

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISILOGIA E FARMACOLOGIA**  
**LABORATÓRIO DE ANGIOGÊNESE**

**CINÉTICA DA ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR IMPLANTE  
DE ESPONJA NA MUSCULATURA ABDOMINAL EM CAMUNDONGOS**

**ALUNA: Pollyana Ribeiro Castro**

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Passos Andrade**

**BELO HORIZONTE**

**2012**

**POLLYANA RIBEIRO CASTRO**

**CINÉTICA DA ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR IMPLANTE  
DE ESPONJA NA MUSCULATURA ABDOMINAL EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

**Área de concentração:** Fisiologia

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvia Passos Andrade

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
BELO HORIZONTE

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

REITOR: Clélio Campolina Diniz

VICE-REITORA: Rocksane de Carvalho Norton

**Pró-Reitoria de Pós-Graduação**

Pró-Reitor: Ricardo Santiago Gomez

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/ ICB/ UFMG**

Diretor: Tomaz Aroldo da Mota Santos

Vice-Diretora: Janetti Nogueira Francischi

**Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia**

Coordenadora: Adelina Martha dos Reis

Trabalho realizado no Laboratório de Angiogênese, Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina...”  
(Cora Coralina)

A Deus por ter me dado minha família e amigos e a minha família e amigos por terem me permitido ser o que sou.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me iluminou, deu força e sabedoria nos momentos de dúvidas, fraquezas e dificuldades.

Aos meus pais pelo exemplo de vida e pelos ensinamentos valiosos, ambos referência de caráter, humildade e amor incondicional aos filhos. Agradeço pelo carinho, paciência e dedicação nas épocas tumultuadas e por sempre acreditarem em mim. Amo vocês!

Aos meus irmãos Lílian, Kerle, Selmo, Vera, Veranice e Wantuil pelo apoio, amizade, companheirismo e amor. Obrigada por serem referência em minha vida! Agradeço por tê-los sempre comigo!

A toda minha família por apoiarem e torceram para que tudo desse certo.

À professora Silvia Passos Andrade pela oportunidade, paciência, disponibilidade, amizade, humildade e pelos valiosos ensinamentos na área de fisiologia e angiogênese.

À Suzane pela amizade sincera durante todos esses anos e por sempre estar por perto nos momentos mais difíceis e tumultuados da minha vida! Obrigada *best friend* por caminhar comigo, pelas risadas, apoio e por tornar o Mestrado tão especial e agradável. Não sei o que seria de mim sem você!

À Fernanda (Fernandez) pela alegria, descontração e convivência agradável, com certeza é uma grande amiga que conquistei no Mestrado.

Ao Celso pela descontração, alegria e apoio no Mestrado, um grande amigo e uma pessoa incrível que quero ter sempre em minha vida.

Ao Leandro Barbosa, Leandro Ceotto, Brígida, Jousie, Fabrício, Luíza, Ciça, Tiago Bruno, Alan, Simone, Cibele, Camila e Alejandra pela convivência agradável, amizade e descontração no laboratório.

Às professoras Paula Peixoto Campos, Mônica Diniz, Lucíola Barcelos pelas valiosas discussões sobre angiogênese e ajuda na realização de experimentos.

Aos meus amigos Fernanda Gabrielle, Sheyla, Daniela, Rondinele, Nayara, Bruno, Gabriela, Maíra e Valéria por compreenderem minha ausência em determinados momentos, por apoiarem e acreditarem no meu sonho.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação e do departamento Fisiologia e Biofísica: Cynthia, Nilda, Ítalo, Zezé e Taquinho pelo atendimento, cordialidade, ajuda e dedicação aos alunos da pós-graduação.

Aos funcionários do CEBIO, especialmente Gilmar, Elmo, Gabriel e Patrícia. Às funcionárias Djaime e Deusmira pelo carinho e alegria com que sempre me trataram.



Aos alunos e toda a Comissão do XXI Curso de Verão em Fisiologia e Farmacologia Wilson Teixeira Beraldo pelo carinho e por instigarem minha paixão pelo ensino.

A todos os professores que contribuíram para a realização desse trabalho e para aprendizagem da Fisiologia e Farmacologia e pela paixão pela pesquisa.

Às fontes de apoio à pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (Capes); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, meu muito obrigada!

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
CCL2/JE	quimiocina ligante 2
ECM	matriz extracelular
Hb	Hemoglobina
IL	Interleucina
IFN- $\gamma$	interferon gama
M	Molar
MMP	Metaloproteinases
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
NaCl	cloreto de sódio
nmol	Nanomol
NAG	<i>N</i> -acetil- $\beta$ - <i>D</i> - glucosaminidase
NO	óxido nítrico
OPD	o-fenilenediamina dihidrochloride
PA	ativador de plasminogênio
SEM	erro padrão da média
TGF- $\beta$ 1	fator de crescimento transformante $\beta$ 1
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral $\alpha$
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular

As demais abreviaturas e siglas foram explicadas quando citadas pela primeira vez no texto.

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1** – Etapas do processo angiogênico.

**Figura 2** – Inter-relações entre angiogênese e inflamação.

**Figura 3** – Esquema representando a técnica de difusão da Fluoresceína Sódica.

**Figura 4** – Fotos representativas do tecido muscular abdominal basal e de tecidos musculares/implante de esponjas em vários pontos temporais pós-implante.

**Figura 5** – Cinética do conteúdo de hemoglobina na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal).

**Figura 6** – Variação do fluxo sanguíneo avaliado pelo método de difusão da fluoresceína sódica na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal).

**Figura 7** – Níveis da citocina pró-angiogênica VEGF na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal).

**Figura 8** – Número de vasos em secções imunohistoquímicas da musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal).

**Figura 9** – Secções histológicas representativas da interface músculo esquelético/implante de esponjas coradas com o anticorpo monoclonal CD31.

**Figura 10** – Cinética da atividade da enzima MPO na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal).

**Figura 11** – Cinética da atividade da enzima NAG na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal).

**Figura 12** – Cinética da produção de nitrito na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal).

**Figura 13** – Cinética dos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal).

**Figura 14** – Cinética dos níveis da quimiocina CCL2/JE na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal).

**Figura 15** – Secções histológicas representativas da interface músculo esquelético/implante de esponjas coradas com Hematoxilina & Eosina (HE).

**Figura 16** – Cinética do conteúdo de colágeno determinado pelo ensaio colorimétrico com *Picrosirius Red* na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal).

**Figura 17** – Secções histológicas representativas da interface músculo esquelético/ implante de esponjas coradas com *Picrosirius Red*.

**Figura 18** – Cinética dos níveis da citocina pró-fibrogênia TGF- $\beta$ 1 na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal).

**Figura 19** – Sumário das alterações vasculares, inflamatórias e fibrogênicas induzidas por implantes de esponja na musculatura esquelética abdominal de camundongos durante o período experimental de 10 dias.

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	pg. 01
1.1 – Angiogênese .....	pg. 02
1.2 – Angiogênese e inflamação .....	pg. 05
1.3 – Angiogênese inflamatória e musculatura esquelética .....	pg. 07
1.4 – Musculatura esquelética, regeneração e reparo .....	pg. 08
1.5 – Musculatura abdominal e lesões .....	pg. 09
1.6 – Biomateriais e implantes sintéticos .....	pg. 10
1.7 – Resposta do organismo aos biomateriais e implantes sintéticos ..	pg. 11
1.8 – Cicatrização de feridas após implantes .....	pg. 12
1.8.1 – Fase inflamatória .....	pg. 13
1.8.2 – Fase proliferativa .....	pg. 14
1.8.3 – Fase de remodelamento .....	pg. 16
1.9 – Modelos experimentais para o estudo da angiogênese e inflamação .....	pg. 17
1.10 – Modelo experimental de implante de esponja .....	pg. 18
<b>2 – JUSTIFICATIVA</b> .....	pg. 20
<b>3 – OBJETIVOS</b> .....	pg. 23
3.1 – Objetivo geral .....	pg. 24
3.2 – Objetivos específicos .....	pg.24
<b>4 – MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	pg. 26
4.1 – Animais .....	pg. 27
4.2 – Técnica do implante de esponja .....	pg. 27
4.2.1 – Confeção e preparo dos discos de esponja .....	pg. 27

4.2.2 – Implante em camundongos .....	pg. 28
4.3 – Remoção do implante e do músculo abdominal .....	pg. 28
4.4 – Avaliação de marcadores angiogênicos .....	pg. 29
4.4.1 – Dosagem de hemoglobina .....	pg. 29
4.4.2 – Avaliação do fluxo sanguíneo pela técnica de difusão da fluoresceína sódica .....	pg. 30
4.5 – Avaliação de marcadores inflamatórios .....	pg. 31
4.5.1 – Análise da atividade da mieloperoxidase (MPO) .....	pg. 31
4.5.2 – Análise da atividade da <i>N</i> -acetil- $\beta$ - <i>D</i> -glicosaminidase (NAG) ....	pg. 32
4.6 – Avaliação de marcadores fibrogênicos .....	pg. 33
4.6.1 – Quantificação de colágeno .....	pg. 33
4.7 – Dosagem de nitrito .....	pg. 34
4.8 – Dosagem de citocinas .....	pg. 35
4.9 – Análise histológica e colorações .....	pg. 35
4.10 – Análise estatística .....	pg. 38
<b>5 – RESULTADOS</b> .....	pg. 39
5.1 – Cinética da angiogênese induzida por implante de esponja na musculatura abdominal .....	pg. 40
5.2 – Cinética da inflamação induzida por implante de esponja na musculatura abdominal .....	pg. 44
5.3 – Deposição de colágeno e níveis de TGF- $\beta$ 1 .....	pg. 49
<b>6 – DISCUSSÃO</b> .....	pg. 54
<b>7 – CONCLUSÕES</b> .....	pg. 67
<b>8 – ABSTRACT</b> .....	pg. 69

**9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ..... pg. 72

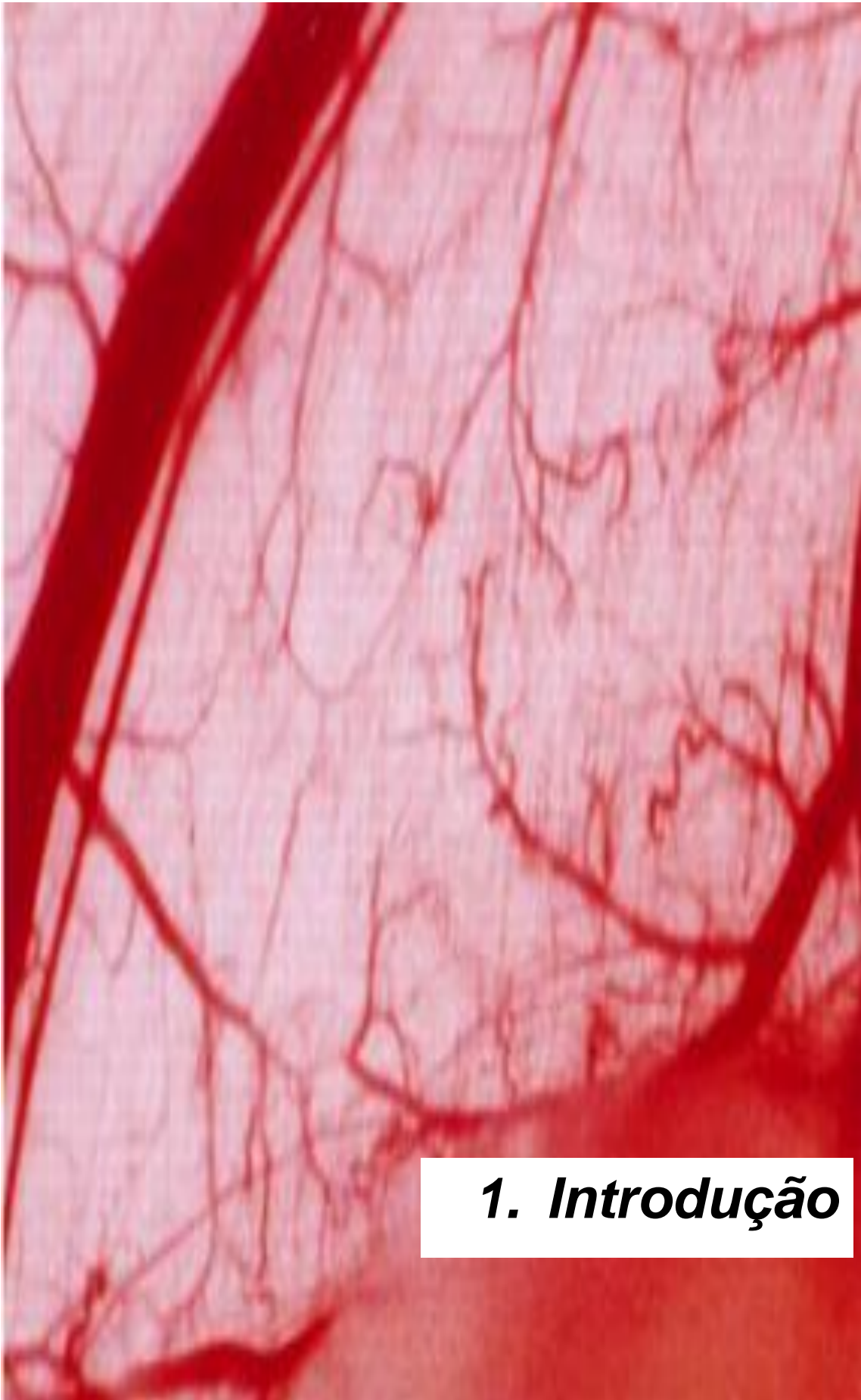


## **RESUMO**

Lesões no músculo esquelético que compõe a parede abdominal são condições médicas comuns e a implantação de materiais sintéticos ou biológicos para reparar defeitos músculo-fasciais é um procedimento médico adotado atualmente. Propusemos caracterizar a dinâmica do recrutamento de células inflamatórias, da formação de neovasos, produção de citocinas e fibrogênese no músculo esquelético abdominal, em resposta a implantes de esponja de poliéster-poliuretano em camundongos. Aos 2, 4, 7 e 10<sup>o</sup> dias após implantação, o tecido muscular abaixo da matriz de esponja foi removido para a avaliação da resposta angiogênica (teor de hemoglobina, fator de crescimento do endotélio vascular e análise morfométrica do número de vasos) e inflamação (atividade de mieloperoxidase e da *N*-acetil- $\beta$ -*D*- glicosaminidase e citocinas). Além disso, a fibrogênese do músculo foi determinada pelos níveis de deposição de colágeno e conteúdo de TGF- $\beta$ 1. Observou-se um aumento no conteúdo de hemoglobina, na taxa de difusão da fluoresceína sódica (indicativo do fluxo sanguíneo) e do número de vasos no músculo abdominal contendo a matriz sintética em comparação com o músculo intacto. O pico do recrutamento de neutrófilos no músculo ocorreu no segundo dia pós-implante, seguido pelo acúmulo de macrófagos no quarto dia pós-implante. Os níveis das citocinas VEGF, TNF- $\alpha$ , CCL2/JE foram maiores no músculo lesionado, em comparação com o músculo intacto e atingiu um pico logo após o implante da esponja (dia 2 a 4). Os níveis de colágeno foram maiores nos músculos de animais implantados em comparação aos músculos de animais não implantados (dia 2). A técnica de implante em conjunto com os parâmetros

inflamatórios e vasculares utilizados neste estudo revelou eventos inflamatórios, angiogênicos e fibrogênicos, além de sugerir alguns mecanismos associados com respostas músculo-esqueléticas frente a materiais sintéticos implantados neste tecido.

Palavras-chave: interface músculo/implante, citocinas, colágeno, fluxo sanguíneo.



# ***1. Introdução***

## **1. INTRODUÇÃO**

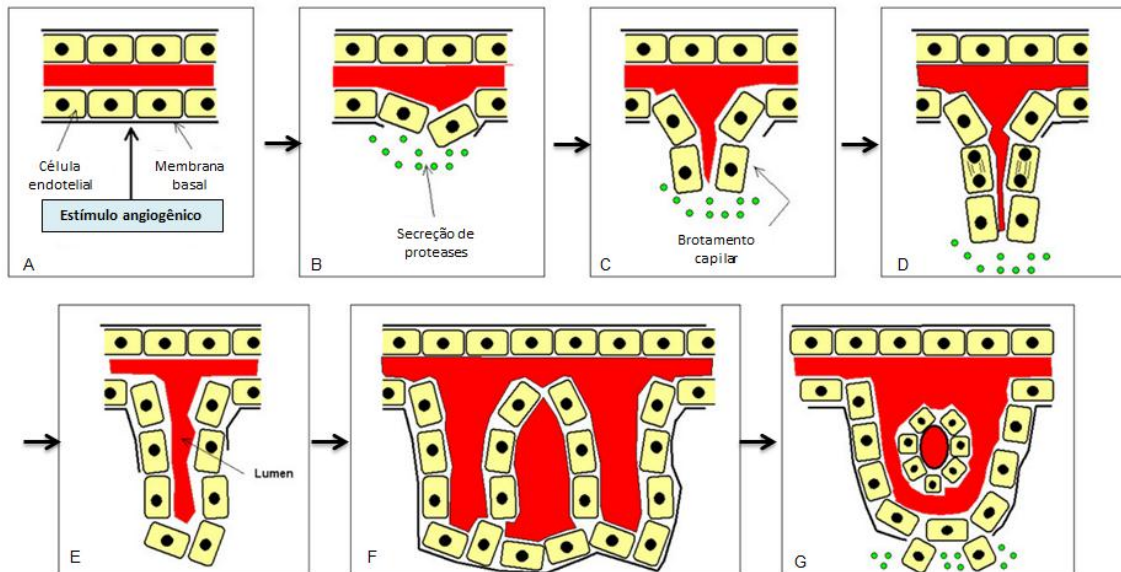
### **1.1 - Angiogênese**

Angiogênese ou neovascularização consiste no processo pelo qual novos vasos sanguíneos são formados por brotamento, a partir de pequenos vasos pré-existentes em adultos ou em tecidos embrionários, ou por divisão intravascular (intussuscepção). Este processo é órgão específico e depende do estágio da microvasculatura local (RISAU, 1997).

