

Universidade Federal de Minas Gerais

**Avaliação da influência do background genético murino na
inflamação, angiogênese e fibrogênese intraperitoneal
induzidas por implantes**

Belo Horizonte / Minas Gerais

2016

SUZANE MOTA MARQUES COSTA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof. Dra. Silvia Passos Andrade

Belo Horizonte / MG

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

2016

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Angiogênese do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio financeiro: CAPES, CNPq e FAPEMIG.

A persistência é o menor caminho do êxito.
(Charles Chaplin)

DEDICO ESTA TESE....

A Deus, aos meus pais, à
minha irmã, ao meu
noivo e à minha
orientadora.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu forças nos momentos de dificuldade e cansaço, não me deixando desistir. Por ter colocado em minha vida pessoas especiais que tornaram minha trajetória mais leve e divertida. E pela fé, que cresceu a cada dia e me fez levantar diante todas as minhas derrotas.

Aos meus pais, Raquel e Vilson, pelo exemplo de trabalho, humildade e força. Por terem me dado a oportunidade de estar aqui hoje, mesmo diante a todas as dificuldade que a vida nos impôs. Por todos os sacrifícios que fizeram para que eu conseguisse chegar até aqui e por não terem me deixado desistir em tempo algum. Amo vocês com toda força da minha alma!

À minha irmã, por toda a amizade e carinho. Foi ela que sempre esteve lá para me ouvir, para me fazer companhia e para oferecer palavras de incentivo nos momentos difíceis. Quando estive agitada, sempre soube me trazer equilíbrio e sensatez. Amo-te muito!

Ao Flaviano, pelo amor, gratuito e sincero, que me deu forças para enfrentar todos os obstáculos. Por toda a disponibilidade em me ajudar sempre, pela paciência nos momentos de estresse e pela alegria diária, bom humor e alto- astral contagiante. Ao seu lado eu encontrei amor e paz e assim, a vida me parece bem melhor. Amar você é imensamente fácil!

À professora Silvia Passos Andrade, por todos os ensinamentos, paciência e dedicação. Mas do que uma orientadora, Silvia é uma grande amiga, uma “mãezona” de todos. Gosto do jeito como ela faz tudo parecer mais simples e interessante e pela sua capacidade incrível de adaptação a diferentes situações e pessoas. Espero um dia poder ser uma profissional ao menos parecida com ela. Muito obrigada!

À professora Paula Peixoto Campos. Quando cheguei ao laboratório de Angiogênese, a “Paulinha” foi quem me ensinou a maioria dos experimentos.

Com o tempo, eu pude perceber o quanto ela é uma pessoa doce, solidária, dedicada e afetuosa. Está sempre disposta a ajudar e faz tudo com muito empenho. Obrigada pela paciência e por toda ajuda!

À professora Mônica Diniz e Lucíola Barcelos pelas valiosas contribuições ao trabalho.

Aos amigos Simone, Tereza, Luciana, Celso, Alejandra, Jousie e Pollyana. Obrigada pelo auxílio nos experimentos e pelo apoio nos momentos de dificuldade. Mais do que colegas de trabalho, vocês foram grandes amigos e estiveram sempre ao meu lado. Agradeço pelas palavras de apoio, pela compreensão nos momentos difíceis, pelo companheirismo e carinho. Contem sempre comigo! Guardo vocês em um lugar muito especial em meu coração!

Aos colegas de laboratório, Camila, Leandro Barbosa, Puebla, Leandro Ceotto, Brígida, Fabrício, Tiago, Alan, Luiza, Ciça e Marianne, pelos momentos de descontração e alegria no laboratório. A jornada se tornou bem mais fácil com a companhia de vocês!

Pelos amigos que fiz em outros laboratórios: Katia, Dalton, Natália, Ariadne. Conhecer vocês foi ótimo, obrigada por todos os momentos alegres que passamos juntos.

Aos secretários da graduação e pós-graduação, Cintya, Nilda, Rodner e Fernanda, por toda ajuda e carinho.

A todos os funcionários do ICB, porteiros, faxineiros, servidores e técnicos. Sem o trabalho de vocês o nosso não seria possível.

LISTA DE ABREVIATURAS

Sigla	Significado
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclica
ANG	Angiopietina
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
CCL-2	Quimiocina ligante-2
CT	Controles
DMSO	Dimetil sulfóxido
DP	Dipiridamol
ECM	Matriz extracelular
EGF	Fator de crescimento Epidermal
ENT	Transportador Equilibrativo de Nucleosídeo
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
HB	Hemoglobina
HTAB	Brometo de hexa-1,6-bisdeciltrimetilamonio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Òxido nítrico sintase induzida
MMPs	Metaloproteinases de matriz
μ M	Micromol
mM	Milimol
MPO	Mieloperoxidase
N	Normalidade (N/L)
NaCl	Cloreto de sódio
NAG	N-acetil- β -D-glicosaminidase
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanomol

NO	Óxido nítrico
NOS	Òxido nítrico sintase
OD	Densidade ótica
OPD	Orto fenilenediamine
PAA	Ativador da atividade de plasminogênio
PBS	Tampão salina fosfato
PDE	Fosfodiesterase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pg	Picogramas
PMN	Polimorfonucleadas
SEM	Erro padrão da média
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
TIMPs	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TMB	3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- Principais componentes celulares da membrana peritoneal.
- FIGURA 2- Alterações sequenciais no número relativo de elementos celulares e fibrina durante o reparo peritoneal normal em ratos.
- FIGURA 3- Vias de formação de aderência.
- FIGURA 4- Etapas da angiogênese inflamatória.
- FIGURA 5- Mecanismo de ação do dipiridamol.
- FIGURA 6- Esquema representativo da técnica de difusão da fluoresceína.
- FIGURA 7- Difusão da fluoresceína após injeção intrabdominal do marcador em linhagens de camundongos DBA/1, Swiss, C57BL/6 e Balb/c.
- FIGURA 8- Marcadores inflamatórios no lavado da cavidade peritoneal de animais das linhagens DBA/1, Swiss, C57BL/6 e Balb/c.
- FIGURA 9- Níveis de citocinas pró-inflamatórias no lavado intraperitoneal de animais de diferentes linhagens de camundongos.
- FIGURA 10- Fotos representativas das áreas do scratch nos tempos 0 e 24 horas de animais das linhagens Swiss, C57BL/6 e Balb/c.
- FIGURA 11- Percentual de fechamento da área do scratch realizado em placas de cultura celular.
- FIGURA 12- Adesão e peso úmido dos implantes intraperitoneais.
- FIGURA 13- Cortes histológicos representativos do tecido de granulação fibrovascular intra-implante intraperitoneal em camundongos Swiss, Balb/c, DBA/1 e C57BL/6 no dia 7 pós-implante.

FIGURA 14- Marcadores de inflamação nos implantes intraperitoneais (7 dias) de diferentes linhagens de camundongos.

FIGURA 15 Marcadores de inflamação nos implantes intraperitoneais (7 dias) de diferentes linhagens de camundongos.

FIGURA 16- Níveis de citocinas pró-inflamatórias em implantes intraperitoneais (7 dias) de diferentes linhagens de camundongos.

FIGURA 17- Marcadores de fibrogênese intraperitoneal em implantes (7 dias) em diferentes linhagens de camundongos.

FIGURA 18- Efeitos do tratamento com dipiridamol nos componentes angiogênico, inflamatório e fibrogênico do tecido fibroproliferativo peritoneal nas quatro linhagens de camundongos.

TABELAS

TABELA 1	Valores basais dos parâmetros funcional e inflamatórios no lavado peritoneal dos animais das 4 linhagens
TABELA 2	Valores de 24 horas pós-implante dos parâmetros inflamatórios no lavado peritoneal dos animais das 4 linhagens.
TABELA 3	Valores de 7 dias dos parâmetros inflamatórios no lavado peritoneal dos animais das 4 linhagens.
TABELA 4	Análise qualitativa da influência do background genético nos componentes inflamatórios, angiogênico e fibrogênico das aderências intraperitoneais induzidas pelo implante nas quatro linhagens de camundongo.
TABELA 5	Análise qualitativa da resposta ao dipiridamol dos componentes inflamatório, angiogênico e fibrogênico das aderências intraperitoneais induzidos pelo implante, nas quatro linhagens de camundongo.

SUMÁRIO

ABSTRACT	15
RESUMO	16
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Background genético	19
1.2 Classificação genética dos animais de laboratório	20
1.3 Heterogeneidade fenotípica entre as linhagens	23
1.4 Cavidade peritoneal e peritônio	25
1.5 Lesões intraperitoneais e o processo de cicatrização	27
1.6 Inflamação	32
1.7 Angiogênese	34
1.8 Fibrose	36
1.9 Migração celular	38
1.10 Modelos experimentais para o estudo da resposta tipo corpo-estranho e aderência intraperitoneal em animais	39
1.10.1 Modelo de implante de esponja	40
1.11 Abordagens terapêuticas na prevenção e controle das aderências	42
1.11.1 Dipiridamol	44
2. OBJETIVOS	48
3. METODOLOGIA	51
3.1 Animais	52
3.2 Implantes sintéticos para indução da inflamação e aderências	52
3.3 Avaliação do fluxo sanguíneo cutâneo em camundongos DBA/1, Swiss, Balb/c e C57BL/6 (Difusão da fluoresceína)	53
3.4 Lavado peritoneal	55
3.5 Cultura celular	55
3.6 Ensaio de migração celular	56
3.7 Indução de aderências e tratamento com dipiridamol	56
3.8 Processamento dos implantes para as dosagens dos marcadores inflamatórios, angiogênicos, e fibrogênicos	57
3.9 Dosagem de hemoglobina	57
3.10 Avaliação da atividade da mieloperoxidase	58
3.11 Avaliação da atividade da N-acetil- β D- glicosaminidase (NAG)	59
3.12 Dosagem de nitrito	59
3.13 Quantificação de citocinas (VEGF, TNF- α , CCL-2, KC, TGF- β 1)	60

3.14	Quantificação de colágeno	60
3.15	Avaliação histológica	61
3.16	Análise estatística	62
4.	RESULTADOS	63
4.1	Influência do background genético na permeabilidade vascular da cavidade peritoneal, no perfil inflamatório e na migração celular do lavado peritoneal induzidos por implantes sintéticos.	64
4.2	Influência do background genético na formação de aderência intraperitoneal induzida por implante e a resposta ao dipiridamol.	79
4.2.1	Angiogênese nos implantes intraperitoneais	82
4.2.2	Inflamação nos implantes intraperitoneais	83
4.2.3	Deposição de colágeno e níveis de TGF-β1	86
4.1.5	Resposta ao Dipiridamol	87
5	DISCUSSÃO	92
6.	CONCLUSÕES	106
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
9	ANEXOS	139

ABSTRACT

Genetic differences between individuals of the same species have been associated with distinct morphological and functional features in a large number of pathophysiological processes. We characterized the acute inflammatory response and chronic adhesion formation and the effect of dipyridamole using a synthetic matrix deployment model in the peritoneal cavity four strains of mice: DBA / 1, Swiss, C57BL / 6 and Balb / c . In vascular permeability, as assessed by fluorescein diffusion technique, it was observed that the animals had different responses, with Balb / c and C57BL / 6 showing lower permeability marker. There were also marked differences in the release / levels of most of the assessed inflammatory markers in the intraperitoneal washed between the lines, both at baseline and in response to the implant. Basal lavage of animals showed that the animals Swiss strains showed higher levels of the enzyme N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) and of the chemokine CCL-2. However, after implantation, the washing of animals BALB / c had higher MPO levels, CCL-2 when compared to other strains. For evaluation of chronic inflammation, angiogenesis and fibrogenesis tissues induced by the synthetic matrix implant in the peritoneal cavity were characterized. Angiogenesis, the content evaluated intra-implant hemoglobin was higher in Swiss mice, whereas the levels of the growth factor vascular endothelium (VEGF) were higher in C57BL / 6 mice. The levels of proinflammatory cytokines and enzymes (MPO and NAG) were also strain dependent. The pro-fibrogenic markers transforming growth factor (TGF- β 1) and collagen under way in mice DBA / 1, while in animals C57BL strains / 6 showed elevated levels. differential sensitivity to dipyridamole was also observed, with pro-angiogenic effects in animal implants DBA / 1 but antiangiogenic effects in Swiss animal implants. These important differences related to strain in the development of peritoneal fibrosis and in response to dipyridamole should be considered in the design and analysis of studies on fibrogenesis in mice.

Keywords: Genetic Background, adhesion, inflammation, fibrogenesis, angiogenesis, mice.

RESUMO

Diferenças genéticas entre indivíduos de uma mesma espécie têm sido associados a características morfológicas e funcionais distintas em um grande número de processos fisiopatológicos. Nós caracterizamos as respostas inflamatórias aguda e crônica, a formação de aderência e o efeito do dipiridamol utilizando-se um modelo de implantação de matriz sintética na cavidade peritoneal de quatro linhagens de camundongos: DBA/1, Swiss, C57BL/6 e Balb/c. Na permeabilidade vascular, avaliada pela técnica de difusão da fluoresceína, observou-se que os animais apresentaram respostas distintas, com camundongos Balb/c e C57BL/6 apresentando menor permeabilidade ao marcador. Houve também diferenças marcantes na liberação/níveis da maioria dos marcadores inflamatórios avaliados no lavado intraperitoneal entre as linhagens, tanto basalmente quanto em resposta ao implante. Em condições basais, o lavado dos animais mostrou que os animais da linhagens Swiss apresentaram maiores níveis de da enzima N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) e da quimiocina CCL-2. Porém, após a implantação, o lavado dos animais Balb/c apresentaram maiores níveis de MPO, CCL-2, quando comparados às demais linhagens. Para avaliação da inflamação crônica, angiogênese e fibrogênese os tecidos induzidos pelo implante de matriz sintética na cavidade peritoneal foram caracterizados. Angiogênese, avaliada pelo conteúdo de hemoglobina intra-implante, foi maior em camundongos Swiss, enquanto os níveis do fator de crescimento do endotélio vascular(VEGF) foram maiores em camundongos C57BL/6. Os níveis de citocinas e enzimas pró-inflamatórias (MPO e NAG) também foram linhagem dependente. Os marcadores pró-fibrogênicos fator de crescimento transformante(TGF- β 1) e colágeno foram menores em camundongos DBA/1, enquanto em animais da linhagens C57BL/6 apresentaram níveis elevados. Sensibilidade diferencial ao dipiridamol também foi observada, com efeitos pró-angiogênicos em implantes de animais DBA/1 mas efeitos antiangiogênicos em implantes de animais Swiss. Essas importantes diferenças relacionadas à linhagem no desenvolvimento de fibrose peritoneal e em resposta ao dipiridamol devem ser considerados no desenho e análise de estudos sobre fibrogênese em camundongos.

Palavras-chave: Background genético, aderência, inflamação, fibrogênese, angiogênese, camundongos.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Background genético

Background genético é a coleção de todos os genes presentes em um organismo que influencia uma ou mais características. Esses genes podem ser parte de uma mesma via bioquímica ou de sinalização ou de vias opostas ou podem ainda aparecer sem relação com o gene estudado. O *background* genético não é uma entidade fixa, podendo alterar-se com a idade ou com alterações do ambiente físico (SIGMUND, 2000; LEITER et al., 2004; ANDRIKOPOULOS et al., 2005; JOHNSON et al., 2006; DOETSCHMAN, 2009).

Para avaliar o impacto de alterações na atividade gênica, genes candidatos têm sido deletados ou superexpressos gerando modelos de animais geneticamente modificados (SIGMUND 2000; ANDRIKOPOULOS et al., 2005; BERTOK, et al., 2011; JEANSSON et al., 2011; MARRAZO et al., 2011; FAN et al, 2014; JUNG et al, 2014).

A utilização de linhagens de camundongos, transgênicos e nocautes, é uma importante ferramenta para testes e verificações de hipóteses, incluindo mecanismos que envolvem a cicatrização de feridas. Esses animais são frequentemente uma mistura genética e por isso apresentam dificuldades para aqueles que tentam usar controles mais apropriados em seus estudos (CHAN, 1999; HARTNER et al., 2003; PAL-GHOSH et al., 2008; THIESSE, et al., 2010; QIAO et al., 2011, FERGUSON et al, 2014). Ao gerar um camundongo transgênico ou nocaute, a escolha da predisposição genética pode ter um

efeito significativo no fenótipo. Isso implica que a seleção da linhagem do animal pode ser de vital importância para os resultados do estudo (BORNE et al., 2009; THIESSE et al., 2010; WANG et al., 2010; FERGUSON et al., 2014). As diferenças fenotípicas entre as linhagens de camundongos podem ser identificadas, mas a comparação entre dados obtidos é extremamente difícil (HARTNER et al., 2003; MASSET & BERK, 2005).

1.2 Classificação genética de animais de laboratório

Com o avançar da Ciência de Animais de Laboratório vários estudos genéticos que resultaram da necessidade do conhecimento e aprimoramento do padrão genético das espécies trouxeram aos dias atuais uma diversidade de linhagens geneticamente definidas, que muito tem contribuído com as pesquisas biológicas (BISHOP, 1999).

Atualmente, a classificação genética das espécies se baseia e está de acordo com os programas de acasalamento utilizados. Estes definem a forma de transmissão dos caracteres genéticos. A partir desses entendimentos têm-se dois grandes sistemas: *inbred* (ou isogênicos) e *outbred* (ou heterogênicos) (www.uff.br/animaislab/ap6.doc).

Animais isogênicos são obtidos a partir de cruzamentos entre irmãos da mesma geração, por pelo menos, vinte gerações consecutivas em pares monogâmicos permanentes. Isto assegura um alto grau de consaguinidade, cerca de 98,6%, fixando algumas características e perdendo outras. Em geral, são animais de menor porte, menos férteis e com menor número de filhotes por ninhada quando comparados aos animais heterogênicos. Nesse grupo,

encontram-se as linhagens Balb/c, C57BL/6 e DBA/1 (www.uff.br/animaislab/ap6.doc).

Os camundongos C57BL/6 constituem a linhagem mais usada entre os animais isogênicos e a primeira a ter seu genoma sequenciado. Apesar desta linhagem ser resistente a diversos tipos de tumores, ela é caracterizada por uma alta susceptibilidade à obesidade induzida por dieta e ao diabetes tipo 2, com moderada hiperglicemia e hiperinsulinemia (<http://www.jaxmice.jax.org/support/straindata/index.html>). Diferenças genéticas na resposta metabólica da gordura têm sido sugeridas como mais importantes para o desenvolvimento da obesidade e diabetes do que a ingestão calórica (SURWIT et al., 1995). Além disso, esses animais são altamente susceptíveis ao desenvolvimento de arteriosclerose, apresentando altos níveis de colesterol quando oferecida dieta rica em gordura (OOSTERLINCK et al., 2011). Outros estudos também já foram capazes de demonstrar que esses animais apresentam predominantemente uma resposta imune do tipo TH₁, apresentando produção de linfócitos T, através da via do IFN- γ e consequente ativação de macrófagos (MILLS et al, 2000).

Já os animais do tipo Balb/c são usados em vários tipos de estudos. Eles desenvolvem altos níveis de colesterol plasmáticos e altas pressões sanguíneas sistólicas, mas são resistentes à arteriosclerose induzida por dieta. Embora apresentem uma baixa frequência cardíaca média, eles mostram altas taxas de adaptação cardíaca (OOSTERLINCK et al., 2011). São resistentes à encefalomielite autoimunes experimentais (EAE) e susceptíveis a *Listeria*, todas as espécies de *Leishmania* e a várias espécies de *Trypanossoma* (<http://www.jaxmice.jax.org/support/straindata/index.html>). Ao contrário dos

animais da linhagem C57BL/6, esses animais apresentam predominantemente resposta imune do tipo TH₂, que está associada com IL-4, IL-5 e IL-10, contrárias à via do IFN- γ e que, portanto, inibem a ativação de macrófago (MILLS et al, 2000).

A linhagem DBA/1 é a mais antiga das linhagens isogênicas. Esses animais são amplamente usados em modelos de artrite reumatoide e demonstram uma susceptibilidade intermediária ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em aorta após ingestão de dieta aterogênica. Essa linhagem desenvolve nefrite imunomediada caracterizada por proteinúria, glomerulonefrite e doença túbulo-intersticial (<http://www.jaxmice.jax.org/support/straindata/index.html>).

Por outro lado, os animais heterogênicos são animais de constituição genética variada, por serem obtidos através de cruzamentos aleatórios, evitando que animais em acasalamento sejam parentes próximos. Com isso, busca-se manter um baixíssimo grau de consanguinidade, cerca de 1%. Esses animais são mais robustos, com maior fertilidade, com maior número de filhotes por ninhada e menos susceptíveis às variações do meio. A linhagem de camundongo Swiss se encontra nessa categoria (www.uff.br/animaislab/ap6.doc).

Os camundongos Swiss são animais albinos, usados amplamente em todos os tipos de pesquisas biomédicas, especialmente pesquisas relacionadas ao câncer, estudos de toxicidade, avaliação de compostos farmacológicos e doenças infecciosas (ABBOTT et al., 1991; NYSKA et al., 1991; OOSTERLINCK et al., 2011).

1.3 Heterogeneidade fenotípica entre as linhagens

Embora todas as linhagens de camundongos possuam a mesma coleção de genes, seqüências diferentes e interações entre os alelos influenciam fenótipos específicos. Um grande número de trabalhos tem mostrado a influência do background genético em diferenças morfológicas e funcionais intrínsecas em vários processos fisiológicos e patológicos (SIGMUND 2000; ANDRIKOPOULOS et al., 2005; JOHNSON et al., 2006; DOETSCHMAN, 2009; MARQUES et al., 2011; WIJNVOORD et al., 2010; SIMONE et al, 2014)

Essas diferenças têm sido mostradas não somente entre espécies como também em linhagens de uma mesma espécie. Populações celulares de vários compartimentos anatômicos (cavidade peritoneal, tecido adiposo) apresentam fenótipos distintos entre muitas linhagens investigadas. Macrófagos da cavidade peritoneal de Balb/c diferem com relação à produção de TGF- β , IL-17 e IL-10 de macrófagos de animais C57BL/6 após estímulo inflamatório químico com lipopolissacarídeo (LPS) (SOUDI et al, 2013). As propriedades imunomoduladoras de células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo, também apresentam diferenças entre as linhagens Balb/c, C57BL/6 e DBA quanto a produção de citocinas, óxido nítrico e indoleamine 2,3-dioxigenase (HASHEMI et al, 2013). Várias doenças fibroproliferativas, tais como fibrose pulmonar, esclerose sistêmica e queloides estão entre os processos anormais associados a traços genéticos em humanos e animais experimentais (BONNIAUD et al, 2005; TULANDI et al, 2011). A linhagem de

camundongo C57BL/6, por exemplo, desenvolve uma severa fibrose pulmonar após exposição à bleomicina, irradiação ou sílica. Por outro lado, a linhagem do tipo Balb/c desenvolve uma fibrose bem menos pronunciada quando exposta aos mesmos agentes causadores (KOLB et al, 2002). De maneira similar, quando expostos à cloridina, camundongos FVB/NJ desenvolvem fibrose pronunciada, enquanto camundongos A/J apresentam pequena ou nenhuma fibrose de vias aéreas, mostrando que o mesmo estímulo pode induzir respostas completamente diferentes quando uma variação genética está envolvida (MO Y et al, 2013). Margetts et. al. 2013 mostraram diferenças significantes na susceptibilidade à fibrose peritoneal em camundongos de diferentes linhagens associada ao mecanismo de sinalização do TGF- β . A resposta fibrogênica de camundongos C57BL/6 a injeção intraperitoneal de um adenovírus expressando TGF- β 1 foi mais intensa quando comparada a outras linhagens (SJL/J, DBA/2 e C3H/HeJ).

A heterogeneidade interindividual tem sido demonstrada também quanto a diferenças na intensidade da resposta inflamatória. HUNT e colaboradores em 2012 compararam as linhagens MRL e C57BL/6 e demonstraram que os animais MRL sobrevivem mais ao infarto induzido cirurgicamente, apresentam um menor infiltrado inflamatório e menos apoptose quando comparados à linhagem C57BL/6.

Outros trabalhos, inclusive do nosso grupo de pesquisa, também reportaram diferenças entre linhagens de camundongos na formação de vasos sanguíneos, fibrogênese e produção de citocinas na lesão ou no tecido de reparo, mostrando o quanto a variação genética pode ser crucial na resposta a

um mesmo estímulo (ROHAN et al, 2000; CHALOTORN et al, 2007; MARQUES et al, 2011; SAMPAIO et al, 2012). No entanto, não encontramos na literatura qualquer estudo que avaliou a influência da heterogeneidade genética na resposta inflamatória a lesões na cavidade peritoneal induzidas por estímulos mecânicos.

Tendo em vista a alta prevalência do uso de implantes e biomateriais no reparo de lesões teciduais, particularmente na cavidade peritoneal, investigar a influência do background genético em processos induzidos por corpos estranhos neste compartimento anatômico poderá elucidar diferenças individuais na utilização desta abordagem terapêutica e possíveis resultados adversos deste procedimento.

1.4 Cavidade peritoneal e peritônio

A cavidade peritoneal é um espaço definido pelo peritônio e abriga um grande número de órgãos. É estruturalmente complexa e contém uma grande quantidade de líquido viscoso que age lubrificando as superfícies internas. (WATSON et al, 1989). Nela estão presentes uma variedade de células do sistema imune, entre elas linfócitos T, linfócitos B, células *natural killer (NK)*, granulócitos e fagócitos do sistema mononuclear (CASSADO, 2011).

O peritônio é a maior das membranas serosas, com uma área de superfície igual à da pele. É revestido por células mesoteliais frouxamente ligadas à membrana basal. O tecido conjuntivo subjacente consiste principalmente de fibras colágenas frouxas, incluindo fibroblastos, vasos

sanguíneos e linfáticos, bem como fibras nervosas (BITTINGER et al, 1997). A Figura 1 ilustra os principais tipos celulares da cavidade peritoneal. O peritônio é importante porque controla a passagem de substâncias, facilita os movimentos dos órgãos abdominais e também os protege contra atritos (FIGURA 1) (ABU- HIJLHE et al, 1995). Em condições normais, dentro da cavidade peritoneal em humanos encontra-se cerca de 100 mL de fluido com propriedades bactericidas e bacteriostáticas. Esse fluido é caracterizado por baixo conteúdo celular e proteico. Além disso, sua quantidade pode aumentar e a composição pode ser alterada em diferentes condições patológicas (BEELEN, 1991).

