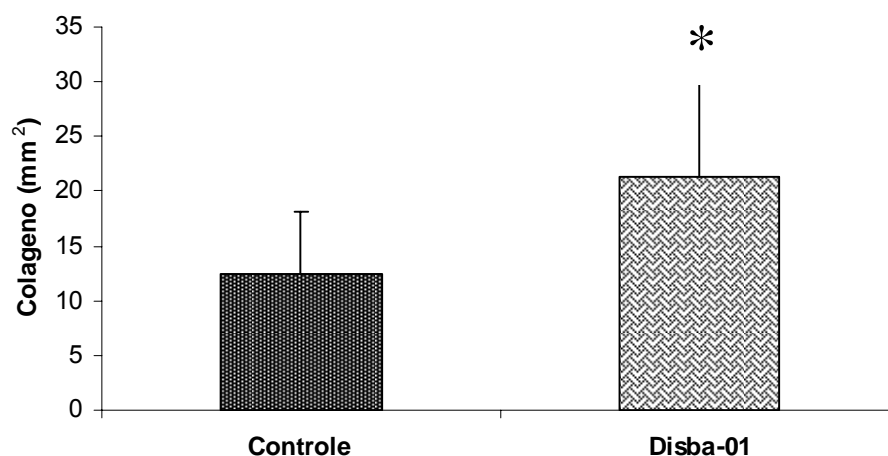


Figura 15: Análise morfométrica do colágeno entre o grupo controle e o grupo DisBa-01 (* $p=0,05$).

4.3) Análise da atividade de Metalopeptidases de matriz (MMPs)

A seguir, na figura 16, estão apresentados os resultados da análise das MMPs entre os grupos estudados. Como pode ser observado a DisBa-01 aumentou significativamente a expressão da MMP-2 quando comparado ao grupo controle.

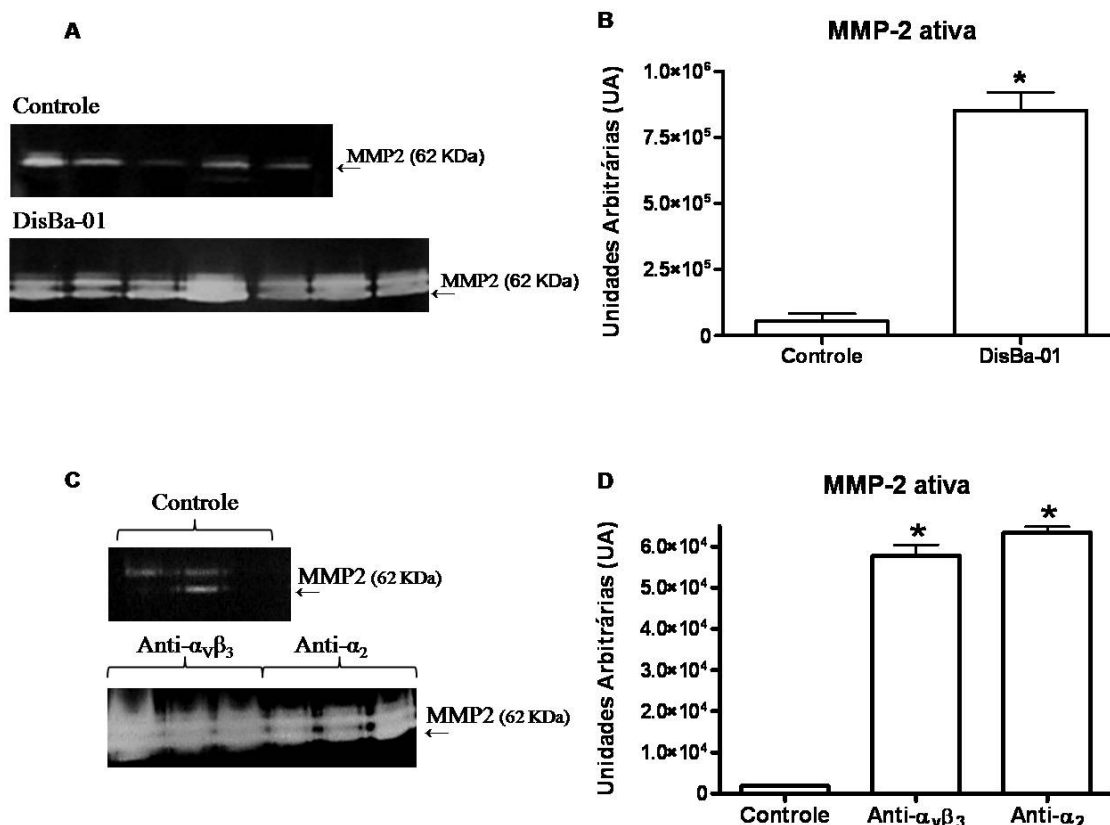


Figura 16: **A:** aumento da expressão da atividade proteolítica da MMP-2 em extrato de músculo abdominal no grupo DisBa-01 em relação ao grupo controle no 14^o dia pós-operatório, por zimografia; **C:** aumento da expressão da atividade proteolítica em extrato de músculo abdominal no grupo anti- $\alpha_v\beta_3$ e anti- α_2 em relação ao grupo controle no 14^o dia pós-operatório por zimografia; **B:** Intensidade da banda ativa da MMP-2 no grupo DisBa-01 em relação ao grupo controle em unidades arbitrárias; **D:** Intensidade da banda ativa da MMP-2 no grupo anti- $\alpha_v\beta_3$ e anti- α_2 em relação ao grupo controle em unidades arbitrárias (* $p < 0.05$).