A formação de novos vasos sanguíneos é regulada por um equilíbrio entre fatores pró e anti-angiogênicos e ocorre tanto em processos fisiológicos como patológicos (ZHANG *et al.*, 2011). Fisiologicamente, a angiogênese manifesta-se basicamente no ciclo reprodutivo feminino (maturação do folículo ovariano, implantação do óvulo fecundado e desenvolvimento da placenta) (REYNOLDS *et al.*, 1992; BURKE & DeNARDO, 2001), suprimento nutricional adequado de tecidos, como no músculo esquelético e cardíaco submetidos à exercícios crônicos, no processo de cicatrização de feridas e reparo tecidual (HUDLICKÁ & TYLER, 1986). O aumento inadequado é observado no desenvolvimento tumoral, inflamações crônicas como na artrite reumatoide, escleroderma e psoríase e nas retinopatias do prematuro e dos diabéticos (FOLKMAN, 1995).

As etapas envolvidas no processo da angiogênese estão em destaque na figura 1 e foram inicialmente observadas por Sandison (1924) e

posteriormente descritas por Ausprunk & Folkman (1977). Os vasos neoformados são gerados por uma série de eventos morfológicos e bioquímicos complexos que ocorrem em sequência, independente do tipo de estímulo angiogênico presente.



**Figura 1.** Etapas do processo angiogênico. (A) Ativação de células endoteliais por um estímulo pró-angiogênico. (B) As células endoteliais secretam proteases que degradam a membrana basal e matriz extracelular. (C) Um broto capilar é formado como resultado de uma migração celular direcionada. (D) O crescimento do vaso ocorre por meio de mitoses e migração de células endoteliais. (E) Um lúmen é formado, bem como uma nova membrana basal. (F) Dois brotos se unem para formar uma alça capilar. (G) Uma segunda geração de brotos capilares começa a se formar. Modificado de Grizzi *et al.*, 2005.

Inicialmente os vasos adjacentes ao estímulo se dilatam, seguido pela ativação de células endoteliais (ARROYO & IRUELA-ARISPEM, 2010). Tem-se sugerido que o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) seja o principal mediador do início da angiogênese, visto que esta citocina é capaz de

induzir vasodilatação via produção de óxido nítrico (NO), além de aumentar a permeabilidade das células endoteliais (GRIFFOEN & MOLEMA, 2000).

O aumento da permeabilidade das células endoteliais permite o extravasamento de proteínas para os tecidos, formando uma rede provisória de fibrina. Após a ativação das células endoteliais, inicia-se a degradação da membrana basal para posterior migração e proliferação das células endoteliais e invasão do tecido. Os processos de migração e invasão requerem a atividade conjunta do sistema ativador do plasminogênio (PA) e das metaloproteinases (MMP) (NASH *et al.*, 2001).

Vale ressaltar que antes da migração e proliferação das células endoteliais, ocorre o afastamento dos pericitos ou células musculares lisas que envolvem a camada endotelial; a degradação proteolítica da membrana basal do vaso original e a remodelação do estroma perivascular (MOSES, 1997). Vários tipos celulares contribuem para a degradação da matriz extracelular dentre eles as células epiteliais, células do sistema imunológico e fibroblastos (JAIN, 2003). A degradação da membrana basal permite a migração de células endoteliais, originando um broto capilar (MIGNATTI & RIFKIN, 1996; ARROYO & IRUELA-ARISPEM, 2010).

Assim, a migração é seguida pela proliferação das células estimulada por uma variedade de fatores de crescimento, alguns dos quais liberados pela própria matriz degradada (LIEKENS *et al.*, 2001).

A fase final do processo angiogênico inclui maturação das células endoteliais constituintes do novo vaso, através da formação de “*loops*”

capilares e a determinação da polaridade das células endoteliais, que será importante para a formação do lúmen capilar e para as interações célula-célula e célula-matriz (BISCHOFF, 1995). A estabilização do vaso neoformado é alcançada após a migração das células mesenquimais para a proximidade dos neovasos e a posterior diferenciação deste tipo celular em pericitos ou células musculares lisas (HIRSHI & DÁMORE, 1997) e pela regeneração da matriz extracelular e da membrana basal (JAIN, 2003).

## **1.2 - Angiogênese e inflamação**

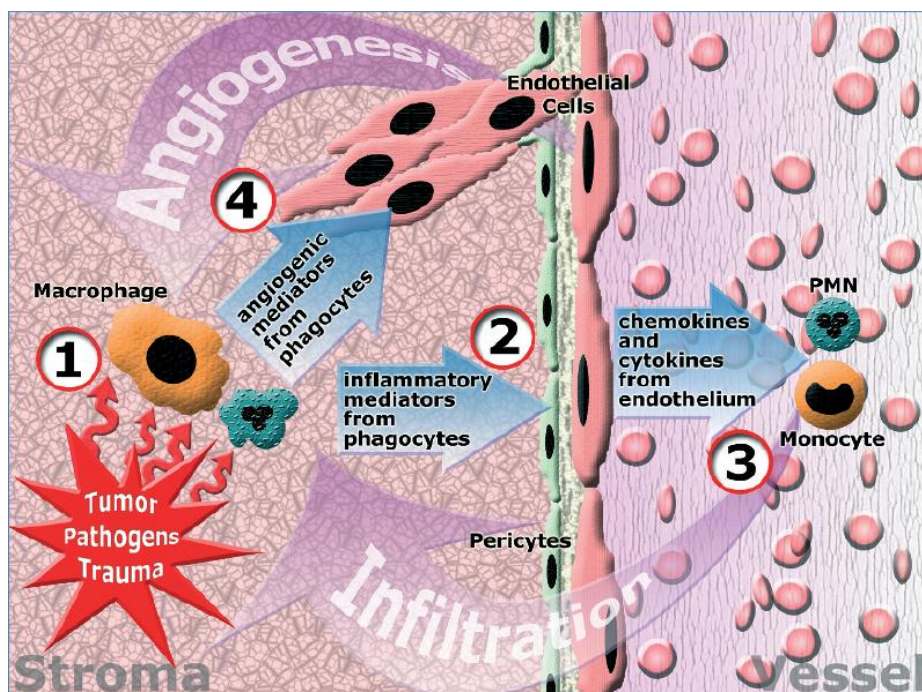
Diversas evidências sugerem que angiogênese e inflamação crônica são processos interligados (Figura 2). A natureza dessa interconexão envolve o aumento da migração e da proliferação de células inflamatórias bem como a ação regulatória de citocinas e de fatores de crescimento (JACKSON *et al.*, 1997).

A neovascularização está comumente associada a condições que apresentam diferentes estágios de infiltrado de células inflamatórias. Sendo assim, a angiogênese inflamatória pode ser entendida devido à habilidade das células endoteliais e dos leucócitos de responderem a um estímulo comum: as citocinas (JACKSON *et al.*, 1997).

A angiogênese inflamatória é um processo complexo que envolve, portanto, grande intercomunicação entre as células, fatores solúveis e componentes da matriz extracelular (LIEKENS *et al.*, 2001). Este processo é



controlado pelo balanço entre a produção e a secreção de moléculas que possuem atividade regulatória positiva (fatores angiogênicos) e negativa (fatores anti-angiogênicos) (PEPPER, 1983). O equilíbrio entre a produção de substâncias endógenas pró e anti-angiogênicas pode ser rompido por fatores químicos e físicos (injúria tissular, hipóxia, liberação de citocinas) ou mecânicos (alterações no fluxo sanguíneo e no formato celular) (INGBER, 1998).



**Figura 2.** Inter-relações entre angiogênese e inflamação. (1) Diferentes estímulos (proliferação de células tumorais, necrose e apoptose) causam ativação de macrófagos residentes e outros fagócitos causando a liberação de mediadores pró-inflamatórios. (2) Estes fatores derivados de fagócitos estimulam as células endoteliais a produzirem moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas. (3) Moléculas de adesão e fatores solúveis do endotélio ativado recrutam e estimulam fagócitos circulantes que aumentam o infiltrado de células. (4) Fagócitos ativados estimulam a remodelação tecidual, liberando fatores que provêm o crescimento e migração de células endoteliais para a formação de novos vasos. (Copiado de ALBINI *et al.*, 2005).



Os fatores angiogênicos e inflamatórios são representados, principalmente por citocinas, estas são polipeptídeos que induzem uma ou mais etapas destes processos, interagindo com receptores específicos nas células endoteliais e/ou recrutando e ativando células, tais como macrófagos e outros leucócitos, que possuem a capacidade de produzir fatores angiogênicos (BERNARDINI *et al.*, 2003).

### **1.3 - Angiogênese inflamatória e musculatura esquelética**

A angiogênese inflamatória na musculatura esquelética tem sido investigada em resposta a vários estímulos, tais como aumento de carga, isquemia, lesões químicas e invasão tumoral (EGGINTON *et al.*, 2001; JENSEN *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Estas abordagens tem determinado a contribuição de ambos os processos para a regeneração, reparo e desempenho muscular (TIDBALL, 2005).

É bem conhecido, que ocorre aumento da capilarização no músculo esquelético após atividade contrátil regular, estímulo elétrico e hipóxia, devido ao aumento no fluxo sanguíneo, tensão de cisalhamento e estirpe cíclico. Todos estes eventos, por sua vez, estimulam a migração e proliferação de células endoteliais (ANDERSEN & HENRIKSON, 1977; HUDLICKÁ *et al.*, 1992; WHITE *et al.*, 1998; OLFERT *et al.*, 2001).

Lesões teciduais também desencadeiam respostas inflamatórias na musculatura esquelética, onde os primeiros tipos celulares a chegarem ao local são os neutrófilos (TOUMI & BEST, 2003; TIDBALL, 2005). Durante esse

processo, células inflamatórias liberam proteases, moléculas citolíticas e citotóxicas que podem ser benéficas ou prejudiciais para o reparo ou regeneração das fibras musculares. A completa recuperação da lesão depende primordialmente do tipo de agente lesivo, mecânico ou químico, e do número e tipo de neutrófilos recrutados para o sítio da lesão (TIIDUS, 1998; TIDBALL, 2005).

Várias observações têm demonstrado que os macrófagos, a segunda linhagem de células inflamatórias a invadir o local lesionado, também pode modular tanto o dano quanto o reparo muscular pós-lesão. Os papéis dos macrófagos incluem a fagocitose de debris musculares, produção e liberação de citocinas e fatores pró-angiogênicos, inflamatórios e fibrogênicos, bem como de radicais livres (NGUYEN & TIDBALL, 2003; TIDBALL, 2005). Além disso, para os eventos inflamatórios e angiogênicos, o tipo do estímulo tem uma variável capacidade em iniciar o processo de reparo via ativação de células musculares satélite (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

#### **1.4 - Musculatura esquelética, regeneração e reparo**

A musculatura esquelética representa aproximadamente 50% da massa corporal e é composta por camadas de fibras musculares densas e altamente orientadas (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

Por muitos anos, acreditou-se que a regeneração muscular não era possível, entretanto a presença de células satélites na periferia de miofibrilas

demonstrou que a fibra muscular é capaz de se regenerar (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004). Assim, a fibra muscular pode responder à lesão tanto com a regeneração quanto com a formação de fibrose na área lesionada (JARVINEN *et al.*, 2000; KÄÄRIÄINEN *et al.*, 2000). No entanto, esta última pode levar à inibição completa da regeneração e perda funcional do tecido (LEHTO *et al.*, 1986; KÄÄRIÄINEN *et al.*, 2000).

O sucesso da regeneração, por sua vez, depende da extensão e natureza da lesão, mas em todas as situações o processo envolve revascularização, infiltração celular, fagocitose das células ou fragmentos danificados, proliferação e fusão de células precursoras do músculo (células satélites) e finalmente a reinervação (TIDBALL, 2005).

A revascularização é um fator importante para a formação da nova fibra muscular, pois são os novos vasos que permitirão a oxigenação e entrega de nutrientes para o reparo do tecido (KAUHANEN *et al.*, 2003). Entretanto, apesar da musculatura esquelética ocupar uma grande extensão da massa corporal e possuir abundante suprimento vascular, a angiogênese neste tecido só ocorre em condições especiais ainda não totalmente caracterizadas.

## **1.5 - Musculatura abdominal e lesões**

A musculatura esquelética abdominal é um tecido altamente exposto a traumas e procedimentos, podendo levar a complicações como dor crônica,

infecções, aderências, seromas e formação de fístulas (O'DWYER *et al.*, 2005; ROBINSON *et al.*, 2005; LASCHKE, 2009).

O reparo da parede abdominal é feito utilizando tecidos autólogos, materiais sintéticos como malhas de polipropileno ou politetrafluoretileno ou ainda, materiais biológicos como matrizes dermais humanas acelulares (GOBIN *et al.*, 2006; LIN & BUTLER, 2010; BURNS *et al.*, 2010).

Sendo assim, dentro da perspectiva da interface matriz sintética/hospedeiro, tanto os implantes quanto os tecidos adjacentes, como a musculatura esquelética abdominal, podem ser afetados pela resposta fisiológica desencadeada pelo organismo. No entanto, há poucos estudos que investigaram os eventos celulares, vasculares e inflamatórios desta interface.

## **1.6 - Biomateriais e implantes sintéticos**

Dentro desta perspectiva, observa-se que o objetivo final de processos cirúrgicos, desde épocas remotas, tem sido o reparo de órgãos e tecidos. E que, tradicionalmente este reparo tem sido realizado de duas principais formas: pelo enxerto de tecidos ou através da substituição do tecido por algum material sintético ou biomateriais (HOLLISTER, 2005).

O enxerto de tecidos está amplamente associado à morbidade, além disso, a quantidade limitada de materiais restringe seu uso. Por outro lado, os implantes sintéticos e biomateriais têm sido cada vez mais utilizados em muitos

tipos de cirurgia, com o objetivo de melhorar a função e estrutura de órgãos e tecidos (DAROUICHE, 2004; ZIMMERLI & SENDI, 2011).

Atualmente diversos estudos na área de biomateriais, biotecnologia, e engenharia tecidual têm permitido a criação de dispositivos implantáveis com aplicação médica e/ou farmacêutica no intuito de oferecer novas estratégias para a restauração da estrutura e função de tecidos lesionados (MORAIS *et al.*, 2010). Dentre as estratégias utilizadas para tal fim encontram-se o transplante de células, o implante de tecidos bioartificiais construídos *in vitro* e a estimulação da regeneração a partir de tecidos residuais *in vivo* (STOCUM, 1998).

Além disso, têm-se testado e confeccionado biosensores (BAILEY *et al.*, 2007; BUCKINGHAM *et al.*, 2007), cateteres (CALLAHAN & NATALE, 2008), *scaffolds* para a engenharia tecidual (SALGADO *et al.*, 2004; MATSUMOTO *et al.*, 2007) e malhas sintéticas ou biossintéticas para reparo de lesões na parede abdominal (ZIEREN *et al.*, 1998; SCOTT *et al.*, 2002) e para diversas outras aplicações clínicas.

### **1.7 - Resposta do organismo aos biomateriais e implantes sintéticos**

Apesar dos biomateriais e implantes sintéticos terem sido desenvolvidos para serem biocompatíveis tanto física como quimicamente, eles não são considerados inertes pelo organismo (LASCHKE *et al.*, 2005). Quando implantados, os biomateriais podem induzir uma resposta inflamatória do tipo

“corpo estranho” culminando com a formação de um tecido fibrovascular no implante e no tecido adjacente ao mesmo (MORAIS *et al.*, 2010). Esta resposta homeostática ocorre principalmente devido à lesão tecidual causada pelo implante e por interações existentes entre a interface tecido/implante (WILLIAMS, 1987; ANDERSON, 2001).

Além disso, a resposta do organismo ao corpo estranho depende das propriedades do material implantado como composição, duração do contato, taxa de degradação, morfologia, porosidade, aspereza, forma, tamanho, esterilidade e superfície química (MORAIS *et al.*, 2010). Outros fatores como a extensão da lesão, perda de estruturas membranosas, formação de matriz extracelular, grau de necrose celular e extensão da resposta inflamatória influenciam na resposta do corpo ao implante (ANDERSON, 2001).

Assim, as principais respostas do organismo aos biomateriais e matrizes sintéticas envolvem o recrutamento de leucócitos mononucleares que irão estimular a deposição de matriz extracelular; a liberação e ativação de mediadores fibrogênicos e a deposição de tecido fibrovascular (RATNER *et al.*, 1996). Estas respostas ocorrem sob condições fisiológicas com o intuito de proteger o organismo do objeto estranho (ANDERSON, 2001).