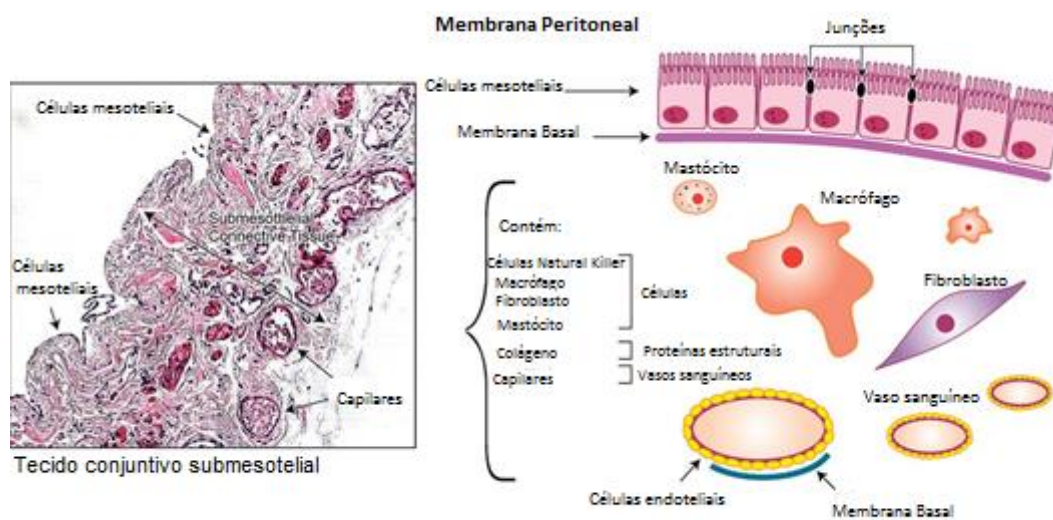


FIGURA 1: Principais componentes celulares da membrana peritoneal (Adaptado de YOUNG et al, 2013)

1.5 Lesões intraperitoneais e o processo de cicatrização

Injúria na cavidade peritoneal é um fenômeno comum. Ela pode ser decorrente de trauma, cirurgia, infecção, processos malignos, implantes de biomateriais e está associada com inflamação da serosa. Após uma lesão do peritônio, uma reação inflamatória local provoca aumento da permeabilidade vascular em vasos sanguíneos que suprem a área danificada e as células mesoteliais podem ser retiradas prontamente por leve trauma (BRUGGMANN et al, 2010; LAUDER et al., 2010; ATTA, 2011). A lesão estimula também a ação plaquetária, que libera citocinas para o reparo tecidual e ativam a cascata da coagulação. Após a hemostasia ser atingida com a formação do trombo, ocorre a migração de polimorfonucleadas (PMN). Quanto maior for o número de PMN, maior será a produção de citocinas e fatores de crescimento que vão induzir a neovascularização e a migração e proliferação de fibroblastos. Juntos estes processos coordenam a transitória deposição de fibrina que ocorre desde o início da lesão. Normalmente, o ativador da atividade de plasminogênio (PAA) sintetizado nas células mesoteliais e fibroblastos submesoteliais, degrada a massa fibrinosa, resultando na cura de superfícies peritoneais dentro de 72 a 96 horas, sem aderências. Um esquema representativo da cinética da infiltração celular em resposta à inflamação peritoneal é mostrado na Figura 2. O primeiro tipo celular que aparece no peritônio lesionado são neutrófilos que persistem por 1 a 2 dias. O aparecimento de monócitos a partir de 48 horas, que mais tarde se diferenciam em macrófagos tem seu pico aos 5 dias após a lesão. No terceiro dia, as células mesoteliais se aderem aos macrófagos na superfície da lesão. A partir do 4^o dia até o 7^o as células mesoteliais são

predominante na superfície peritoneal. Estas células proliferam na base da ferida e formam múltiplas ilhas. A confluência destas ilhas permite a cicatrização rápida da ferida independente do tamanho da lesão.

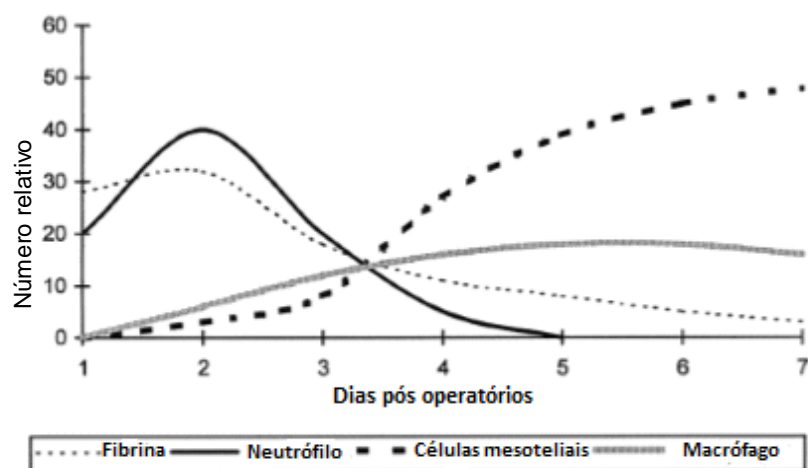


FIGURA 2: Alterações sequenciais no número relativo de elementos celulares e fibrina durante o reparo peritoneal normal em ratos. (Adaptado de Cheong et al, 2001)

No entanto, se o PAA está diminuído, a massa fibrinosa persiste e os fibroblastos subjacentes migram para a massa fibrinosa. Os fibroblastos depositam matriz extracelular, incluindo colágeno e fibronectina, conduzindo a formação de aderências (BRUGGMANN et al, 2010; LAUDER et al., 2010; ATTA, 2011). A fibrina possui capacidade adesiva promovendo aposição visceral e as resultantes, aderências fibrosas. Estudos recentes mostram que fibroblastos presentes no tecido da aderência possuem um fenótipo diferente

dos de tecidos normal, variando quanto à forma e quanto à secreção de citocinas (BUTUREANO & BUTUREANO, 2014). Estas lesões constituem as principais complicações da cicatrização peritoneal após cirurgia abdominal, isquemia, trauma, infecção ou introdução de material estranho no abdômen e ocorrem em cerca de 90% dos pacientes submetidos à cirurgia abdominal (ATTA, 2011; AYSAN et al, 2012; DI FILLIPO et al, 2012; UYSAL et al., 2012; BUTUREANO & BUTUREANO, 2014). Além disso, podem também causar sangramento, obstrução intestinal, infertilidade feminina secundária e gestação ectópica constituindo-se na principal causa de dor abdominal e pélvica e mortalidade pós-cirúrgica (CHEONG, 2001; CHEGINI, 2002; BRUGGMANN et al, 2010; ATTA, 2011; ARUNG et al, 2011; DI FILLIPO et al, 2012; AYSAN et al, 2012; BROUCHHAUSEN et al; 2012; TURKOGU et al.; 2014). O risco de desenvolvimento de aderência aumenta com a idade, com o número de laparotomias e com a complexidade dos procedimentos cirúrgicos (CHEGINI et al, 2002; ATTA, 2011; YANG et al, 2012; BUTUREANO & BUTUREANO; 2014).

As aderências intraperitoneais são adjacências patológicas geralmente entre o omento, as alças intestinais e a parede abdominal. Essas ligações podem ser uma película fina de tecido conjuntivo, uma ponte fibrosa espessa contendo vasos sanguíneos e tecido nervoso ou um contato direto entre duas superfícies de órgãos. A patogênese da formação de aderências ainda não é bem compreendida e não existe um tratamento específico (TURKOGU et al., 2014). No entanto, acredita-se que seja uma consequência da irritação peritoneal e pode ser considerada uma etapa patológica da cascata de

cicatrização após lesão no abdômen. O balanço entre a deposição e degradação de fibrina é crítica na cicatrização peritoneal normal ou na formação de aderências. É amplamente aceito que nas aderências a fibrinólise seja insuficiente (ARUNG et al, 2012; TURKOGLU et al., 2014; DI FILLIPO et al., 2012). Atualmente, não há um método ideal nem tratamento específico para prevenir a formação/reformação de aderências (CHEONG 2001, BOEK et al, 2013). (ARUNG et al, 2012; BUTUREANO & BUTUREANO; 2014). Portanto, estudos que investiguem mecanismos, fatores e potenciais abordagens terapêuticas são de grande interesse médico. O diagrama abaixo mostra as principais vias da formação de aderências.

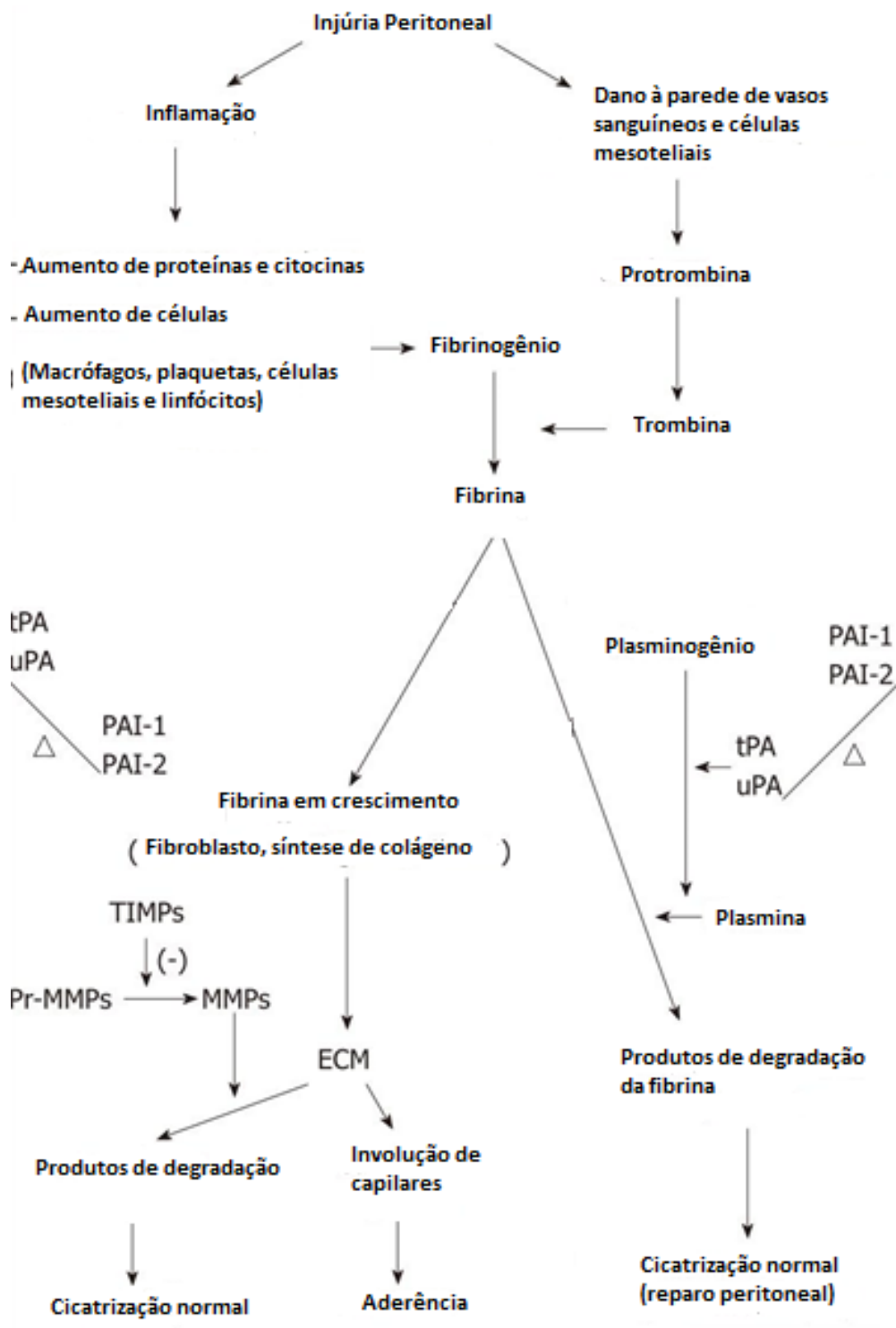


FIGURA 3: Vias de formação de aderência. Adaptado de Cheong et al, 2001

Além desta complicação, lesões intraperitoneais causadas por implantes de biomateriais, tais como órgãos artificiais, enxertos vasculares, dialisadores renais e sistemas de liberação controlada de fármacos, normalmente induzem uma resposta tipo corpo estranho que é caracterizada por recrutamento/ativação de células inflamatórias e subseqüentes encapsulação do biomaterial por um tecido fibrótico e células gigantes tipo corpo-estranho isolando-o dos tecidos adjacentes (CHRISTO et al, 2015; MOORE & KYRIAKIDES, 2015; MOONEY et al, 2010). O confinamento do biomaterial é um fator que limita sua funcionalidade (CHRISTO et al, 2015; DAI et al, 2015; MOORE & KYRIAKIDES, 2015).

Tanto a reação tipo corpo estranho quanto a formação de aderências apresentam processos comuns: inflamação, angiogênese e fibrogênese.

1.6 Inflamação

O processo inflamatório pode ser classificado em agudo e crônico. Após uma injúria peritoneal, a resposta imediata do tecido é promover a hemostasia, de forma a prevenir a perda excessiva de sangue. Vasos arteriais lesados são rapidamente constrictos através de contração do músculo liso na camada circular da parede do vaso, mediado pelo aumento dos níveis de cálcio citoplasmático. Dentro de alguns minutos, o fluxo sanguíneo reduzido mediado pela constrição arteriolar leva à hipóxia do tecido e acidose. Esses processos então irão promover a produção de óxido nítrico, adenosina e outros metabólicos vasoativos que irão causar um reflexo de vasodilatação e

relaxamento dos vasos arteriais. Simultaneamente, a liberação de histamina pelos mastócitos atua também para aumentar a vasodilatação e aumentar a permeabilidade vascular. Uma perda adicional de sangue nessa fase é prevenida pela formação de um coágulo de fibrina através da ativação da cascata de coagulação (HARPER et al., 2014; ZIELINS et al., 2014).

Esse aumento da permeabilidade vascular facilita a entrada de células inflamatórias para o espaço extracelular em torno da ferida. Os neutrófilos são as primeiras células imunes a chegar, apresentando seu pico de concentração entre 24 a 48 horas após a injúria (HARPER et al., 2014; ZIELINS et al., 2014). Essas células são recrutadas por diversos fatores, entre eles, componentes da cascata de complemento, quimiocinas e citocinas (WRIGHT et al, 2010). A principal função do neutrófilo é destruir debris e bactérias, prevenindo infecções. Os neutrófilos também apresentam outras funções, como ativação de queratinócitos, fibroblastos e células imunes. Uma vez que as funções dessas células tenham sido concluídas, essas sofrem apoptose ou são fagocitados por macrófagos (NUNES et al., 2011; HARPER et al., 2014; ZIELINS et al., 2014; KASUYA & TOKURA, 2014).

Os macrófagos são células fagocíticas que atingem o pico de concentração 48 a 72 horas após a lesão. Eles são atraídos para a ferida por mensageiros químicos liberados por plaquetas e células danificadas e são capazes de sobreviver no meio ácido gerado por esse estágio da ferida. Os macrófagos armazenam um grande reservatório de mediadores químicos, fatores de crescimento e citocinas, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 ou IL-12, TGF- β e EGF, que são importantes na regulação da resposta inflamatória, estimulando a angiogênese e favorecendo a formação de tecido de granulação

(THURASINGAM et al., 2010; HARPER et al., 2014; ZIELINS et al., 2014; KASUYA & TOKURA, 2014).

1.7 Angiogênese

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos, a partir de uma vasculatura pré-existente (STATON et al, 2004; CHAO & HIRSCHI, 2010; RICHARDSON & YODER, 2011). Embora a neoformação vascular seja benéfica para o crescimento e regeneração dos tecidos, um crescimento anormal dos vasos pode contribuir para a ocorrência de doenças inflamatórias ou malignas, tais como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, câncer, distúrbios inflamatórios, hipertensão pulmonar e distúrbios oculares (CARMELIET & JAIN, 2011).

A angiogênese ocorre através de um balanço dinâmico entre fatores pró e anti-angiogênicos, favorecendo a homeostase fisiológica. No tecido normal, a vasculatura permanece quiescente. Porém, diante de um estímulo, ocorre uma regulação positiva de fatores angiogênicos como, por exemplo, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e angiopoietinas (ANG). Em contrapartida, ocorre também uma regulação negativa de fatores anti-angiogênicos, como trombospondina, angiostatina e endostatina. Esses dois processos, uma vez associados, levam então ao desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (TOMAO et al., 2014).

Quando um vaso quiescente detecta um sinal angiogênico, liberado por células hipóxicas, inflamatórias ou tumorais, uma célula de ponta é selecionada

para garantir a formação do vaso. Essas células endoteliais se separam de suas células vizinhas, devido à ruptura de junções de caderinas do endotélio vascular. Os pericitos também se separam da parede dos vasos e há a degradação da membrana basal por enzimas proteolíticas tais como metaloproteinases de matriz (MMPs). Com isso, as células endoteliais afrouxam suas junções e o vaso nascente se dilata. O VEGF então aumenta a permeabilidade da camada de células endoteliais, causando extravasamento de proteínas plasmáticas e estabelecendo uma matriz extracelular (ECM) provisória. Em resposta à sinalização da integrina, as células endoteliais migram para essa superfície. Proteases liberam moléculas angiogênicas como VEGF e FGF e remodelam essa ECM. As demais células endoteliais então proliferam por detrás das células de ponta, alongando e formando um lúmen. Diferentes brotos se fundem para formar um novo vaso. A proliferação de células atraem pericitos e a deposição da membrana basal fica estabilizada. Células mielóides são recrutadas, podendo produzir fatores pró-angiogênicos ou estimular a liberação desses pela ECM. Após a fusão de vasos vizinhos, a formação de um lúmen permite a perfusão do neovaso (FIGURA 4). (BONNET & WALSH, 2005; ARROYO & IRUELA-ARISPEM, 2010; CARMELIET & JAIN, 2011).

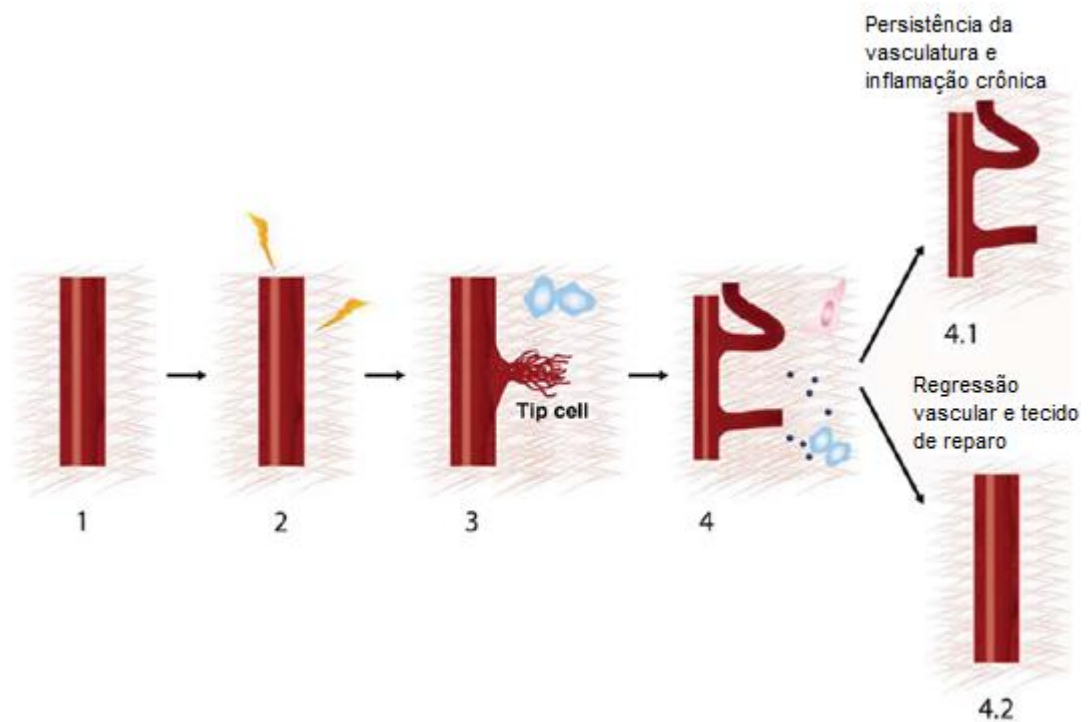


FIGURA 4- Etapas da angiogênese inflamatória. (1) Vasculatura quiescente. (2) Inflamação induzida por fontes locais ou sistêmicas ativam um processo angiogênico por aumento da permeabilidade vascular e por desestabilização de junções de células endoteliais. (3) Proteólise da matriz extracelular por células endoteliais em processo de “brotamento” induzidas por estímulo inflamatório. (4) Formação dos vasos estimulados por células e mediadores inflamatórios. (4.1) Persistência dos vasos e inflamação crônica. (4.2) Regressão vascular e tecido de reparo (Adaptado de ARROYO & IRUELA- ARISPEM, 2010)

1.8 Fibrose

A fibrose é resultado de uma lesão crônica e inflamação com uma reparação incompleta, que leva ao acúmulo de matriz extracelular (ECM). Quando prolongada, esse acúmulo pode se tornar excessivo, gerando impactos na estrutura e função do tecido lesado (MCCRACKEN et al, 2016).

Após uma lesão, fatores de crescimento (TGF, PDGF) liberados pelo coágulo estimulam a migração e proliferação de fibroblastos. No terceiro dia, a ferida se torna abundante em fibroblastos, que se apoiam em diferentes proteínas da matriz extracelular (ácido hialurônico, fibronectinas e proteoglicanos) e posteriormente produzem colágeno e fibronectina. O colágeno sintetizado por fibroblastos é o componente fundamental no fornecimento de uma boa resistência aos tecidos (UD-DIN & BAYAT, 2016). A fibronectina é essencial para a modulação de fibroblastos a miofibroblastos. Os miofibroblastos secretam grandes quantidades de proteínas da matriz extracelular, que ajudam a preservar a integridade do tecido. Nessa etapa, o colágeno é reorganizado em estruturas de rede que são determinados pelas características moleculares e propriedades mecânicas da ferida. Assim, há alterações na proporção de colágeno I e III, aumentando a resistência à tração do tecido. O colágeno imaturo do tipo III vai sendo substituído pelo maduro do tipo I, tornando o tecido cicatricial então semelhante ao tecido normal. Apesar disso, a ferida nunca atinge o mesmo nível de resistência do tecido normal, atingindo em média 50% de resistência original à tração nos 3 primeiros meses e apenas 80% a longo prazo. À medida que a cicatriz amadurece, o nível de vascularização diminui e a cor que originalmente era vermelha, passa para rosa e por fim, se torna cinza. O final dessa fase é caracterizado pela apoptose das células reparadoras (NAYAK et al., 2009; MURPHY et al., 2011; CUMMING et al., 2010; HARPER et al., 2014; ZIELINS et al., 2014; BONAVENTURA et al., 2016).

1.9 Migração celular

A migração celular desempenha um papel importante no desenvolvimento dos seres vivos, uma vez que permite o movimento das células para o local desejado. Esse processo é importante em diferentes etapas do desenvolvimento, começando na gastrulação e formação do embrião. No entanto, a migração celular continua crucial na fase adulta do indivíduo, tanto em processos fisiológicos, por exemplo na cicatrização de feridas, como em processos patológicos, no crescimento e desenvolvimento tumoral e outros (SCHUMACHER, et al, 2016).

Para que a migração ocorra, é necessário uma interação entre as células e o ambiente, que irão influenciar esse movimento, direcionando-o ou limitando-o. Assim, o movimento das células é caracterizado por uma coordenação, que é mediada por uma variedade de sinais (SCHUMACHER, et al, 2016).

Na cicatrização de feridas, a migração celular ocorre em diferentes momentos. Durante a inflamação, a liberação de uma série de citocinas estimulam a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos. Os macrófagos liberam fatores de crescimento, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), que estimulam a migração de células endoteliais, que levarão a formação de novos vasos sanguíneos. Além disso, outros fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformante (TGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), estimulam a migração de fibroblastos, que serão responsáveis pelo remodelamento da matriz

extracelular (PIRAINO & SELIMOVIC, 2015; HARPER et al., 2014; ZIELINS et al., 2014) .

No contexto da cavidade peritoneal, sabe-se que intervenções cirúrgicas geram respostas inflamatórias locais e sistêmicas, caracterizadas pelo aumento sistêmico dos níveis de hormônios do estresse e liberação local de citocinas. Estudos anteriores mostraram que após cirurgia, os níveis de TNF- α , IL-6 e IL-10 estão mais elevados na cavidade peritoneal que no sangue periférico, indicando que o ambiente peritoneal é fonte de produção de mediadores inflamatórios, que, conseqüentemente, podem afetar a migração celular (BERKOVICH et al, 2016, SOUDI et al, 2013).

Devido à importância da migração celular e sua possível alteração por mudanças na cavidade peritoneal, há uma motivação para desvendar as dúvidas ainda existentes inerentes a esse processo, uma vez que é um evento chave em processos fisiológicos e patológicos (SCHUMACHER, et al, 2016).

1.10 Modelos experimentais para o estudo da resposta tipo corpo-estranho e aderência intraperitoneal em animais

A resposta tecidual a corpos estranhos incluindo biomateriais e implantes médicos é conhecida como resposta tipo corpo estranho e caracterizada pelo recrutamento de células inflamatórias e subsequente encapsulamento do corpo estranho por tecido fibrótico. Vários estudos já caracterizaram a resposta tipo corpo-estranho a materiais implantados na cavidade peritoneal (coágulo sanguíneo fervido, tubos sintéticos, fragmentos de

clara de ovo). Estes materiais permanecem livres na cavidade, mas são encapsulados por um tecido fibrótico rico em monócitos/macrófagos e linfócitos (CAMPBELL & RYAN, 1983; CAMPBELL et al., 1999; MOONEY et al. 2010).

Na literatura é possível encontrar vários modelos capazes de induzir a formação de aderência intraperitoneal em animais. Deng e colaboradores em 2016 utilizaram uma técnica na qual foi realizada uma lesão no peritônio. Em seguida foi adicionado pó de luva na cavidade, o que levou então a formação de aderências.

Outro método utilizado é a abrasão da camada serosa do ceco de animais com o auxílio de uma lixa. Nesse modelo, realiza-se também uma esfoliação com bisturi da membrana abdominal diretamente em contato com o ceco lesado (BANG et al, 2016, BIANCHI et al, 2016).

BIANCHI e colaboradores, além de utilizarem a técnica de abrasão do ceco, já descrita, também induziram aderência pela técnica de botões isquêmicos, no qual se formam regiões com baixo suprimento de oxigênio. Essas regiões são criadas com o auxílio de pinças hemostáticas e induzem a formação de aderências (BIANCHI et al, 2016).

1.10.1 Modelo de implante de esponja

No modelo de implantação de esponja, a resposta do hospedeiro a uma matriz sintética é análoga à cicatrização. As matrizes esponjosas, inicialmente acelulares e não vascularizadas, são implantadas na região subcutânea ou na

cavidade intraperitoneal do animal, dependendo do que se deseja avaliar. Inicia-se, então, um processo complexo, primariamente gerido por células inflamatórias que acumulam dentro do compartimento da esponja e posteriormente por angiogênese e deposição de matriz extracelular no local da injúria. Assim sendo, este modelo proporciona um ambiente inflamado, em fase aguda ou crônica, dependendo do tempo em que o implante de esponja permanece no animal. Cada um dos vários componentes do tecido fibrovascular proliferativo (angiogênese, recrutamento e ativação de células inflamatórias e deposição de matriz extracelular) pode ser determinado após o extirpe e processamento do implante. O modelo de inflamação aguda é particularmente útil, permitindo a coleção e análise das fases fluidas e celulares do exsudato formado dentro da esponja. O modelo também foi modificado para o estudo de respostas inflamatórias mais crônicas e avaliação do tecido de granulação (ANDRADE et al., 1997; BRADSHAW, et al., 2001; BELO et al., 2005; CAMPOS et al., 2006; CASTRO et al., 2014).

O modelo de implante de esponja vem sendo amplamente estudado e utilizado para vários fins, como testes de drogas, estudo do diabetes do desenvolvimento de tumores, e também para avaliação da aderência peritoneal entre outros (TEIXEIRA et al., 1999; ANDRADE & FERREIRA et al, 2009; MENDES et al., 2009; ARAÚJO et al., 2011; SAMPAIO et al., 2012; VIANA et al., 2013; LIMA et al., 2014; OLVIDO-SACARRAS et al, 2014).