4.4) Análise dos componentes da membrana de oclusão da HI

Fragmentos da membrana formada nos animais tratados com DisBa-01 foram homogeneizados e analisados por SDS-PAGE (Fig. 18) e sequenciamento N-terminal das bandas após transferência para membrana de PVDF (Fig. 18). Para efeito de comparação, foi incluída uma amostra de tendão de rato, pelo seu alto teor de colágeno tipo I. Pode-se observar, na figura 18A, que as membranas formadas pelo tratamento com a DisBa-01 são ricas em colágeno tipo I, o que foi confirmado

pelo sequenciamento de uma das bandas majoritárias (Fig. 18). A seqüência GEQGPAGS foi comparada a um banco de dados genômicos (www.ncbi.nlm.nih.gov) obtendo-se o seguinte resultado:

>gi|109156932|pdb|1YGV|A Chain A, The Structure Of Collagen Type I.

No entanto, diversos outros componentes protéicos de menor massa molecular estão presentes na membrana, porém sua identidade permanece a ser identificada.

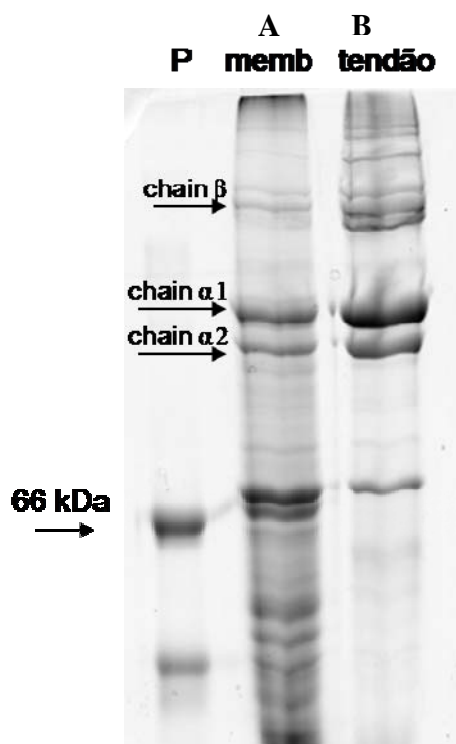


Figura 17: A) Análise em SDS-PAGE mostrando as cadeias de colágeno no extrato da membrana formada pela DisBa-01. B) tecido de referência com predominância de colágeno tipo I. (amostra de tendão calcâneo).

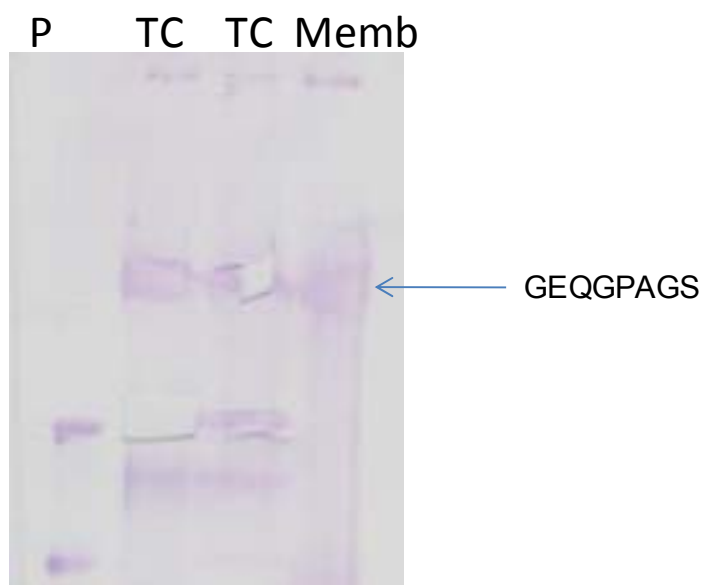


Figura 18: Amostras de extrato tecidual transferidas para membrana de PVDF e submetidas à sequenciamento amino-terminal. P: padrão; TC: tendão calcâneo; Memb: membrana abdominal.

5) DISCUSSÃO

O conhecimento dos mecanismos de formação da hérnia primária é importante para o aprimoramento do diagnóstico, determinar o prognóstico e prevenir os riscos de formação da hérnia. Sendo assim, é provável que as desordens da matriz tecidual que induzem a formação da hérnia, também dificultariam o processo cicatricial da ferida operatória predispondo a hérnia incisional (Franz et al, 2008).

As fases do processo de cicatrização da ferida operatória podem ser descritas como: inflamatória, fibro-proliferação (formação da cicatriz) e remodelamento. Qualquer defeito ou atraso na ativação de alguma destas fases do reparo tecidual, poderá conduzir a formação da hérnia incisional. A infecção da ferida operatória, a isquemia e uso de esteróides são considerados fatores prejudiciais ao processo normal da cicatrização tecidual (Robson et al, 2000). Adicionalmente, o mecanismo fundamental da formação das hérnias da parede abdominal está associado com perda da integridade estrutural e funcional músculo aponeurótica.

O modelo experimental de HI utilizado neste trabalho foi de máxima eficiência (100%) uma vez que todos os animais controle desenvolveram herniação 14 dias após o procedimento cirúrgico. Dubay et al., (2004) descreveram uma incidência de 80% de HI fascial após 28 dias, em um modelo muito similar. Talvez a diferença na incidência encontrada por estes autores e no presente trabalho possa ser explicada pela diferença no intervalo de tempo entre a cirurgia e a observação da HI.