## **1.8 - Cicatrização de feridas após implantes**

Ao se implantar um material sintético no organismo ocorre uma lesão tecidual que conseqüentemente desencadeia uma cascata de respostas

inflamatórias e de cicatrização (ANDERSON, 2001; MITCHELL & COTRAN, 2002).

Na cicatrização da ferida os macrófagos são conhecidos por secretar fatores essenciais de crescimento e mediadores inflamatórios que coordenam processos importantes, como deposição de colágeno, contração da ferida e angiogênese (THURASINGAM *et al.*, 2010). A cicatrização de feridas ocorre em três fases: inflamação, proliferação e remodelamento (NAYAK *et al.*, 2009).

### **1.8.1 - Fase inflamatória**

A fase inflamatória das lesões desempenha um papel central na cicatrização de feridas. Condições de estresse fisiológico ou patológico exigem adaptações das células e do microambiente. A inflamação é a mais importante reação do dano de células e tecidos (ALBINI *et al.*, 2005).

A inflamação pode ser descrita como a sucessão de mudanças que ocorre em um tecido vivo quando este está lesionado, desde que a lesão seja incapaz de destruir sua estrutura e vitalidade (PUNCHARD *et al.*, 2004).

Os neutrófilos são os primeiros tipos celulares que entram na área lesionada predominando até o terceiro dia com o pico em 48 horas pós-lesão. Essas células limpam a área lesionada (fagocitose), impedindo a invasão e a proliferação de microrganismos (MORAIS *et al.*, 2010; NUNES *et al.*, 2011). Eles são atraídos por numerosas citocinas inflamatórias produzidas por

plaquetas ativadas, células endoteliais e produtos de degradação de agentes patogênicos (NUNES *et al.*, 2011).

As citocinas liberadas por essas células durante o processo de apoptose são importantes componentes no recrutamento de monócitos. Os monócitos circulantes penetram então na ferida e se diferenciam em macrófagos. Essas células são conhecidas por secretar fatores essenciais de crescimento e mediadores inflamatórios que coordenam processos importantes, como deposição de colágeno, contração da ferida e angiogênese (THURAISINGAM *et al.*, 2010; WRIGHT *et al.*, 2010; MURPHY *et al.*, 2011).

Entre os fatores liberados por macrófagos destaca-se o óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias tais como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6 ou IL-12 e a super expressão de moléculas de classe II (MHC). Essas substâncias também possuem características antibióticas e antitumorais (RODERO & KHOSROTEHRANI, 2010).

O estímulo inflamatório persistente, como o que ocorre na presença contínua do material sintético, leva a uma inflamação crônica cuja resposta de cicatrização é dependente do tamanho e/ou grau da lesão (KOVACS, 1991).

### **1.8.2 - Fase proliferativa**

A fase proliferativa do processo de cicatrização é caracterizada por angiogênese, deposição de colágeno, formação de tecido de granulação e contração da ferida (NAYAK *et al.*, 2009).



Nessa fase, os fibroblastos migram sobre a estrutura de fibrina substituindo-a por uma rede de colágeno, através da deposição de colágeno e fibronectina, restaurando, assim, a matriz extracelular (ECM) na ferida. O colágeno é o principal componente que fortalece e suporta o tecido extracelular (MURPHY *et al.*, 2011; NAYAK *et al.*, 2009).

Inicialmente, queratinócitos migram para a região da ferida entre a derme e o coágulo de fibrina. Essa migração é facilitada pela produção de proteases específicas por células epiteliais, para degradar a matriz extracelular. Fibroblastos ativados também migram para a região da ferida e formam, junto com os leucócitos, o tecido de granulação (NAYAK *et al.*, 2009).

A angiogênese permite o suprimento de oxigênio, nutrientes e células inflamatórias necessárias para o processo de cicatrização que ocorre dentro do tecido (KOVACS, 1991; PIERCE *et al.*, 1991; ANDRADE *et al.*, 1997; BRASSHAW *et al.*, 2001; MORAIS *et al.*, 2010; RODERO & KHOSROTEHRANI, 2010). Este processo constitui-se um passo decisivo na cicatrização, pois a interação entre um biomaterial e o tecido circundante requer capilaridade e formação de vasos suficientes para assegurar um transporte adequado de fatores entre tecido e material implantado (RICKERT *et al.*, 2003).

O VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) é um dos fatores mais críticos e específicos que induz várias funções endoteliais ligadas à angiogênese, incluindo migração e proliferação das células endoteliais, responsáveis pela cicatrização do tecido (KROLL *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*,

2011). Essas células usam a matriz extracelular para formação de novos vasos. Assim, a angiogênese ocorre concomitantemente com a proliferação (NAYAK *et al.*, 2009; MURPHY *et al.*, 2011).

Já na etapa de contração da ferida, os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos. Essas células contráteis ajudam a preencher as lacunas entre as bordas da ferida. No mesmo momento, fatores de crescimento produzidos pelo tecido de granulação irão favorecer a proliferação e diferenciação de células epiteliais que irão restaurar a integridade da barreira epitelial, através da remodelação das redes de colágeno (NAYAK *et al.*, 2009, RODERO & KHOSROTEHRANI, 2010; MURPHY *et al.*, 2011).

### **1.8.3 - Fase de remodelamento**

Durante a fase de remodelamento, ocorre a reparação final da matriz extracelular, a fim de melhorar a resistência mecânica do tecido (GERIS *et al.*, 2010). Essa fase é a mais longa, podendo durar semanas ou até meses para ser concluído. Fibroblastos na ferida continuam remodelando colágeno e os vasos sanguíneos regridem deixando uma cicatriz avascular. O tecido resultante é caracterizado pelo aumento da densidade do colágeno, maiores níveis de alinhamento das fibras e proporções diferentes de colágeno I e III do que os observados em tecidos normais (CUMMING *et al.*, 2010).

No estágio final do processo, o implante sintético pode ser encapsulado por fibras de colágeno, prevenindo a interação com o tecido adjacente (ANDERSON, 2001).

### **1.9 - Modelos experimentais para o estudo da angiogênese e inflamação**

No estudo da angiogênese inflamatória a escolha da técnica ou modelo experimental a ser utilizado é de suma importância. Muitas vezes torna-se necessária a combinação de ensaios para a identificação de eventos celulares e moleculares relacionados à neoformação de vasos sanguíneos (STATON *et al.*, 2004). O ensaio ideal deve ser, portanto, confiável, simples, facilmente quantificável e mais importante, fisiologicamente relevante.

Na literatura, encontram-se vários modelos experimentais *in vivo* desenvolvidos para o estudo da inflamação e angiogênese como, por exemplo: ensaio bidimensional mesentérico (BENEST & BATES, 2009), administração de radioisótopos inertes na corrente sanguínea e mensuração do tempo de captação destes pelos tecidos (TOZER *et al.*, 2009), avaliação da migração de células endoteliais em matrigel (MALINDA, 2009), técnica de câmara de pregas cutâneas dorsais (SCKELL & LEUNIG, 2009), modelo da bolsa da córnea (ZICHE & MORBIDELLI, 2009), modelo de fibras ocas (SHNYDER, 2009), modelo de janela óssea craniana (SCKELL & KLENKE, 2009) e modelo de implantação de esponja (ANDRADE & FERREIRA, 2009). Cada um deles apresentando vantagens e desvantagens.

### **1.10 - Modelo experimental de implante de esponja**

O modelo utilizado neste trabalho foi o de implante de esponjas sintéticas de poliéster-poliuretano, pois tem sido referência no estudo *in vivo* das respostas angiogênicas, inflamatórias e fibrogênicas que ocorrem durante o reparo de feridas (CAMPOS *et al.*, 2006). Neste modelo a resposta do hospedeiro a uma matriz sintética é análoga à cicatrização e ao que ocorre durante implante de biomateriais.

As matrizes esponjosas inicialmente acelulares e não vascularizadas são implantadas no tecido subcutâneo do animal, gerando um processo complexo dirigido inicialmente por células inflamatórias que se acumulam dentro do compartimento da esponja e posteriormente por angiogênese e deposição de matriz extracelular no local da injúria (ANDRADE *et al.*, 1997).

Este modelo também proporciona um microambiente cronicamente inflamado em que cada um dos vários componentes do tecido fibrovascular proliferativo (angiogênese, recrutamento e ativação de células inflamatórias e deposição de matriz extracelular) pode ser determinado (ANDRADE *et al.*, 1997; BRADSHAW, *et al.*, 2001; BELO *et al.*, 2005; CAMPOS *et al.*, 2006).

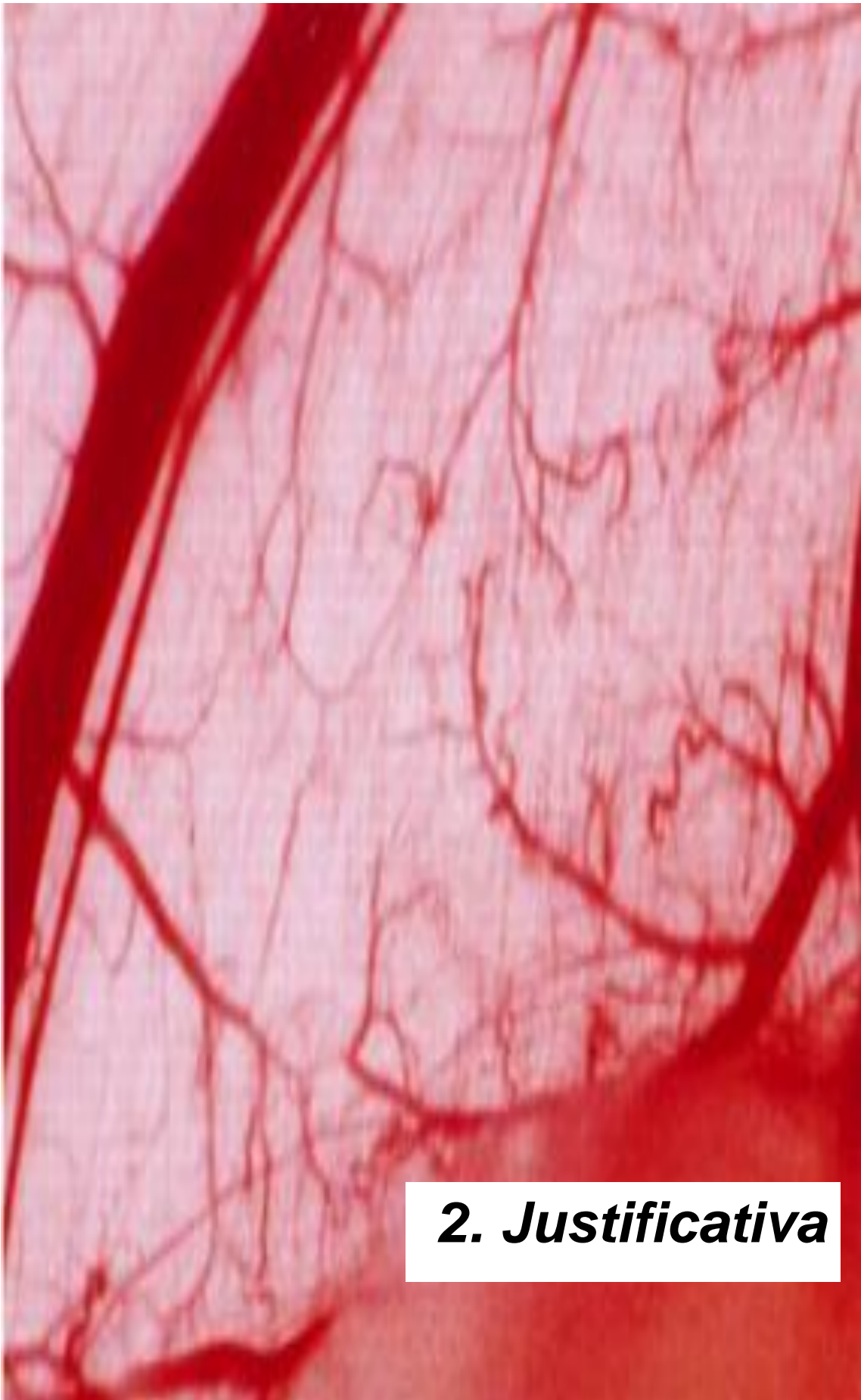
Dessa forma, variáveis bioquímicas do tecido fibrovascular, incluindo metabolismo de colágeno, deposição de fibronectina e *turnover* de proteoglicanos podem ser quantificados (ANDRADE *et al.*, 1997).

Além disso, a técnica é empregada para caracterizar a sequência de alterações histológicas na formação do tecido de granulação e para monitorar

a cinética de proliferação celular. A medida da acumulação de neutrófilos e macrófagos acumulados no compartimento da esponja tem sido possível através da determinação das enzimas mieloperoxidase (MPO) e *N*-acetil- $\beta$ -*D*-glicosaminidase (NAG).

O modelo de inflamação aguda é particularmente útil, permitindo a coleção e análise das fases fluidas e celulares do exsudato formado dentro da esponja (ANDRADE & FERREIRA, 2009).

A angiogênese tem sido avaliada por métodos diretos (contagem morfológica de vasos sanguíneos em cortes histológicos e marcação imunohistoquímica de estruturas vasculares) e indiretos (fluxo sanguíneo e conteúdo de hemoglobina intrainplante). Embora, vários componentes (inflamação, angiogênese e fibrogênese) do tecido fibrovascular induzido por matrizes sintéticas sejam bem caracterizados, eventos inflamatórios e vasculares nos tecidos da interface implante/tecido do hospedeiro não tem sido ainda completamente estabelecidos.



## ***2. Justificativa***

## **2. JUSTIFICATIVA**

Biomateriais e implantes sintéticos podem interagir com tecidos desencadeando uma resposta adversa do organismo (HOLLISTER, 2005). Esta reação do hospedeiro pode ser medida pelo grau em que os mecanismos homeostáticos são perturbados, pelas condições patofisiológicas criadas e pela resolução da resposta inflamatória (PAPPAS, 1996). Sendo assim, é particularmente importante avaliar as reações ocorridas intrainplante e no tecido adjacente ao mesmo, a fim de se evitar complicações ou danos à saúde do hospedeiro. Deve-se ressaltar, ainda, que embora seja conveniente distinguir mecanismos homeostáticos, os componentes envolvidos nesta resposta são parte de um mesmo processo fisiológico (SIEMINSKI & GOOCH, 2000).

A musculatura abdominal, como dito anteriormente, é uma região altamente exposta a traumas, procedimentos e complicações cirúrgicas. Além do mais, é um tecido altamente vascularizado e resistente a estímulos que desequilibrem sua homeostasia (BALDWIN & HADDAD, 2002). No entanto, eventos celulares, respostas inflamatórias e alterações vasculares na interface músculo/implante são pouco caracterizadas.

Além disso, pouco se sabe sobre a cinética da angiogênese inflamatória no músculo esquelético após uma lesão ou estímulos mecânicos crônicos, como o induzido por um implante de matriz de esponja sintética. Lesão da parede abdominal do músculo esquelético é uma condição médica comum e a

implantação de materiais sintéticos ou biológicos são procedimentos para reparar defeitos músculo-fasciais. Isto estimula a infiltração celular, vascularização adequada e deposição de matriz extracelular ao redor do material implantado (DEBORD, 1998; MENDES *et al.*, 2007).

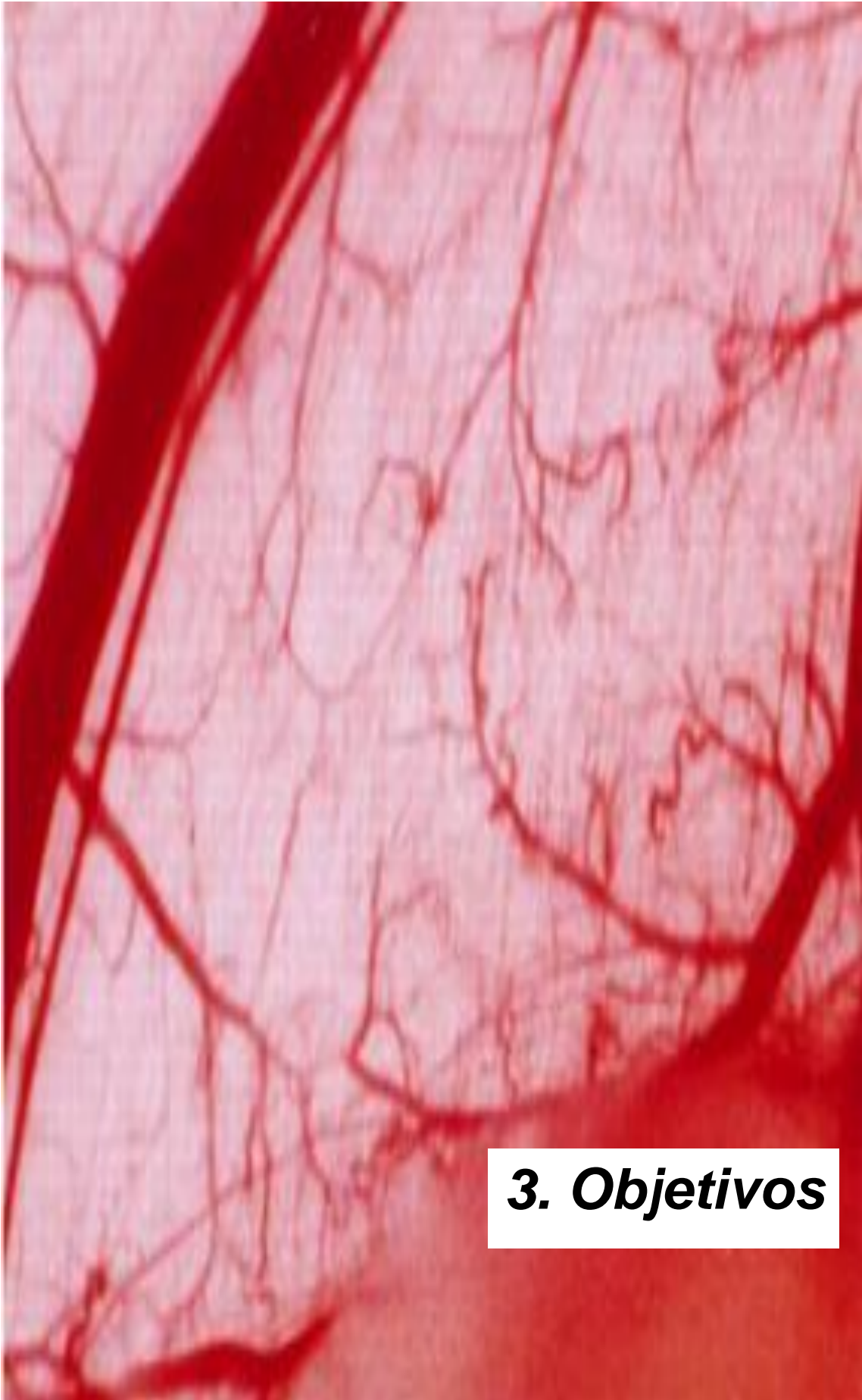
A reação do hospedeiro ao material estranho é um tipo de inflamação não específica e tem sido avaliada, principalmente no ambiente do implante (BRADSHAW *et al.*, 2001, VAN AMERONGEN *et al.*, 2002).