Já foi mostrado que a implantação cirúrgica de matrizes esponjosas na cavidade peritoneal em camundongos induziu intensa aderência de vários órgãos da cavidade peritoneal ao implante (particularmente fígado e intestino). O tecido fibroproliferativo das aderências foi caracterizado quanto à formação

de novos vasos sanguíneos, o recrutamento de células inflamatórias, a deposição de colágeno e a produção de citocinas relevantes envolvidas nestes eventos (MENDES et al., 2009; ARAÚJO et al., 2011). Este modelo foi utilizado para avaliar o efeito de compostos (estatinas, inibidores de fosfodiesterases; própolis) com atividade anti-angiogênica e anti-inflamatória em outros processos patológicos e mostraram ser eficazes em atenuar a formação de aderências intraperitoneais induzidas por implantes de matriz sintética (MENDES et al., 2009; ARAÚJO et al., 2011; LIMA et al, 2014). Dessa forma, esse modelo apresenta-se adequado para avaliar a influência do background genético na formação de aderências em camundongos hetero- e isogênicos, bem como a resposta destas lesões ao dipiridamol.

1.11 Abordagens terapêuticas na prevenção e controle de aderências

Terapias atuais na prevenção de aderências são limitadas, uma vez que a fisiopatologia do desenvolvimento das aderências até os dias de hoje ainda não está totalmente esclarecida (BRAUN & DIAMOND, 2014).

As terapias incluem técnicas cirúrgicas mais cuidadosas, barreiras mecânicas e intervenções medicamentosas. Entre as barreiras mecânicas utilizadas estão incluídas barreiras sólidas, como a celulose renegerada oxidada, a politetrafluoroetileno, hialurato de sódio e o filme de carboximetilcelulose. Há também barreiras líquidas, como a icodextrina 4% e dextran 32% e barreiras na consistência de géis, como óxido polietileno, gel

glicol polietileno, e gel hialuronato férrico, entre outros (HINDOCHA et al, 2015; BRAUN & DIAMOND, 2014).

Entre as intervenções medicamentosas, vários tipos de drogas já foram testadas. Entre os antiinflamatórios, foi demonstrado que administração de corticóides como a prednisolona e dexametasona pode ser capaz de prevenir a formação de aderências em modelos animais (AHMAD et al, 2014; DU et al, 2015). Outra droga, com característica anti-inflamatória e antiangiogênica, o etil piruvato, também foi capaz de prevenir a formação de aderência em modelos animais (CAGLAYAN¹ et al, 2014).

Além disso, outras classes de drogas já foram investigadas quanto à aos seus efeitos na prevenção da formação de aderências, como por exemplo, os anticoagulantes. ALKHAMESI e SCHLACHTA em 2013 demonstraram que a heparina, em associação com o ácido hialurônico, é uma droga eficiente para prevenção da formação de aderências pós-operatórias. No entanto, esses achados são discordantes de outros trabalhos encontrados na literatura. AHMAD e colaboradores em 2014 descrevem que não há evidências de que a heparina possa inibir a formação de aderências. Além disso, o uso de anticoagulantes pode ser um problema uma vez que aumenta o risco de hemorragias (AYDOSELI et al, 2015).

Drogas com características antifibrogênicas, como a breviscapina e o próprio fator ativador de plasminogênio tecidual (tPA) também já foram avaliados e apresentaram resultados promissores na prevenção da formação de aderência pós-cirúrgica (ZHANG et al, 2015; TOPAL et al, 2010)

Ademais, alguns antibióticos, como a linezolida, cefazolina, ceftriaxona e imipenem também foram capazes de inibir a formação de aderência (CAGLAYAN et al, 2014²; KAYAOGU et al, 2013; AYTAN et al, 2009).

1.11.1 Dipiridamol

Vários estudos utilizando fragmentos de aderências humanas ou de modelos experimentais têm mostrado que este novo tecido em formação vai se tornando altamente diferenciado, vascularizado, innervado e infiltrado por muitos tipos celulares, os quais produzem uma grande variedade de moléculas pró-inflamatórias, pró-angiogênicas e pró-fibrogênicas (LUIJENDIJK et al., 1996; CHEONG et al., 2001; EPISTEIN et al., 2006; BROUCHHAUSEN et al; 2012). A atenuação ou inibição de um ou mais componentes envolvidos nesses processos responsáveis pela formação de fibrose peritoneal, representa um ponto chave no desenvolvimento de estratégias para prevenir a formação de aderência intraperitoneal. Assim, compostos com propriedades anti-inflamatória, anti-angiogênica e/ou anti-fibrogênica são de grande interesse e relevância clínica (BROUCHHAUSEN et al; 2012; TURKOGLU et al.; 2014).

O dipiridamol (DP) é uma droga que inibe a recaptção de adenosina, um produto de decomposição do trifosfato de adenosina (ATP). Normalmente, a adenosina livre é rapidamente removida do plasma por transportadores específicos. O DP bloqueia o transportador equilibrativo de nucleosídeo (ENT), inibindo a recaptção da adenosina por hemácias, aumentando então seus níveis séricos. A adenosina age através de receptores de adenosina, estimulando a adenil ciclase em plaquetas e aumentando os níveis intracelulares de monofosfato de adenosina cíclica (AMPc). Além disso, essa

droga é um inibidor da fosfodiesterase, em especial da fosfodiesterase 5 e 6, que estão envolvidas na hidrólise do monofosfato guanina cíclica (GMPc) e AMPc.. Assim, o DP aumenta os níveis intracelulares de AMPc e de GMPc, tanto por inibir a quebra dessas moléculas quanto por impedir a recaptação de adenosina (FIGURA 5). Por aumentar os níveis de AMPc e GMPc nas plaquetas, o DP inibe a agregação plaquetária e previne doenças trombóticas mediadas por plaquetas (GIBB et al.; 1990; GAMBOA et al.,2005; KIM & LIAO, 2008; RAMAKERS et al.; 2011; DOUMAS et al.; 2014).

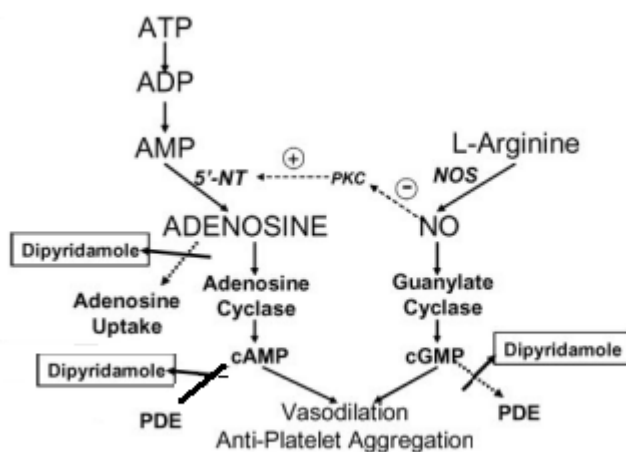


FIGURA 5: Mecanismo de ação do dipiridamol (Adaptado de GAMBOA et al., 2005).

O dipiridamol é amplamente usado há vários anos como agente antitrombótico e antiplaquetário, e além de efeitos benéficos em diversas condições vasculares, tem mostrado outras atividades biológicas, tais como efeitos antiinflamatórios, antiproliferativos, antifibrogênicos e antifosfodiesterase (HUNG et al., 2001; VENKATESH et al., 2010; PATILLO et al., 2011; MASSARO et al., 2013; SAMPAIO et al.; 2013; BALAKUMAR et al, 2014).

Estudos anteriores já tem demonstrado o efeito antiproliferativo do dipiridamol em células do músculo liso vascular de ratos e células mesangiais humanas (FITZGERALD, 1987; IIMURA et al, 1996; HILLIS, 1998; KIM et al, 2007). Em células mesangiais humanas, HUNG e colaboradores em 2001, demonstraram que o dipiridamol inibe a indução do gene de expressão do colágeno pela citocina TGF- β , minimizando então a ocorrência de fibrose. Além disso, tem sido demonstrado que a droga aumenta a perfusão em tecidos isquêmicos, angiogênese e arteriogênese devido ao aumento da biodisponibilidade de NO (GAMBOA et al., 2005; KIM & LIAO, 2008; VENKATESH et al., 2010; PATILLO et al., 2011). Com relação à inflamação, Balakumar e colaboradores mostraram que o dipiridamol pode reduzir a inflamação, uma vez que diminuiu os níveis de citocinas pró-inflamatórias e conseqüentemente o número de células inflamatórias (BALAKUMAR et al, 2014).

A evidência experimental de que o DP exerce outras ações terapêuticas além daquelas primariamente descritas é um importante direcionamento no reposicionamento de fármacos (nova indicação para uma droga existente). Essa atividade é bem mais vantajosa que o desenvolvimento de novas drogas, uma vez que reduz os custos e diminui o tempo de aprovação e lançamento. Além disso, diminui substancialmente também o risco associado com a descoberta da droga convencional, uma vez que utiliza dados farmacocinéticos, toxicológicos e de segurança já existentes (KIM; 2014). Estudos prévios do laboratório mostraram a eficácia deste composto na atenuação da angiogênese inflamatória induzida por implantes subcutâneos em camundongos. Além disso, disso foi observada sensibilidade diferencial ao DP entre camundongos Swiss e Balb/c (PORTELA et al., 2012). No entanto, ainda

não foram demonstrados os efeitos deste composto nos componentes inflamatório, angiogênico e fibrogênico do tecido fibroproliferativo induzido por implante intraperitoneal em murinos de diferentes linhagens. Se for demonstrada sensibilidade diferencial deste composto no tratamento de lesões na cavidade peritoneal entre diferentes linhagens de camundongos, então abordagens terapêuticas individuais devem ser sugeridas nestas condições patológicas.

Um grande número de trabalhos tem mostrado que a heterogeneidade genética é um fator determinante nas diferenças morfológicas e funcionais intrínsecas em vários processos fisiológicos e patológicos em humanos e animais experimentais. No entanto, a influência deste fator no reparo de lesões da cavidade abdominal em diferentes linhagens murinas ainda não foi avaliada. Lesões neste compartimento anatômico decorrentes de trauma, cirurgia, infecção, processos malignos, implantes de biomateriais estão frequentemente associadas a processos fisiopatológicos como a reação tipo corpo estranho e a formação de aderências, constituindo as principais causas de morbidade e mortalidade pós-cirúrgica. Particularmente, a alta prevalência do uso de implantes e biomateriais no reparo de lesões teciduais requerem o entendimento e caracterização de eventos biológicos envolvidos no processo. Assim, a proposta deste trabalho foi investigar a participação da heterogeneidade genética nas respostas inflamatória, angiogênica e fibrogênica de diferentes linhagens murinas à implantação de matriz sintética na cavidade peritoneal. Espera-se que este estudo, possa contribuir para elucidar respostas individuais diferenciadas não apenas a um mesmo tipo de lesão, como também a intervenções terapêuticas utilizadas.

OBJETIVOS

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da heterogeneidade genética na inflamação, angiogênese e fibrogênese intraperitoneais induzidas por implantes de matriz sintética em linhagens murinas isogênicas (DBA/1, C57BL/6 e Balb/c) e heterogênicas (Swiss).

4.1 Objetivos específicos-

- Caracterizar nas linhagens C57BL/6, Balb/c, Swiss e DBA/1 as respostas inflamatórias aguda (24 h) e crônica (7 dias) à implantação da matriz sintética de polieter-poliuretano na cavidade abdominal, utilizando-se parâmetros funcional e bioquímicos.

- Avaliar o perfil de migração celular de células cultivadas do lavado peritoneal de animais das quatro linhagens.

- Avaliar o desenvolvimento de aderências intraperitoneais induzidas por um mesmo estímulo mecânico (matriz sintética) nas diferentes linhagens.

- Caracterizar o perfil da inflamação angiogênese e fibrose neste tecido por meio de marcadores inflamatórios (MPO, NAG, TNF- α , CCL-2, nitrito), angiogênicos (hemoglobina, VEGF) e fibrogênicos (colágeno e TGF- β 1).

- Avaliar e comparar características histológicas das aderências nas quatro linhagens utilizando-se técnicas histoquímicas, para a determinação da celularidade, presença de vasos sanguíneos e infiltração de células inflamatórias.

- Avaliar o efeito do dipiridamol na formação das aderências objetivando detectar sensibilidade diferencial das linhagens murinas ao tratamento.

METODOLOGIA

3 MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados animais machos das linhagens Swiss, Balb/c, C57BL/6 e DBA/1, com idade de 6 a 8 semanas, pesando aproximadamente 25-30 gramas, provenientes do Centro de Pesquisa René Rachou. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos com livre acesso à água e a ração. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais do Centro de Pesquisa René Rachou, sob o número de licença LW-5/13.

3.2 Implantes sintéticos para indução da inflamação e aderências

Foram confeccionados discos de esponjas de poliéter poliuretano com 1.2cm de diâmetro (Vitafoam Ltd Manchester). Esses implantes foram conservados em álcool 70% v/v durante as 24 horas anteriores à implantação e, posteriormente, fervidos em água destilada por 30 minutos (ANDRADE et al.,1987). Para o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados via intra-peritoneal (i.p.) com 10 μ l/g de peso corporal da solução de Ketamina/Xilazina (2,0:1,5), e submetidos à assepsia e à tricotomia da região abdominal. Em seguida, foi realizada uma incisão de aproximadamente 1 cm na pele e no músculo peritoneal, e assim o disco de esponja foi introduzido na cavidade abdominal, do lado esquerdo do animal, um pouco acima da incisão. A seguir, as mesmas foram suturadas. Após recuperação da anestesia os animais foram colocados em gaiolas individuais (ANDRADE et al., 1987).

3.3 Avaliação do fluxo sanguíneo cutâneo em camundongos DBA/1, Swiss, Balb/c e C57BL/6 (Difusão da fluoresceína)

Supondo-se que o implante cirúrgico de esponja na região intraperitoneal poderia alterar a permeabilidade vascular localmente, utilizamos a técnica de difusão da fluoresceína para avaliar o efeito do background genético na permeabilidade vascular (sinal do processo inflamatório) na cavidade abdominal. Esta técnica é utilizada clinicamente para avaliar a vascularização ocular e a drenagem venolinfática e foi adaptada para avaliar a vasculatura cutânea, a angiogênese inflamatória e tumoral em camundongos (TEIXEIRA et al., 2005). Ela baseia-se no princípio de que a intensidade da fluorescência detectada na circulação sistêmica reflete o fluxo sanguíneo no local da aplicação do marcador fluorescente (fluoresceína sódica). Assim, quanto maior o fluxo sanguíneo no local de aplicação, mais rápido é obtido o pico da fluorescência na circulação sistêmica. Para avaliar a difusão da fluoresceína, foram utilizados animais não implantados e implantados 24 horas antes. O objetivo foi determinar a influência do background genético nos parâmetros vasculares inflamatórios antes e após o estímulo do implante. Foram utilizados 5 animais de cada grupo para se estabelecer esses valores. O protocolo para avaliação da permeabilidade vascular consistiu em injetar 10 μ l de fluoresceína sódica 1% (Sigma, USA) na cavidade abdominal dos animais anestesiados. Em tempos previamente determinados (1', 3', 5', 7', 10', 15', 20', 25' e 30'), foram coletados 15 μ l de sangue da veia da cauda do animal e adicionados a 3 ml de salina de NaCl a 0,9% (FIGURA 6). Uma amostra de sangue foi coletada antes da injeção do marcador fluorescente para

determinação do valor basal da fluorescência sanguínea. Após centrifugação por 5 minutos a 3000g, o sobrenadante foi coletado para leitura fluorimétrica em espectrofotômetro de fluorescência (Varian) em uma excitação/emissão de 485/520. Os resultados foram expressos como pico de fluorescência/min (tempo necessário para a obtenção do pico da fluorescência na circulação sistêmica).

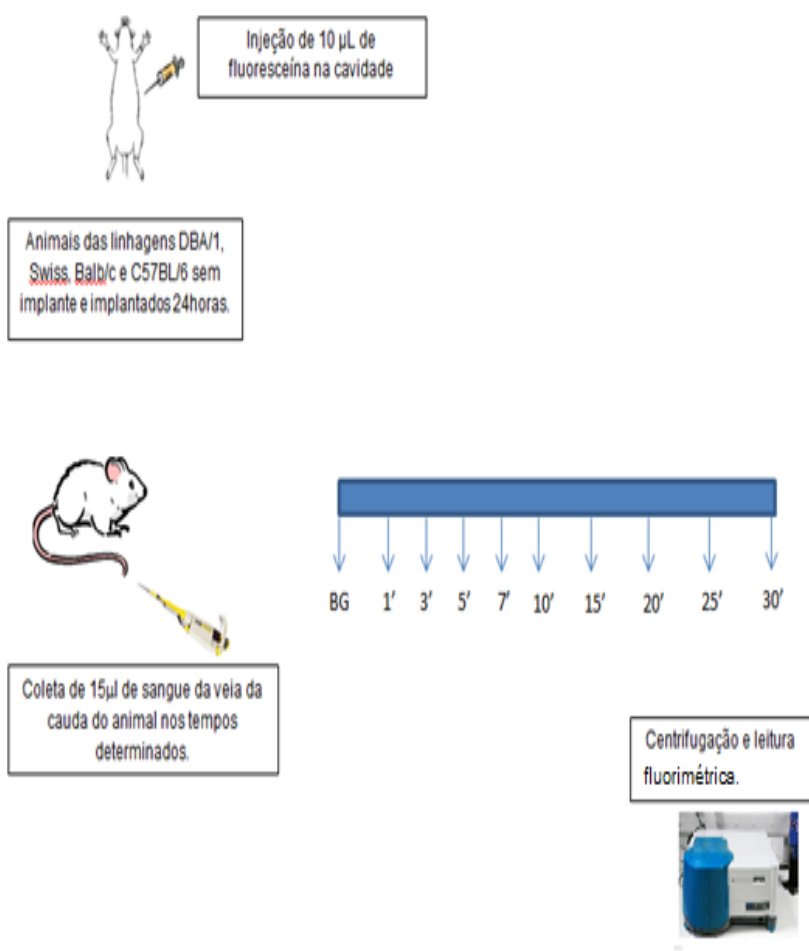


FIGURA 6: Esquema representativo da técnica de difusão da fluoresceína sódica. Foram injetados 10 μ l de fluoresceína na cavidade peritoneal de camundongos das 4 linhagens, não implantados e implantados 24 horas antes. Amostras de sangue da veia da cauda dos animais foram retiradas em tempos pré-determinados. Após homogeneização em 3 mL em solução de NaCl a 0,9%, e centrifugação, a fluorescência no sobrenadante foi detectada em um espectrofotômetro de fluorescência (Varian). BG: background

3.4 Lavado peritoneal

Esta série de experimentos foi realizada para determinar níveis basais de marcadores inflamatórios no fluido peritoneal e a resposta inflamatória aguda e crônica das diferentes linhagens ao implante de polieter-poliuretano. Grupos de 6 animais de cada linhagem receberam implantes e o lavado peritoneal foi coletado 24 horas ou 7 dias pós-implantação. Grupos controle não receberam implantes. Para a obtenção do lavado peritoneal os animais (implantados) e controles (não-implantados), foram inicialmente submetidos a eutanásia. A seguir, foram injetados 5 mL de PBS (pH 7,2-7,4, NaCl (8g/1000 mL), KCl (0,2 g/1000 mL), Na₂HPO₄ (1,15/1000 mL), KH₂PO₄ (0,21/1000mL)) rapidamente na cavidade peritoneal dos animais. A região do abdômen foi então massageada e o líquido na cavidade foi retirado com auxílio de uma pipeta de Pasteur e utilizado para as dosagens de marcadores inflamatórios.

3.5 Cultura celular

As células do lavado peritoneal foram preparadas como descrito anteriormente. Em seguida, foram cultivadas em meio Eagle modificado por

Dulbecco (DMEM) completo suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2mM de glutamina e 1% de antibiótico (100U/ml de penicilina; 100 µg/ml de estreptomicina) em um frascos com área de superfície de 25 cm² em incubadora 5% CO₂ a 37°C. Após atingir confluência de 90 – 95% as células foram semeadas em placas de cultura de células de seis poços para realização de ensaio de migração celular por *scratch*.

3.6 Ensaio de migração celular

As células do lavado peritoneal foram cultivadas em meio DMEM sob incubação (10% SFB; 5% CO₂; 37°C) até atingirem uma confluência de aproximadamente 90%. Nesse momento, o meio foi substituído por DMEM (2% SFB, 5% CO₂; 37°C). Foi realizado, então, o *scratch* dos poços sob a forma de duas linhas verticais e contínuas em toda a extensão do poço, utilizando-se para isso uma ponteira de 200 µL. A migração das células do lavado peritoneal foi avaliada através de microscopia de contraste de fases e imagens foram obtidas através de câmera digital (Zeiss) imediatamente e 24 horas após realização do *scratch*. O software Image J foi utilizado para avaliar as áreas livres de células.

3.7 Indução de aderências e tratamento com dipiridamol

Nestes experimentos, grupos de animais (n=12) das diferentes linhagens receberam implantes intraperitoneais conforme descrito acima, que foram

removidos 7 dias pós-implantação. Metade destes animais foram tratados com dipiridamol na dose de 200 mg/Kg de peso (SAMPAIO et al, 2012), diariamente, a partir do primeiro dia de implante e nos 6 dias seguintes. Os animais dos grupos controle receberam água.

3.8 Processamento dos implantes para as dosagens dos marcadores inflamatórios, angiogênicos e fibrogênicos

Para todas as dosagens os implantes removidos aos 7 dias pós-implantação foram pesados e homogeneizados em 1,5 mL de reagente de Drabkin.

3.9 Dosagem de hemoglobina

Os implantes pesados e homogeneizados em 1,5 mL de um reagente de Drabkin foram centrifugados a 4° C a 10000g por 40 minutos. Em seguida, os sobrenadantes foram filtrados em membranas de 0,22µm (Millípore) e colocados em placas com 96 poços. A leitura foi realizada por espectrofotometria a 540 nm e a concentração de hemoglobina foi determinada por comparação a uma curva padrão de hemoglobina. Os resultados obtidos foram expressos em concentração de hemoglobina (microgramas- µg) por miligrama-mg de peso úmido do implante (BARCELOS et al, 2005; FERREIRA et al, 2004).

3.10 Avaliação da atividade da mieloperoxidase

Após a dosagem de hemoglobina, o sobrenadante foi armazenado e os implantes divididos em fragmentos iguais. As partes foram pesadas e utilizadas para dosagem da mieloperoxidase e N-acetil- β -D-glicosaminidase. Inicialmente, o sedimento foi homogeneizado e ressuspenso em 2,0 mL de tampão fosfato de sódio, pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,015 M de NaEDTA) e centrifugado a 3000 g durante 10 minutos. Foram retirados então 200 μ L do sobrenadante e adicionados 200 μ L de tampão de fosfato de sódio 0,05 M (pH 5,40 contendo 0,5% de hexa-1,6-bisdecyltrimethylammonium bromide (HTAB)). A atividade da enzima MPO no sobrenadante foi mensurada através da mudança de absorvância (densidade óptica; OD) a 450nm adicionando-se simultaneamente 100 μ L de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), preparada em DMSO em uma concentração final de 1,6 mM e 100 μ L de substrato H₂O₂ na concentração final de 0,3 mM, dissolvida em tampão fosfato (pH 5,4). A reação foi interrompida com a adição de 100 μ L de H₂SO₄ (4M) e quantificada colorimetricamente à 450 nm em leitor de microplaca. Os resultados foram expressos em densidade óptica (OD) por miligrama de tecido úmido. Para a dosagem de MPO no lavado peritoneal, foram adicionados 400 μ L do mesmo em 2,0 mL de tampão fosfato de sódio. As etapas seguintes foram idênticas à dosagem no implante.

3.11 Avaliação da atividade da N-acetil-βD- glicosaminidase (NAG)

Os implantes foram homogeneizados em uma solução de NaCl (0,9% vv-1) contendo 0,1% v v-1 Triton X-100 e centrifugado (3000 xg; 10 min 4°), por 10 minutos. Em seguida, alíquotas de 100 µL foram colocadas em uma placa de 96 poços e acrescidas com 100 µL de p-nitrophenyl-N-acetyl-β-glucosaminide, preparado em um tampão de citrato-fosfato (pH 4,5) em uma concentração final de 2,34 mM. Posteriormente, a placa foi incubada à 37° C durante 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2M pH 10,6. A absorbância foi medida por leitor de microplaca (Termoplate) em comprimento de onda de 400nm. Os resultados foram expressos em densidade óptica (OD) por grama de tecido úmido.

Para a dosagem de NAG no lavado peritoneal, foram adicionados 400 µL do mesmo em 200 µL de salina Triton. As etapas seguintes foram idênticas à dosagem no implante.

3.12 Dosagem de nitrito

A produção de óxido nítrico foi avaliada através da mensuração dos níveis de nitrito de acordo com o método descrito por Green et al em 1982. Para a dosagem de nitrito no lavado peritoneal, a 400 µL do mesmo foram acrescidos 500 µL de PBS e levados à incubação por 15 minutos a 37° C. Para a dosagem nos implantes, foram utilizadas as amostras da dosagem de NAG. Estas foram submetidas à mesma temperatura e tempo de incubação, porém sem adição de PBS. Em seguida 100 µL dessas amostras (implante ou lavado)

foram pipetados e adicionados a placa de ELISA. A esta solução foram adicionados 100µL de reagente de Griess (0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine, 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄) e a densidade ótica determinada a 540 nm. O conteúdo de nitrito foi calculado segundo uma curva padrão usando nitrito de sódio (Sigma-Aldrich). Os resultados foram expressos em µg/mg ou µg/mL.

3.13 Quantificação de citocinas (VEGF, TNF-α, CCL-2, KC, TGF-β1)

Para a determinação destas citocinas nos implantes foram utilizados 100 µL do sobrenadante dos tecidos ou 100 µL do lavado peritoneal. Para a realização do ensaio, diluições do sobrenadante foram adicionadas em duplicada à placa de ELISA que continha um anticorpo monoclonal específico. Em seguida, foi adicionado um anticorpo de detecção. Após realizar a lavagem para remover os anticorpos que não se ligaram, uma solução de substrato foi adicionada a placa de ELISA (50 µL de uma 1:1 solução de peróxido de hidrogênio e 10mg/ml de OPD). A reação foi interrompida após 20 minutos de incubação com 50µL de ácido sulfúrico (2N) e a intensidade da cor foi quantificada a 540nm em leitor de microplaca (Thermoplace). Os resultados foram expressos como pg de citocina por mg de peso úmido ou pg/mL.

3.14 Quantificação de colágeno

A quantidade de colágeno solúvel total foi determinada colorimetricamente baseada na reação de picrossirius red. Os implantes foram

homogeneizados com tampão (1mL Triton X, pH 7,8). Em seguida, foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 50µL do reagente picrossirius red a 100 µL da amostra. Após incubação de 20 minutos a temperatura ambiente, o complexo colágeno-picrossirius red foi centrifugado a 10000 g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e o sedimento foi lavado com 500 µL de etanol (99% puro e livre de metanol) e o complexo colágeno-corantes foi reconstituído em 1mL de reagente alcalino (NaOH 0,5M). A absorvância foi quantificada a 540nm em leitor de microplacas (Thermoplate). A quantificação de colágeno foi determinada através da comparação de uma curva padrão utilizando padrão de gelatina (Merck) e os resultados expressos em µg de colágeno por mg de implante.

3.15 Avaliação histológica

Os implantes foram retirados delicadamente, desligados da aderência e fixados em formol tamponado a 10% por no mínimo 48 horas e processados para inclusão em parafina. As seções de 5 µm obtidas foram coradas em hematoxilina e eosina e processadas para estudos microscópicos. Para a análise morfométrica do número de vasos, 15 campos (8,533 µm²) foram capturados das imagens em microscópio luminoso com objetiva de 40X (OlympusBX-640, magnificação final = 400x). As imagens foram digitalizadas com TK-1270/JGB microcâmara (JVC Advanced Media, Schaumburg, IL) e analisadas usando Image-Pro Plus 4.5 software program (Media Cybernetics Inc., Rockville, MD).