A presença de aderências, embora não tenha sido quantificada, foi observada em todos os grupos estudados e aparentemente, nenhum dos tratamentos inibiu a formação de aderências.

Por outro lado, após 14 dias da indução de hérnia incisional nos animais tratados com DisBa-01 observamos a formação de uma membrana que ocluiu todo o anel herniário evitando desta forma a formação da hérnia incisional.

Neste contexto, especula-se com o presente estudo que a DisBa-01 possa ter um papel importante na migração das células mononucleares, favorecendo o processo cicatricial, uma vez que os macrófagos são células inflamatórias requeridas no reparo tecidual (Riches, 1995), uma vez que as células mononucleares (monócitos e macrófagos) tornam-se presentes na ferida operatória após 2 a 3 dias da agressão tecidual e permanecem por até 3 semanas. Além de realizarem também fagocitose, estas células secretam múltiplos fatores de crescimento.

Na fase fibro-proliferativa ocorre intensa proliferação dos fibroblastos, determinada pelos fatores de crescimento, tais como fator de crescimento de fibroblastos (FGF α e β) fator transformador de crescimento (TGF β) e fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), sintetizados pelos macrófagos linfócitos e plaquetas (Brasileiro Filho & Bigliolo, 2004). Nesta fase, verifica-se a importância dos fibroblastos na remodelação da matriz extracelular e no processo de cicatrização tecidual (Morgan et al, 1992) uma vez que são responsáveis pela síntese e degradação do colágeno (Franz 2008).

No presente estudo o grupo tratado com DisBa-01 apresentou um aumento do número de fibroblastos em relação ao grupo controle. Segundo Franz (2008), estas células são responsáveis pela síntese de colágeno, e estão presentes na ferida operatória já no segundo dia após a cirurgia e que esta migração poderia ser influenciada por fatores de crescimento e mediadores inflamatórios.

Estudos demonstraram que o processo de cicatrização normal da ferida operatória, requer uma relação complexa de vários mediadores bioquímicos e celulares, sendo que, dentre os fatores de crescimento, os que parecem ter mais destaque na cicatrização das feridas são os fatores de crescimento de fibroblastos (Medeiros et al, 2003), ressaltando o papel importante dos fibroblastos na remodelação da matriz extracelular durante o processo cicatricial.

Entretanto, não estão bem esclarecidos os defeitos na função dos fibroblastos durante a deiscência da sutura da ferida operatória, bem como na formação da hérnia incisional, segundo Franz (2008), porém, poderiam estar associados à isquemia ou a depleção da sinalização de fatores de crescimento presentes na aponeurose da ferida operatória.

Outro fator a ser observado na fase fibro-proliferativa é a angiogênese, uma vez que a aponeurose abdominal possui uma quantidade muito limitada vasos na intimidade deste tecido, caracterizando nutrição precária desta estrutura anatômica, acarretando um processo cicatricial frágil, e sendo esta submetida habitualmente a grandes esforços e tensões, além de ser frequentemente danificada na laparotomia (Medeiros et al, 1981).

O processo de angiogênese é diretamente influenciado pelo Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que é o fator dominante na angiogênese da ferida operatória, assim como no tecido de granulação e do fator básico de crescimento de fibroblastos, sugerindo que de alguma forma estes fatores possam influenciar o processo de cicatrização (Di Vita et al, 2005). Os fibroblastos, os capilares neoformados, juntamente com as células inflamatórias residuais, passam a constituir o tecido de granulação. Macroscopicamente, o tecido de granulação é mole

e de vermelho intenso, com superfície extremamente irregular, assumindo um aspecto granuloso o que determina o nome desse tecido.

Os capilares do tecido de granulação originam-se a partir do endotélio de capilares da margem da ferida pós-operatória. Adicionalmente ao VEGF, o fator de crescimento de fibroblatos (FGF) e PDGF e a citocina TNF α (fator de necrose tumoral alfa) são responsáveis pela proliferação e formação de brotos de células endoteliais que se organizam em uma estrutura tubular formando uma continuação do capilar original (Brasileiro Filho & Bigliolo, 2004). Esses capilares neoformados possuem grande permeabilidade uma vez que as células endoteliais não desenvolvem junções intercelulares características do tecido epitelial, favorecendo o aspecto edemaciado do tecido de granulação.

Neste contexto, os fibroblastos são células fundamentais no processo de reparo tecidual da ferida pós-operatória. Além dos fibroblastos no presente estudo encontramos aumento do número de células mononucleares e vasos sanguíneos no grupo tratado com DisBa-01, sugerindo que esta desintegrina possa ativar o processo fibro-proliferativo no reparo de ferida pós-operatória, uma vez que os tecidos conjuntivos normalmente que são bem vascularizados parecem ter reparo tecidual mais intenso.

Adicionalmente, estudos também tem demonstrado a relação das MMPs com o processo de angiogênese, uma vez que estas atuam na degradação da membrana basal dos vasos sanguíneos (Smigielski et al, 2009). Esta relação pode ser justificada pelo fato do VEGF ser expresso pelas células do endotélio vascular e células não endoteliais que incluem os macrófagos e monócitos.

Ainda é insipiente na literatura sobre o papel da DisBa-01 em tecidos vivos. No presente estudo, foi evidenciado que esta desintegrina produziu aumento significativo da proliferação vascular, quando comparado ao grupo controle. Em contraste com os nossos resultados, a DisBa-01 inibiu a angiogênese induzida por FGF em modelo de injeção de matrigel em camundongos atímicos (Ramos et al, 2008).