Neste trabalho foi proposto caracterizar a dinâmica sequencial do recrutamento de células inflamatórias, vasos sanguíneos recém-formados, produção de citocinas e fibrogênese no músculo abdominal esquelético frente a um estímulo mecânico crônico, no caso, o implante de uma matriz de esponja em camundongos.

Assim, a análise destes processos é capaz de revelar eventos causais ou paralelos que acometam a musculatura esquelética abdominal durante o implante de materiais sintéticos, sugerindo assim, mecanismos e intervenções terapêuticas aplicáveis à prática clínica.

Além disso, é de suma importância elucidar eventos celulares, inflamatórios e vasculares na musculatura esquelética podendo representar uma ferramenta útil para a engenharia de biomateriais e indicar estratégias que otimizem a integração do biomaterial ao hospedeiro.





### **3. *Objetivos***

### **3. OBJETIVOS**

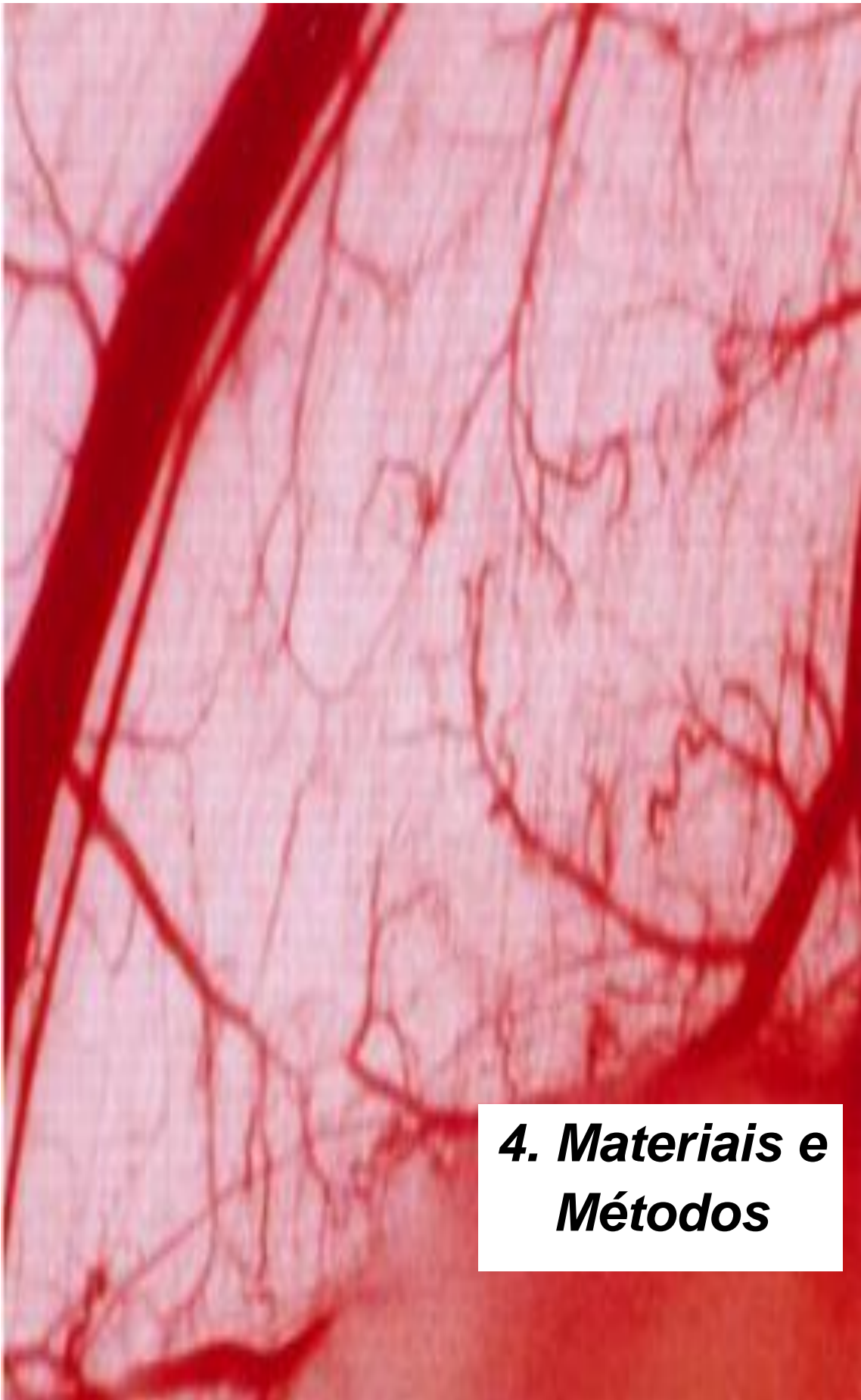
#### **3.1 - Objetivo geral**

- Investigar o curso temporal das respostas angiogênica, inflamatória e fibrogênica induzidas no músculo abdominal por implante sintético de poliéster-poliuretano.

#### **3.2 - Objetivos específicos**

- Caracterizar a dinâmica do recrutamento de células inflamatórias, vasos sanguíneos neoformados, produção de citocinas e fibrogênese no músculo esquelético reto abdominal.
- Determinar simultaneamente os níveis de marcadores inflamatórios (MPO, NAG, NO, CCL2/JE), angiogênicos (hemoglobina, VEGF, TNF- $\alpha$ ) e fibrogênicos (colágeno, TGF- $\beta$ 1) na musculatura abdominal de camundongos.
- Avaliar e comparar características histológicas da musculatura abdominal de animais implantados com discos de esponja e de animais do grupo controle utilizando técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas para a determinação da celularidade, presença de

vasos sanguíneos, quantificação de colágeno e infiltração de células inflamatórias.



## ***4. Materiais e Métodos***

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 - Animais**

Utilizamos nesse estudo camundongos machos da linhagem Swiss com 7 a 8 semanas (25 – 30 gramas). Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram alojados em gaiolas individuais e receberam ração e água *ad libitum*. O alojamento, anestesia e pós-operatório concordaram com as diretrizes estabelecidas pelo Comitê Institucional do Bem Estar Animal da UFMG.

### **4.2 - Técnica do implante de esponja**

#### **4.2.1 - Confeção e preparo dos discos de esponja**

Inicialmente foram confeccionados discos de esponja de poliéster poliuretano com diâmetro de 12 milímetros (mm) e 4 mm de espessura, através de um *punch* cirúrgico. Em seguida, os discos foram acondicionados em etanol 70% v/v durante 24 horas antes da implantação das esponjas.

Antes do início do procedimento cirúrgico de implantação dos discos, os mesmos foram lavados e fervidos em água destilada por aproximadamente 30 minutos.

#### **4.2.2 - Implante em camundongos**

Para o implante dos discos de esponja os animais foram anestesiados com uma solução de ketamina (150 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) (Syntec), e submetidos à tricotomia e à assepsia da região ventral anterior. Em seguida foi realizada uma incisão de aproximadamente 0,5 cm na pele e, após delicada divulsão do tecido subcutâneo, o disco de esponja foi introduzido logo acima do músculo reto abdominal, na linha alba. Após o implante, a incisão realizada foi suturada com fio de Nylon inabsorvível 5-0 (Procure).

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em observação e assim que se recuperaram foram acomodados em gaiolas individuais com livre acesso à água e ração (ANDRADE *et al.*, 1987).

#### **4.3 - Remoção do implante e do músculo abdominal**

Em intervalos de tempo pré-determinados (2, 4, 7 e 10) dias pós-implantes foi administrada dose letal de anestésico para sacrifício dos animais e retirada dos discos de esponja (animais implantados) e do músculo abdominal reto (animais implantados e grupo controle).

Para isso, os animais foram colocados em decúbito dorsal e após uma pequena incisão da pele na região ventral, se procedeu com a divulsão para a separação da pele e retirada, primeiramente, do implante (esponja) e parte dos músculos abdominais, dentro de limites pré-estabelecidos. A saber, o

fragmento da musculatura abdominal logo abaixo e em contato direto com o implante sintético, com limites laterais de 2 mm adjacentes ao implante.

Em seguida, os fragmentos de músculo esquelético foram pesados e processados para análises bioquímicas e histológicas.

#### **4.4 - Avaliação de marcadores angiogênicos**

##### **4.4.1 - Dosagem de hemoglobina**

A dosagem do conteúdo de hemoglobina intramuscular quantifica indiretamente a neovascularização presente nos tecidos e tem sido utilizada como índice de vascularização em modelos de angiogênese. Esta técnica utiliza o método do reagente de Drabkin (DRABKIN & AUSTIN, 1932).

Os fragmentos de músculos abdominais extraídos dos animais foram pesados, fragmentados e homogeneizados (Tekmar TR-10, Ohio, EUA) em 1,0 mililitro (mL) de reagente de Drabkin (Labtest, São Paulo, Brazil) por cerca de 30 minutos (min). Em seguida, foram centrifugados a 4° C a 1200 g por 40 min. Após centrifugação os sobrenadantes foram filtrados em membranas de 0,22 micrômetros (µm) (Millipore) e colocados em placas com 96 poços.

A leitura foi realizada por espectrofotometria a 540 nanômetros (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 ( $\mu\text{g}$ ) por miligramas (mg) de peso úmido do implante (FERREIRA *et al.*, 2004; BARCELOS *et al.*, 2005).

#### **4.4.2 - Avaliação do fluxo sanguíneo pela técnica de difusão da fluoresceína sódica**

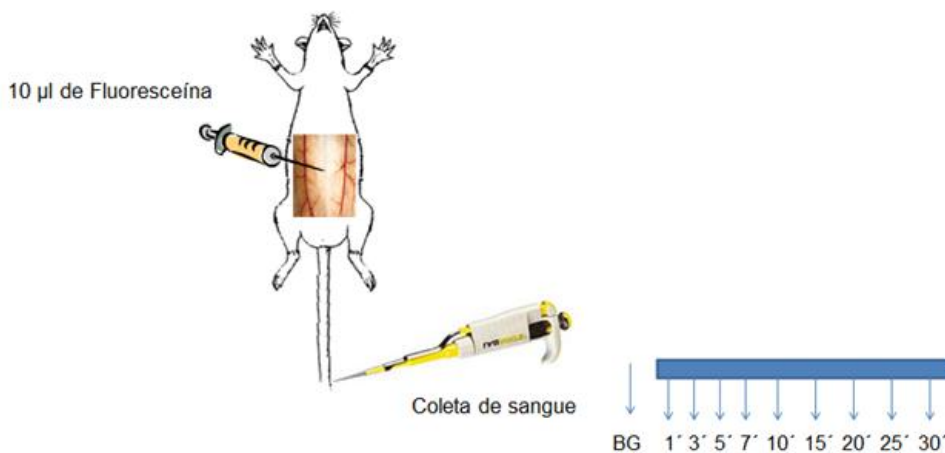
Esta técnica foi descrita por Andrade *et al.* (1997) e foi utilizada neste estudo para estimar o fluxo sanguíneo nos músculos abdominais. Ela consiste na difusão da fluoresceína aplicada ao tecido muscular e sua posterior detecção na corrente sanguínea (Figura 3) (ANDRADE *et al.*, 1997; TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Os animais foram previamente anestesiados com uma solução de ketamina (150mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg) (Syntec) e receberam *in situ* (via intradérmica) 10  $\mu\text{l}$  de uma solução de fluoresceína sódica estéril (Sigma, EUA, 1%).

A difusão da fluoresceína foi monitorada nos tempos 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a injeção, em amostras de sangue colhidas na veia da cauda. As amostras de sangue foram diluídas em 3 ml de solução salina isotônica, centrifugadas durante 5 minutos a 6000 rpm e o sobrenadante foi mantido para determinação da fluorescência em um espectrofotômetro Jeway (modelo 6200) com excitação/emissão de 485/520 nm.



O tempo de detecção do marcador fluorescente na corrente sanguínea foi expresso em termos de meia-vida ( $t_{1/2}$  - tempo calculado para a fluoresceína alcançar 50% do pico máximo da sua detecção na circulação sistêmica).



**Figura 3.** Esquema representando a técnica de difusão da fluoresceína sódica.

## 4.5 - Avaliação de marcadores inflamatórios

### 4.5.1 - Análise da atividade da mieloperoxidase (MPO)

O acúmulo de neutrófilos é um indicador de resposta inflamatória. Esse tipo de célula possui função fagocítica, contribuindo para eliminação de detritos (MCDONAL *et al.*, 2010). A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente em grânulos azurofílicos de neutrófilos sendo, portanto, utilizada para indicar o acúmulo desse tipo celular (CAMPOS, *et al.*, 2008; XAVIER *et al.*, 2010; ARAUJO *et al.*, 2011; MOURA, *et al.*, 2011).

Após a dosagem de hemoglobina, foram coletadas alíquotas de 200 µL do sobrenadante que foram, em seguida, utilizadas para a dosagem da atividade da MPO e da *N*-acetil-β-*D*-glicosaminidase (NAG).

Inicialmente, as alíquotas foram ressuspendidos em 2,0 mL de tampão fosfato de sódio, pH 4,7(0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO<sub>4</sub>, 0,015 M de NaEDTA) e centrifugadas a 12000 x G durante 10 minutos. Foram retirados então 300 µL do sobrenadante e adicionados 600 µL 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 450 nm utilizando 100 µL de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma) , preparada em DMSO em uma concentração final de 1,6 milimóis (mM) e 100 µL de substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) na concentração final de 0,3 mM, dissolvida em tampão fosfato (pH 5,4). A reação foi interrompida com a adição de 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4M) (Sigma) e quantificada colorimetricamente a 450 nm em leitor de microplaca. Os resultados foram, então, expressos em densidade óptica (OD) por miligrama de tecido úmido.

#### **4.5.2 - Análise da atividade da *N*-acetil-β-*D*-glicosaminidase (NAG)**

A quantificação de células mononucleares nos fragmentos de músculos abdominais pôde ser feita avaliando-se a atividade da enzima *N*-acetil-β-*D*-

glicosaminidase (NAG), presente em altos níveis em lisossomas de macrófagos ativados (BELO *et al.*, 2004).

A alíquota retirada do sobrenadante da dosagem de hemoglobina foi homogeneizada em uma solução de NaCl (0,9%) (Synth) contendo 0,1% v/v-1 Triton X-100 (Promega) e centrifugado (3000 G; 10 min 4°), por 10 minutos.

Para a realização do ensaio, foi adicionado 100 µL das amostras em duplicada a uma placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 100 µL do substrato *p*-nitrofenil-*N*-acetil- $\beta$ -*D*-glicosaminidase (Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato (pH 4,5), com concentração final de 2,43 mM. Posteriormente, a placa foi incubada a 37° C durante 30 minutos. Finalmente, foram adicionados 100 µL de tampão glicina 0,2 M, pH = 10,6. A absorbância foi medida por leitor de microplaca (Termoplate) em comprimento de onda de 400 nm. Os resultados foram expressos em nmol/ml<sup>-1</sup>/mg de tecido úmido.

## **4.6 - Avaliação de marcadores fibrogênicos**

### **4.6.1 - Quantificação de colágeno**

A quantidade de colágeno solúvel total foi determinada colorimetricamente baseada na reação de *picrossirius red*. As amostras de músculo foram homogeneizadas com tampão (1 mL Triton X, pH 7,8). Em seguida, foram centrifugadas. Posteriormente, foram adicionados 50 µL do reagente *picrossirius red* a 10 µL da amostra. Após incubação de 30 minutos a

temperatura ambiente, o complexo colágeno-*picrossirius red* foi centrifugado a 10000 G por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e o sedimento lavado com 500 µL de etanol (Synth, 99% puro e livre de metanol) e o complexo colágeno-corante foi reconstituído em 1 mL de reagente alcalino (NaOH 0,5 M) (Synth). A absorbância foi quantificada a 540 nm em leitor de microplacas (Thermoplate). A quantificação de colágeno foi determinada através da comparação com uma curva utilizando padrão de gelatina (Merck) e os resultados expressos em µg de colágeno por mg de implante ou músculo (CAMPOS *et al.*, 2008).