3.16 Análise estatística

Todos os dados estão expressos em média \pm SEM. Comparações foram feitas entre os quatro grupos para cada variável em cada momento avaliado, utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida por fator de correção Newman-Keuls para comparações múltiplas. O teste T de Student foi utilizado para comparação entre 2 grupos. Diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando os valores de p foram menores que 0,05.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Influência do background genético na permeabilidade vascular da cavidade peritoneal, no perfil inflamatório e na migração celular do lavado peritoneal induzidos por implantes sintéticos.

Os resultados desta primeira série de experimentos mostraram que constitutivamente e após a implantação da matriz sintética na cavidade abdominal as diferentes linhagens de camundongos apresentaram permeabilidade vascular e níveis de marcadores inflamatórios distintos. Já foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa que o teste de difusão da fluoresceína avalia a permeabilidade/fluxo sanguíneo do tecido ao marcador fluorescente após sua aplicação intradérmica, em implantes e tumores e na cavidade peritoneal de camundongos (ANDRADE et al., 1997; LAGE & ANDRADE, 2000; LIMA et al., 2014). Assim quanto mais permeável e/ou mais vascularizado for o tecido, menor o tempo necessário para a obtenção do pico da fluorescência na circulação sistêmica. Neste estudo mostramos que em animais não portadores de implantes, a permeabilidade ao marcador fluorescente foi maior em camundongos DBA/1 com o pico de fluorescência alcançado aos $16 \pm 1,9$ min após a injeção da fluoresceína. Em camundongos Balb/c e C57BL/6 o pico foi aos $27 \pm 1,4$ e 25 ± 2 min, respectivamente (Figura 7-A). Após a implantação da matriz sintética na cavidade peritoneal (24 h) houve um aumento na permeabilidade ao marcador em todas as linhagens, exceto em camundongos da linhagem Swiss. Essas alterações refletem o processo inflamatório agudo induzido pelo implante (Fig. 7A). O percentual de redução no tempo da difusão do marcador fluorescente induzido pelo implante é

mostrado na Figura 7-B. Animais das linhagens Balb/c e C57BL/6 apresentaram um maior percentual de redução do tempo de obtenção do pico de fluorescência, indicando maior sensibilidade destas linhagens ao insulto.

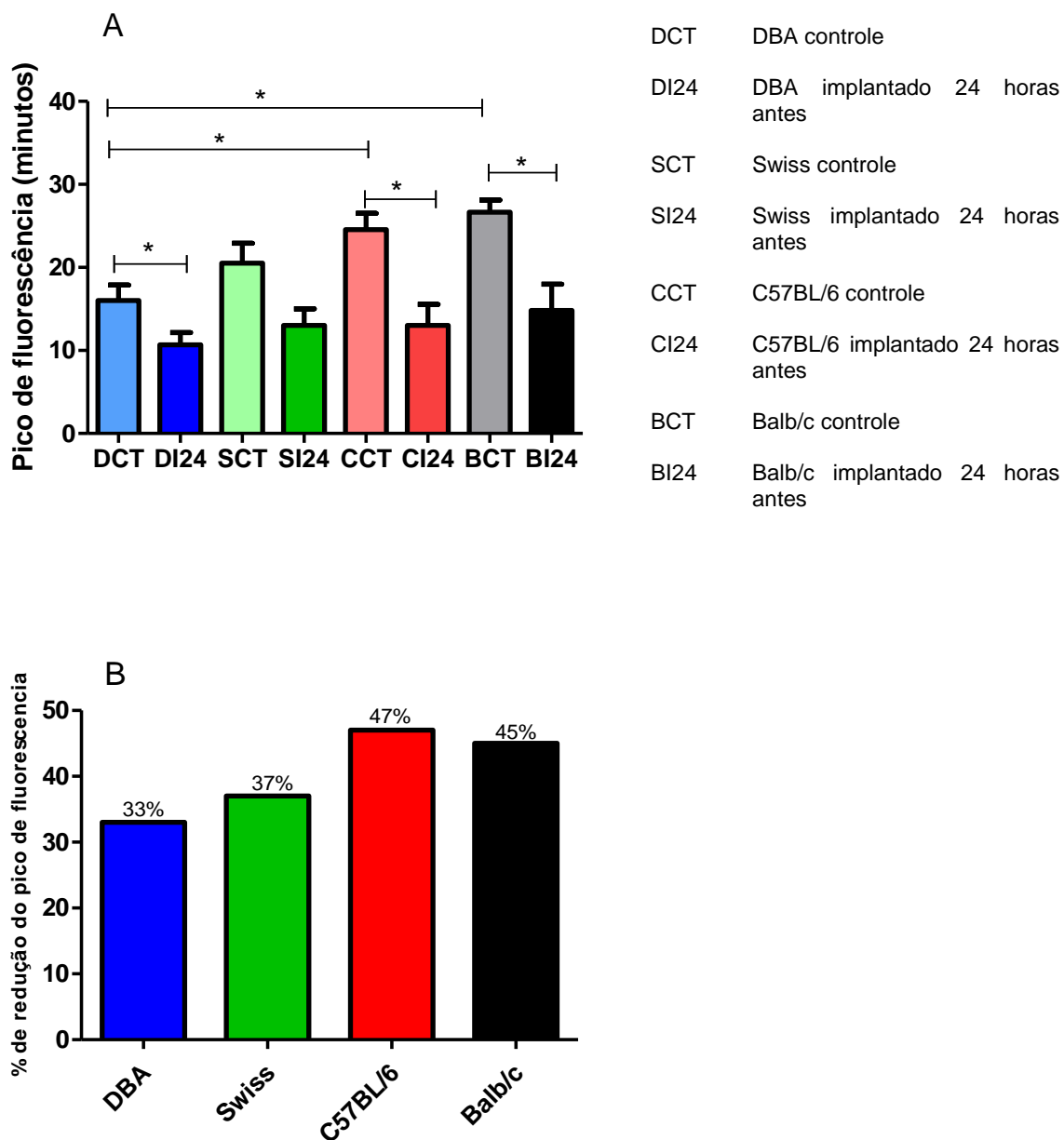


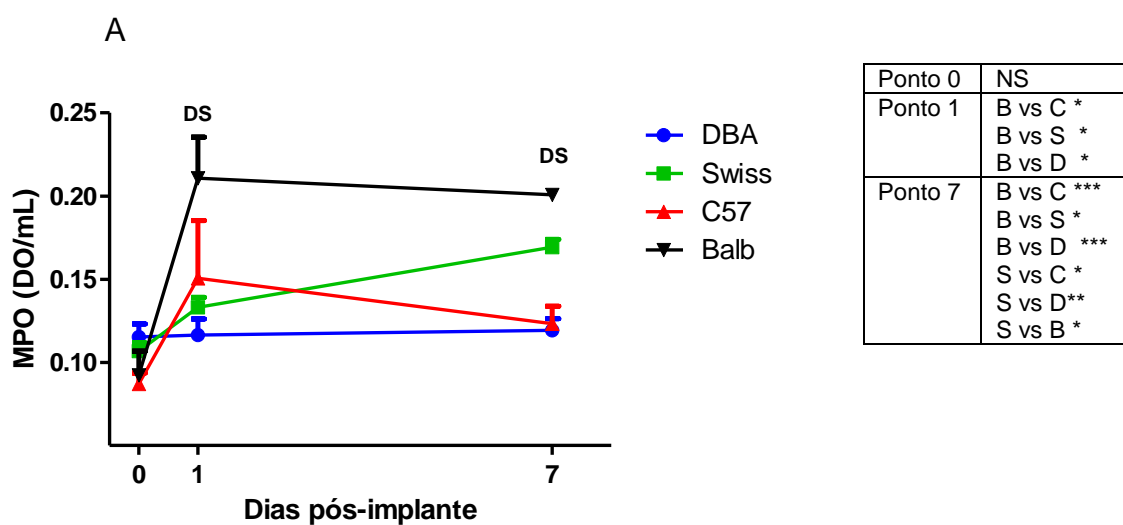
FIGURA 7- A- Difusão da fluoresceína após injeção intrabdominal do marcador em linhagens de camundongos DBA/1J, Swiss, C57BL/6 e Balb/c. Os dados mostram uma diferença significativa entre o pico de fluorescência de DBA/1 em relação ao Balb/c e C57BL/6, em condições basais. Após o implante, as linhagens DBA/1, C57BL/6 e Balb/c apresentaram redução do tempo de

difusão do marcador. Valores mostrados são as médias (\pm SEM) de grupos de 5-10 animais. DCT: Animais da linhagem DBA não implantados. DI24: Animais da linhagem DBA implantados 24 horas antes. SCT: animais da linhagem Swiss sem implante. SI24: Animais da linhagem Swiss implantados 24 horas antes. CCT: animais da linhagem C57BL/6 sem implante. CI24: animais da linhagem C57BL/6 implantados 24 horas antes. BCT: animais da linhagem Balb/c não implantados. BI24: animais da linhagem Balb/c implantados 24 horas antes. *Diferença significativa; ANOVA; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. B-Percentual de redução do tempo para atingir o pico de fluorescência após 24 horas do implante de esponja. Os animais C57BL/6 e Balb/c apresentaram maior percentual de redução do tempo de difusão do marcador após insulto.

Além da alteração na permeabilidade vascular, foram avaliadas por meio de marcadores inflamatórios (MPO, NAG, nitrito e citocinas inflamatórias), as respostas inflamatórias aguda (24 h) e crônica (7 dias) dos camundongos das diferentes linhagens ao implante no lavado peritoneal de animais não portadores e portadores de implantes. Foi possível observar que os níveis basais dos marcadores inflamatórios na cavidade peritoneal foram influenciados pelo background genético das linhagens.

Com relação a atividade da enzima mieloperoxidase nos tempos avaliados (antes e após a implantação), animais da linhagem Balb/c apresentaram níveis mais altos que animais das demais linhagens, 24 horas e 7 dias pós-implante. No sétimo dia após o insulto, animais da linhagem Swiss também apresentaram níveis altos de MPO (Figura 8-A). Com relação a atividade da enzima N-acetil- β -D-glicosaminidase, foi observado que animais da linhagem Swiss apresentaram maiores níveis basais dessa enzima na cavidade peritoneal, quando comparada às outras linhagens. Vinte e quatro horas após a implantação, animais da linhagem DBA/1 apresentaram níveis mais baixos quando comparados às linhagens C57BL/6 e Balb/c (Figura 8-B).

O padrão da produção de nitrito, um marcador indireto dos níveis de NO, diferiu tanto em níveis basais quanto após o estímulo. As linhagens C57BL/6 e Balb/c apresentaram níveis peritoneais bem mais altos que as linhagens Swiss e DBA/1, tanto em níveis basais quanto no primeiro dia pós-implantação (FIGURA 8-C). No sétimo dia, os níveis de nitrito não variaram entre as diferentes linhagens. Na avaliação de citocinas, não houve diferença entre as linhagens em relação à citocina pró-inflamatória TNF- α (FIGURA 9-A). Porém, os animais da linhagem Swiss apresentaram níveis basais mais altos de CCL-2 quando comparados à linhagem C57BL/6. Animais Balb/c apresentaram níveis mais altos da quimiocina CCL-2 quando comparadas às demais linhagens, tanto no primeiro quanto no sétimo dia pós-implantação (Figura 9-B). Com relação aos níveis de CXCL-1/KC, só houve diferença significativa no primeiro dia após o implante, em que animais da linhagem Swiss apresentaram níveis mais elevados da enzima em relação aos animais da linhagem C57BL/6 (Figura 9-C).



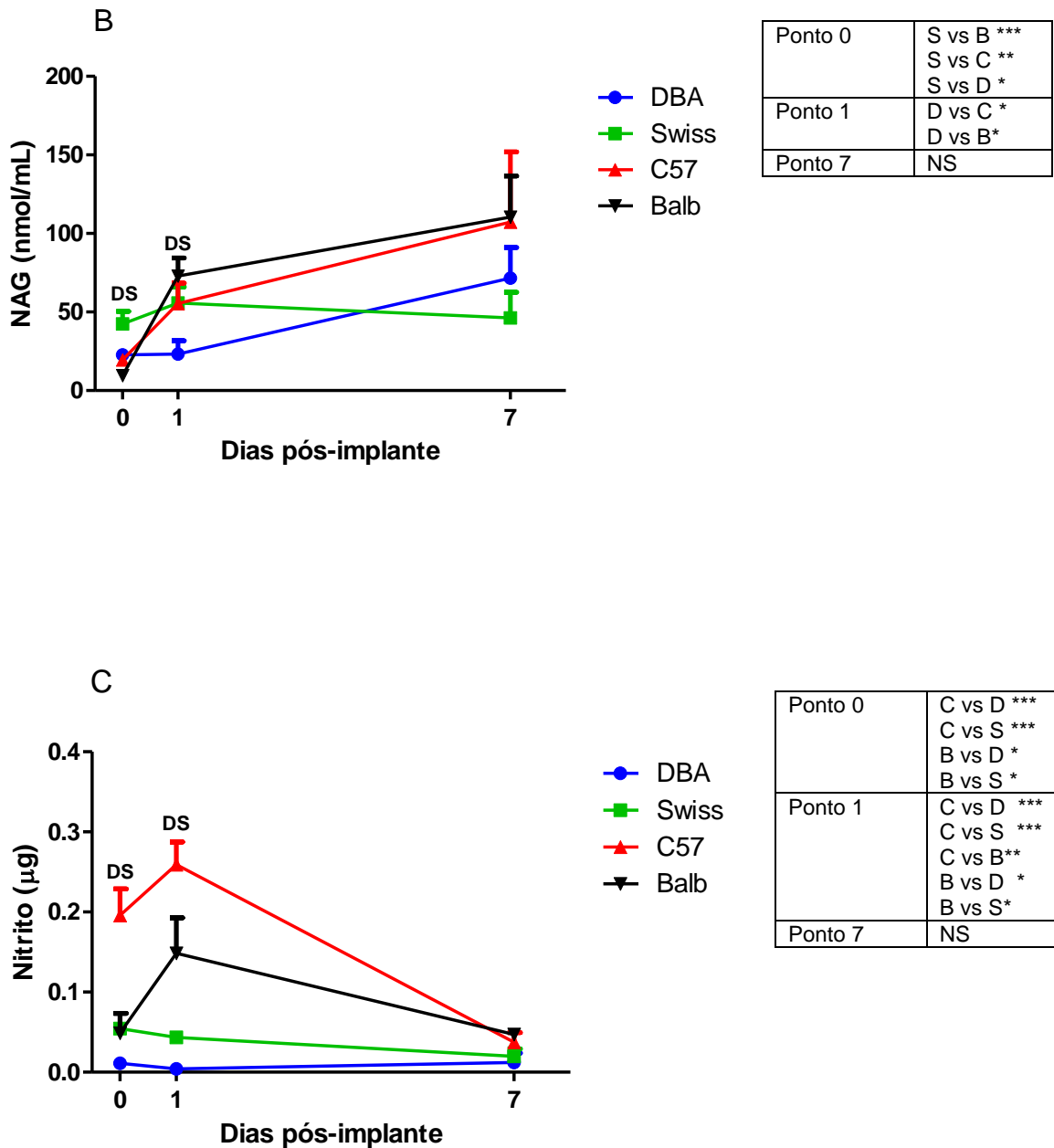
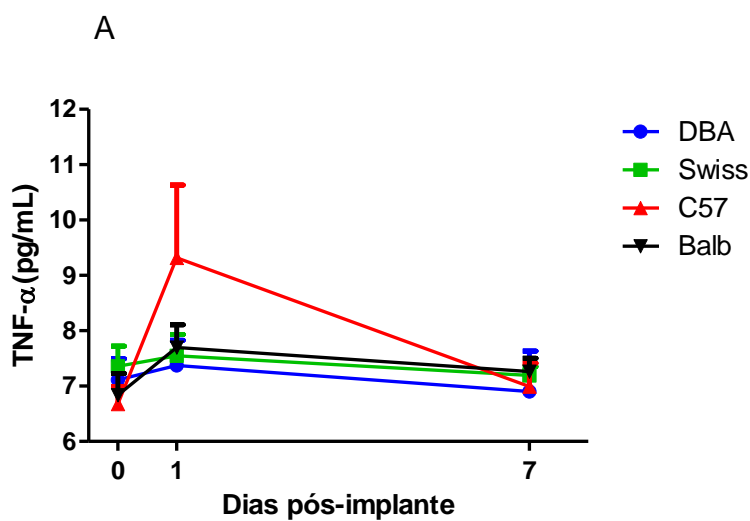
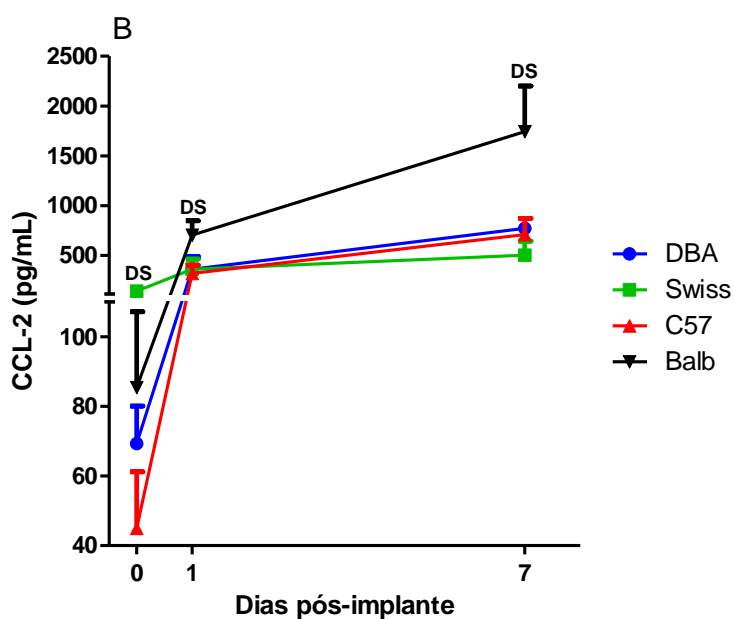


FIGURA 8 - Marcadores inflamatórios no lavado da cavidade peritoneal de animais das linhagens DBA/1, Swiss, C57BL/6 e Balb/c em condições basais e implantados (1 e 7 dias) (A). No primeiro dia pós implantação, animais da linhagem Balb/c apresentaram níveis mais elevados de atividade da MPO quando comparados às demais linhagens. No sétimo dia pós-implantação, a atividade da enzima foi maior em Balb/c e Swiss. (B) Mensuração dos níveis da enzima NAG mostrou que animais da linhagem Swiss apresentaram maiores níveis basais da enzima. Vinte e quatro horas após o implante, animais DBA/1 apresentaram menores níveis de NAG quando comparados às linhagens C57BL/6 e Balb/c. (C) Os níveis de nitrito foram claramente maiores em animais C57BL/6 e Balb/c, em condições basais e no primeiro dia pós-

implantação. B: Balb/c, S: Swiss, C: C57BL/6 e D: DBA. Valores mostrados como média \pm SEM de grupos de 5–10 animais. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Diferença significativa entre as linhagens como mostrada (ANOVA). DS: Diferença significativa.



Ponto 0	NS
Ponto 1	NS
Ponto 7	NS



Ponto 0	S vs C*
Ponto 1	B vs D * B vs C* B vs S*
Ponto 7	B vs D *** B vs S ** B vs C **

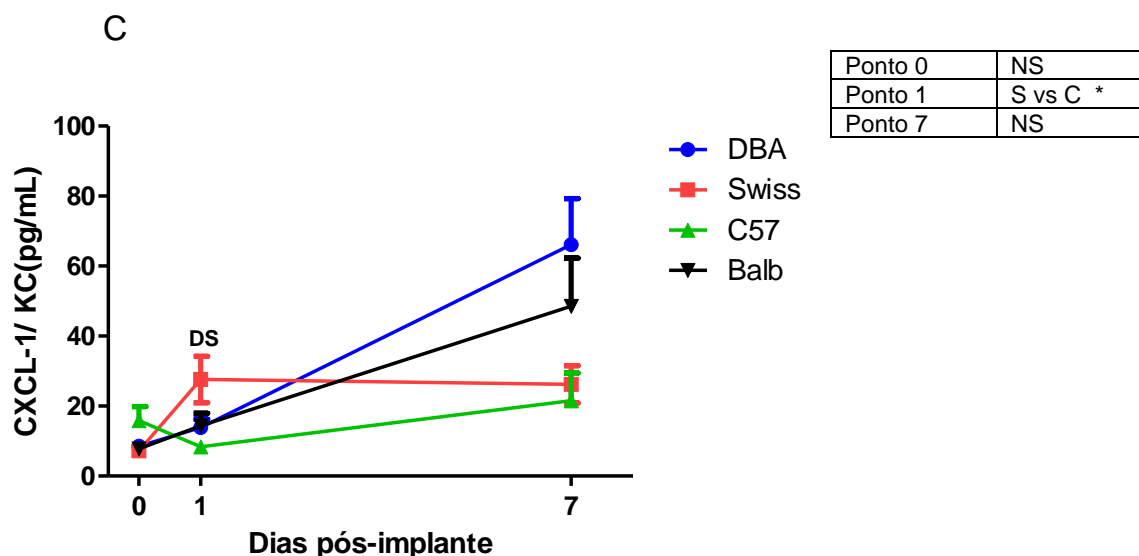


FIGURA 9- Níveis de citocinas pró-inflamatórias no lavado intraperitoneal de animais de diferentes linhagens de camundongo. (A) Os níveis de TNF- α não variaram entre as linhagens. (B) Em condições basais, os níveis de CCL2, foram maiores em camundongos da linhagem Swiss que em camundongos C57BL/6. Após a implantação, animais da linhagem Balb/c apresentaram níveis claramente mais altos do marcador, quando comparados às demais linhagens. (C) Os níveis de CXCL-1/KC só foram diferentes no primeiro dia pós-implantação, com animais da linhagem Swiss apresentando níveis mais elevados da citocina em relação aos animais da linhagem C57BL/6. B: Balb/c, S: Swiss, C: C57BL/6 e D: DBA. Valores mostrados como média \pm SEM de grupos de 5–10 animais. * $p < 0.05$. Diferenças significativas entre linhagens como mostrado (ANOVA). DS: Diferença significativa

Os valores dos parâmetros inflamatórios do lavado peritoneal dos animais das quatro linhagens são apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3. Estão destacados os valores que foram diferentes entre os parâmetros avaliados. A Tabela 1 mostra que em condições basais a linhagem DBA apresentou maior permeabilidade à fluoresceína, a linhagem Swiss apresentou maior atividade NAG e maior nível de CCL2, enquanto que o maior nível de nitrito foi observado na linhagem C57BL/6. Após o implante (24 h) a intensidade da resposta inflamatória foi diferente entre as linhagens (Tabela 2). A maior

intensidade da resposta inflamatória, avaliada pelo número de parâmetros, foi a linhagem Balb/c (4 maiores valores), seguida da linhagem C57BL/6 (2 maiores valores). A linhagem DBA/1 mostrou-se menos reativa ao implante. Na Tabela 3, apenas a linhagem Balb/c continua apresentando maior intensidade na resposta inflamatória (atividade MPO e níveis de CCL-2 aumentados) em relação às demais linhagens.

Tabela 1: Valores basais dos parâmetros funcional e inflamatórios no lavado peritoneal dos animais das quatro linhagens.

	Pico Fluorescência (min) N=5-11	MPO (OD/mL) N=6-8	NAG (nmol/mL) N=6-8	Nitrito (µg/mL) N=6-8	TNF-α (pg/mL) N=6-8	CCL-2 (pg/mL) N=5-8	CXCL-1/KC (pg/mL) N=6-7
DBA/1	16,0±1,9 *	0,11± 0,008	22,8±2,15	0,02± 0,004	7,1±0,4	69,3±10,7	8,6±1,8
Swiss	20,5±2,4	0,11± 0,005	42,4±7,96 *	0,05± 0,005	7,4±0,4	141±33,4 *	7,2±1,5
C57BL/6	24,5±2	0,9± 0,015	19,5±3,78	0,20±0,033 *	6,7±0,3	45,0±16,3	15,9±4,0
Balb/c	26,7±1,4	0,9± 0,006	9,6±1,98	0,13±0,021 *	6,8±0,4	85,4±21,8	7,8±1,4

* Diferença estatisticamente significativa

TABELA 2: Valores de 24 h pós-implante dos parâmetros inflamatórios no lavado peritoneal dos animais das quatro linhagens.

	Pico de Fluorescência (min) N=5-11	MPO (OD/mL) N=6-8	NAG (nmo/mL) N=6-8	Nitrito (µg/mL) N=6-8	TNF-α (pg/mL) N=6-8	CCL-2 (pg/mL) N=5-8	CXCL-1/KC (pg/mL) N=6-7
DBA/1	10,7±1,5	0,12±0,010	23,2±8,5 *	0,01±0,003	7,3±0,5	361,3±126,6	13,9±2,4
Swiss	13,0±2,0	0,13±0,006	55,8±10,2	0,04±0,004	7,5±0,4	308,6±100,0	27,6±6,6 *
C57BL/6	13,0±2,5	0,15±0,034	83,92±24,4	0,26±0,028 *	9,3±1,3	317,2±85,3	8,4±0,7
Balb/c	14,8±3,2	0,24±0,027 *	72,84±11,6	0,15±0,044 *	7,7±0,4	805,6±120,2 *	14,4±3,6

* Diferença estatisticamente significativa

TABELA 3: Valores de 7 dias dos parâmetros inflamatórios no lavado peritoneal dos animais das quatro linhagens.

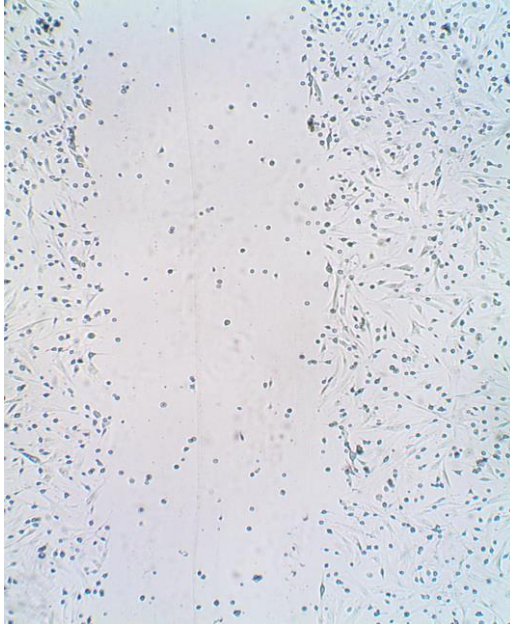
	MPO (OD/ml) N= 6-8	NAG (nmol/mL) N=6-8	Nitrito (µg/mL) N=6-8	TNF-α (pg/mL) N=6-8	CCL-2 (pg/mL) N=5-8	CXCL-1/KC (pg/mL) N=5-8
DBA/1	0,11±0,007	71,6±19,5	0,012±0,011	6,9±0,7	69,3±10,8	66,1±13,1
Swiss	0,17±0,005 *	46,3±16,4	0,033±0,009	7,2±0,2	400,2±149,0	26,2±5,3
C57BL/6	0,14±0,013	107,3±44,7	0,038±0,012	7,0±0,4	707,9±163,4	21,6±7,9
Balb/c	0,20±0,004 *	110,4±26,1	0,047±0,008	7,3±0,2	1741,0±459,5 *	48,5±13,8

* Diferença estatisticamente significativa

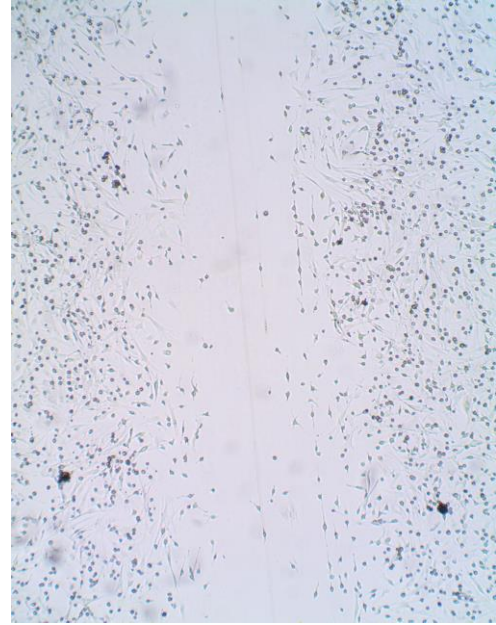
Após a demonstração de diferenças nos níveis de atividades de enzimas e citocinas inflamatórias no lavado peritoneal entre as linhagens, realizamos

ensaios de migração celular *in vitro*. Foi utilizado o modelo de scratch (ranhura) em placas de cultura, após a confluência das células do lavado peritoneal coletado em animais controle e implantados antes e após a implantação (24 h) da matriz sintética. Foi avaliado o percentual de fechamento da área aberta na camada celular das placas. As Figuras 10A e 11A mostram que as células de animais da linhagem Swiss antes e após a implantação apresentaram uma diminuição de 39% e 37%, respectivamente, da área do scratch, 24 horas após a realização do mesmo. Por outro lado, as células dos animais da linhagem C57BL/6 apresentaram uma migração celular muito maior. Houve uma redução de 92% da área do scratch após 24 h nas placas contendo células de animais sem implante. Em placas contendo células de animais implantados o fechamento da área do scratch foi de 90% no mesmo período de tempo (FIGURAS 10B e 11B). Em contraste, a migração de células da linhagem Balb/c em 24 h resultou em aumento de 1% e 11% da área do scratch antes e após a implantação da matriz sintética, respectivamente, porém essas diferenças não foram estatisticamente significativas (FIGURA 10 C e 11 C).