Desta maneira poderíamos especular que “in vivo” a DisBa-01 poderia mediar a proliferação vascular pelo aumento observado nos monócitos e macrófagos, que secretam fatores de crescimento, incluindo o VEGF, uma vez que observamos o aumento das células mononucleares no grupo DisBa-01 em relação ao grupo controle.

Com relação ao colágeno, esta é a proteína estrutural predominante, principalmente na aponeurose da parede abdominal, compreendendo 80% ou mais desta estrutura tecidual (Cleutjens et al, 1995). Os defeitos na cicatrização resultam ou da síntese anormal do colágeno ou aumento da atividade proteolítica sobre a degradação do colágeno. O resultado deste desequilíbrio no reparo da homeostasia do colágeno pode acarretar em alterações dos níveis colágeno, aumentando o risco de deiscência da ferida operatória (Prockop et al, 1979).

O primeiro colágeno depositado após 3 a 5 dias da lesão, possui fibras mais finas e corresponde ao colágeno do tipo III. Progressivamente, o colágeno tipo III é substituído pelo colágeno tipo I, mais resistente. Em duas semanas as fibras colágenas tipo I são predominantes. Simões et al, (1986) afirmam que os fibroblastos atingem seu maior número no 7º dia, ocorrendo um decréscimo a partir deste dia. O aumento da densidade de fibras colágenas e suas retrações, por sinérese, ou seja,

por perda de água, promove a redução do diâmetro de um certo número de capilares. Conseqüentemente, o endotélio desses vasos prolifera para a luz causando sua obstrução (endarterite obliterante). A diminuição do fluxo sanguíneo determina uma redução dos constituintes do tecido de granulação.

Arteriolas e vênulas surgem na área lesada por diferenciação de células mesenquimais em células musculares que envolvem os capilares, passando a constituir a parede desses novos vasos. Estas alterações fazem com que o tecido de granulação mude sua estrutura constituindo um tecido conjuntivo típico. A deposição de colágeno atinge o pico em torno do 80º dia e a resistência ao estiramento continua a crescer após vários meses. Após um ano, somente 70% da resistência original da derme é readquirida (Simões et al, 1986; Franz, 2008).

Neste sentido, no presente estudo, foi observado tanto na análise qualitativa como na quantitativa que a DisBa-01 aumentou significativamente a quantidade de colágeno, podendo assim inferir que esta desintegrina possa ter acelerado o processo de deposição do colágeno nesta fase, uma vez que as demais células que estão relacionadas ao reparo tecidual estavam presentes. Como não foram analisados neste estudo os diversos tipos de colágeno, torna-se difícil saber qual a proporção de fibras colágenas estavam aumentadas na presença da DisBa-01 (tipo I ou tipo III).

Neste contexto, segundo Klinge et al (2001) e Klinge et al (1999) a relação entre colágeno tipo I/III está alterada nos pacientes portadores de hérnia incisional primária ou recidivada pela elevação do colágeno tipo III, como resultado de alterações nos níveis de MMP-1, MMP-13 e fibronectina significativamente diferentes em relação aos pacientes não portadores de hérnias, uma vez que estas

metalopectidases atuam sobre estes substratos da matriz extracelular (colágeno tipo I e III).

O colágeno tipo I é o responsável pela estabilidade mecânica das fibras durante a regulação da fibrilogênese (ZHENG et al, 2002), uma vez que as fibras do colágeno tipo III caracterizam-se por fibrilas diâmetros finos e resistência mecânica reduzida.

Adicionalmente, as MMPs são reconhecidas pelo importante papel na fisiologia e processos patológicos, além de atuar na degradação dos constituintes da matriz extracelular, desta forma facilitando a migração celular e o remodelamento tecidual. O aumento da atividade proteolítica das MMPs pode causar remodelamento da matriz extracelular (MEC) no músculo esquelético (Carmeli, et al., 2004), além de alterar as moléculas da MEC (Szabo; Ablin; Singh, 2004). A regulação da atividade da MMPs é feita por 3 mecanismos: regulação da transcrição (citocininas, fatores de crescimento, agentes químicos); ativação pró-enzima por proteases (plasmina) e inativação da enzima, pelos inibidores teciduais das metalopeptidases de matriz (TIMPs) (Lluri & JAWORSKI, 2005).

Embora as MMPs e os TIMPs estejam expressos nos músculos, não está claro o papel de ambas no desenvolvimento e função do músculo esquelético. De qualquer forma as MMPs e os TIMPs tem uma importante função fisiológica na manutenção da homeostasia das fibras musculares e da matriz extracelular (Lluri & JAWORSKI, 2005).

Na análise da atividade proteolítica de extrato de músculo abdominal por zimografia verificamos a intensidade da MMP2 ativa, observando que a DisBa-01 aumentou significativamente a atividade da MMP-2 quando comparado ao grupo

controle. Neste sentido, é provável que a *DisBa-01* possa estar relacionada ao remodelamento do colágeno, reorganizando assim o tecido conjuntivo durante o processo de reparo tecidual.

Considerando que as MMPs degradam uma variedade de substratos incluindo as proteínas da MEC, proteinases e seus inibidores, moléculas quimiotáticas e receptores de superfície das células (Matrisian, 1992; Chang and Werb, 2001), bem como participam de eventos fisiológicos e fisiopatológicos associados com a mortalidade celular (apoptose), inflamação e reparo tecidual, (Bjorklund & Koivunen, 2005), o presente estudo mostrou após indução de hérnia incisional em ratos, que a *DisBa-01* parece ter papel no “turnover” celular “in vivo”, estimulando os eventos que acompanham o processo de cicatrização da ferida cirúrgica pós-operatória (figura 19).