#### **4.7 - Dosagem de nitrito**

Para a determinação do conteúdo de nitrito no músculo abdominal reto, os mesmos foram pesados e posteriormente incubados em 250 µL de tampão PBS à 37°C por 10 minutos. Foram, então, utilizados 100 µL dos sobrenadantes para a dosagem do nitrito pela técnica da Reação de Griess (GREEN, 1982).

Para a realização do ensaio, 100 µL do sobrenadante foi colocado em uma placa de 96 poços. Em seguida foram adicionados 100 µL de uma solução contendo 1,0 g de sulfanilamida (Sigma-Aldrich) em 100 ml de ácido fosfórico (Sigma-Aldrich) 2,5% e 0,1 g de Need (naphthylethylenediamine) (Sigma-Aldrich) em 10 µL de ácido fosfórico 2,5% na proporção de 1:1 nas amostras e na curva padrão. A absorbância foi medida em leitor de microplaca

(Thermoplate) em comprimento de onda de 540 nm. A quantificação de nitrito foi determinada através da comparação com uma curva utilizando como padrão uma solução de nitrito de sódio e os resultados expressos em  $\mu\text{g/ml/g}$  de tecido úmido.

#### **4.8 - Dosagem de citocinas (VEGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 e CCL2/MCP-1)**

Para a determinação destas citocinas nos implantes e músculos foram utilizados 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante restante da dosagem de hemoglobina.

Para a realização do ensaio, diluições do sobrenadante foram adicionadas em duplicada à placa de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) que continham 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  $\mu\text{L}$  de uma 1:1 solução de peróxido de hidrogênio, Sigma e 10mg/ml de OPD, Sigma). A reação foi interrompida após 20 minutos de incubação com 50  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico (2M) e a intensidade da cor quantificada a 540 nm em leitor de microplaca (Thermoplate). Os resultados foram expressos como picogramas (pg) de citocina por mg de peso úmido.

#### **4.9 - Análise histológica e colorações**

Os tecidos encaminhados para a avaliação histológica foram previamente excisados cuidadosamente, dissecados sem tecido aderente e fixados em formalina (10% v/v em solução salina isotônica) por no mínimo 48 horas, e, posteriormente, submetidos aos processos de desidratação, diafanização, banho e inclusão em parafina.

Após estes procedimentos cortes de 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina e eosina (H&E) e processados para estudos do infiltrado inflamatório e alterações vasculares no tecido muscular em microscópio de luz.

Para determinar e visualizar as fibras de colágeno os cortes histológicos foram corados com vermelho de *picrossirius* seguido por microscopia de luz polarizada (MOURA *et al.*, 2011).

Além disso, reações imunohistoquímicas (IHC) foram realizadas para a detecção das células endoteliais dos vasos sanguíneos. Para isso foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-CD 31 (Fitzgerald MA, EUA). As secções de tecido (µm) foram desparafinadas e recuperadas com antígenos em tampão citrato (pH 6).

As lâminas foram fervidas em tampão citrato durante 25 minutos a 95 °C e, em seguida, resfriada durante 1 hora no mesmo tampão. As secções foram incubadas durante 5 minutos em peróxido de hidrogênio a 3% para extinguir a peroxidase endógena do tecido. A ligação não específica foi bloqueada usando soro de cabra durante 10 minutos (1:10 em solução salina tamponada com fosfato) com 1% de albumina de soro bovino (em tampão salino).

As secções foram então imunocoradas com um anticorpo monoclonal para CD31 (diluição 1:40, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, EUA) durante 60 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem em tampão Tris-HCl, as secções foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente com Estreptavidina Ligante Biotinilada Universal – HRP (DAKO; Carpinteria, CA, EUA).

As reações foram reveladas através da aplicação de 3,3' – diaminobenzidina em solução de cromogénio (DAB) (DAKO; Carpinteria, CA, EUA). As secções foram contrastadas com hematoxilina e montadas em Permount (Fisher Scientific; NJ, EUA). Todas as reações imunohistoquímicas foram realizadas manualmente, e o baço foi utilizado como controle positivo.

Os controles negativos foram realizados com omissão do anticorpo primário, resultando em nenhuma coloração detectável. A expressão das proteínas foi avaliada com base no grau de imunomarcagem citoplasmática em células endoteliais que formavam lúmen em seis campos de alta potência, independentemente da intensidade da coloração (x 400).

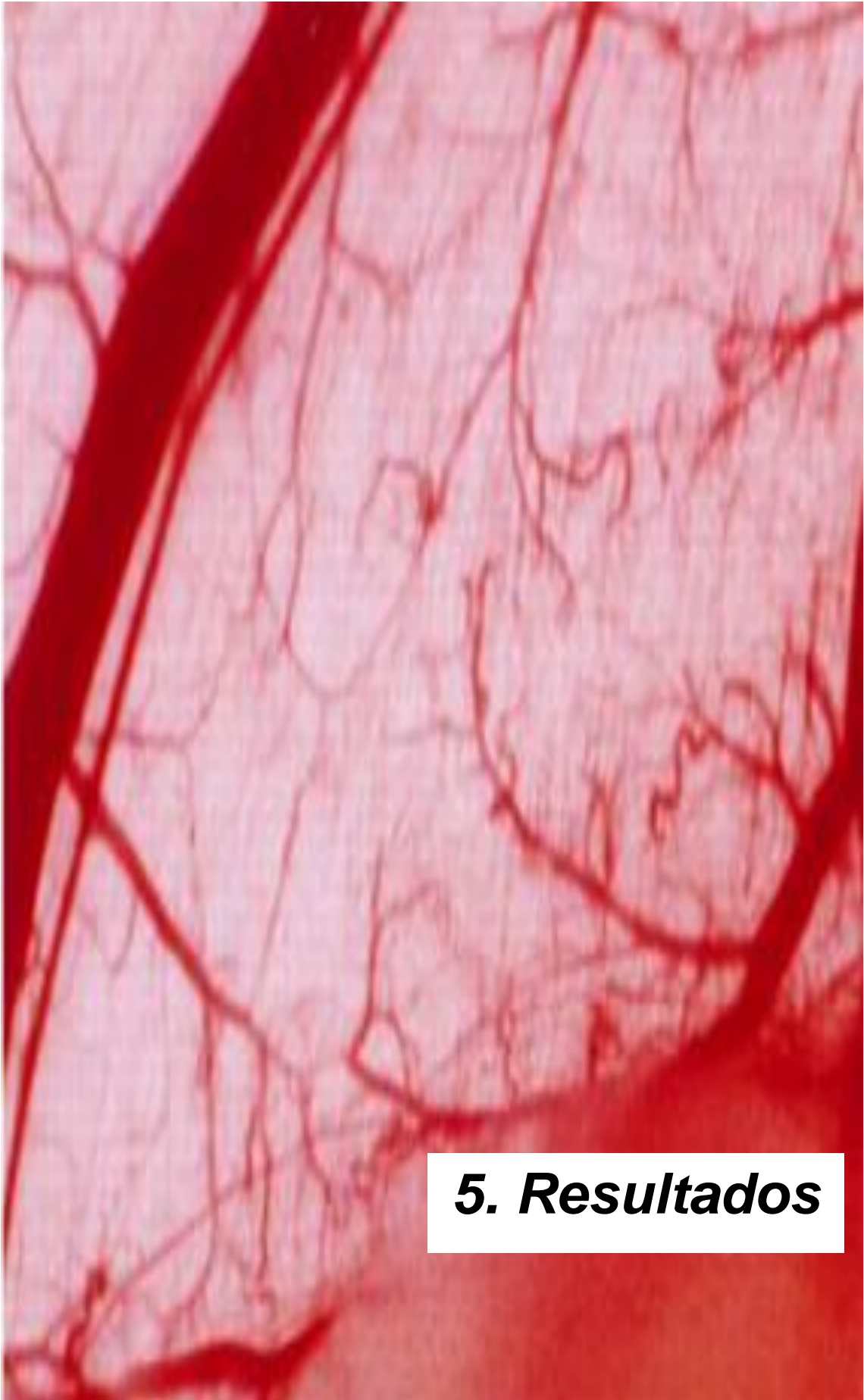
Para realizar a análise morfométrica, as imagens de secções transversais obtidas à partir de 15 campos (8533  $\mu\text{m}^2$ ) foram capturadas com uma objetiva planocromática (40x) em microscopia de luz (aumento final = 400x) e de (10x) em microscopia de luz polarizada (aumento final = 100x). As imagens foram digitalizadas através de uma microcâmara Olympus e transferidas para um analisador (Image Pro Plus, versão 6). Um vaso contável

foi definido como sendo uma estrutura com um lúmen contendo ou não glóbulos vermelhos.

#### **4.10 - Análise estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). As comparações entre os grupos foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) seguida por fator de correção Newman-Keuls para comparações múltiplas. Diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando os valores de  $p$  foram menores que 0,05.

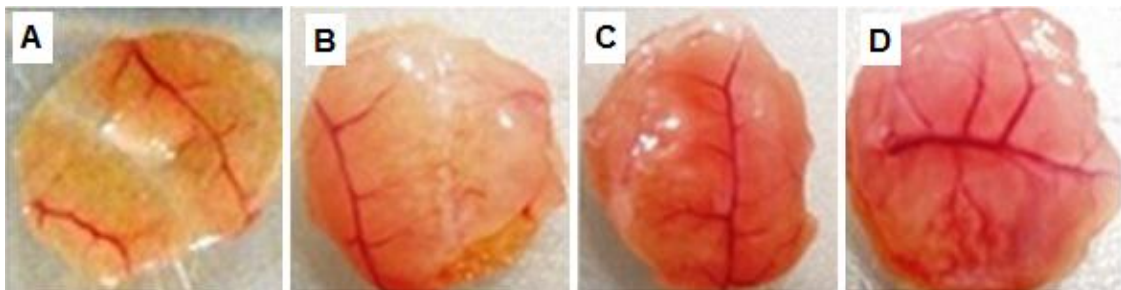




## ***5. Resultados***

## **5. RESULTADOS**

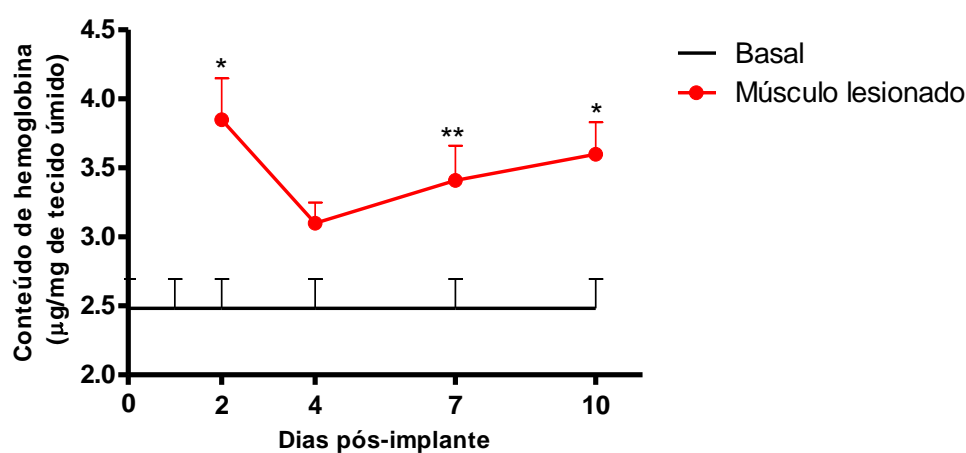
A matriz de esponja foi bem tolerada pelos animais. Não havia sinais de infecção ou rejeição no local do implante durante o período experimental máximo de 10 dias. Além disso, os implantes tornaram-se progressivamente mais aderidos aos tecidos adjacentes (pele ou músculo). A figura 4 evidencia o aspecto macroscópico dos fragmentos de músculo intacto (Figura 4A) e dos fragmentos de músculos adjacentes aos implantes (Figura 4B-D). No exame *in situ* o tecido muscular logo abaixo da matriz sintética implantada mostrou-se progressivamente vascularizado e integrado ao implante durante o período experimental estudado (Figura 4).



**Figura 4.** Fotos representativas do tecido muscular abdominal basal e de tecidos musculares/ implante de esponjas em vários pontos temporais pós-implante. Alterações vasculares visíveis podem ser vistas durante o período de 10 dias. Músculo não lesionado ou controle (A), músculo abdominal 4 dias pós-implante (B), músculo abdominal 7 dias pós-implante (C), músculo abdominal 10 dias pós-implante (D).

### **5.1 - Cinética da angiogênese induzida por implante de esponja na musculatura abdominal**

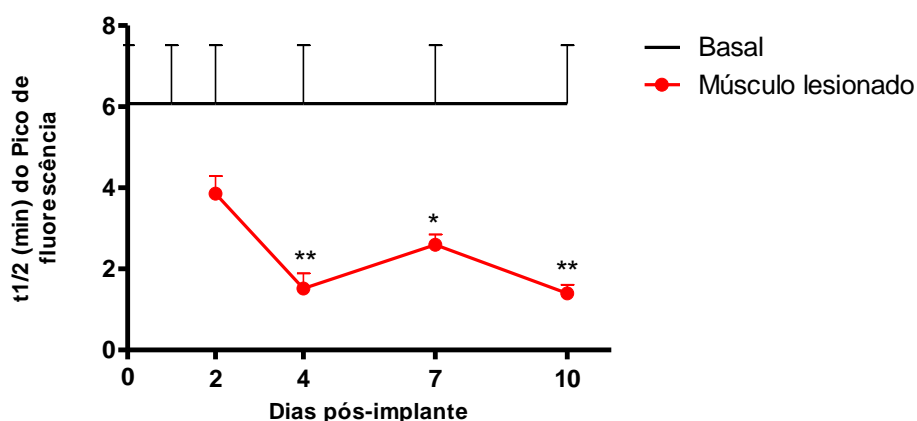
A mensuração do conteúdo de hemoglobina nos implantes proporciona um índice bem validado de neovascularização (HU *et al.*, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 2006; MENDES *et al.*, 2009) e foi utilizado também como índice de neovascularização da musculatura abdominal neste estudo. O teor de hemoglobina no músculo de animais implantados apresentou um aumento no segundo dia pós-implante, quando comparado aos músculos de animais que não receberam implantes, este aumento perdurou até o décimo dia pós-implante (Figura 5).



**Figura 5.** Cinética do conteúdo de hemoglobina na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal). Os valores representam as médias  $\pm$  e.p.m. de grupos de 6 a 8 animais em cada ponto de tempo. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . Diferença significativa entre os parâmetros avaliados em relação ao músculo intacto (linha reta).

A variação do fluxo sanguíneo na musculatura abdominal de camundongos que receberam implantes de esponja e de camundongos não implantados mostrou uma redução dos valores de  $t_{1/2}$  do pico de fluorescência,

indicando, ainda, um aumento do fluxo sanguíneo a partir do segundo até o décimo dia em animais implantados (Figura 6).

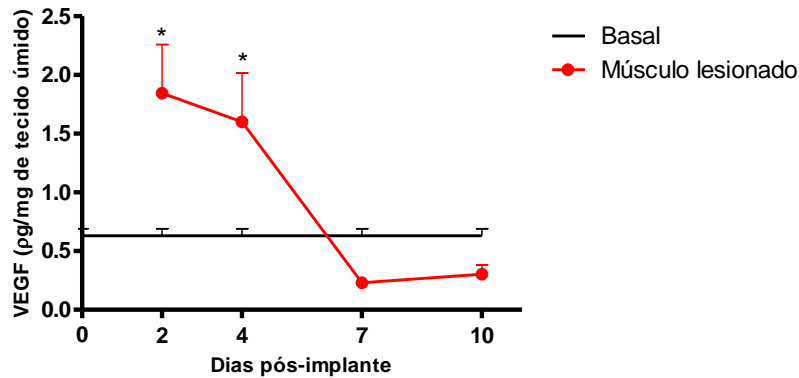


**Figura 6.** Variação do fluxo sanguíneo avaliado pelo método de difusão da fluoresceína sódica na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal). Os valores representam as médias  $\pm$  e.p.m. de grupos de 6 a 8 animais em cada ponto de tempo. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . Diferença significativa entre os parâmetros avaliados em relação ao músculo intacto (linha reta).

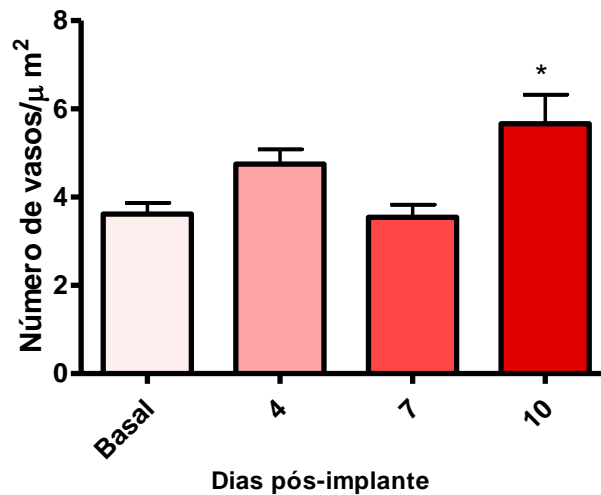
A dosagem dos níveis da mais importante citocina pró-angiogênica, o VEGF, atingiu o pico logo após o implante (dia 2) caindo progressivamente a níveis abaixo dos valores basais (dia 10) (Figura 7).