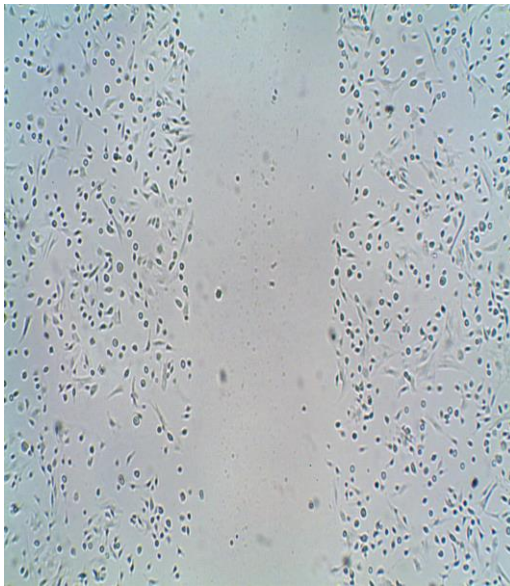
A



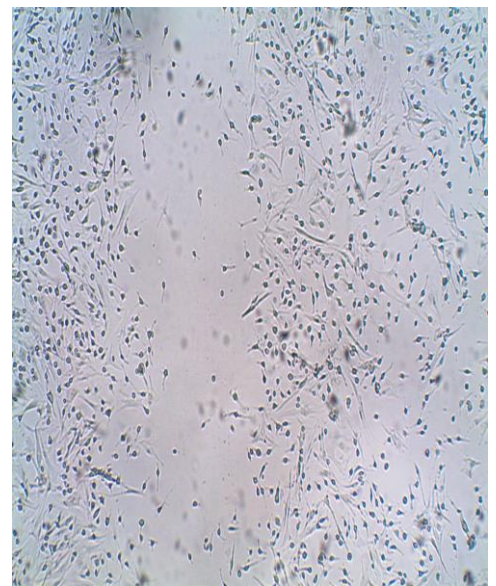
Swiss sem implante 0 horas



Swiss sem implante 24 horas

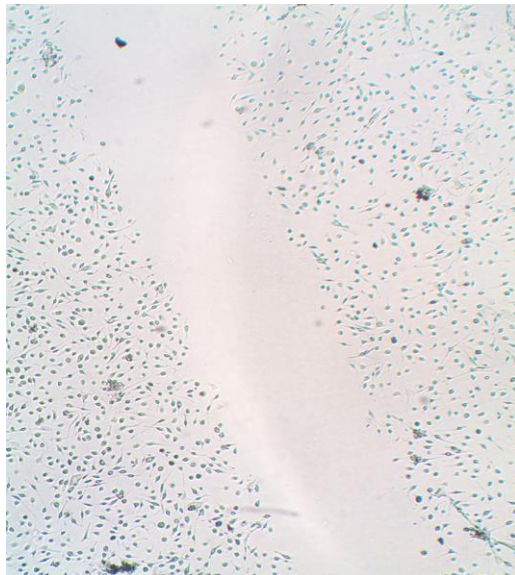


Swiss Implantado Tempo 0

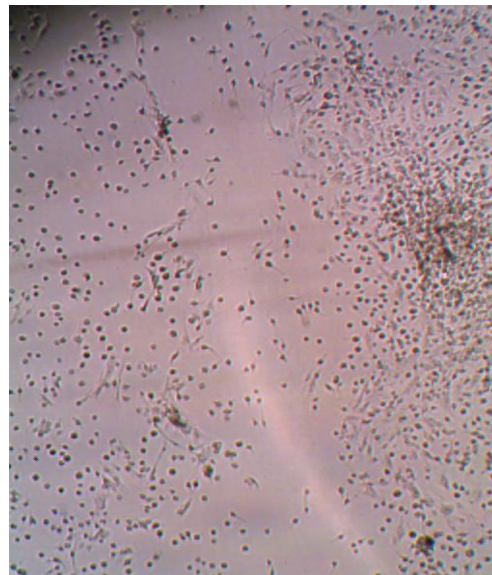


Swiss Implantado 24 horas

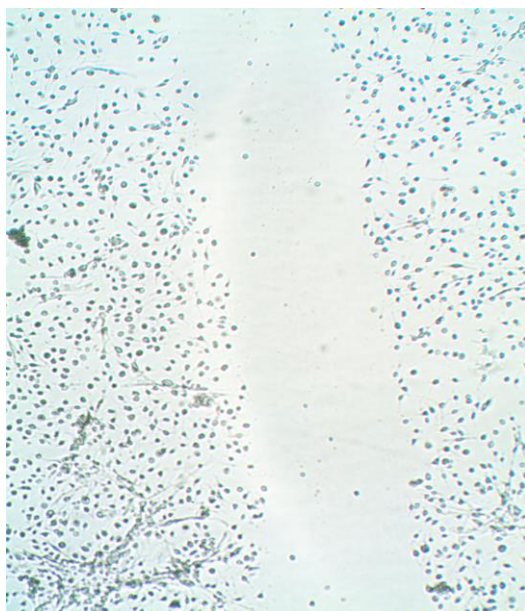
B



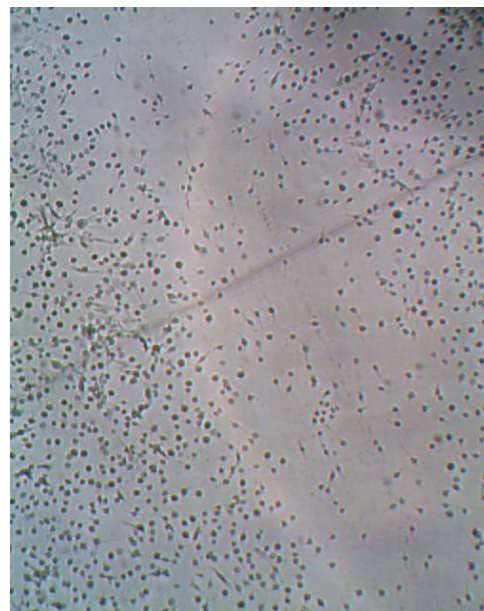
C57BL/6 sem implante tempo 0



C57BL/6 sem implante 24 horas

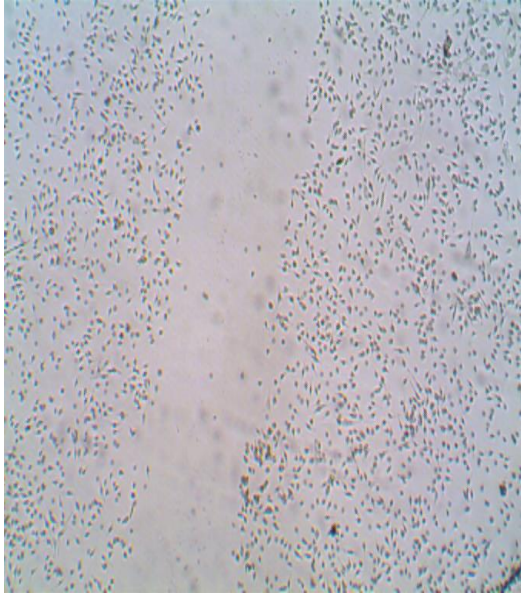


C57BL/6 Implantado tempo 0

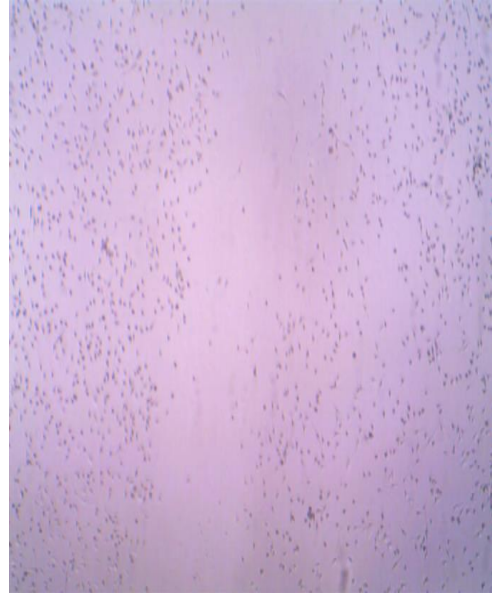


C57BL/6 Implantado 24 horas

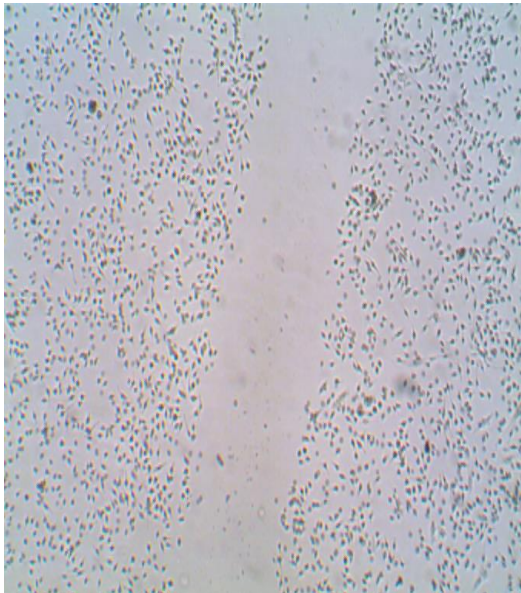
C



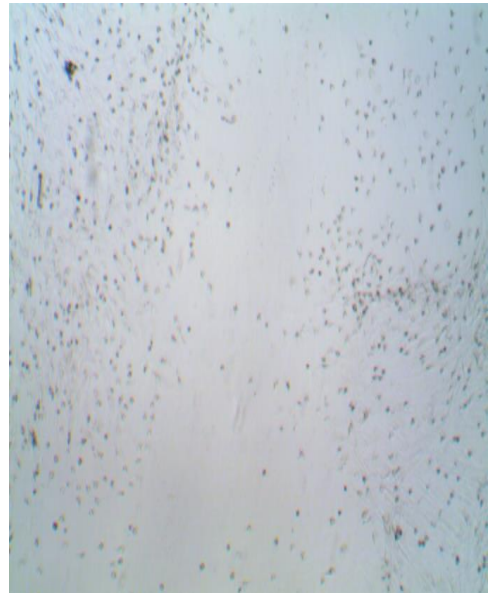
Balb/c sem implante tempo 0



Balb/c sem implante 24 horas

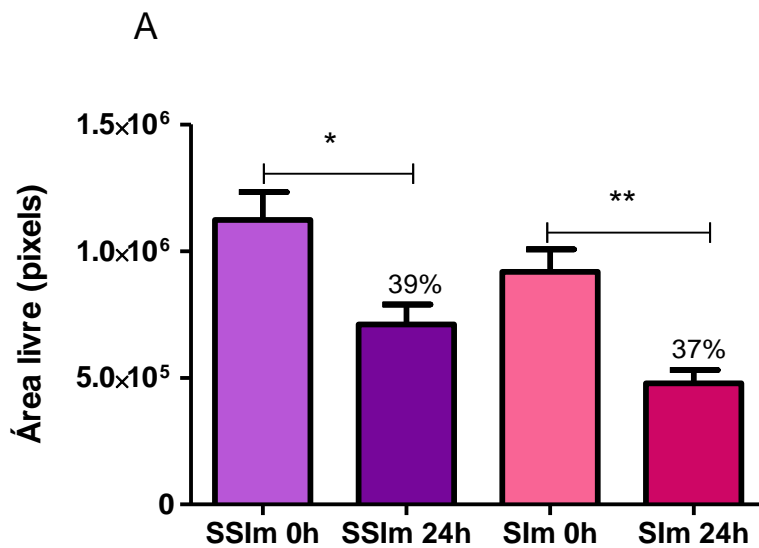


Balb/c implantado tempo 0



Balb/c implantados 24 horas

FIGURA 10- Fotos representativas das áreas do *scratch* nos tempos 0 e 24 horas de animais das linhagens Swiss, C57BL/6 e Balb/c sem implante e implantados 24 horas antes. Fotos obtidas através de uma câmera digital (Zeiss) acoplada a um microscópio de contraste de fases, no aumento de 4 vezes.



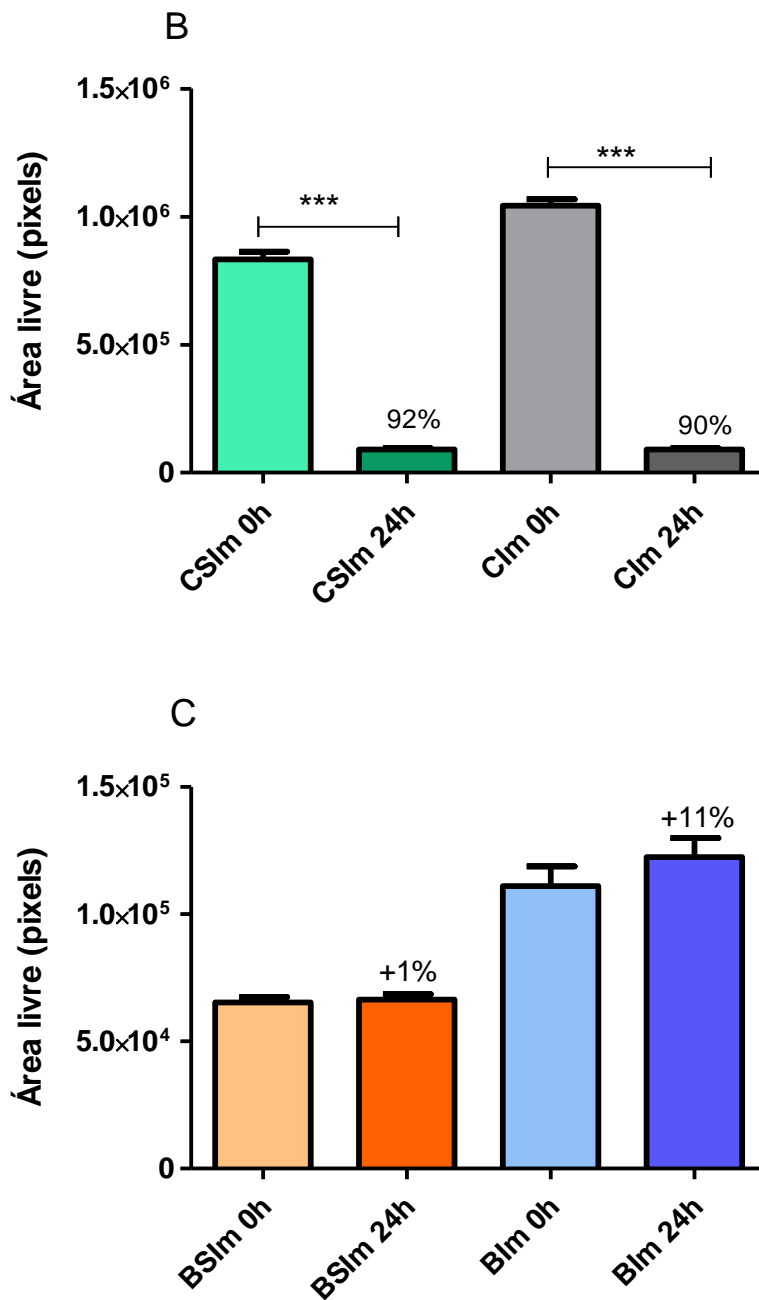


FIGURA 11- Percentual de fechamento da área do *scratch* realizado em placas de cultura celular. (A) Redução de 39% da área do *scratch* em placas contendo células do lavado peritoneal de animais da linhagem Swiss sem implante e 37% nas placas contendo células dos animais implantados (B) Redução de 92% da área do *scratch* em placas contendo células da linhagem C57BL/6 sem

implante e de 90% nas placas contendo células de animais com implante. (C) Não houve redução da área de fechamento do scratch em placas contendo células da linhagem Balb/c. As mensurações das áreas foram feitas no momento da incisão e 24 h após.

SSIm e SIm: células do lavado peritoneal de animais Swiss sem e com implante, respectivamente; CSIm e CIm: células do lavado peritoneal de animais C57BL/6 sem e com implante, respectivamente. BSIIm e BIIm: células do lavado peritoneal de animais Balb/c sem e com implante. Valores representam a média±erro padrão; * P< 0,05; **P<0,01; ***P<0,001

4.2 Influência do background genético na formação de aderência intraperitoneal induzida por implantes e a resposta ao dipiridamol

Após ter sido mostrado que a heterogeneidade genética é determinante nas respostas inflamatórias aguda e crônica ao implante de polieter-poliuretano, foi avaliada a influência deste fator na formação de aderência intraperitoneal e a resposta ao tratamento com o dipiridamol. A observação dos implantes *in situ* mostrou que os mesmos aderiram firmemente a órgãos viscerais (fígado e/ou intestinos) por meio de estruturas de aspecto de tecido conjuntivo fibroso (Figura 12A). O peso úmido dos implantes de camundongos DBA/1 foi menor quando comparado aos pesos dos implantes das demais linhagens (Figura 12B). A análise histológica revelou que no tecido fibrovascular de todos os implantes havia um estroma preenchendo os poros da matriz da esponja. Nesse estroma havia vasos sanguíneos, células

inflamatórias e fibroblastos (Figura 13 A-D). No entanto, houve diferenças quanto ao número de vasos, na intensidade da celularidade e na deposição de colágeno entre as linhagens. Os componentes angiogênicos, inflamatórios e fibrogênicos do tecido fibrovascular foram quantificados e descritos a seguir.

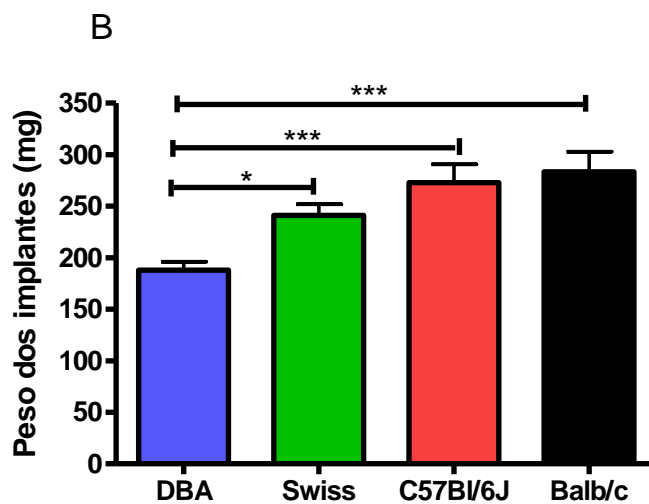
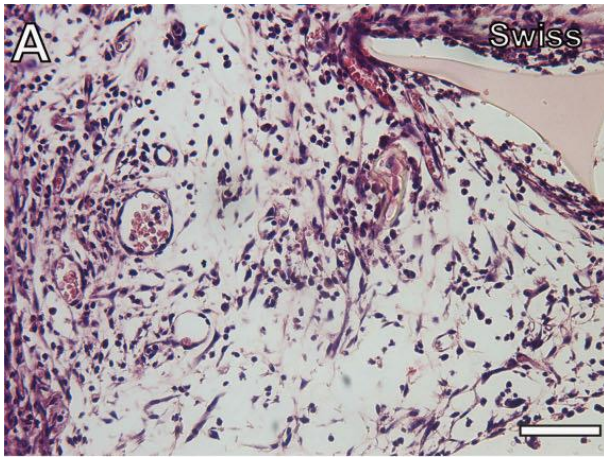
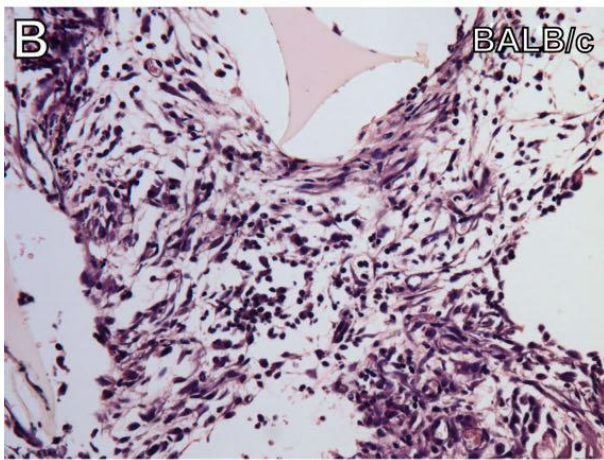


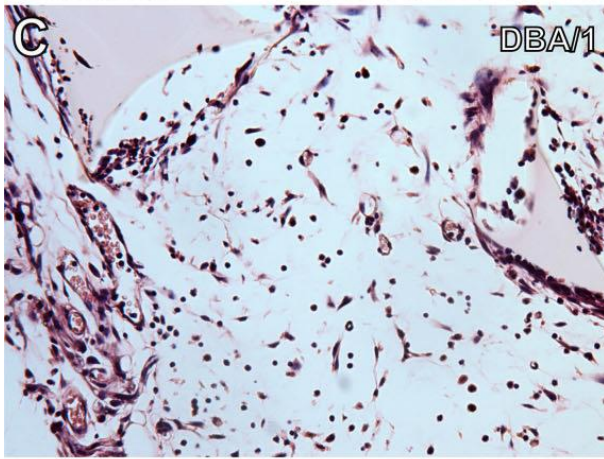
FIGURA 12- Adesão e peso úmido dos implantes intraperitoneais. (A) Adesão de tecido fibroso induzido por discos de esponjas de polieter-poliuretano em camundongos Swiss, 7 dias após a implantação. (B) Peso úmido dos implantes de camundongos DBA/1 é claramente menor do que os pesos das linhagens Swiss, C57BL/6 e Balb/c. Valores mostrados são média \pm SEM de grupos de 5-7 animais * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ Diferenças estatísticas entre linhagens como mostradas (ANOVA).



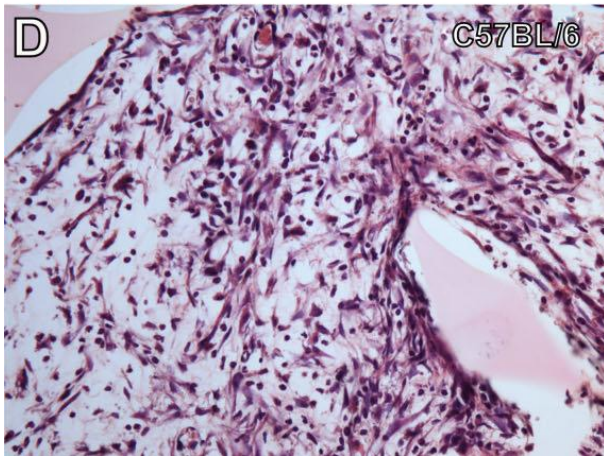
Swiss



Balb/c



DBA/1

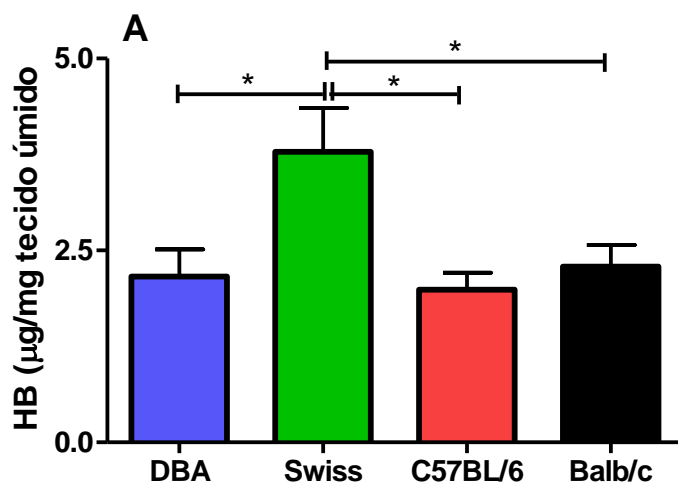


C57BL/6

FIGURA 13- Cortes histológicos representativos (5µm, corados com hematoxilina e eosina) do tecido de granulação fibrovascular intra-implante intraperitoneais em camundongos Swiss (A), Balb/c (B), DBA/1 (C), C57BL/6 (D) no dia 7 pós-implantação. O estroma fibrovascular que ocupa os poros da matriz de esponja (formas triangulares) é composto por vasos sanguíneos, células inflamatórias e fibroblastos fusiformes. O tecido de granulação nos implantes de camundongos Swiss é mais vascularizado que os dos outros implantes. Barra de escala: 50 µm

4.2.1 Angiogênese nos implantes intraperitoneais

O conteúdo de hemoglobina e o número de vasos foram mais altos nos implantes de camundongos Swiss, comparado aos outros três grupos e os níveis da principal citocina pró-angiogênica VEGF foi maior em implantes de C57BL/6 (Figura 14A-C).