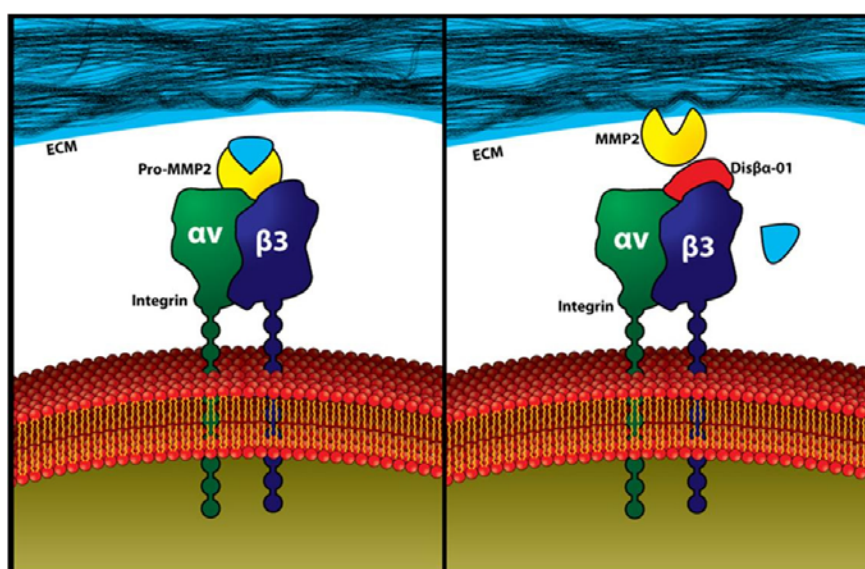


Figura 19: proposta de mecanismo de ação da *DisBa-01*. **A:** a integrina $\alpha_v\beta_3$ recruta pró-MMP-2 para superfície da célula para controlar a degradação local dos componentes da MEC; **B:** o bloqueio desta integrina pela *DisBa-01* libera a pró-MMP-2, que pode ser ativada pelo colágeno I e MT1-MMP aumentando assim atividade MMP-2.

Este processo de degradação do substrato da MEC pelas MMPs tem sido observado em outros tecidos, como nas lesões da medula espinhal, mostrando que as MMPs participam ativamente do processo de remodelamento em estados de injúria destes tecidos (Yong 2005). Estudos prévios com tecido cerebral têm observado que as MMPs, incluindo a MMP-9 (gelatinase B), contribuíram para a patogênese secundária a lesão, promovendo inflamação (Rosenberg et al., 1998), stress oxidativo (Kim et al., 2003), e desmielinização (Asahi et al., 2001).

Por outro lado, as MMPs também podem assumir funções benéficas e especializadas que incluem crescimento tecidual, guiando o processo de regeneração e plasticidade tecidual (Yong, 2005). Neste sentido, há evidências de que as MMPs poderiam estar associadas a cicatrização de feridas baseadas em parte pela habilidade de degradar a MEC e liberar moléculas da MEC que regulam a angiogênese (Chang & Werb, 2001).

Desta forma, no presente estudo, verificou-se o aumento da expressão da MMP-2, a qual é denominada de gelatinase-A, (que atua sobre o colágeno tipo I e III presente na matriz extracelular) no processo cicatricial de hérnia incisional induzida. Entretanto, faz-se necessário em ensaios futuros, a análise de outras MMPs que estejam associadas ao reparo tecidual.

Vários membros da família da integrina α_v também estariam envolvidos na cicatrização tecidual. A expressão de $\alpha_v\beta_3$ (um receptor de vitronectina da matriz extracelular) está elevada em vários tipos de células que estão envolvidas na cicatrização de feridas incluindo as plaquetas, células endoteliais vasos sanguíneos, macrófagos e fibroblastos. Além disso, a inibição da função da integrina α_v utilizando-se anticorpos podem impedir a migração dessas células “*in vitro*”, assim como, a

administração de inibidores de $\alpha_v\beta_3$ reduziram a formação de tecido de granulação e da angiogênese na ferida operatória, sugerindo que a integrina $\alpha_v\beta_3$ é necessária para uma boa cicatrização (Reynolds et al, 2005). Camundongos deficientes de subunidade β_3 apresentaram maiores taxas de re-epitelização com aumento na sinalização celular mediada por TGF- β_1 (Reynolds et al, 2005). Em contraste com estes estudos, animais nocauteados para as subunidades β_5 ou β_6 não exibiram alterações nas taxas de cicatrização da ferida, sugerindo que o papel da integrina α_v na cicatrização de feridas seja provavelmente mais complexo do que inicialmente previsto, e levantar a questão da importância da integrina $\alpha_v\beta_3$ na cicatrização de feridas (Reynolds et al, 2005).

No presente trabalho, o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ com anticorpos específicos reproduziu parcialmente os resultados observados com a *DisBa-01*, reforçando o papel desta integrina no processo de reparo tecidual uma vez que esta desintegrina é um antagonista deste receptor (Ramos et al., 2008; Kauskot et al., 2008). No entanto, o fechamento da hérnia foi incompleto e ocorreu por retração da musculatura, sem produção de membrana. É provável que a *DisBa-01* possa ativar outros mecanismos em monócitos e fibroblastos, uma vez que esta proteína também se liga à integrina $\alpha_5\beta_1$.