A análise morfométrica do número de vasos em secções imunohistoquímicas do músculo abdominal esquelético marcadas com o anticorpo monoclonal CD31 pode ser observada na figura 8. O número de vasos em músculos abdominais de animais que receberam implantes de esponja durante um período de 10 dias foi significativamente maior do que nos

músculos esqueléticos de animais que não haviam recebido implantes de esponja (basal).



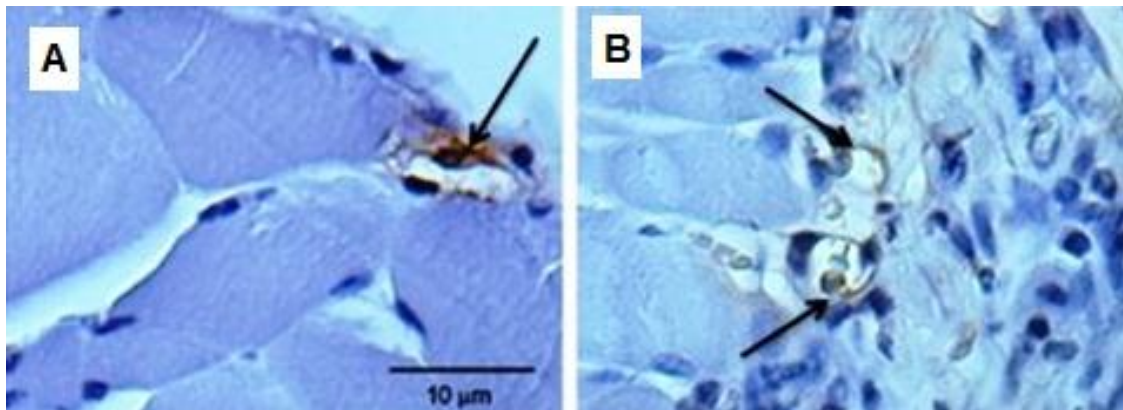
**Figura 7.** Níveis da citocina pró-angiogênica VEGF na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal). Os valores representam as médias  $\pm$  e.p.m. de grupos de 6 a 8 animais em cada ponto de tempo. \*  $p < 0,05$ . Diferença significativa entre os parâmetros avaliados em relação ao músculo intacto (linha reta).



**Figura 8.** Número de vasos em seções imunohistoquímicas da musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal). Os valores representam as médias  $\pm$  e.p.m. de grupos de 6 a 8 animais em cada ponto de tempo. \*  $p < 0,05$ . Diferença significativa entre os parâmetros avaliados em relação ao músculo intacto (linha reta).

Além disso, a avaliação das secções histológicas imunomarcadas corroborou com os dados obtidos através dos parâmetros funcionais e bioquímicos indicativos de angiogênese aumentada em músculos de animais que receberam implantes de esponja, sobretudo no grupo de 10 dias.

Foi possível observar que o tecido muscular em contato com o implante de esponja apresentou maior celularidade e vascularização (Figura 9A) em comparação com o músculo intacto (Figura 9B).



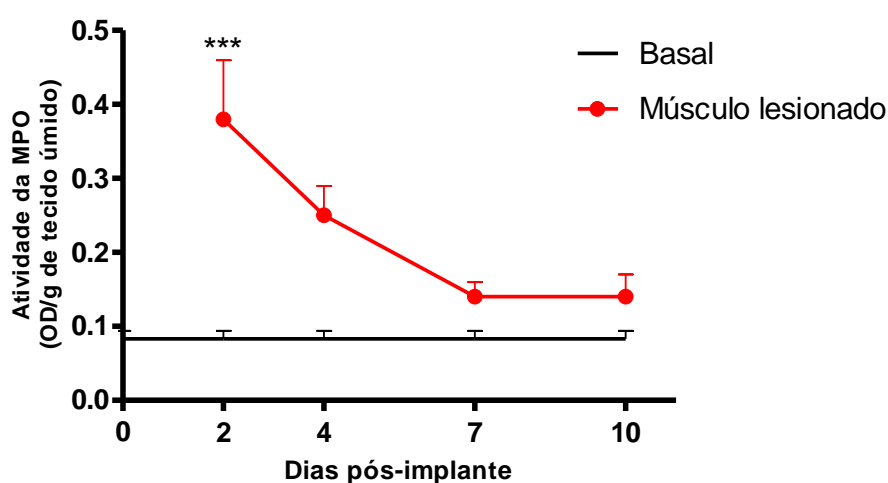
**Figura 9.** Secções histológicas representativas da interface músculo esquelético/implante de esponjas coradas com o anticorpo monoclonal CD31. Em “A” micrografia representativa de músculos não lesionados (basais) e em B de músculos lesionados (10 dias). Barra 10 µm; 40x; setas indicam os vasos sanguíneos marcados pelo CD31.

## **5.2 - Cinética da inflamação induzida por implante de esponja na musculatura abdominal**

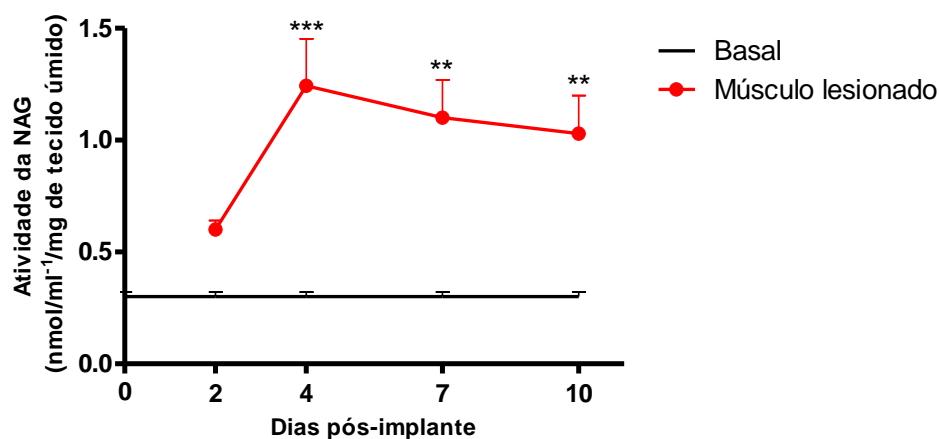
Para avaliação do processo inflamatório induzido por implante de esponja na musculatura abdominal de camundongos foram dosadas as atividades das enzimas MPO e NAG. Além disso, a citocina pró-inflamatória

TNF- $\alpha$  também foi dosada, bem como a quimiocina atrativa de monócitos CCL2/JE para avaliar o perfil inflamatório da musculatura abdominal esquelética dos animais estudados.

Assim, o curso de tempo do acúmulo de leucócitos no músculo revelou aumento de neutrófilos no período inicial ao implante de esponja, como determinado pela atividade da MPO (pico no dia 2) (Figura 10), seguido pelo acúmulo de macrófagos, como determinado pela atividade da NAG (pico no dia 4) (Figura 11).



**Figura 10.** Cinética da atividade da enzima MPO na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal). Os valores representam as médias  $\pm$  e.p.m. de grupos de 6 a 8 animais em cada ponto de tempo. \*\*\*  $p < 0,001$ . Diferença significativa entre os parâmetros avaliados em relação ao músculo intacto (linha reta).

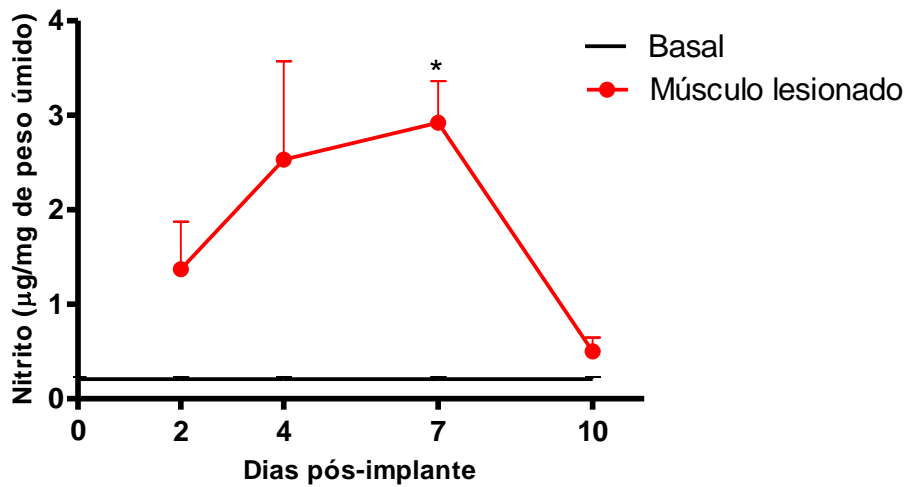


**Figura 11.** Cinética da atividade da enzima NAG na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal). Os valores representam as médias  $\pm$  e.p.m. de grupos de 6 a 8 animais em cada ponto de tempo. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Diferença significativa entre os parâmetros avaliados em relação ao músculo intacto (linha reta).

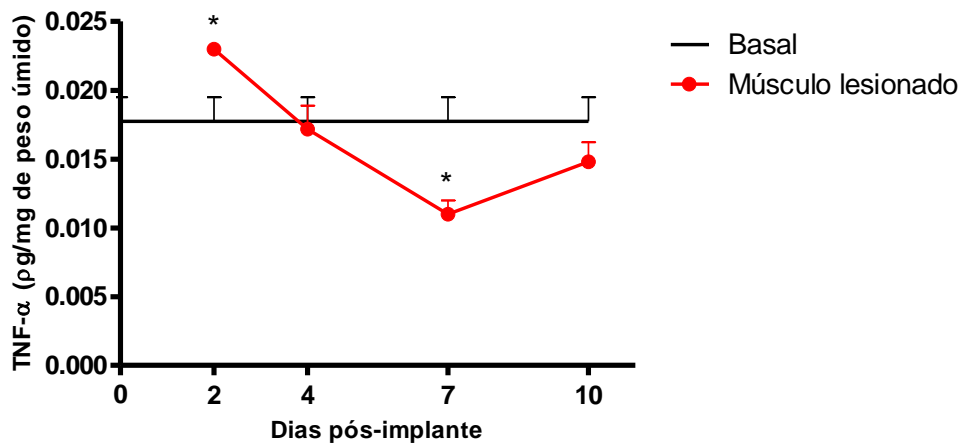
A dosagem da concentração de nitrito no músculo como medida indireta da produção de óxido nítrico foi avaliada. Observou-se um aumento progressivo e sustentado nos níveis de nitrito até o sétimo dia pós-implante, após isso as concentrações de nitrito reduziram a níveis de animais não implantados (Figura 12).

Ao avaliar a cinética de produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  observa-se um pico na liberação desta citocina no segundo dia pós-implante, após este período verifica-se uma redução progressiva no conteúdo de TNF- $\alpha$  em músculos lesionados, apresentando níveis inferiores aos de músculos de animais não implantados (Figura 13).



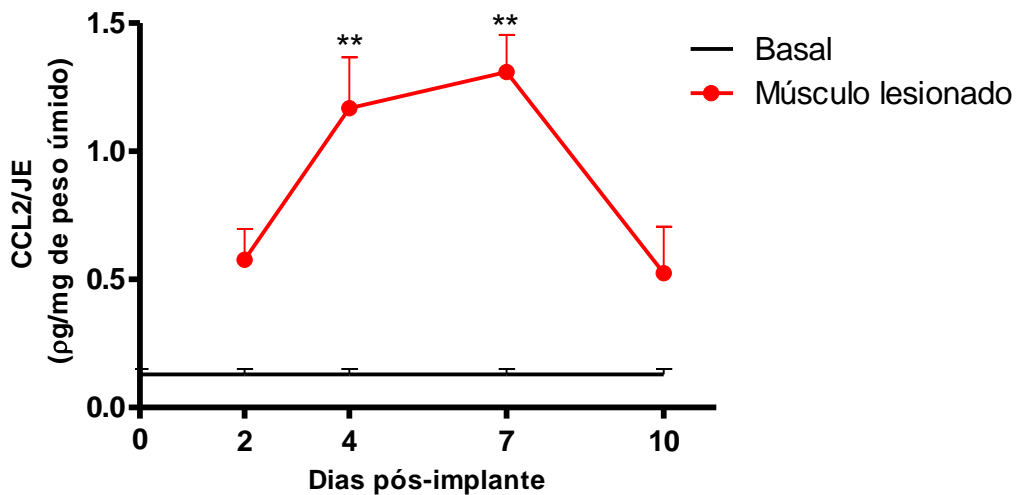


**Figura 12.** Cinética da produção de nitrito na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal). Os valores representam as médias  $\pm$  e.p.m. de grupos de 6 a 8 animais em cada ponto de tempo. \*  $p < 0,05$ . Diferença significativa entre os parâmetros avaliados em relação ao músculo intacto (linha reta).



**Figura 13.** Cinética dos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal). Os valores representam as médias  $\pm$  e.p.m. de grupos de 6 a 8 animais em cada ponto de tempo. \*  $p < 0,05$ . Diferença significativa entre os parâmetros avaliados em relação ao músculo intacto (linha reta).

Em relação aos níveis da quimiocina CCL2/JE observa-se um aumento progressivo na sua produção até o sétimo dia pós-implante, após este período há uma redução nos níveis desta citocina. Entretanto, o conteúdo de CCL2/JE na musculatura abdominal de animais que receberam implantes, permanece mais elevado do que em músculos abdominais de animais não implantados (Figura 14).

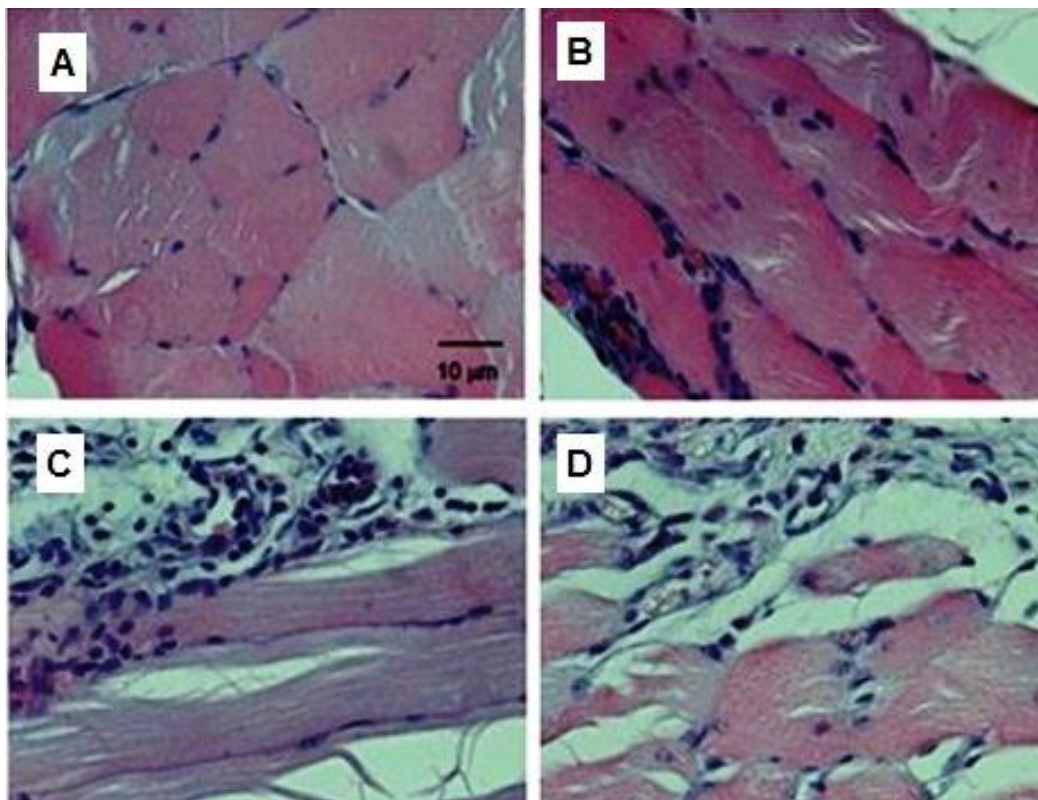


**Figura 14.** Cinética dos níveis da quimiocina CCL2/JE na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal). Os valores representam as médias  $\pm$  e.p.m. de grupos de 6 a 8 animais em cada ponto de tempo. \*\*  $p < 0,01$ . Diferença significativa entre os parâmetros avaliados em relação ao músculo intacto (linha reta).

Cortes histológicos corados com Hematoxilina & Eosina (HE) indicaram um aumento progressivo do infiltrado de células inflamatórias (Figura 15) em músculos lesionados comparados a músculos não lesionados (basais).

Músculos abdominais de animais 4 dias após o implante, apresentaram

um predomínio de neutrófilos (Figura 15B) ao passo que músculos abdominais referentes a animais com 7 ou 10 dias pós-implante apresentaram predomínio de macrófagos (Figura 15C-D). Além disso, é possível perceber o aumento progressivo na formação de tecido de granulação em músculos de animais implantados (Figura 15B-D) quando comparado a músculos de animais não implantados (Figura 15A).