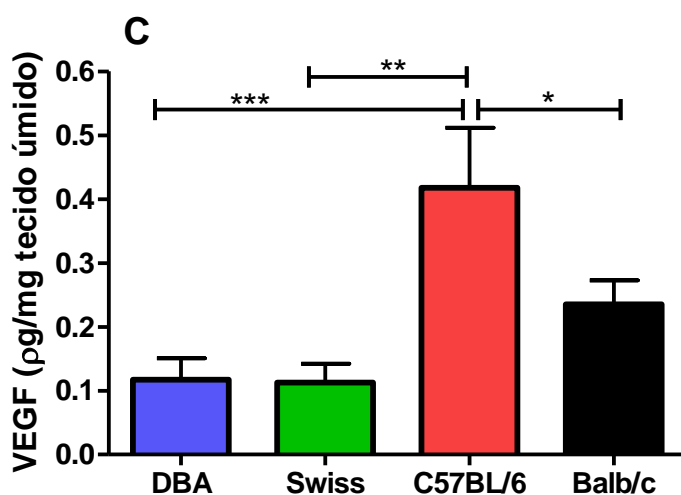
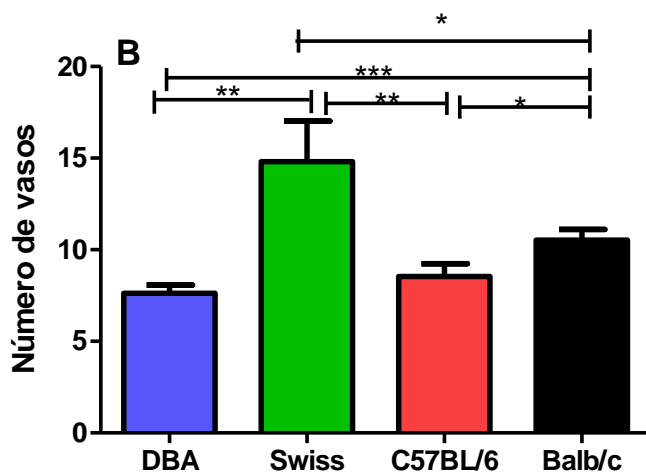
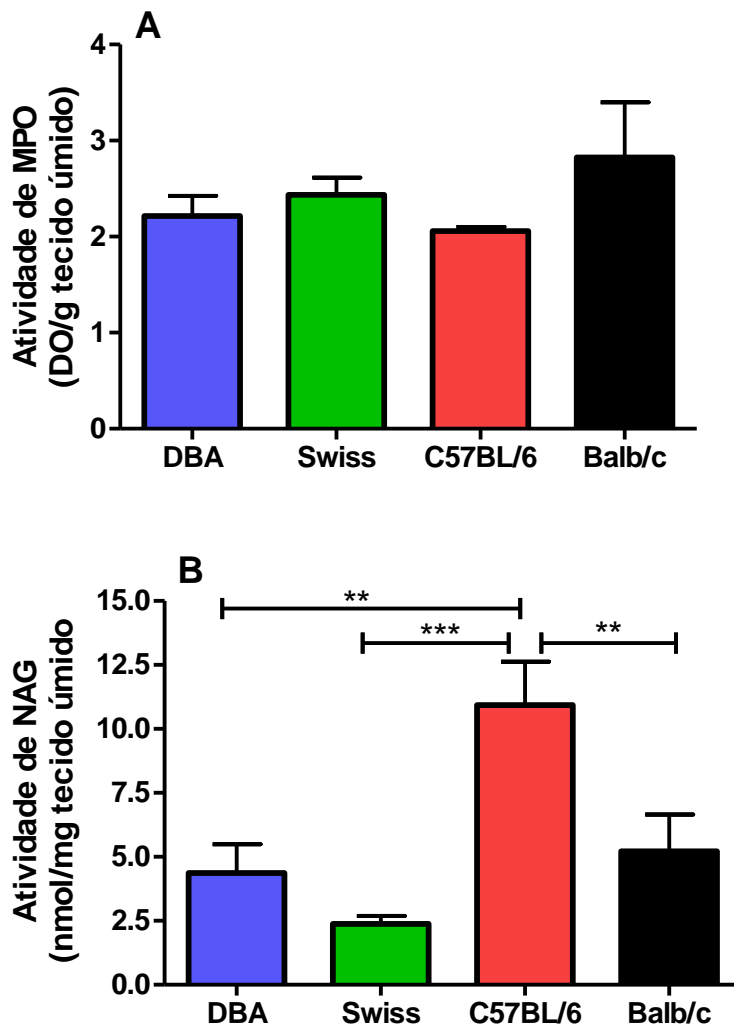


FIGURA 14- Marcadores de angiogênese em implantes intraperitoneais (7dias) de diferentes linhagens de camundongos. (A, B) Implantes de camundongos Swiss apresentam maiores conteúdos de hemoglobina e número de vasos comparados com as outras linhagens. (C) Os níveis do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) foram maiores em implantes de C57BL/6. Valores mostrados são a média ± SEM de grupos de 5–7 animais. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Diferenças significativas entre linhagens como mostradas (ANOVA).

4.2.2 Inflamação nos implantes intraperitoneais

Houve diferenças relacionadas às linhagens na atividade de NAG, que

indica indiretamente ativação de macrófagos, mas não na atividade da MPO em implantes de 7 dias (figura 15A e 15B). Os níveis de atividade de NAG em implantes de animais C57BL/6 foram bem mais altos que os níveis das outras três linhagens (figura 15B). A produção de óxido nítrico, avaliada como nitrito, também foi relacionada à linhagem, sendo que os implantes em DBA/1 apresentaram menores conteúdos de nitrito que as demais (Figura 15C). Avaliação do conteúdo de citocinas mostrou que os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α foram maiores nos implantes dos camundongos Balb/c comparados com os demais grupos, enquanto os níveis da quimiocina CCL-2 foram maiores em implantes de animais DBA/1 (figura 16A e B).



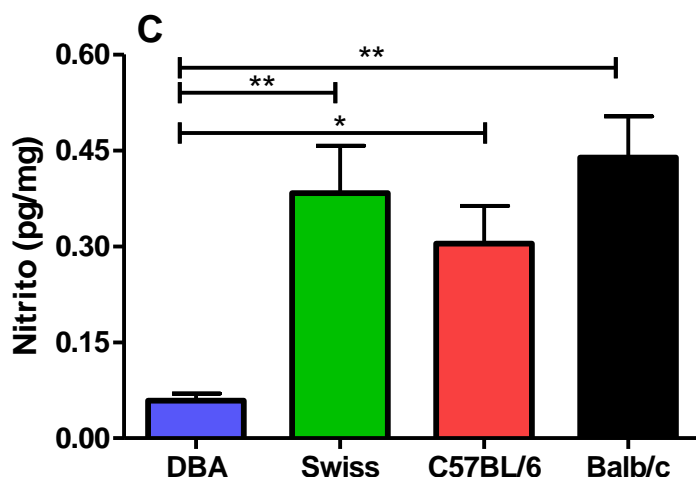
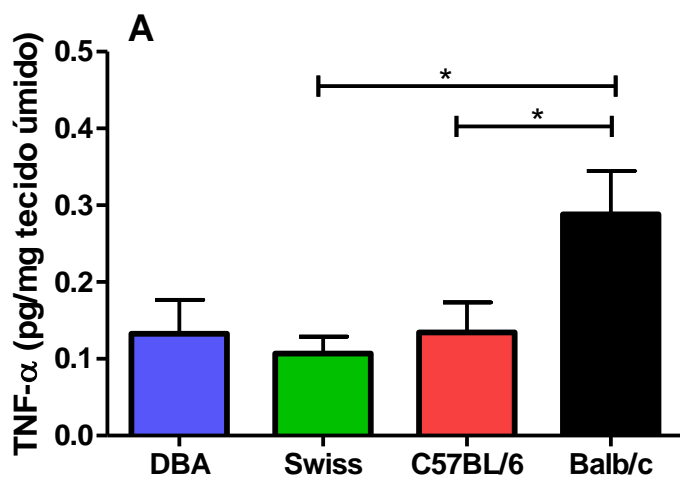


FIGURA 15- Marcadores de inflamação nos implantes intraperitoneais (7 dias) de diferentes linhagens de camundongo. (A) O nível de acumulação de neutrófilos (mensurado através da atividade da mieloperoxidase) foi similar entre as linhagens. (B) O nível da acumulação de macrófago (mensurado pela atividade de N-acetyl- β -D-glicosaminidase [NAG] foi claramente maior em C57BL/6. (C) Os níveis de nitrito foram claramente menores em DBA/1 mas similares nas outras linhagens. Valores mostrados como média \pm SEM de grupos de 4–10 animais. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Diferença significativa entre as linhagens como mostrada (ANOVA).



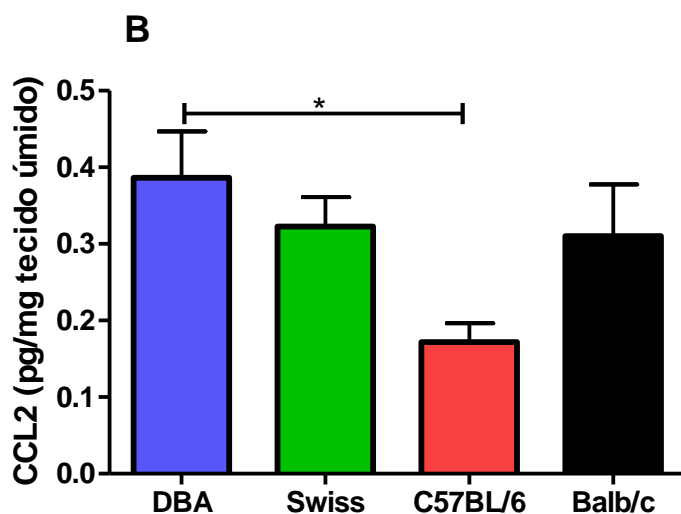


FIGURA 16- Níveis de citocinas pró-inflamatórias em implantes intraperitoneais (7 dias) de diferentes linhagens de camundongo. Os níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foram maiores em implantes de BALB/c (A), e os níveis da quimicina ligante 2 (CCL2) foram menores em implantes de C57BL/6 (B). Valores mostrados como $\text{media} \pm \text{SEM}$ de grupos de 5–10 animais. * $p < 0.05$. Diferenças significativas entre linhagens como mostrado (ANOVA).

4.2.3 Deposição de colágeno e níveis de TGF- β 1

Implantes retirados de animais DBA/1 apresentaram menores níveis de TGF- β 1 e colágeno, comparado com os demais implantes (Figura 17A e B). Implantes retirados de C57BL/6 apresentaram maiores conteúdos de colágeno, sendo esses cerca de duas vezes maior que os implantes dos animais DBA/1.

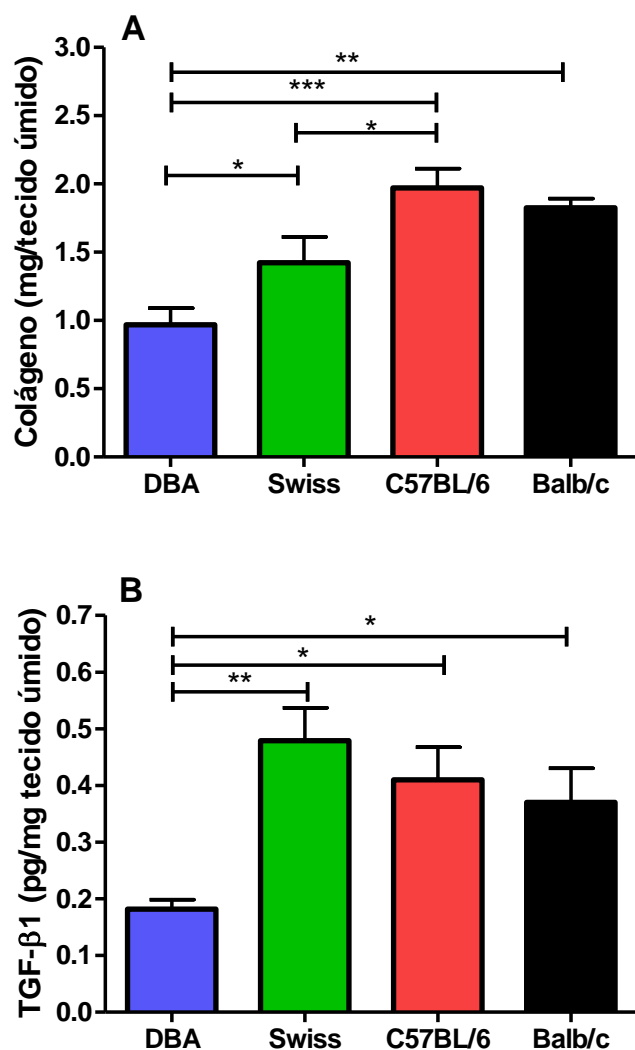
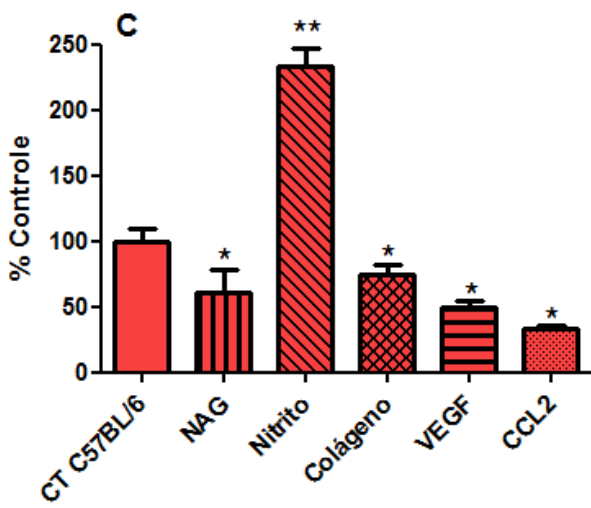
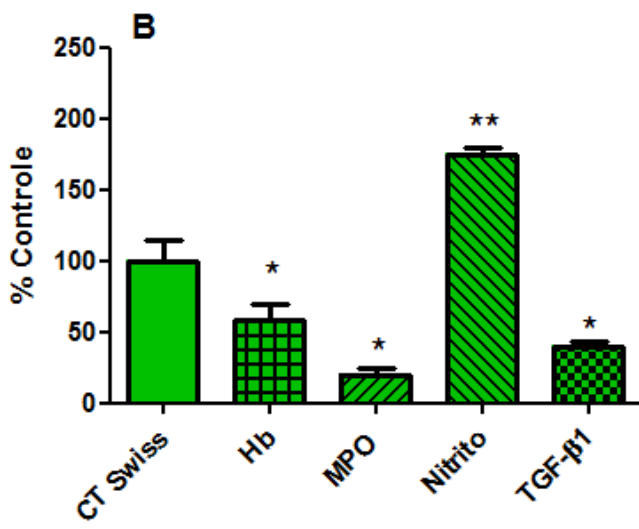
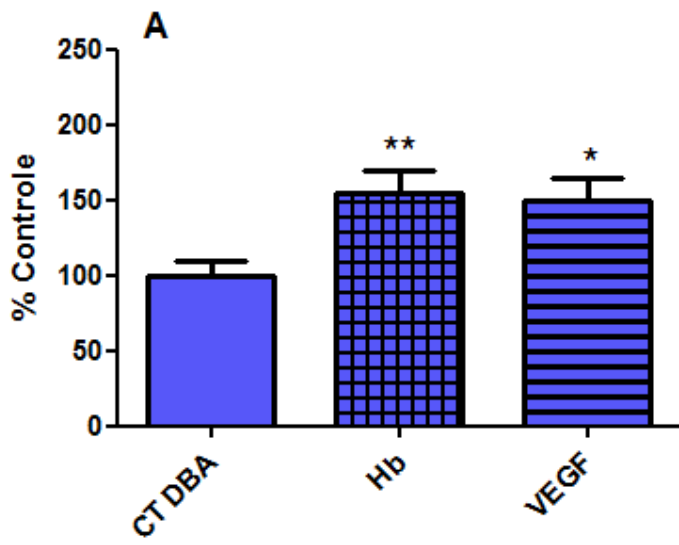


FIGURA 17- Marcadores de fibrogênese intraperitoneal em implantes (7 dias) em diferentes linhagens de camundongo. (A) A deposição de colágeno, como detectado pelo método colorimétrico de picro-Sirius, foi maior em C57BL/6 e BALB/c comparado com as outras duas linhagens. (B) Os implantes com menor fibrogenêse (como mensurada pela atividade do fator de crescimento transformante beta-1 [TGF-β1]) foram menores em camundongos DBA/1. Valores mostrados como média± SEM de grupos de 6–10 animais *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. Diferenças significativas entre linhagens como mostrado (ANOVA).

4.2.4 Resposta ao dipiridamol

Depois de estabelecidos os perfis angiogênico, inflamatório e fibrogênico nos implantes das quatro linhagens, nós avaliamos os efeitos do dipiridamol nestes perfis. A dose de dipiridamol (200mg/Kg) usada no presente estudo se

mostrou eficaz na indução de arteriogênese na isquemia em camundongos C57BL/6 e na modulação da angiogênese inflamatória em camundongos Swiss e Balb/c (VENKATESH et al, 2010; SAMPAIO et al; 2012). O tratamento com dipiridamol foi iniciado no dia da implantação e continuou com doses diárias por 6 dias. Devido ao fato dos parâmetros avaliados diferirem entre as linhagens, os efeitos do dipiridamol foram expressos relativamente aos animais não tratados (definidos como 100%). A potenciação ou inibição da resposta ao dipiridamol nas quatro linhagens foi registrada (Figura 18 A-D). O tratamento com o dipiridamol aumentou os níveis de HB e de VEGF nos implantes de animais DBA/1 (Figura 18A). Por outro lado, diminuiu os níveis de HB em implantes de animais Swiss. Nesta linhagem, o tratamento diminuiu a atividade da enzima MPO e os níveis da citocina TGF- β (Figura 18B). Em implantes de animais C57BL/6, a atividade de NAG, deposição de colágeno e níveis de VEGF e CCL2 foram reduzidos pelo tratamento com dipiridamol (Figura 18C). O tratamento foi eficaz somente na inibição de marcadores inflamatórios (MPO e TNF- α) em implantes de camundongos Balb/c (Figura 18D). Embora o efeito do dipiridamol tenha sido predominantemente inibitório (MPO, NAG, TNF- α e CCL-2) nos implantes de camundongos Swiss e C57BL/6, aumentou em cerca de duas vezes os níveis de nitrito nestas linhagens (Figura 18B e C). Uma análise qualitativa dos resultados dos parâmetros inflamatórios, angiogênicos e fibrogênicos no implante dos animais das quatro linhagens está apresentada nas Tabelas 4 e 5.



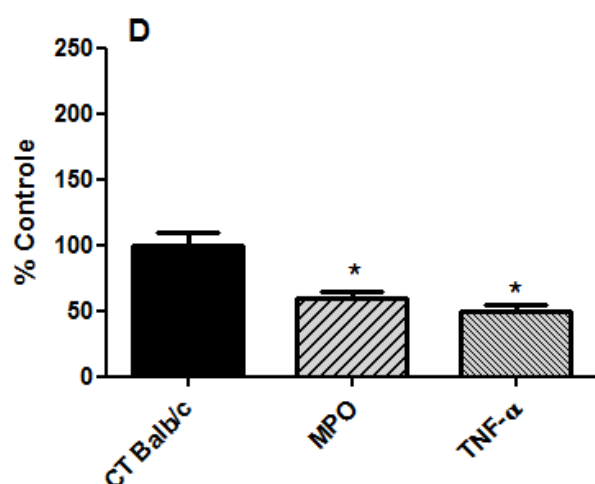


FIGURA 18- Efeitos do tratamento com dipiridamol nos componentes angiogênico, inflamatório e fibrogênico do tecido fibroproliferativo peritoneal nas quatro diferentes linhagens de camundongo. (A) O tratamento com dipiridamol aumentou o conteúdo de hemoglobina (HB) e do VEGF em implantes de camundongos DBA/1. (B) Por outro lado, o dipiridamol diminuiu HB em implantes de camundongos Swiss. Nessa linhagem, o tratamento diminuiu a atividade da mieloperoxidase (MPO) e os níveis do TGF-β1. (C) Em implantes de C57BL/6, a atividade da N-acetyl-β-D-glicosaminidase (NAG), deposição de colágeno e os níveis de VEGF e da quimiocina CCL2 foram reduzidos pelo dipiridamol. (D) O tratamento foi eficaz somente na inibição da atividade MPO e níveis de TNF-α em implantes de camundongos Balb/c. *p < 0.05; **p < 0.01. Diferenças significativas entre linhagens como mostrado (ANOVA). CT, controle. Valores mostrados como média ± SEM de grupos de 5–10 animais.

TABELA 4: Análise qualitativa da influência do background genético nos componentes inflamatórios, angiogênicos e fibrogênicos das aderências intraperitoneais induzidas pelo implante nas quatro linhagens de camundongo.

	Peso dos implantes	Nº de vasos	HB	VEGF	MPO	NAG	Nitrito	TNF-α	CCL-2	Colágeno	TGF-β
DBA/1	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-
Swiss	+	+++	+++	-	-	-	+++	-	-	++	+++
C57BL/6	+	-	-	+++	-	+++	+++	-	-	+++	+++
Balb/c	+	++	++	-	-	-	+++	+++	-	++	+++

- menor valor + baixo valor; ++ valor intermediário; +++ maior valor

TABELA 5: Análise qualitativa da resposta ao dipiridamol nos componentes inflamatório, angiogênico e fibrogênese das aderências intraperitoneais induzidas pelo implante nas quatro linhagens de camundongo.

	HB	VEGF	MPO	NAG	Nitrito	TNF- α	CCL-2	Colágeno	TGF- β
DBA/1	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-
Swiss	↓	-	↓	-	↑	-	-	-	↓
C57BL/6	-	↓	-	↓	↑	-	↓	↓	-
Balb/c	-	-	↓	-	-	↓	-	-	-

↑ aumento; - sem efeito; ↓ diminuição

DISCUSSÃO

5. Discussão

Fatores genéticos têm sido associados a diferenças morfológicas e funcionais encontradas em um grande número de processos fisiopatológicos entre indivíduos de uma mesma espécie. Assim, um mesmo estímulo/lesão pode resultar em respostas e reparos teciduais distintos, tanto entre seres humanos como em animais experimentais de backgrounds diferentes. Várias doenças fibroproliferativas, tais como fibrose pulmonar, esclerose sistêmica e queloides estão entre os processos anormais associados com traços genéticos em humanos e animais experimentais. (SIGMUND 2000; ANDRIKOPOULOS et al., 2005; JOHNSON et al., 2006; DOETSCHMAN, 2009; MARQUES et al., 2011; WIJNVOORD et al., 2010; SIMONE et al, 2014). Processos fibroproliferativos patológicos (aderências, esclerose peritoneal) são comuns na cavidade peritoneal após cirurgia abdominal, isquemia, trauma, infecção ou introdução de material estranho neste compartimento. Estas manifestações clínicas constituem as principais complicações da cicatrização peritoneal e ocorrem em cerca de 90% dos pacientes submetidos à cirurgia abdominal. (ATTA, 2011; AYSAN et al, 2012; DI FILLIPO et al, 2012). Embora alguns estudos tenham investigado a influência do background genético na formação de processos fibroproliferativos da cavidade peritoneal, não encontramos na literatura qualquer estudo que tenha avaliado a influência deste fator na resposta a lesões na cavidade peritoneal induzidas por estímulos mecânicos. Considerando que o procedimento cirúrgico de implantação de material sintético/biomateriais no reparo de lesões teciduais, particularmente na cavidade peritoneal é altamente prevalente, investigar a influência do

background genético em processos induzidos por corpos estranhos neste compartimento anatômico, poderia elucidar diferenças individuais na utilização desta abordagem terapêutica e possíveis resultados adversos deste procedimento. Neste estudo, utilizando-se o modelo de implantação de matriz de discos sintéticos (polieter-poliuretano) na cavidade peritoneal de quatro linhagens murinas distintas foram caracterizadas comparativamente as respostas inflamatórias aguda e crônica, a formação de aderência e o efeito do dipiridamol nesta lesão. Foi demonstrado que o background genético teve impacto diferencial no fenótipo da resposta ao corpo estranho (estímulo mecânico).

Os primeiros resultados desta investigação mostraram que constitutivamente a permeabilidade vascular basal (funcionalidade) da cavidade peritoneal difere entre as linhagens, avaliada pela técnica da difusão da fluoresceína sódica. Esta técnica consiste na difusão do marcador fluorescente aplicada ao tecido e sua posterior detecção na corrente sanguínea, assim quanto menor o tempo para o aparecimento do pico da fluorescência da circulação sistêmica maior é a permeabilidade/fluxo sanguíneo local (ANDRADE et al. 1997). Camundongos Balb/c e C57BL/6 apresentaram menor permeabilidade ao marcador, mas uma resposta vascular mais intensa ao processo inflamatório induzido pelo implante na cavidade peritoneal, 24 h após a lesão. O tempo para o aparecimento do pico da fluorescência diminuiu (47% e 45%, respectivamente) nestes animais comparados ao tempo dos camundongos DBA (33%) e Swiss (37%). Em um estudo com pacientes submetidos à diálise peritoneal que avaliou a permeabilidade vascular foi

demonstrado que fatores genéticos influenciam a permeabilidade da membrana peritoneal a pequenos solutos. Pacientes com genótipo CC e GC apresentaram maior permeabilidade a pequenos solutos em comparação com aqueles com genótipo GG (GILLEROT et al 2005).

Houve também diferenças marcantes na liberação/níveis da maioria dos marcadores inflamatórios avaliados no lavado intraperitoneal entre as linhagens, tanto constitutivamente quanto em resposta ao implante. Ficou claro, que a linhagem DBA/1 apresentou menor atividade inflamatória tanto em níveis basais quanto após o estímulo em comparação com as demais. Foi interessante observar que na linhagem Swiss, a atividade NAG foi a mais alta entre as linhagens e os níveis basais da quimiocina CCL2 foram aproximadamente 3 vezes maiores comparados às demais. Esses achados são coerentes com o papel desta quimiocina no recrutamento de macrófagos em vários estudos (ROLLINS et al, 1997; RAMAN et al, 2011; CASTRO et al, 2014). Na linhagem C57BL/6 destacam-se maiores níveis de nitrito no lavado antes e 24 h pós-implantação. Esses achados discordam daqueles descritos por Petricevich e Pena (2002) no qual não foram observadas diferenças significativas nos níveis de nitrito no soro de camundongos das linhagens A/J, C57BL/6 e DBA após a injeção de veneno de escorpião. Porém, eles utilizaram outro tecido e estímulo inflamatório distinto (veneno). A linhagem Balb/c foi a que apresentou maior resposta inflamatória à presença do implante com níveis mais altos em 2 (MPO, CCL2) dos 5 parâmetros estudados na fase aguda pós-implantação. Nesta linhagem, a atividade da MPO e os níveis de CCL2 e CXCL-1/KC foram estáveis ou aumentados até o 7º dia pós-implantação.

Vários outros estudos, utilizando modelos e estímulos diferentes do nosso mostraram respostas inflamatórias distintas a estímulos químicos aplicados na cavidade peritoneal entre várias linhagens de camundongos. Macrófagos da cavidade peritoneal de Balb/c diferiram com relação à produção de TGF- β , IL-17 e IL-10 de macrófagos de animais C57/BL-6 após estímulo inflamatório químico com lipopolisacarídeo (LPS) (SOUDI et al., 2013). Em nosso estudo, foi interessante observar que o níveis TNF- α no lavado peritoneal, uma potente citocina inflamatória envolvida no recrutamento de neutrófilos e na liberação de mediadores inflamatórios e outras citocinas (Ballou et al. 1996), foram similares entre as linhagens antes e após o implante. Um estudo de KLEINER et al, 2013 comparando animais das linhagens Balb/c e C57BL/6 também mostrou similaridade nos níveis de TNF- α entre os grupos em tecido neuronal, mesmo após tratamento químico.

Este conjunto de resultados confirma e reforça o conceito da influência da heterogeneidade genética na resposta do hospedeiro a estímulos lesivos. No entanto, descreve pela primeira vez não apenas as condições distintas do estado inflamatório latente da cavidade peritoneal, como também respostas inflamatórias diferenciais ao implante sintético biocompatível em linhagens murinas de diferentes backgrounds.

Após a avaliação dos marcadores inflamatórios, nós realizamos o ensaio de migração *in vitro* das células coletadas da cavidade peritoneal de animais das linhagens Swiss, C57BL/6 e Balb/c. Nessa etapa, os animais da linhagem DBA/1 foram excluídos, devido aos baixos níveis de marcadores inflamatórios que apresentaram. Foram utilizados lavados peritoneais de animais sem

implante e implantados 24 horas antes. Os resultados mostraram que o implante, por si só, não foi capaz de alterar significativamente a migração celular dos animais de nenhuma das três linhagens avaliadas. No entanto, o background genético parece ter influência decisiva na migração celular, uma vez que variou de forma significativa entre as linhagens, mesmo em condições basais. As células da cavidade peritoneal dos animais da linhagem Balb/c, em 24 horas, não apresentaram migração celular significativa. Por outro lado, as células dos animais das linhagens Swiss e C57BL/6 apresentaram migração, sendo que as células dos animais Balb/c quase foram capazes de ocupar completamente a área do *scratch*. Nossos achados são coerentes com os de PAL-GOSH e colaboradores 2008, que mostraram que os animais da linhagem C57BL/6 apresentam maior migração de queratinócitos do que de animais da linhagem Balb/c.