Por outro lado, o bloqueio da subunidade α_2 não promoveu o fechamento da hérnia. Este anticorpo foi utilizado como um controle uma vez que a *DisBa-01* não se liga à integrina $\alpha_2\beta_1$ (receptor de colágeno tipo I). Estes resultados reforçam a sugestão de que a integrina $\alpha_v\beta_3$ esteja diretamente ligada ao processo cicatricial.

Estudos propõem que provavelmente que a diminuição da expressão da integrina α_2 ou um aumento da expressão do receptor α_v (vitronectina) ou uma combinação dos dois eventos seja o responsável pela ruptura de colágeno e o aparecimento dos defeitos no processo cicatricial das feridas (Reynolds et al, 2005). No entanto, mais estudos deverão ser realizados para uma maior compreensão do papel destes receptores no desenvolvimento da HI.

6) CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a *DisBa-01*, uma desintegrina RGD ligante da integrina $\alpha_v\beta_3$ inibiu o desenvolvimento de HI em ratos após 15 dias do processo cicatricial, através dos seguintes mecanismos:

- a) formação de uma membrana de colágeno que ocluiu o anel herniário,
- b) indução de proliferação vascular, da migração de células mononucleares e fibroblastos e o remodelamento da MEC.
- c) Constatamos que a *DisBa-01* estimulou a colagenização no tecido estudado,

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

7) 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.
- 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**. 1991 Oct 7;291(1):50-4.
- 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** 2001, 21:7724 –7732.

- BAUER M, SUN Y, DEGENHARDT C, KOZIKOWSKI B. Assignment of all four disulfide bridges in echistatin. **J Protein Chem.** 1993; 12(6):759-64.
- BAYER I, ELLIS H. Jaundice and wound healing: an experimental study. **Br J Surg.** 1976; 63(5):392-6.
- BELLÓN JM, BAJO A, GA-HONDUVILLA N, GIMENO MJ, PASCUAL G, GUERRERO A, ET AL. Fibroblasts from the transversalis fascia of young patients with direct inguinal hernias show constitutive MMP-2 overexpression. **Ann Surg.** 2001; 233(2):287-91.
- 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.** 2005 Nov;4(11):1670-80.
- 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.** 1995; 7(1):7-20.
- BJÖRKLUND M, KOIVUNEN E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. **Biochim Biophys Acta.** 2005 May 25;1755(1):37-69.
- BREW K, DINAKARPANDIAN D, NAGASE H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochim Biophys Acta.** 2000 Mar 7;1477(1-2):267-83. Review.
- BRASILEIRO FILHO G. **Bigliolo Patologia Geral.** 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 75-80.
- BROOKS PC. Role of integrins in angiogenesis. **Eur J Cancer.** 1996 Dec;32A(14):2423-9. Review.

- BRUCE A et al (1994). **Molecular biology of the cell**. 3rd edn. Garland, New York.
- 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**. 2004; 240(4):578-83.
- 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**. 1996 Oct 25;39(22):4520-6
- BURKE PA, DENARDO SJ. Antiangiogenic agents and their promising potential in combined therapy. **Crit Rev Oncol Hematol**. 2001 Jul-Aug;39(1-2):155-71
- BUSCHMANN I, SCHAPER W. Arteriogenesis versus angiogenesis: two mechanisms of vessel growth. **News Physiol Sci** 1999; 14: 121-125.
- 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**. 1992,15;206(3):759-65.
- CARLSON MA. Acute wound failure. **Surg Clin North Am**. 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 alphaVbeta3/alphaVbeta5 integrin dual binders. **J Med Chem**. 2005 Dec 1;48(24):7675-87.

CLEUTJENS JP, KANDALA JC, GUARDA E, GUNTAKA RV, WEBER KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. **J Mol Cell Cardiol.** 1995; 27(6):1281-92.

CHANG C, WERB Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol.** 2001; 11(11):S37-43. Review.

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.** 1994; 30;1224(3):506-16.

CROMACK DT, SPORN MB, ROBERTS AB, MERINO MJ, DART LL, NORTON JA. Transforming growth factor beta levels in rat wound chambers. **J Surg Res.** 1987; 42(6):622-8.

DEBUS ES, SCHMIDT K, ZIEGLER UE, THIEDE A. The role of growth factors in wound healing. **Zentralbl Chir.** 2000;125 Suppl 1:49-55. Review. German.

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.** 1999 Aug 12;42(16):3033-40

DIEGELMANN RF (2001) collagen metabolism. **Wounds** 13(5): 177-182.

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.** 2005 Nov;390(6):528-33. 2005; 23.

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.** 2007; 245(1):140-6.

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** 2006;140(1):14-24.

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** 2005;137(4):463–71.

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.** 2004;240(1):179-86.

ESKENS F. New targets and innovative strategies in cancer treatment: a short course for clinicians. **J Drugs.** 2003 Mar;6(3):207-10.

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.** 2007; 392(4):459-64.

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.** 1993;132(3):1411-3

FRANZ MG, KUHN MA, NGUYEN K, WANG X, KO F, WRIGHT TE, et al.
Transforming growth factor b_2 lowers the incidence of incisional hernias. **J Surg Res.** 2001;97:109-16.

FRANZ MG, SMITH PD, WACHTEL TL, et al. Fascial incisions heal faster than skin: a new model of abdominal wall repair. **Surgery** 2001;129(2):203–8.

FRANZ MG, KUHN MA, NGUYEN K, WANG X, KO F, WRIGHT TE, et al.
Transforming growth factor β_2 lowers the incidence of incisional hernias. **J Surg Res.** 2001, 15;97(2):109-16.