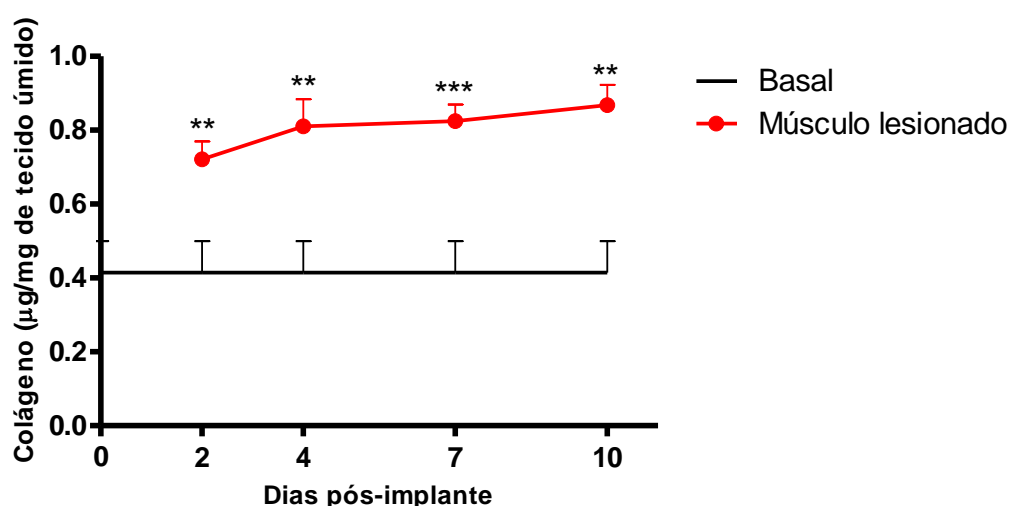


**Figura 15.** Secções histológicas representativas da interface músculo esquelético/implante de esponjas coradas com Hematoxilina & Eosina (HE). Em A, basal (músculo não lesionado), em B músculo abdominal 4 dias pós-implante, em C músculo abdominal 7 dias pós-implante, em D músculo abdominal 10 dias pós-implante. Barra 10 µm; 40x.

### 5.3 - Deposição de colágeno e níveis de TGF- $\beta$ 1

A avaliação da resposta fibrogênica frente ao implante de esponja foi realizada pela análise do conteúdo de colágeno e da citocina pró-fibrogênica TGF- $\beta$ 1 na musculatura de animais que receberam ou não implantes.

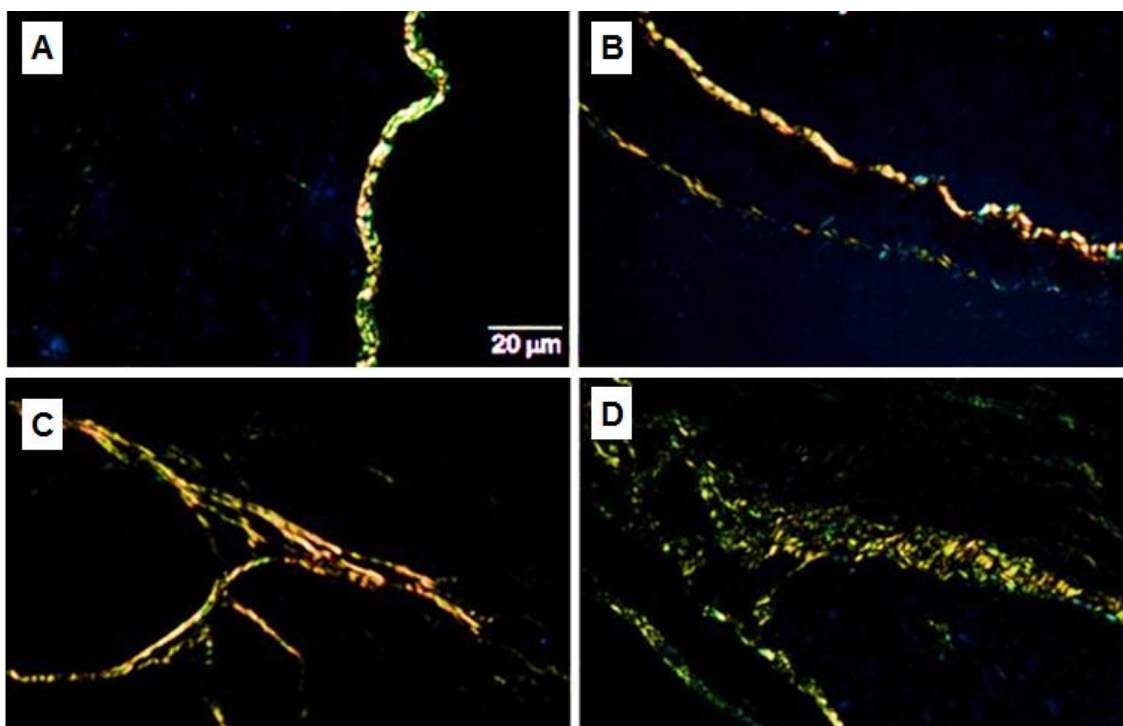
Os níveis de colágeno foram maiores nos fragmentos de músculos adjacentes aos implantes quando comparados aos músculos intactos (basal). É interessante observar que este aumento ocorre logo no segundo dia pós-implante permanecendo constante até o fim do período experimental do estudo (Figura 16).



**Figura 16.** Cinética do conteúdo de colágeno determinado pelo ensaio colorimétrico com *Picrosirius Red* na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal). Os valores representam as médias  $\pm$  e.p.m. de grupos de 6 a 8 animais em cada ponto de tempo. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Diferença significativa entre os parâmetros avaliados em relação ao músculo intacto (linha reta).

Para uma confirmação adicional da deposição de colágeno na musculatura abdominal de camundongos foi realizada a análise densitométrica

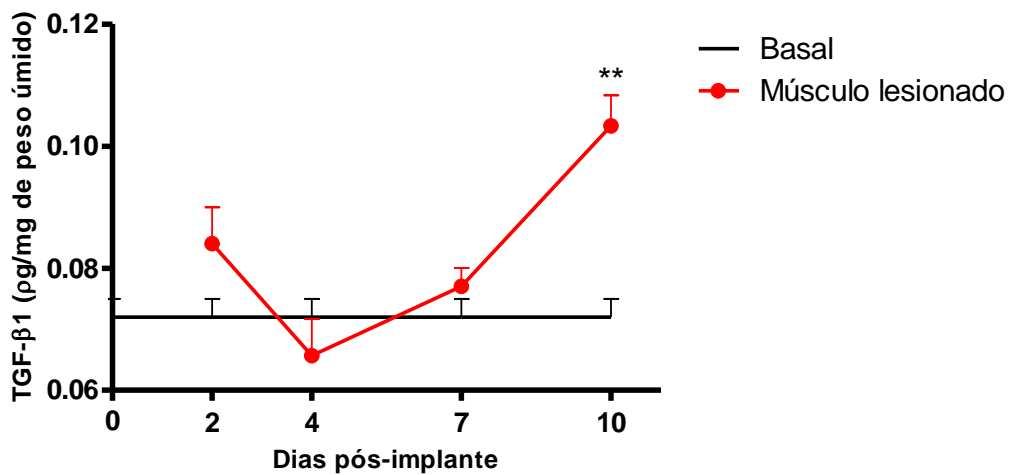
de secções histológicas coradas com *Picrossirius*. A partir desta técnica foi possível observar uma aparência aumentada de fibras de colágeno em músculos abdominais de animais com 7 e 10 dias pós-implante (Figura 17C-D), quando comparada a músculos de animais controle (Figura 17A).



**Figura 17.** Secções histológicas representativas da interface músculo esquelético/ implante de esponjas coradas com *Picrossirius Red*. Músculo não lesionado ou controle (A), músculo abdominal 4 dias pós-implante (B), músculo abdominal 7 dias pós-implante (C), músculo abdominal 10 dias pós-implante (D). Barra 20 µm.

Em relação à cinética da produção da citocina pró-fibrogênica, TGF- $\beta$ 1, observa-se um aumento inicial em seus níveis no segundo dia pós-implante, reduzindo, posteriormente no quarto dia após implantação. Em seguida,

observa-se aumento progressivo nos níveis desta citocina do sétimo ao décimo dia quando comparado ao músculo não lesionado (Figura 18).



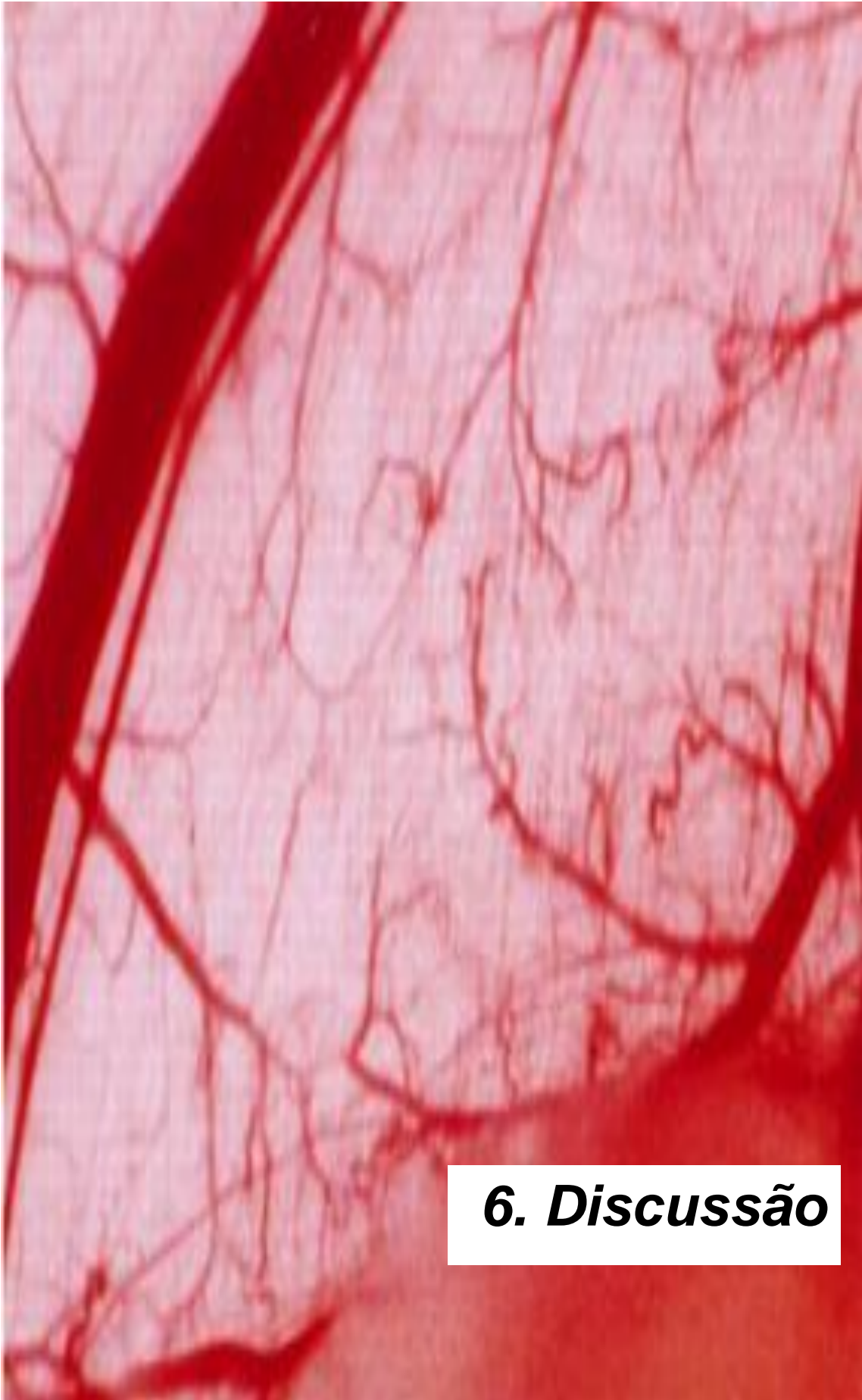
**Figura 18.** Cinética dos níveis da citocina pró-fibrogênica TGF-β1 na musculatura abdominal esquelética de camundongos adjacente a implantes de esponja e musculatura abdominal esquelética de camundongos não implantados (basal). Os valores representam as médias  $\pm$  e.p.m. de grupos de 6 a 8 animais em cada ponto de tempo. \*\*  $p < 0,01$ . Diferença significativa entre os parâmetros avaliados em relação ao músculo intacto (linha reta).

De forma geral, a cinética das alterações induzidas pelo implante de esponja na musculatura abdominal de camundongos pode ser evidenciada na Figura 19.

<b>Parâmetros/Grupos</b>	<b>2 dias</b>	<b>4 dias</b>	<b>7 dias</b>	<b>10 dias</b>
<b>Angiogênicos</b>				
Hemoglobina	↑	=	↑	↑
Fluxo sanguíneo	=	↑	↑	↑
VEGF	↑	↑	=	=
Número de vasos	=	=	=	↑
<b>Inflamatórios</b>				
MPO	↑	=	=	=
NAG	=	↑	↑	↑
Nitrito	=	=	↑	=
TNF- $\alpha$	↑	=	↓	=
CCL2/JE	=	↑	↑	=
<b>Fibrogênicos</b>				
Colágeno	↑	↑	↑	↑
TGF- $\beta$ 1	=	=	=	↑

**Figura 19.** Sumário das alterações vasculares, inflamatórias e fibrogênicas induzidas por implantes de esponja na musculatura esquelética abdominal de camundongos durante o período experimental de 10 dias.





## ***6. Discussão***



## **6. DISCUSSÃO**

É bem documentado que implantes de matrizes sintéticas induzem crescimento espacial e temporal de tecido fibrovascular localizado, permitindo a quantificação de vários componentes do processo inflamatório e angiogênico (FERREIRA *et al.*, 2004; MENDES *et al.*, 2009). Essa abordagem experimental foi utilizada no presente trabalho mimetiza uma condição clínica de cicatrização de feridas e reação inflamatória tipo corpo estranho/hospedeiro, permitindo, assim, avaliar o recrutamento de células inflamatórias, neovascularização e resposta fibrogênica da musculatura abdominal de camundongos frente a matrizes esponjosas.

Clinicamente lesões do músculo esquelético são patologias comuns e o implante de materiais sintéticos ou tecidos biológicos são procedimentos para o reparo de defeitos músculo-fasciais que, além dos efeitos benéficos, dispara uma cascata de respostas na interface entre o material implantado e o tecido adjacente. Estas respostas são vistas como sendo, contraditoriamente, benéficas e/ou prejudiciais ao reparo tecidual dependendo de alguns fatores como o tipo de material implantado e a intensidade da resposta do hospedeiro a este material (ANDERSON, 2001; MORAIS *et al.*, 2010).

Além disso, a distensão ou estiramento excessivo das fibras musculares (estímulos mecânicos) podem estar envolvidos nos processos de reparo, sobretudo nas fases inflamatórias e angiogênicas. O estiramento excessivo das fibras provoca lesão das mesmas e a migração de células inflamatórias (BEST,

1999). Além disso, forças mecânicas exercidas sobre as fibras também desencadeiam a formação de novos vasos sanguíneos na musculatura esquelética, por influenciar na expressão de metaloproteinases e VEGF (BROWN & HUDLICKÁ, 2003).

Assim, se por um lado a reação do hospedeiro ao implante poderia estar colaborando com as alterações detectadas na musculatura abdominal, observadas neste estudo, por outro, alterações nas estruturas musculares com o comprometimento da integridade das fibras musculares e sua contratilidade poderiam alterar importantes funções do músculo esquelético, bem como a contenção dos órgãos abdominais e a manutenção da pressão intra-abdominal (MUTOH *et al.*, 1991; FLINTROP *et al.*, 1997).

Deste modo, poderíamos inferir que a resposta do organismo ao implante, bem como a força mecânica aplicada por este sobre a musculatura, acompanhada por um processo inflamatório poderia estar afetando a contratilidade das fibras musculares dos camundongos avaliados.

Embora vários estudos tenham investigado a resposta inflamatória do hospedeiro, a reação ao corpo estranho e a neovascularização de materiais implantados em vários tecidos animais (ARBÓS *et al.*, 2000; GOBIN *et al.*, 2006; MORAIS *et al.*, 2010), a caracterização da angiogênese inflamatória induzida por implantes na parede abdominal é escassa. Neste estudo, descrevemos mudanças bioquímicas e estruturais que ocorrem na parede muscular abdominal adjacente a implantes de matrizes sintéticas de poliéster-poliuretano em camundongos.

O exame macroscópico do tecido muscular em contato direto com a matriz de esponja apresentou uma progressiva alteração vascular e integração do tecido ao implante durante o período experimental estudado (10 dias). Estas alterações foram confirmadas pelos aumentos na taxa de difusão da fluoresceína sódica e conteúdo de hemoglobina (índice vascular) na musculatura abdominal.

Os parâmetros utilizados neste estudo para determinar o fluxo sanguíneo têm sido extensivamente utilizados para avaliar a neovascularização em vários tecidos e modelos animais (HU *et al.*, 1995; Teixeira *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2011), e refletiu-se como um bom marcador no presente trabalho.

É importante ressaltar que a vasodilatação e/ou aumento da permeabilidade ocorre em condições inflamatórias e estes eventos resultam em aumento do fluxo sanguíneo, deste modo, as técnicas utilizadas poderiam ter refletido apenas alterações vasculares ao invés do aumento do número de vasos. Entretanto, análises morfométricas do tecido muscular confirmaram o aumento do número de vasos na musculatura esquelética abdominal de camundongos implantados, corroborando, assim, com parâmetros os funcionais e bioquímicos realizados.