A etapa seguinte deste trabalho foi avaliar os componentes, inflamatório, angiogênico e fibrogênico do tecido fibroproliferativo peritoneal induzido pelo implante. A primeira observação relevante foi que aos 7 dias pós-implantação, o disco de polieter-poliuretano era invariavelmente aderido à parede dos órgãos da cavidade particularmente fígado e intestino por uma estrutura fibrosa de tecido conjuntivo nas 4 linhagens de camundongos estudadas. Esta observação *in situ* já havia sido reportada em estudos prévios do laboratório que descreveram o modelo experimental de aderência baseado na implantação de uma matriz sintética (MENDES et al., 2005; ARAÚJO et al., 2009; LIMA et al., 2014).

Em seres humanos a formação de aderências tem sido um problema

clínico de considerável magnitude por constituírem as principais causas de mortalidade e morbidades pós-cirúrgica (CHEGINI, 2002; ATTA, 2011; BROUCHHAUSEN, 2012). Mais de 2/3 dos pacientes submetidos à laparotomias apresentam aderências e cerca de um terço dos pacientes submetidos à cirurgia abdominal ou pélvica são readmitidos em hospitais devido a complicações relacionadas a aderências (ARUNG et al., 2011). Como consequência, a formação de aderências tem um significativo impacto econômico. Nos Estados Unidos, obstruções intestinais causadas por aderências geraram 2200 mortes em 2001 e mais de 67000 admissões hospitalares com internação média de 9,8 dias. Os encargos financeiros gerados pelas complicações associadas à aderência para o sistema de saúde norte-americano é estimada em mais de 5 bilhões de dólares por ano (BUTUREANU & BUTUREANU et al; 2014).

A formação de aderências tem sido amplamente estudada, mas até o momento, não há nenhuma estratégia definitiva para impedir seu desenvolvimento, com controvérsias quanto à eficácia de agentes preventivos disponíveis (ARUNG et al., 2011; BOEK et al, 2013). O tratamento preconizado mais adequado, lise das aderências (STEET & STOUT, 1991; BUTUREANU & BUTUREANU et al; 2014) resulta em 5% a 20% de mortalidade (MENZIES et al., 2001). Portanto, outras intervenções farmacológicas que resultem na prevenção/inibição de aderências são de grande interesse e relevância clínica.

Devido à complexidade e gravidade dessa patologia e o interesse no entendimento dos fatores/mecanismos do seu desenvolvimento, nós avaliamos a influência de antecedentes genéticos na formação destas lesões em resposta a um trauma mecânico (implantação cirúrgica de na cavidade peritoneal em

diferentes linhagens de camundongos). A implantação de biomateriais na cavidade peritoneal é um procedimento médico comum que além de ser um dos fatores que levam à formação de aderências, resulta muito frequentemente na reação corpo estranho. Esta reação adversa, não apenas estimula a formação do tecido fibroproliferativo local como também interfere na funcionalidade do biomaterial. Além disso, avaliamos também como o background genético influenciaria a sensibilidade/resistência ao tratamento com o dipiridamol. Este fármaco inibe a recaptação de adenosina, um produto de decomposição do trifosfato de adenosina (ATP), dificultando a agregação plaquetária e prevenindo doenças trombóticas mediadas por plaquetas (KIM & LIAO, 2008; RAMAKERS et al.; 2011; DOUMAS et al.; 2014). Nossos resultados mostraram diferenças marcantes na formação do tecido fibroproliferativo após implantação de discos de matriz de polieter-poliuretano na cavidade abdominal de camundongos DBA/1, Swiss, C57BL/6 e Balb/c. A influência do background genético tem sido uma questão crítica no delineamento e interpretação de resultados em um grande número de respostas biológicas (SIGMUND et al, 2000). No presente estudo, nós utilizamos três linhagens isogênicas (DBA/1, C57BL/6 e Balb/c) e uma heterogênic (Swiss Webster) porque linhagens heterogênicas são frequentemente usadas em estudos de efeitos de drogas e linhagens isogênicas são usadas como background em manipulação genética. Contudo, em termos de fibrogênese, as linhagens isogênicas tem sido caracterizadas ou como resistentes à fibrose pulmonar (Balb/c) ou propensos (C57BL/6), indicando que fibroproliferação patológica é um processo anormal associado a traços genéticos (KOLB et al., 2002). Assim, seria importante para estudos do

processo fibroproliferativo em diferentes linhagens que as respostas e os mecanismos envolvidos nessa resposta biológica fossem geneticamente determinados. Além disso, uma das dificuldades em estudos de prevenção e/ou tratamento de adesões intra-abdominais (um defeito do processo de cicatrização peritoneal) é a falta de uniformidade nas análises experimentais dessas lesões (OZEL et al, 2005). Ao estudar componentes inflamatórios, angiogênicos e fibrogênicos do tecido fibroproliferativo induzidos por implante de matriz sintética (poliéter-poliuretano) em linhagens isogênicas e heterogênicas, nós fomos capazes de mostrar que respostas a esses componentes são significativamente afetados pelo background genético em camundongos. Além disso, esse modelo pode ser usado para superar as limitações dos atuais modelos de adesão pós-cirúrgica porque, como mostrado pela análise histológica, o tecido de granulação vascular observados nesses implantes continha macrófagos, fibroblastos e células gigantes (todas características típicas do tecido de adesão).

Angiogênese nos implantes de camundongos Swiss, como determinado por seu conteúdo de HB, foi maior que nos implantes das demais linhagens. Esses achados são consistentes com outros trabalhos que mostram que a diferença entre as linhagens de camundongos varia sua habilidade de desenvolver vasos colaterais e a formar neovasculatura em resposta a fatores angiogênicos e no processo inflamatório crônico (ROHAN et al, 2000; FUKINO et al, 2003; CHALOTHORN et al, 2007; MARQUES et al, 2011; PORTELA et al, 2012). Embora o processo de formação de novos vasos seja controlado por vários fatores (estágio do remodelamento vascular, hipóxia e fatores de crescimento), ele também é determinado pelo background genético. Um

importante marcador da angiogênese, a citocina pró-angiogênica VEGF, foi maior em implantes de C57BL/6, mas foi pouco presente em implantes dos animais mais vascularizados da linhagem Swiss. Nossos resultados são comparáveis com os relatados por FUKINO et al, 2003, que mostrou maiores níveis de VEGF de animais C57BL/6 em músculo esquelético isquêmico quando comparado aos músculos de animais Balb/c. Porém, esses nossos resultados não coincidem com o ensaio de HB. Isso demonstra que mesmo marcadores de um mesmo processo fisiológico podem variar independentemente, evidenciando a complexidade observada das variações relacionadas às linhagens. No entanto, em um estudo de OZEL et al, 2005, o córtex hipóxico de camundongos CD-1 mostrou maior área de neovascularização, que coincide com aumento da expressão de VEGF quando comparada com animais C57BL/6 ou Balb/c. Assim, a regulação da angiogênese pode variar em diferentes tecidos e diferentes linhagens. Apesar disso, para as linhagens estudadas, os marcadores angiogênicos foram menores nos animais DBA/1, sugerindo que as outras linhagens devam ser um melhor modelo para a angiogênese no peritônio.

Nós mensuramos cinco marcadores da inflamação (MPO, NAG, nitrito e as citocinas TNF- α e CCL-2). Novamente, sem um padrão claro, as linhagens apresentaram diferenças entre elas. Nossos achados mostram que implantes de camundongos Balb/c continham mais TNF- α que implantes das outras linhagens. Por outro lado, FUKINO et al, 2003 haviam relatado que a expressão do TNF- α foi 50% menor em camundongos Balb/c quando comparado à animais C57BL/6, mas esses autores usaram modelos diferentes (isquemia da pata traseira). A discrepância entre os níveis da quimiocina CCL-2

e a atividade de NAG (macrófagos ativados) em implantes de C57BL/6 está também em contraste com a correlação entre essas variáveis anteriormente demonstradas (ROLLINS et al, 1997; RAMAN et al, 2011). Para a produção de óxido nítrico, uma molécula que é gerada por diferentes tipos de células (leucócitos e células endoteliais) envolvidas na resposta inflamatória (KORHONEN et al, 2005; OLSON et al, 2011), a característica mais marcante foi os menores níveis observados em implantes de camundongos DBA/1. De forma geral, nossos resultados confirmam e ampliam as diferenças na intensidade e magnitude do processo inflamatório entre linhagens de camundongos já relatadas em vários modelos experimentais de inflamação (CAMPOS et al, 2008; MARQUES et al, 2011; DING et al, 2012; TRAMMEL et al, 2012). Contudo, para nosso conhecimento, essa é a primeira demonstração das diferenças relacionadas às linhagens no padrão de marcadores inflamatórios no tecido fibroproliferativo peritoneal induzido por matriz sintética.

Fibrogênese no tecido de remodelamento é regulado por complexas interações de proteínas pró- e antifibrogênicas dentro do tecido inflamatório. O TGF- β 1 é uma citocina pró-fibrótica chave que induz a diferenciação de fibroblastos a miofibroblastos, que sintetizam colágeno (LEASK et al, 2004; BONNIAUD et al, 2005). Os maiores níveis dessa citocina em implantes da linhagem Swiss são totalmente consistentes com maiores conteúdos de HB observados nessa linhagem, uma vez que o TGF- β 1 é altamente expressa em plaquetas (GALLIERA et al, 2012). Os altos níveis de ambos marcadores (colágeno e TGF- β 1) em implantes de camundongos C57BL/6 parece estar de acordo com uma maior susceptibilidade desses animais para o desenvolvimento de fibrose pulmonar e intraperitoneal em resposta ao TGF- β 1

comparado com as demais linhagens (KOLB et al, 2002; MARGETTS et al, 2013). Além disso, corroborando com esses achados, PAL-GHOSH e colaboradores, em 2008, já haviam mostrado que animais da linhagem C57BL/6 cicatrizam melhor feridas na córnea do que animais da linhagem Balb/c. Manigrasso e colaboradores também mostraram em 2008 que os animais da linhagem C57BL/6 apresentam melhor cicatrização óssea que animais da linhagem DBA/2. De maneira geral, nossos resultados da resposta fibrogênica peritoneal poderiam sugerir que os camundongos DBA/1 possuem um menor nível de resposta e assim poderiam ser evitados em estudos de fibrogênese. Por outro lado, os camundongos C57BL/6 poderiam ser um melhor modelo para fibrose no peritônio. Uma limitação do nosso estudo é que as diferenças relacionadas às linhagens no desenvolvimento de fibrose peritoneal foram observadas em apenas um tempo. Assim, as mudanças que podem ocorrer durante o curso desse processo (resposta à matriz) podem ter sido alteradas pelo background genético.

Uma vez mostradas diferenças relacionadas às linhagens na resposta ao implante de esponja, esperava-se uma diferença comparável na modulação de parâmetros do implante pelo tratamento com dipiridamol. Esse componente, usado há vários anos como agente antiplaquetário, já se mostrou capaz de controlar o desenvolvimento de fibrose peritoneal em ratos (HUNG et al, 2001) e de exercer efeitos antiproliferativos em células musculares lisas vasculares de ratos e células mesangiais e mesoteliais humanas (FITZGERALD et al, 1987; IIMURA et al, 1996; HILLS et al, 1998). Atualmente, a descoberta de novas indicações para drogas já existentes (reposicionamento de fármacos) tem valor comercial e terapêutico porque muitos parâmetros clínicos

importantes desses medicamentos, como a dose eficaz, os efeitos colaterais e a toxicidade já foram anteriormente avaliados. Nesse trabalho, nós não só avaliamos uma possível nova aplicação desse fármaco como também mensuramos a variabilidade da resposta ao dipiridamol entre linhagens de camundongos e entre os marcadores avaliados. Nós utilizamos nove marcadores em 4 linhagens, num total de 36 valores que poderiam ser afetados pelo dipiridamol. Contudo, o efeito predominante do dipiridamol (22 dos 36 casos) não foi alterado, com 9 respostas inibidas e 5 estimuladas. A distribuição das respostas mostrou que nos camundongos DBA/1 o dipiridamol mostrou claramente um efeito angiogênico, aumentando ambos marcadores. KIM e colaboradores, em 2007 já haviam descrito efeitos angiogênicos do dipiridamol. Por outro lado, efeitos antiinflamatórios (através do NAG e TNF- α) foram melhor observados em camundongos Balb/c. Nossos achados mostraram que o dipiridamol induziu um aumento nos níveis de nitrito em implantes de animais Swiss e C57BL/6. Esses dados são corroborados com os achados de VENKATESH et al, 2010, que mostrou aumento na produção de óxido nítrico/ nitrito em isquemia de pata de camundongos C57BL/6 após tratamento com dipiridamol. De maneira intrigante, esses efeitos foram associados com uma melhor atividade arteriogênica e perfusão do fluxo sanguíneo. Em nosso experimento, dipiridamol mostrou um efeito antiangiogênico em implantes de animais Swiss mas não em implantes de animais C57BL/6. Novamente, isso pode ser atribuído à linhagem e/ou ao tecido utilizado. Embora o dipiridamol iniba o TGF- β e o colágeno nos implantes, esses efeitos foram em linhagens diferentes, Swiss e C57BL/6, respectivamente. De acordo com esses resultados, esse componente pode ser

menos eficaz como componente antifibrogênico do que como agente anti-inflamatório e antiangiogênico, nessa dose (200 mg/Kg) e nesse estágio (7 dias) da resposta fibroproliferativa nos implantes. Em alguns pontos, nossos resultados estão de acordo com os de HUNG et al 2001, que relatam atenuação da fibrose peritoneal pelo dipiridamol em ratos.

Nossos resultados confirmam, ampliam e quantificam a dependência da genética da linhagem em características da fisiopatologia da fibrogênese peritoneal. Dessa forma, eles podem explicar mais a variabilidade em modelos animais e, aliado a comparáveis variações na resposta ao dipiridamol, explicar grande parte das variações em ensaios de atividade antifibrogênica *in vivo*. Além disso, essa variabilidade pode explicar porque alguns componentes são eficazes em modelos animais, mas não na prática clínica.

A demonstração da heterogeneidade genética na resposta do hospedeiro de diferentes backgrounds genéticos a implantes sintéticos mostra a relevância deste estudo no contexto clínico, uma vez que procedimentos de implantação de biomateriais em reparos de lesões da cavidade peritoneal são altamente prevalentes na prática médica.

Esses estudos podem contribuir para um delineamento mais eficaz de estudos e modelos experimentais de processos fibroproliferativos e da sua modulação farmacológica, ambos essenciais para uma melhor compreensão dessa expressão clínica significativa da fibrogênese. Além disso, compreender melhor esse processo pode contribuir para aperfeiçoar as propostas terapêuticas da aderência e outras doenças dependentes da fibrogênese, melhorando o prognóstico dos pacientes e reduzindo custos aos serviços públicos de saúde.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

- O implante de matriz sintética se mostrou eficaz para a avaliação dos objetivos propostos, uma vez que mimetiza os implantes sintéticos de biomateriais utilizados na prática clínica.
- Nosso trabalho reforça a ideia de que o background genético influencia características da fisiopatologia da fibrogênese peritoneal.
- As diferenças genéticas individuais influenciaram a resposta à inflamação aguda e crônica, angiogênese, fibrogênese e resposta ao dipiridamol, mostrando a importância da escolha da linhagem no delineamento experimental.
- De acordo com os resultados do estudo, a linhagem mais indicada para o estudo de aderência é a C57BL/6.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBOTT, S. L.; KOKKA, R. P.; JANDA, J. M. (1991). Laboratory investigations on the low pathogenic potential of *Plesiomonas shigelloides*. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(1):148–153.
2. AHMAD, G.; MACKIE, F.L.; ILES, D.A.; O'FLYNN, H.; DIAS, S.; METWALLY, M.; WATSON, A (2014). Fluid and pharmacological agents for adhesion prevention after gynaecological surgery. The Cochrane Database of systematic reviews. 2014: 1-114.
3. ALKHAMESI, N.A. & SCHLACHTA, C.M. (2013). The role of aerosolized intraperitoneal heparin and hyaluronic acid in the prevention of postoperative abdominal adhesions. *Surgical Endoscopy*, 27 (12): 4663-4669.
4. ANDRADE, S.P.; FAN, T-P.D.; LEWIS, G.P. (1987). Quantitative in vivo studies on angiogenesis in rats sponge model. *British Journal of Experimental Pathology*, 68(6):755-766.
5. ANDRADE, S.P.; MACHADO, R.D.P.; TEIXEIRA, A.S.; BELO, A.V.; TARSO, A.M.; BERALDO, W.T (1997). Sponge-induced angiogenesis in

mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. *Microvascular Research*, 54(3):253-261.

6. ANDRADE, S.P.; FERREIRA, M.A.N.D. The sponge model of angiogenesis. *Angiogenesis protocols. Nittingham*, 2009, Cap. 18, 295-304.
7. ANDRIKOPOULOS, S.; MASSA, C.M.; ASTON-MOURNEY, K.; FUNKAT, A.; FANT, B.C.; HULL, R.L.; KAHN, S.E.; PROIETTO, J. (2005). Differential effects of inbred mouse strain (C57BL/6J, DBA/2, 129T2) on insulin secretory function in response to a high fat diet. *Journal of Endocrinology*, 187(1): 45-53.
8. ARAUJO, F.A.; ROCHA, A.A.; FERREIRA, M.A.N.D.; CAMPOS, P.P.; LEMOS, V.S.; ANDRADE, S.P. (2011). Implant-induced intraperitoneal inflammatory angiogenesis is attenuated by fluvastatin. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 38(4): 262-268.
9. ARROYO, A.G.; IRUELA-ARISPEM, A. (2010). Extracellular matrix, inflammation and the angiogenic response. *Cardiovascular Research*, 86 (2): 226-235.
10. ARUNG, W.; MEURISSE, M.; DETRY, O. (2012). Pathophysiology and prevention of postoperative peritoneal adhesions. *World Journal of Gastroenterology*, 17(41): 4545-4553.

11. ATTA, H.M. (2011). Prevention of peritoneal adhesions: A promising role for gene therapy. *World Journal of Gastroenterology*, 17(46): 5049-5058.
12. AYDOSELI, A.; TAHTA, A.; ARAS, Y.; SABANCI, A.; KESKIN, M.; BALIK, E.; ONDER, S.; SENCER, A.; IZGI, N. (2015). Use of antibiobrotics to prevent ventriculoperitoneal shunt complications due to intra-abdominal fibrosis: experimental study in a rat model. *Journal of neurological surgery part A, central european neurosurgery*, 76(3): 219-223.
13. AYSAN, E.; BEKTAS, H.; FEYSYLLAH, E.; SARI, S.; KAYGUSUZ, A.; HUQ, G.E.; (2012). New and simple approach for preventing postoperative peritoneal adhesions: Do not touch the peritoneum without viscous liquid a multivariate analysis. *Obstetrics Gynecology International*, 2012(2012): 1-7.
14. AYTAN, H.; CALISKAN, A.C.; YENER, T.; DEMIRTURK, F.; AYTAN, P.; YENISEHURLI, A. (2009). A novel antibiotic, linezolid, reduces intraperitoneal adhesion formation in the rat uterine horn model. *Acta obstreticia et gynecologica scandinavica*, 88(7): 781-786.
15. BALAKUMAR, P.; NYO, Y.H.; RENUSHIA, R.; RAAGINEY, D.; OH, A.N.; VARATHARAJAN, R.; DHANARAJ,S.A. (2014). Classical and pleiotropic actions of dipyridamole: Not enough light to illuminate the dark tunnel?

Pharmacological Research, 87(2014): 144-150.

16. BANG, S.; LEE, E.; KO, Y-G.; KIM, W.; KWON, O.H. (2016). Injectable pullulan hydrogel for the prevention of postoperative tissue adhesion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87: 155-162.
17. BARCELOS, L.S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A.S.; VIEIRA, L.Q.; CASSALI, G.D.; ANDRADE, S.P.; TEIXEIRA, M.M. (2005). Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(2): 352-358.
18. BEELEN, R.H.J. (1991). The Greater omentum: physiology and immunological concepts. *The Netherlands Journal of Surgery*. 43(5): 145 - 149.
19. BELO, A.V.; LELES, F.; BARCELOS, L.S.; FERREIRA M.A.N.D.; BAKHLE, Y.S.; TEIXEIRA, M.M.; ANDRADE, S.P. (2005). Murine chemokine CXCL2/KC is a surrogate marker for angiogenic activity in the inflammatory granulation tissue. *Microcirculation*, 12(7):597-606.
20. BERTOK, S.; WILSON, M.R.; DORR, A.D.; DOKPESI, J.O.; O'DEA, K.P.; MARCZIN, N.; TAKATA, M. (2011). Characterization of TNF receptor subtype expression and signaling on pulmonary endothelial cells in mice.

American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology,
300(5): 781-789.

21. BIANCHI, E.; BOEKELHEIDE, K.; SIGMAN, M.; LAMB, D.J.; HALL, S.J.; HWANG, K. (2016). Ghrelin inhibits post-operative adhesions via blockage of the TGF- β signaling pathway. *Plos One*, 11(4): 1-15.

22. BISHOP, J. Mouse husbandry and genetics. *Transgenic mammals*. London, 1999, Cap. 4. , 47-65.

23. BITTINGER, F.; BROCHHAUSEN, C.; KOHLER, H.; LEHR, H.A.; OTTO, M.; SKARKE, C.; WALGENBACH, S.; KIRKPATRICK, C.J. (1998) Differential expression of cell adhesion molecules in inflamed appendix: Correlation with clinical stage. *The Journal of Pathology*, 186(4):422–428.

24. BOEK, R.P.G; KRANT, N.K.; BAKKUM, E.A.; BLEICHRODT, R.P.; GOOR, H. (2013). Different surgical techniques to reduce post-operative adhesion formation: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 19(1): 12-25.

25. BONAVENTURA, A.; MONTECUCCO, F.; DALLEGRI, F. (2016). Cellular recruitment in myocardial ischemia/reperfusion injury. *European Journal of clinical investigation*, 2016: 1-39.

26. BONNET, C.S.; WALSH, D.A. (2005). Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology*, 44(1): 7-16.
27. BONNIAUD, P.; MARGETTS, P.J.; ASK, K.; FLANDERS, K.; GAULDIE, J.; KOLB, M. (2005). TGF- β and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *Journal of Immunology*, 175 (8): 5390-5395.
28. BORNE, S.W.M.V.; SCHANS, V.A.M.V.; STRZELECKA, A.E.; VERVOORT-PETERS, H.T.M.; LIJNEN, P.M.; CLEUTJENS, J.P.M.; SMITS, J.F.M.; DAEMEN, M.J.A.P.; JANSSEN, B.J.A.; BLANKESTEIJN, W.M. (2009). Mouse strain determines the outcome of wound healing after myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 84(2): 273-282.
29. BRADSHAW, A.D.; REED, M.J.; CARBON, J.G.; PINNEY, E.; BREKKEN, R.A.; SAGE, H. (2001). Increased fibrovascular invasion of subcutaneous polyvinyl alcohol sponges in SPARC-null mice. *Wound Repair and Regeneration*, 9(6):522-530.
30. BRAUN, K.M. & DIAMOND, M.P. (2014). The biology of adhesion formation in the peritoneal cavity. *Seminars in Pediatric Surgery*, 23(6): 336-343.
31. BROCHAHAUSEN, C.; SCHMITT, V.H.; PLANCK, C.N.E.; RAJAB, T.K.; HOLLEMANN, D.; TAPPRICH, C.; KRAMER, B.; WALLWIENER, C.;

- HIERLEMANN, H.; ZEHBE, R.; PLANCK, H.; KRIRKPATRICK, C.J. (2012). Current Strategies and future perspectives for intraperitoneal adhesion prevention. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 16 (6): 1256-1274.
32. BRUGGMANN, D.; TCHARTCHIAN, G.; WALWIENER, M.; MUNSTEDT, K.; TINNEBERG, H.R.; HACKETHAL.A. (2010). Intra-abdominal adhesions: definition, origin, significance in surgical practice, and treatment options. *Deutsches Arzteblatt International*, 104(44): 769-775.
33. BUTUREANU, S.A.; BUTUREANU, T.A.S. (2014). Pathophysiology of Adhesions. *Chirurgia*, 109(3): 293-298.
34. CAGLAYAN¹, E.K.; CAGLAYAN, K.; ERDOGAN, N.; CINAR, H.; GUNGOR, B. (2014). Preventing intraperitoneal adhesions with ethyl pyruvate and hyaluronic acid/carboxymethylcellulose: a comparative study in an experimental model. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 181 (2014):1-5.
35. CAGLAYAN², K.; GUNGOR, B.; CINAR, H.; ERDOGAN, N.Y.; KOCA, B. (2014). Preventing intraperitoneal adhesions with linezolid and hyaluronic acid/ carboxymethylcellulose: a comparative study in cecal abrasion model. *The American Journal of Surgery*, 208 (1): 106-111.

36. CAMPBELL, G.R.& RYAN, G.B. (1983). Origin of myofibroblasts in the avascular capsule around free-floating intraperitoneal blood clots. *Pathology*, 15(3): 253-264.
37. CAMPBELL, J.H.; EFENDY, J.L.; CAMPBELL, G.R. (1999). Novel vascular graft grown within recipient's own peritoneal cavity. *Circulation Research*, 85(12): 1173-1178.
38. CAMPOS, P.P.; ANDRADE, S.P.; MORO, L.; FERREIRA, M.A.N.D.; VASCONCELOS, A.C. (2006). Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. *Histology and Histopathology*, 21(12):1263-1270.
39. CAMPOS, P.P.; BAKHLE, Y.S.; ANDRADE, S.P. (2008). Mechanisms of wound healing responses in lupus-prone New Zealand White mouse strain. *Wound Repair and Regeneration*, 16 (3): 416-424.
40. CARMELIET, P.; JAIN, R.K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature Reviews. Drug discovery*, 10(6): 417-427.
41. CASSADO, A.A. Heterogeneidade dos macrófagos peritoneais. 2011. 158 f. Tese (Doutorado em Imunologia)- Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

42. CASTRO, P.R.; MARQUES, S.M.; VIANA, C.T.R.; CAMPOS, P.P.; FERREIRA, M.A.N.D.; BARCELOS, L.S.; ANDRADE, S.P. (2014). Deletion of the chemokine receptor CCR2 attenuates foreign body reaction to implants in mice. *Microvascular Research*, 95:37- 45.
43. CHALOTHORN, D.; CLAYTON, J.A.; ZHANG, H.; POMP, D.; FABER, J.E. (2007). Collateral density, remodeling, and VEGF-A expression differ widely between mouse strains. *Physiological Genomics*, 30(2):179-191.
44. CHAN, A.W.S. (1999). Transgenic animals: current and alternative strategies. *Cloning*, 1(1): 25-46.
45. CHAO, M.; HIRSCHI, K.K. (2010). Hemato-vascular origins of endothelial progenitor cells? *Microvascular Research*, 79(3): 169-173.
46. CHEGINI, N. (2002). Peritoneal molecular environment, adhesion formation and clinical implication. *Frontiers in Bioscience*, 7:91-115.
47. CHEONG, Y.C., LAIRD, S.M., LI, T.C., SHELTON, J.B., LEDGER, W.L., COOKE, I.D., (2001). Peritoneal healing and adhesion formation/reformation. *Human Reproduction Update* 7(6):556-566.
48. CHRISTO, S.N.; DIENER, K.R.; BACHHUKA, A.; VASILEV, K.; HAYBALL, J.D. (2015). Innate Immunity and Biomaterials at the Nexus: Friends or

Foes, 2015 (2015): 1-23.