FRANZ MG, SMITH PD, WRIGHT TE, KO F AND ROBSON MC. Fascial healing exceeds skin: A novel model of abdominal wall repair. **Surg. Forum** 50: 604, 1999.

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.** 1996;107(3):404-11.

GLADSON CL. Expression of integrin $\alpha v \beta 3$ in small blood vessels of glioblastoma tumors. **J Neuropathol Exp Neurol.** 1996 Nov;55(11):1143-9

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.** 1990; 87: 168-171, 1990.

HESSELINK VJ, LUIJENDIJK RW, DE WILT JH, HEIDE R, JEEKEL J. An evaluation of risk factors in incisional hernia recurrence. **Surg Gynecol Obstet.** 1993;176(3):228-34.

- HOUCK JP, RYPINS EB, SARFEH IJ, JULER GL, SHIMODA KJ. Repair of incisional hernia. **Surg Gynecol Obstet**. 1989;169(5):397-9.
- HUGH TB. Abdominal wound dehiscence. **Aust N Z J Surg**. 1990; 60(3):153-5.
- 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**. 1984;96(1):48-54.
- JIA LG, SHIMOKAWA K, BJARNASON JB, FOX JW. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. **Toxicon**. 1996; 34(11-12):1269-76. Review.
- JONES FS, JONES PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. **Dev Dyn**. 2000 Jun;218(2):235-59. Review.
- JUÁREZ, P., COMAS, I., GONZÁLEZ-CANDELAS, F., CALVETE, J.J. (2008) Evolution of snake venom disintegrins by positive Darwinian selection. **Mol. Biol. Evol.** 25, 2391-2407)
- JUSSILA L, ALITALO K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. **Physiol Rev** 2002; 82:673-700.
- 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**. 2008 May 1;13:6604-16
- KEILL RH, KEITZER WF, NICHOLS WK, HENZEL J, DEWEESE MS. Abdominal wound dehiscence. **Arch Surg**. 1973;106(4):573-7.

- 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** 2003, 23:8733– 8742
- KLINGE U, BINNEBÖSEL M, MERTENS PR. Are collagens the culprits in the development of incisional and inguinal hernia disease? **Hernia**. 2006 ;10(6):472-7. Review.
- 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**. 1999;31(6):480-90.
- 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** 1999;1(3):219–27.
- 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**. 2003 Sep 16;108(11):1375-81. Epub 2003 Aug 25.
- LARSON GM, VANDERTOLL DJ. Approaches to repair of ventral hernia and full-thickness losses of the abdominal wall. **Surg Clin North Am**. 1984;64(2):335-49
- LIEKENS S, DE CLERCQ E, NEYTS J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochem Pharmacol**. 2001 Feb 1;61(3):253-70. Review.

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.** 1993;121(5):1181-9.

LLURI G, JAWORSKI DM. Regulation of TIMP-2, MT1-MMP, and MMP-2 expression during C2C12 differentiation. **Muscle Nerve.** 2005 Oct;32(4):492-9

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.** 2002;6:144-7.

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.** 2000, 10;343(6):392-8.

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

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

MARCINKIEWICZ C, CALVETE JJ, MARCINKIEWICZ MM, RAID A 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.** 1999, 30;274(18):12468-73 (a).

MARCINKIEWICZ C, CALVETE JJ, VIJAY-KUMAR S, MARCINKIEWICZ MM, RAID A 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.** 1999; 5;38(40):13302-9 (b).

- MARCINKIEWICZ C, VIJAY-KUMAR S, MCLANE MA, NIEWIAROWSKI S. Significance of RGD loop and C-terminal domain of echistatin for recognition of α IIb β 3 and α (v) β 3 integrins and expression of ligand-induced binding site. **Blood**. 1997, 15;90(4):1565-75.
- 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**. 1996;135(5):1415-26.
- MATRISIAN LM (1992) The matrix-degrading metalloproteinases. **BioEssays** 14:455– 463.
- MCLANE MA, MARCINKIEWICZ C, VIJAY-KUMAR S, WIERZBICKA-PATYNOWSKI I, NIEWIAROWSKI S. Viper venom disintegrins and related molecules. **Proc Soc Exp Biol Med**. 1998; 219(2):109-19. Review.
- MCLANE MA, SANCHEZ EE, WONG A, PAQUETTE-STRAUB C, PEREZ JC. Disintegrins. **Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord**. 2004; 4(4):327-55.
- 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 Brás** 2003, 18: 2003 – 5.
- MEDEIROS AC, BARRETO H, GARCIA OS. Vascularização dos tendões planos do abdome. Estudo experimental. **Rev Col Bras Cir** 1981; 8: 274-277.

- 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.** 1995;108 (Pt 8):2825-38.
- 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.** 1986 ;83(19):7297-301.
- MATRIX. 1992 Feb;12(1):50-5. 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.** 1992 Feb;12(1):50-5.
- MUDGE M, HUGHES LE. Incisional hernia: a 10 year prospective study of incidence and attitudes. **Br J Surg.** 1985;72(1):70-1.
- 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.** 1987; 11;237(4820):1333-6.
- 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.** 1995;161(9):655-61.
- 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.** 1999; 8;353(9164):1563-7.

- 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.** 2002; 1;277(5):3606-13.
- 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.** 1992; 15;267(32):22869-76.
- PARK D, KANG I, KIM H, CHUNG K, KIM DS, YUN Y. Cloning and characterization of novel disintegrins from Agkistrodon halys venom. **Mol Cells.** 1998; 31;8(5):578-84.
- PAULO DNS, PEREIRA FEL, MATA RF, DAUAD FRD, PAULO ICAL. Experimental models of longitudinal abdominal incisional hernia in rats. **Acta Cir Bras** 1997; 12:231-4.
- PEACOCK J. Fascia and muscle. In: **Peacock J**, editor. Wound repair. 3rd edition. Philadelphia: W.B. Saunders; 1984. p. 332–62.
- 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.** 1992 Oct 16;35(21):3962-9.
- 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.** 1994 Dec;2(6):491-501.

- POLLOCK AV, EVANS M. Early prediction of late incisional hernias. **Br J Surg** 1989;76:953–4.
- PORIES WJ, MACDONALD KG JR, FLICKINGER EG, DOHM GL, SINHA MK, BARAKAT HA, et al. Is type II diabetes mellitus (NIDDM) a surgical disease? **Ann Surg**. 1992;215(6):633-42; discussion 643.
- PROCKOP DJ, KIVIRIKKO KI, TUDERMAN L, et al. The biosynthesis of collagen and its disorders. **NEJM** 1979;301:13–23.
- RAMOS OH, KAUSKOT A, COMINETTI MR, BECHYNE I, SALLA PONTES CL, CHAREYRE F, et al. A novel alpha(v)beta (3)-blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clin Exp Metastasis**. 2008, 19.
- 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**. 2003 May 14;125(19):5592-3.
- READ RC, YODER G. Recent trends in the management of incisional herniation. **Arch Surg**. 1989;124(4):485-8.
- 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**. 2005 Feb;11(2):167-74.
- RICHES DWH. Macrophage involvement in wound repair, remodeling and fibrosis. In: Clark RAF, editor. The cellular and molecular biology of wound healing. 2nd edition. New York: **Plenum Press**; 1995. p. 95-141.

- ROBSON MC, MUSTOE TA, HUNT TK. The future of recombinant growth factors in wound healing. **Am J Surg**. 1998;176(2A Suppl):80S-82S.
- ROBSON MC, HILL DP, WOODSKE ME, et al. Wound healing trajectories as predictors of effectiveness of therapeutic agents. **Arch Surg** 2000;135:773–7.
- 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**. 1997 Jul;52(1):93-102
- 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**. 2003;387(11-12):427-32.
- ROSENBERG GA, ESTRADA EY, DENCOFF JE (1998) Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. **Stroke** 29:2189 –2195.
- RUOSLAHTI E, SUZUKI S, HAYMAN EG, ILL CR, PIERSCHBACHER MD. Purification and characterization of vitronectin *Methods Enzymol* 1987; 144:430-7.
- SANTORA TA, ROSLYN JJ. Incisional hérnia **Surg Clin North Am**. 1993;73(3):557-70
- SCHOETZ DJ JR, COLLER JA, VEIDENHEIMER MC. Closure of abdominal wounds with polydioxanone. A prospective study. **Arch Surg**. 1988;123(1):72-4.
- SIMÕES MJ, CABRAL ACV, BOYACIYAN K, KULAY JÚNIOR L, SASSO WS. Aspectos ultraestruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparac o da pele de ratos. **Rev Paul Med** 1986;104(3):132-5.

- 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.** 1999;126(1):137-45.
- 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.** 2000; 25;259(1):213-24.
- 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.** 2002;131(3):324-31.
- 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.** 1996;171(1):80-4.
- 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** 2009;42:118-121.
- STERNLICHT MD, WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 2001;17:463-516. Review.
- SZABO KA, ABLIN RJ, SINGH G. Matrix metalloproteinases and immune response. **Clin. Appl. Immun. Rev** 2004., 4, 295-319.
- 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.** 1994; 15; 54(18):4993-8.

- TRINDADE EN, TRINDADE MR. The use of mesh and collagen in incisional hernias. **Hernia**. 2007;11(1):83-4.
- TUCKER GC. Inhibitors of integrins. **Curr Opin Pharmacol**. 2002 Aug;2(4):394-402. Review.
- URSCHEL JD, SCOTT PG, WILLIAMS HT. Etiology of late developing incisional hernias--the possible role of mechanical stress. **Med Hypotheses**. 1988;25(1):31-4.
- VENCLAUSKAS L, SILANSKAITE J, KANISAUSKAITE J, KIUDELIS M. Long-term results of incisional hernia treatment. **Medicina (Kaunas)**. 2007;43(11):855-60.
- VOGEL W, GISH GD, ALVES F, PAWSON T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. **Mol Cell**. 1997 Dec;1(1):13-23.
- VOGT PM, DRÜCKE D, MÜHLBERGER T, HOMANN HH, STEINAU HU. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. **Zentralbl Chir**. 2000;125 Suppl 1:65-8. Review. German.
- XIONG YM, ZHANG L. Structure-function of the putative I-domain within the integrin beta 2 subunit. **J Biol Chem**. 2001 Jun 1;276(22):19340-9.
- XIONG YM, HAAS TA, ZHANG L. Identification of functional segments within the beta2I-domain of integrin alphaMbeta2. **J Biol Chem**. 2002 Nov 29;277(48):46639-44.
- WAGH PV, LEVERICH AP, SUN CN, WHITE HJ, READ RC Direct inguinal herniation in men: a disease of collagen. **J Surg Res**. 1974;17(6):425-33.

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**. 1998 Aug;124(2):464-70.

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

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

YEH CH, PENG HC, HUANG TF. Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by acting as integrin α v β 3 antagonist and inducing apoptosis. **Blood**. 1998; 1;92(9):3268-76.

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

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