49. CUMMING, B.D.; McELWAIN, DL.S.; UPTON, Z (2010). A mathematical model of wound healing and subsequent scarring. *Journal of the Royal Society Interface*, 7(42): 19-34.
50. DAI, Z.; LI, Y.; LU, W.; JIANG, D.; LI, H.; YAN, Y.; LV, G.; YANG, A. (2015). In vivo biocompatibility of new nano-calcium-deficient hydroxyapatite/poly-amino acid complex biomaterials. *International Journal of Nanomedicine*, 2015: 6303- 6316.
51. DENG, L.; LI, Q.; LIN, G.; HUANG, D.; ZENG, X.; WANG, X.; LI, P.; JIN, X.; ZHANG, H.; LI, C.; CHEN, L.; WANG, L.; HUANG, S.; SHAO, H.; XU, B.; MAO, J. (2016). P-glycoprotein mediates postoperative peritoneal adhesion formation by enhancing phosphorylation of the chloride channel-3. *Theranostics*, 6(2): 204- 218.
52. DI FILLIPO, C.; PETRONELLA, P.; FREDA, F.; SCORZELLI, M.; FERRETI, M.; CANONICO, S.; ROSS, S.; D'AMICO, M. (2012). Involvement of the ubiquitin-proteasome system in the formation of experimental postsurgical peritoneal adhesions. *Mediators of Inflammation*, 2012 (2012): 1-7.

53. DING, S.; WALTON, K.L.; BLUE, R.L.; MCNAUGHTON, K.; MAGNESS, S.T.; LUND, P.K. (2012). Mucosal healing and fibrosis after acute or chronic inflammation in wild type FVB-N mice and C57BL6 procollagen α 1(I)-promoter-GFP reporter mice. *PLoS ONE*, 7: 1–16.
54. DOETSCHMAN, T. (2009). Influence of genetic background on genetically engineered mouse phenotypes. *Methods in Molecular Biology*, 530: 423-433.
55. DOUMAS, A.; CHRISTOFORIDIS, T.; IAKOVOU, I.; MOSIALOS, L.; BOBOTOS, G.; KARATZAS, N. (2014). Incidence of reversible defect. Seen on myocardial perfusion scintigraphy using dipyridamole pharmacologic test early after primary percutaneous coronary intervention: how safe is it to perform this protocol? (2014). *Hellenic Journal of Cardiology*, 55(6): 492-498.
56. DOWNIE, L.E.; STAINER, M.J.; CHINNERY, H.R. (2014). Monitoring of Strain-Dependent Responsiveness to TLR Activation in the Mouse Anterior Segment Using SD-OCT. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(12): 8189-8199.
57. DU, X.H.; LIU, J.Q.; XIN, K.; LIU, G.H. (2015). Dexamethasone and sodium carboxymethyl cellulose prevent postoperative intraperitoneal adhesions in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(4): 344-348.

58. EMING, S.A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine*, 6(265): 1-16.
59. EPISTEIN, J.C., WILSON, M.S., WILKISZ, S., IRELAND, G., O'DWYER, S.T., ERIC, S.E., (2006). Human peritoneal adhesions show evidence of tissue remodeling and markers of angiogenesis. *Diseases of Colon and Rectum*, 49(12):1885-1892.
60. FAN, Y.; FANG, X.; TAJIMA, A.; GENG, X.; RANGANATHAN, S.; DONG, H.; TRUCCO, M.; SPERLING, M.A. (2014). Evolution of hepatic steatosis to fibrosis and adenoma formation in liver-specific growth hormone receptor knockout mice. *Frontiers in Endocrinology*, 2014,:1-10.
61. FERGUSSON, G.; ETHLER, M.; GUEVREMONT, M.; CHRETLEN, C.; ATTANE, C.; JOLY, E.; FIORAMONTI, X.; PRENTKI, M.; POITOUT, V.; ALQUIER, T. (2014). Defective insulin secretory response to intravenous glucose in C57Bl/6J compared to C57Bl/6N mice. *Molecular Metabolism*, 3(9): 848-854.
62. FERREIRA, M.A.N.D.; BARCELOS, L.S.; CAMPOS, P.P.; VASCONCELOS, A.C.; TEIXEIRA, M.M.; ANDRADE, S.P. (2004). Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFK-KO). *British Journal of Pharmacology*, 141(7): 1185-1192.

63. FITZGERALD, G.A. (1987). Dipyridamole. *The New England Journal of Medicine*, 316: 1247–57.
64. FUKINO, K.; SATA, M.; SEKO, Y.; HIRATA, Y.; NAGAI, R.(2003). Genetic background influences therapeutic effectiveness of VEGF. *Biochemand Biophysical Research Communications*, 310: 143–7.
65. GALLIERA, E.; CORSI, M.M.; BANFI, G. (2012). Platelet rich plasma therapy: inflammatory molecules involved in tissue healing. *Journal of Biological Regulators Homeostatic Agents*, 26 (2 Suppl. 1): 35S–42S.
66. GAMBOA, A.; ABRAHAM, R.; DIEDRICH, A.; SHIBAO, C.; PARANJAPE, S.Y.; FARLEY, G.; BIAGGIONI, J. (2005). Role of adenosine and nitric oxide on the mechanisms of action of dipyridamole. *Stroke*, 10: 2170-2175.
67. GIBB, D.M.; DUNGER, D.; LEVIN, M.; GRANT, D.; JONES, P.; BARRATT, T.M. (1990). Absence of effect of dipyridamole on renal and platelet function in diabetes mellitus. *Archives of Disease in Childhood*, 65(1): 93-98.
68. GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R.(1982). Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126(1): 1-8.

69. HARPER, D.; YOUNG, A.; McNAUGHT, C-E. (2014). The physiology of wound healing. *Basic Science*, 2014: 445-450.
70. HARTNER, A.; CORDASIC, N.; KLANKE, B.; VEELKEN, R.; HILGERS, K.F. (2003). Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice. *Nephrology, Dialysis Transplantation*, 18(10):1999-2004.
71. HASHEMI, S.M.; HASSAN, Z.M.; POURFATHOLLAH, A.A.; SOUDI, S.; SHAFIEE, A.; SOLEIMANI, M. (2013). Comparative immunomodulatory properties of adipose-derived mesenchymal stem cells conditioned media from Baçb/c, C57Bl/6 and DBA mouse strains. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(4): 955-965.
72. HILLS, G.S.; DUTHIE, L.A.; MACLEOD, A.M.(1998). Dipyridamole inhibits human mesangial cell proliferation. *Nephron*, 78: 172–8.
73. HINDOCHA, A.; BEERE, L.; DIAS, S.; WATSON, A.; AHMAD, G. (2015). Adhesion prevention agents for gynaecological surgery: an overview of Cochrane reviews. *The Cochrane Database of systematic reviews*, 2015: 1-47.
74. HUNG, K.Y.; SHYU, R.S.; FANG, C.C.; TSAI, C.C.; LEE, P.H.; TSAI, T.J.; HSIEH, B.S. (2001). Dipyridamole inhibits human peritoneal mesothelial cell

proliferation in vitro and attenuates rat peritoneal fibrosis in vivo. *Kidney International*, 59: 2316–24.

75. HUNT, D.L.; CAMPBELL, P.H.; ZAMBON, A.C.; VRANIZAN, K.; EVANS, S.M.; KUO, H-C.; YAMAGUCHI, K.D.; OMENS, J.H.; McCULLOCH, A.D. (2012). Early post-myocardial infarction survival in MRL mice is mediated by attenuated apoptosis and inflammation but depends on genetic background. *Experimental Physiology*, 97(1): 102-114.

76. IIMURA, O.; KUSANO, E.; AMEMIYA, M.; MUTO, S.; IKEDA, U.; SHIMADA, K.; ASANO, Y. (1996). Dipyridamole enhances interleukin-1 beta-stimulated nitric oxide production by cultured rat vascular smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology*, 296: 319–26.

77. ITO, T.; UCHIDA, K.; NAKAYAMA, M. (2013). Neuronal or inducible nitric oxide synthase (NOS) expression level is not involved in the different susceptibility to nigro-striatal dopaminergic neurotoxicity induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) between C57BL/6 and BALB/c mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65 (1-2) 121–125

78. JEANSSON, M.; GAWLIK, A.; ANDERSON, G.; LI, C.; KERJASCHLI, D.; HENKELMAN, M.; QUAGGIN, S.E. (2011). Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6): 2278-2289.

79. JOHNSON, K.R.; ZHENG, Q.Y.; NOBEN-TRAUTH, K. (2006). Strain background effects and genetic modifiers of hearing in mice. *Brain Research*, 26(1): 79-88.
80. JUNG, W.Y.; KANG, J.H.; KIM, H.S.; JANG, B.J.; PARK, Y.H.; SONG, I-H. (2014). Human adipose-derived stem cells attenuate inflammatory bowel disease in IL-10 knockout mice. *Tissue and Cell*, 2014: 1-8.
81. KASUYA, A.; TOKURA, Y.(2014). Attempts to accelerate wound healing. *Journal of Dermatological Science*, 76(2014): 169–172.
82. KAYAOGU, H.A.; OZHAN, N.; YENIDOGAN, E.; KOSEOGU, R.D. (2013). Effect of antibiotic lavage in adhesion prevention in bacterial peritonitis. *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery*, 19(3): 189-194.
83. KIM, H.H.; Liao, J.K. (2008). Translational Therapeutics of Dipyridamole. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 28(3): 39-42.
84. KLEBANOFF, S.J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of leukocyte biology*, 77(5): 598-625.
85. KLEINER, G.; CELSI, F.; TRICARICO, P.M.; ZACCHIGNA, S.; CROUELLA, S.; MARCUZZI, A. (2013). Systemic and Neuronal Inflammatory Markers in a Mouse Model of Mevalonate Kinase Deficiency: a Strain-comparative Study. *Anticancer Research*, 27(6): 715-722

86. KOLB, M.; BONNIAUD, P.; GALT, T.; SIME, P.J.; KELLY, M.M.; MARGETTS, P.J.; GAULDIE, J.(2002). Differences in the fibrogenic responses after transfer of active transforming growth factor- β 1 gene to lungs of “fibrosis-prone” and “fibrosis-resistant” mouse strains. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 27(2): 141-150.
87. KORHONEN, R.; LAHTI, A.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. (2005). Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current Drug Targets Inflammation & Allergy*, 4: 471–9.
88. LAGE, A.; ANDRADE, S.P.(2000). Assessment of angiogenesis and tumor growth in conscious mice by a fluorimetric method. *Microvascular Research*, 59(2): 278-285.
89. LAUDER, C.I.W.; GARCEA, G.; STRICKLAND, A.; MADDERN, G.J. (2010). Abdominal adhesion prevention: still a sticky subject? *Digestive Surgery*, 27(5): 345-358.
90. LEASK, A.; ABRAHAM, D.V. (2004). TGF- β signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal*, 18 (7): 816-827.

91. LEITER, E.H.; REIFSNYDER, P.C. (2004). Differential levels of diabetogenic stress in two new models of obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*, 53, Suppl. 1:S4-11.
92. LIMA, L.D.C. ; ANDRADE, S.P. ; CAMPOS, P.P.; BARCELOS, L.S.; SORIANI, F.M.; AL MOURA, S.; FERREIRA, M.A.N.D. (2014). Brazilian green propolis modulates inflammation, angiogenesis and fibrogenesis in intraperitoneal implant in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14: 1-9.
93. LUIJENDIJK, R.W.; LANGE, D.C.D.; WAUTERS, C.C.A.P.; HOP, W.C.J.; DURON, J.J.; PAILER, J.L.; COMPRODON, B.R.; HOLMDAHL, L.; GELDORP, H.J.; JEEKEL, J. (1996). Foreign material in postoperative adhesions. *Annals of surgery*, 223(3): 242-248.
94. MANIGRASSO, M.B. & O'CONNOR, J.P. (2008). Comparison of fracture healing among different inbred mouse strains. *Calcified Tissue International*, 82: 465-474.
95. MARRAZO, G.; BELLNER, L.; HALILOVIC, A.; VOLT, G.L.; DRAGO, F.; DUNN, M.W.; SCHWARTZMAN, M.L.(2011). The role of neutrophils in corneal wound healing in HO-2 null mice. *PLOS One*, 6(6): 1-8.

96. MARGETTS, P.J.; HOFF, C.; LIU, L.; KORSTANJE, R.; WALKIN, L.; SUMMERS, A.; HERRICK, S.; BRENCHLEY, P. (2013). Transforming growth factor β -induced peritoneal fibrosis is mouse strain dependent. *Nephrology Dialysis Transplant*, 28: 2015–27.
97. MARQUES, S.M.; CAMPOS, P.P.; CASTRO, P.R.; CARDOSO, C.C.; FERREIRA, M.A.N.D.; ANDRADE, S.P. (2011). Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. *Microvascular Research*, 82(2011): 246-252.
98. MASSARO, M.; SCODITT, E.; CARLUCCIO, M.A.; PELLEGRINO, M.; CALABRISO, N.; STORELLI, C.; MARTINES, G.; CATERINA, R. (2013). Dipyridamole decreases inflammatory metalloproteinase-9 expression and release by human monocytes. *Cardiovascular Biology and Cell Signalling*, 109(2):280-289.
99. MASSET, M.P.; BERK, B.C. (2005). Strain- dependent differences in responses to exercise training in bred and hybrid mice. *American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 586 (16): 3979-3990.
100. MCCRACKEN, J.M.; JIANG, L.; DESHPANDE, K.T.; O'NEIL, M.F.; PRITCHARD, M.T. (2016). Differential effects of hyaluronan synthase 3

deficient after acute vs chronic liver injury in mice. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 9: 1-15.

101. MENDES, JB.; ROCHA, M.A.; ARAÚJO, F.A.; MOURA, S.A.; FERREIRA, M.A.; ANDRADE, S.P. (2009). Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. *Microvascular Research*, 78 (3), 265-271.

102. MENZIES, D.; ELLIS, H.(1990). Intestinal obstruction from adhesions—how big is the problem? *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 72: 60–3.

103. MENZIES, D.; PARKER, M.; HOARE, R.; KNIGHT, A. (2001). Small bowel obstruction due to postoperative adhesions: treatment patterns and associated cost in 110 hospital admissions. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 83(1): 40-46.

104. MILLS, C.D.; KINCAID, K.; ALT, J.M.; HEILMAN, M.J.; HILL, A.M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12): 6166-6173.

105. MO, Y.; CHEN, J.; SCHLUETER, C.F.; HOYLE, G.W. (2013) Differential susceptibility of inbred mouse strains to chlorine-induced airway fibrosis.

American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology,
304(2): L92–102.

106. MOONEY, J.E.; ROLFE, B.E.; OSBOME, G.W.; SESTER, D.P.; ROOIJEN, N.; CAMPBELL, G.R.; HURNE, D.A.; CAMPBELL, J.H. (2010). Cellular Plasticity of inflammatory myeloid cells in the peritoneal foreign body response. *The American Journal of Pathology*, 176 (1): 369-380.
107. MOORE, L. B.; KYRIAKIDES, T.R. (2015). Molecular characterization of macrophage-biomaterial interactions. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 865: 109-122.
108. MURPHY, K.E.; HALL, C.L.; McCue, S.W.; McELWINS, D.L.S (2011). A two- compartment mechanochemical model of the roles of transforming growth factor β and tissue tension in dermal wound healing. *Journal of Theoretical Biology*, 272(2011): 145-159.
109. NAYAK, B.S.; SANDIFOR, S.; MAXWELL, A. (2009). Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda cetrifolia* L.Leaf. *Evidence- based Complementary and Alternative Medicine*, 6(3): 351-356.
110. NINAN, N.; THOMAS, S.; GROHENS, Y. (2014). Wound healing in urology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014:1-13.

111. NUNES, P.S.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R.L.C.; CAVALCANTE, D.R.R.; DANTAS, M.D.M.; CARDOSO, J.C.; BEZERRA, M.S.; SOUZA, J.C.C.; SERAFINI, M.R.; QUITANS-JR, L.J.; BONJARDIM, L.R.; ARAUJO, A.A.S. (2011). Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1-9.
112. NYSKA, A.; WANER, T.; TAL, H.; DAYAN, D. (1991). Spontaneous ameloblastic fibro-odontoma in a female mouse. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 20(5): 250–252.
113. OLSON, N.; VAN DER VLIET, A. (2011). Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. *Nitric Oxide*, 25: 125–37.
114. OLVEDO-SOCARRÁS, T.; VASCONCELOS, A.C.; BARBOSA, I.X.; PEREIRA, N.B.; CAMPOS, P.P.; ANDRADE, S.P. (2014). Diabetes alters inflammation, angiogenesis, and fibrogenesis in intraperitoneal implants in rats. *Microvascular research*, 2014.
115. OOSTERLINCK, W.; VANDERPER, A.; FLAMENG, W.; HERJIGERS, P. (2011). Glucose tolerance and left ventricular pressure-volume relationships in frequently used mouse strains. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1-7.

116. OZEL, H.; AVSAR, F.M.; TOPALOGLU, S.; SAHIN, M.(2005). Induction and assessment methods used in experimental adhesion studies. *Wound Repair and Regeneration*, 13: 358–64.
117. PAL-GHOSH, S.; TADVALKAR, G.; JURJUS, R.A.; ZIESKE, J.D.; STEPP, M.A. (2008). BALB/C and C57BL6 mouse strains vary in their ability to heal corneal epithelial debridement wounds. *Experimental Eye Research*, 87(5): 478-486.
118. PATILLO, C.B.; BIR, S.C.; BRANCH, B.G.; GREBER, E.; SHEN, X.; PARDUE, S.; PATEL, R.P.; KEVIL, C.G. (2011). Dipyridamole reverses peripheral ischemia and induces angiogenesis in the Db/Db diabetic mouse hind-limb model by decreasing oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 50(2):262–269.
119. PETRICEVICH, V.L.; PENA, C.F. (2002). The dynamics of cytokine and nitric oxide secretion in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Mediators of Inflammation*, 11(3): 173–180
120. QIAO, Q.; LI, T.; SUN, J.; LIU, X.; REN, J.; FEI, J. (2011). Metabolomic analysis of normal (C57BL/6J, 129S1/SVJmJ) mice by gas chromatography-

- mass spectrometry: Detection of strain and gender differences. *Talanta*, 85(1): 718-724.
121. RAMAKERS, B.P.; RIKSEN, N.P.; STAL, T.H.; HEEMSKERK, S.; BROEK, P.; PETERS, W.H.M.; HOEVEN, J.G.; SMITS, P.; PICKKERS, P. (2011). Dipyridamole augments the antiinflammatory response during human endotoxemia. *Critical Care*, 15(6): 1-10.
122. RAMAN, D.; SOBOLIK-DELMARE, T.; RICHMOND, A. (2011). Chemokines in health and disease. *Experimental Cell Research*, 317(5): 575-89.
123. RICHARDSON, M.R.; YODER, M.C. (2011). Endothelial progenitor cells: quo vadis? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50 (2): 266-272.
124. RODERO, M.P.; KHOSROTEHRANI, K. (2010). Skin wound healing modulation by macrophages. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 3(7): 643-653.
125. ROHAN, R.M.; FERNANDEZ, A.; UDAGAWA, T.; YOUN, J.; D'AMATO, R.J. (2000). Genetic heterogeneity of angiogenesis in mice. *FASEB Journal*. 14: 871-876.
126. ROLLINS, B.J. (1997). *Chemokines. Blood*, 90(3): 909-928.

127. SAMPAIO, F.P.; CASTRO, P.R.; MARQUES, S.M.; CAMPOS, P.P.; FERREIRA, M.A.N.D., ANDRADE, S.P.(2012). Genetic background determines inflammatory angiogenesis response to dipyridamole in mice. *Experimental Biology and Medicine*, 237: 1084–92
128. SIGMUND, C.D. (2000). Viewpoint: are studies in genetically altered mice out of control? *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 20(6):1425-1429.
129. SIMONE, M.; SPAGNUOLO, L.; LORE, N.J.; ROSS, G.; CIGANA, C.; FINO, I.; IRAQI, F.A.; BRAGONZI, A. (2014). Host Genetic Background Influences the Response to the Opportunistic *Pseudomonas aeruginosa* Infection Altering Cell-Mediated Immunity and Bacterial Replication. *PLOS ONE*, 9(9): 1-10
130. STATON, C.A.; STRIBBLING, S.M.; TAZZYMAN, S.; HUGHES, R.; BROWN, N.J.; LEWIS, C.E. (2004). Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *International Journal of Experimental Pathology*, 85(5): 233-248.
131. STEEGE, J.F; STOUT, A.L. (1991). Resolution of chronic pelvic pain after laparoscopic lysis of adhesions. *American Journal of Obstetrics Gynecology* 165(2):278-81.

132. SURWIT, R.S.; FEINGLOS, M.N.; RODIN, J.; SUTHERLAND, A.; PETRO, A.E.; OPARA, E.C.; KUHN, C.M.; REBUFEE-SCRIVE, M. (1995). Differential Effects of Fat and Sucrose on the Development of Obesity and Diabetes in C57BL/6J and A/J Mice. *Metabolism: clinical and experimental*, 44(5): 645-651.
133. TEIXEIRA, A.S.; CALIARI, M.V.; et al. (1999). Aminoguanidine prevents impaired healing and deficient angiogenesis in diabetic rats. *Inflammation*, 23(6):569-581.
134. THIESSE, J.; NAMATI, E.; SIEREN, J.C.; SMITH, A.R.; REINHARDT, J.M.; HOFFMAN, E.A.; McLENNAN, G. (2010). Lung structure phenotype variation in inbred mouse revealed through in vivo micro-CT imaging. *Journal of Applied Physiology*, 109(6):1960-1968.
135. THURAISSINGAM, T.; XU, Y.Z.; EADIE, K.; HERAVI, M.; GUIOT, M.; GREEMBERR, R.; GAESTEL, M.; RADZIOCH, D. (2010). MAPKAPK- 2 signaling is critical for cutaneous wound healing. *The Journal of Investigative Dermatology*, 130(1): 278-286.
136. TOMAO, F.; PAPA, A.; ROSSI, L.; ZACCARELLI, E.; CARUSO, D.; ZORATTO, F.; PANICI, P.B.; TOMAO, S. (2014). Angiogenesis and

- antiangiogenic agents in cervical cancer. *Targets and Therapy*, 7:2237-2248.
137. TOPAL, E.; OZTURK, E.; SEN, G.; YERCI, O.; YILMAZIAR, T. (2010). A comparison of three fibrinolytic agents in prevention of intra-abdominal adhesions. *Acta chirurgica Belgica*, 110(1): 71-75.
138. TRAMMELL, R.A.; LIBERATI, T.A.; TOHT, L.A.(2012) Host genetic background and the innate inflammatory response of lung to influenza virus. *Microbes and Infection*, 14: 50–8.
139. TULANDI, T.; AL-SANNAN, B.; AKBAR, G.; ZIEGLER, C.; MINER, L.(2011). Prospective study of intraabdominal adhesions among women of different races with or without keloids. *American Journal Obstetrics & Gynecology*, 204(2): 132e1-4.
140. TURKOGLU, A.; GUL, M.; YUKSEL, H.K.; ALABALIK, U.; ULGER, B.V.; USLUKAYA, O.; AVCI, Y. (2014). Effects on intraperitoneal curcumin instillation on postoperative peritoneal adhesions. *Medical Principles and Practice*, 2014:1-6.
141. UD-DIN, S.& BAYAT, A.(2016). Non-invasive objective devices for monitoring the inflammatory, proliferative and remodeling phases of cutaneous wound healing and skin scarring. *Experimental Dermatology*, 2016: 1-34.

142. UYSAL, B.; DEMIRBAG, S.; POYRAZOGLU, Y.; CAYCI, T.; YESILDAGLAR, N.; GUVEN, A.; SURER, I.; KORKMAZ, A. (2012). Medical ozone therapy decreases postoperative uterine adhesion formation in rats. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 286(5): 1207-1207.
143. YANG, B.; GONG, C.; ZHAO, X.; ZHOU, S.; LI, Z.; QI, X.; ZHONG, Q.; LUO, F.; QIAN, Z. (2012). Preventing postoperative abdominal adhesions in rat model with PEG-PCL-PEG hydrogel. *Int. J. Nanomedicine*, 2012(7): 547-557.
144. YOUNG, V.J.; BROWN, J.K.; SAUNDERS, P.T.K.; HORNE, A.W. (2013). The role of peritoneum in the pathogenesis of endometriosis. *Human Reproduction Update*, 19(5):558-569.
145. VENKATESH, P.K.; PATTILLO, C.B.; BRANCH, B.; HOOD, J.; THOMA, S.; ILLUM, S.; PARDUE, S.; TENG, X.; PATEL, R.P.; KEVIL, C.G. (2010). Dipyridamole enhances ischaemia-induced arteriogenesis through an endocrine nitrite/nitric oxide-dependent pathway. *Cardiovascular Research*, 85: 661–70.
146. VIANA ,C.T.R.; CAMPOS , P.P.; CARVALHO L.A.; CENEDEZI , J.M.; LAVALL , L.; LOPES , M.T.P.; FERREIRA, M.A.N.D.; ANDRADE, S.P.

- (2013). Distinct types of tumors exhibit differential grade of inflammation and angiogenesis in mice. *Microvascular Research*, 86: 44-51.
147. WANG, J.; OHMURAYA, M.; SUYAMA, K.; HIROTA, M.; OZAKI, N.; BABA, H.; NAKAGATA, N.; ARAKI, K. ; YAMAMURA, K. (2010). Relationship of strain-dependent susceptibility to experimentally induced acute pancreatitis with regulation of Press 1 and Spink 3 expression. *Laboratory Investigation*, 90(5): 654-664.
148. WATSON, E.E.; STABIN, M.G.; DAVIS, J.L.; ECKERMAN, K.F. (1989). A model of the peritoneal cavity for use in internal dosimetry. *Journal of Nuclear Medicine*, 30(12): 2002-2011
149. WIJNVOORD, N.; ALBUQUERQUE, B.; HAUSSLER, A.; MYRCZEK, T.; POPP, L.; TEGEDER, I. (2010). Inter-strain differences of serotonergic inhibitory pain control in inbred mice. *Molecular Pain*, 6(70): 1-11.
150. WYKRETOWICZ, A.; SZCZEPANIK, A.F.A.; WYSOCKI, H. (2004). Dipyridamole Inhibits Hydroxylamine Augmented Nitric Oxide (NO) Production by Activated Polymorphonuclear Neutrophils Through an Adenosine-Independent Mechanism. *Physiological research/ Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 53(6): 645-652.
151. WYNN, T.A.(2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in

various fibroproliferative diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 117:524–9.

152. WRIGHT, H.L.; MOOTS, R.T.; BUCKNALL, R.C.; EDWARDS, S.W. (2010). Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*, 49(9): 1618-1631.

153. ZHANG, H.; SONG, Y.; ZHIYONG, L.; ZHANG, T.; ZENG, L. (2015). Evaluation of breviscapine on prevention of experimentally induced abdominal adhesions in rats. *The American Journal of Surgery*, 2015: 1-10.

154. ZIELINS, E.R.; ATASHROO,D.; MAAN,Z.N.; DUSCHER,D.; WALMSLEY,G.G; MARECIC, O.; HU, M.; SENARATH-YAPA, K.; McARDLE, A.; TEVLIN, R.; WEARDA, T.; PAIK, K.J.; DULDULAO,C.; HONG, W.X.; GURTNER,G.C.; LONGAKER, M.T. (2014). Wound healing: an update. *Regenerative Medicine*, 9(6): 817-830.

ANEXOS