Os resultados obtidos são, portanto, consistentes com a noção de que a musculatura esquelética é capaz de se vascularizar frente a determinados estímulos tais como treinamento, hipóxia e isquemia (BROWN & HUDLICKÁ, 2003; TIDBALL, 2005). Ademais, este estudo acrescenta a informação de que

tecidos musculares se vascularizam quando em contato com materiais sintéticos, ou seja, um estímulo mecânico e crônico foi capaz de aumentar a capilaridade da musculatura abdominal de camundongos.

No caso do estímulo utilizado neste trabalho, a neovascularização observada poderia estar associada a lesões da estrutura muscular provocadas pelo infiltrado de células inflamatórias, ou pela liberação de fatores pró-angiogênicos secretados por estas células.

Dentre os fatores pró-angiogênicos, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), é um dos mais estudados (SHWEIKI *et al.*, 1992; RISSANEM *et al.*, 2002; JENSEN *et al.*, 2004) e pode ter influenciado a formação de vasos sanguíneos na musculatura abdominal estudada.

O pico deste fator no tecido muscular foi alcançado no segundo dia pós-implante decrescendo até o décimo dia a níveis de músculos não lesionados. Têm-se relatado que os níveis de VEGF ocorrem em maior extensão e mais consistentemente que outros fatores angiogênicos no crescimento capilar induzido pelo exercício em tecidos musculares (GUSTAFSSON, 2011).

Além disso, a supressão ou inibição do VEGF no músculo esquelético de ratos adultos reduz a capilaridade muscular, diminui o tempo de resistência ao exercício e suprime a resposta angiogênica ao treinamento (WAGNER, 2011). Sendo assim, a dosagem desta citocina permitiu avaliar a influência do VEGF na capilarização de tecidos musculares submetidos a uma lesão mecânica crônica.

Ao avaliar os dados de hemoglobina e VEGF percebe-se a nítida relação entre estes dois parâmetros, pois níveis aumentados de hemoglobina refletiram em menores níveis de VEGF muscular. Desta forma, podemos inferir que o VEGF é uma das citocinas pró-angiogênicas que estaria envolvida na capilarização de tecidos musculares estimulados por implantes sintéticos.

Em relação ao processo inflamatório, este influenciará benéfica ou prejudicialmente a função e o reparo muscular, sendo que a magnitude da resposta frente ao estímulo, história prévia do uso da musculatura e interações específicas entre lesões e musculatura são os principais determinantes para direcionar a resposta inflamatória em reparo/regeneração ou perda da função (fibrose) do tecido (TIDBALL, 2005).

Neste trabalho, a participação do processo inflamatório nas alterações encontradas na musculatura abdominal foi avaliada quanto à atividade de enzimas e citocinas inflamatórias. Estes parâmetros são amplamente aceitos como marcadores deste processo (RAMOS *et al.*, 2007; ASSI *et al.*, 2011; ECKERMANN, *et al.*, 2011; GALLET *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2011).

A atividade da mieloperoxidase, uma enzima presente em grânulos azurofílicos de neutrófilos, tem sido, portanto utilizada para indicar o recrutamento de neutrófilos em vários tecidos e modelos experimentais (CAMPOS, *et al.*, 2008; XAVIER *et al.*, 2010; ARAUJO *et al.*, 2011; MOURA, *et al.*, 2011).

Os neutrófilos representam a linha primária de defesa do organismo (DIEGELMANN & EVANS, 2004; NUNES *et al.*, 2011), sendo atraídos para o

local da lesão por numerosas citocinas inflamatórias produzidas por plaquetas ativadas, células endoteliais e por produtos de degradação de patógenos. Esse tipo celular pode ser ativado por agentes que incluem produtos bacterianos, citocinas ou quimiocinas, como por exemplo, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

No local da inflamação associada a implantes, os “corpos estranhos” são reconhecidos por receptores de membranas dos neutrófilos e são, então, fagocitados. Além disso, esse tipo celular, em algumas situações, pode ser capaz de sintetizar mediadores pró-inflamatórios e apresentar antígenos às células T. Os neutrófilos entram em apoptose rapidamente, liberando citocinas que são importantes para o recrutamento de macrófagos (RODERO & KHOSROTEHRANI, 2010; WRIGHT *et al.*, 2010).

Nossos achados revelaram uma invasão/ativação inicial de neutrófilos (como determinado pela atividade da MPO), com pico no segundo dia, decrescendo subsequentemente a valores próximos ao de músculos não estimulados. Este perfil confirma o padrão do processo inflamatório na musculatura esquelética observado em diversos estudos experimentais e em humanos que constataram que os primeiros tipos celulares a chegar ao tecido muscular lesionado são os neutrófilos (TIDBALL, 2005).

A atividade da enzima *N*-acetil- $\beta$ -*D*-glicosaminidase (NAG), presente em macrófagos ativados está relacionada à fase inflamatória tardia (APPLETON *et al.*, 1993; BARCELOS *et al.*, 2004). Os macrófagos são células mielóides maduras, derivadas principalmente da diferenciação de monócitos circulantes. Essas células possuem inúmeras propriedades fisiológicas e patológicas,

dependendo da estimulação de certas citocinas. Os macrófagos infiltram na ferida maciçamente e acentuam a atividade fagocitária (RODERO & KHOSROTEHRANI, 2010; WRIGHT *et al.*, 2010). Essas células também são importantes para o fechamento da ferida, bem como para a fibrose e formação de cicatriz.

No músculo esquelético lesionado a principal função dos macrófagos consta em limpar a área lesionada de debris e secretar moléculas que contribuirão para o processo de reparo/regeneração muscular (TIDBALL, 2005; TSIROGIANNI *et al.*, 2006). A atividade na NAG apresentou pico no quarto dia, permanecendo aumentado até o décimo dia pós-implante, corroborando com outros estudos que observaram que os macrófagos são os tipos celulares que participam de uma resposta mais tardia (BURY & PIRNAY, 1995; BELCASTRO *et al.*, 1996; TEIXEIRA *et al.*, 2006), embora se observe um ligeiro aumento da atividade da NAG no músculo estimulado já no segundo dia pós-implante. Deve-se considerar que a presença de macrófagos residentes no tecido muscular poderia liberar fatores quimiotáticos de forma mais precoce contribuindo para um recrutamento celular precoce frente ao estímulo pró-inflamatório utilizado neste estudo.

Em adição, o presente estudo traz algo inovador em relação ao processo inflamatório na musculatura abdominal, pois não se baseou em treinamento, estimulação elétrica, hipóxia ou estímulo químico no músculo esquelético fornecendo, assim, evidências do envolvimento de neutrófilos e macrófagos na lesão muscular sob estímulo crônico.

Outro fator importante no processo inflamatório em músculos esqueléticos é o óxido nítrico (NO). O NO é um gás solúvel, inorgânico e incolor que apresenta papel dúbio, muitas vezes sendo benéfico outras vezes prejudicial ao organismo. Esta molécula está envolvida no relaxamento vascular e constitui um importante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas. Além disso, possui um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; HIBBS *et al.*, 1988; PALMER *et al.*, 1988 ; MORRIS & BILLIAR, 1994) .

Macrófagos e células musculares expressam óxido nítrico sintase inflamatória (iNOS), que é a enzima responsável pela produção de NO em estados e doenças inflamatórias, e é provável que o NO produzido por esta enzima seja relevante para a defesa do hospedeiro (KOBAYASHI, 2010).

No presente trabalho, a cinética da produção de nitrito (evidência indireta do óxido nítrico) na musculatura abdominal mostrou uma produção sustentada desta molécula do segundo ao sétimo dia após injúria. O NO derivado do músculo tem sido apontado como sendo um importante regulador da inflamação e dano muscular pela invasão de células inflamatórias (NGUYEN & TIDBALL, 2003). Estudos *in vitro* demonstraram que o NO derivado do músculo reduziu a lise de células musculares induzida por neutrófilos e diminuiu a concentração do ânion superóxido em meios de cultura. Além disso, o NO parece inibir a expressão de moléculas de adesão necessárias para recrutamento e migração celular (NIU *et al.*, 1994; TIDBALL, 2005).



Desta forma parece ser pertinente propor que no modelo de estímulo inflamatório crônico utilizado neste estudo, a produção prolongada de NO possa ter sido uma tentativa para controlar a inflamação crônica no músculo abdominal e promover o reparo/regeneração tecidual.

Além do NO diversas citocinas e quimiocinas desempenham papéis críticos na lesão e reparo/regeneração do musculoesquelético. Dentre elas o TNF- $\alpha$  é a citocina pró-inflamatória mais importante por promover o reparo tecidual através da indução de componentes da membrana basal e de proteases para a degradação de colágeno, participando ativamente da reconstrução da matriz extracelular. Alguns autores mostraram que o TNF- $\alpha$  também é capaz de induzir angiogênese, através do aumento dos níveis do fator de crescimento do endotélio vascular e do fator de crescimento fibroblástico em células endoteliais (YOSHIDA *et al.*, 1997; BANNO *et al.*, 2004).

Os níveis de TNF- $\alpha$  foram dosados na musculatura abdominal de animais dos grupos controle e implantados e apresentaram níveis aumentados somente no segundo dia, quando comparados à músculos de animais sem implantes. Estes achados estão, até certo ponto, de acordo com alguns trabalhos publicados. Tem sido demonstrado que os níveis de TNF- $\alpha$  se elevam no músculo logo após uma lesão (COLLINS & GROUNDS, 2001) e que a recuperação da força muscular após uma injúria por congelamento foi prejudicada em camundongos sem receptor para TNF- $\alpha$  e em camundongos

tratados com um neutralizante anti-TNF- $\alpha$  comparados com camundongos selvagens lesionados (WARREN *et al.*, 2002).

Os resultados deste estudo também estão de acordo com os publicados por Pelosi *et al.* (2007) que mostraram uma redução progressiva na expressão TNF- $\alpha$  em músculos esqueléticos quimicamente lesionados com injeções de cardiotoxina.

Quimiocinas são proteínas pequenas que funcionam como quimioatrativos para facilitar a migração de células do sistema imunológico durante a vigilância imunológica e períodos de inflamação. Dentre este grupo, a quimiocina ligante 2 (CCL2/JE), anteriormente conhecida como proteína quimioatrativa 1 (MCP-1), recruta monócitos, linfócitos-T e basófilos para os locais de inflamação (PAGE *et al.*, 2011), sendo, portanto um marcador importante a ser avaliado em resposta inflamatórias.

Os níveis desta quimiocina nos tecidos musculares apresentaram-se aumentados a partir do segundo dia, permanecendo elevados até o sétimo dia pós-implante. A cinética da produção de CCL2/JE no músculo abdominal esquelético estimulado por matriz sintética também foi compatível com o papel relatado desta quimiocinas em processos inflamatórios após lesão. A deficiência de CCL2/JE têm sido mostrada como sendo a causa de uma inflamação alterada e do prejuízo da regeneração no músculo esquelético lesionado (SHIREMAN *et al.*, 2007).

O fato da maioria dos marcadores inflamatórios no músculo lesionado não terem apresentado redução dos níveis para valores equivalentes a de

músculos intactos no décimo dia pós-injúria é consistente com a noção de que a resolução das respostas inflamatórias são processos intrínsecos para o reparo/regeneração muscular, indicando que o material implantado foi adequado para a avaliação dos principais eventos associados com injúria muscular crônica.

Para a avaliação da fibrogênese, foram avaliados alguns parâmetros, tais como o colágeno e a citocina TGF- $\beta$ 1. O remodelamento do tecido do estroma fibrovascular é regulado por complexas interações de proteínas pró- e anti-fibrogênicas dentro do tecido inflamatório. O TGF- $\beta$ 1 é uma citocina pró-fibrótica chave que induz a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos que, por sua vez, sintetizam colágeno (LEASK & ABRAHAM, 2004; BONNIAUD *et al.*, 2005).

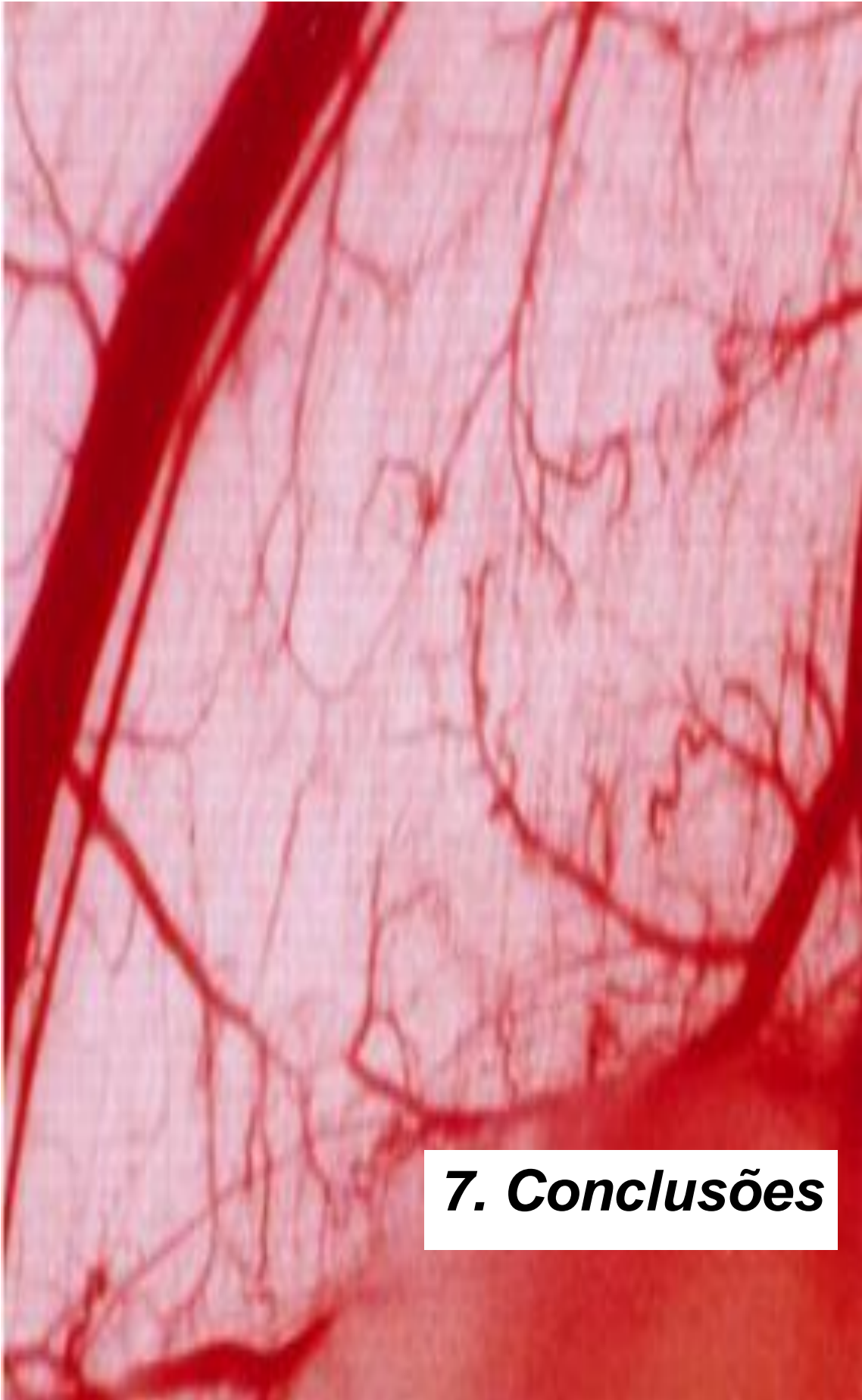
O perfil da produção de TGF- $\beta$ 1 no músculo abdominal paralelamente aos achados por Yan *et al.* (2003) em que a expressão de um transcrito induzido por TGF- $\beta$ 1 foi inicialmente reduzida, apresentou, em seguida, um aumento à partir do quinto ao décimo dia em músculos lesionados com uma injeção de cardiotoxina. Corroborando com os achados do presente estudo, em que inicialmente se observa uma queda nos níveis de TGF-  $\beta$ 1 intramuscular, seguido de um aumento progressivo desta citocina até o décimo dia pós-implante.

O grau de deposição de colágeno após a lesão determina o resultado do reparo/regeneração de tecidos lesionados (JORGENSEN, 2003). Curiosamente, no ensaio de colágeno total, como determinado pelo ensaio

colorimétrico pelo *Picrossirius* mostrou uma quantidade aumentada de colágeno no músculo abdominal logo após a lesão (dia 2) em comparação a músculos intactos. Níveis aumentados de colágeno permaneceram por todo o período experimental. É possível que o pool de enzimas produzidas pelos vários tipos celulares na interface implante/músculo tenha sido capaz de solubilizar o colágeno pré-existente no músculo, tornando-o disponível para uma detecção precoce. Entretanto, o colágeno neoformado é claramente presente na interface implante/músculo a partir do quarto dia em diante como observado nos ensaios histológicos.

Paralelamente aos achados para níveis de colágeno determinados pelo ensaio colorimétrico com o *Picrossirius*, foi realizada análise histológica de secções de músculos implantados e não implantados corados com *Picrossirius Red*. Esta análise evidenciou que a deposição de colágeno aumenta progressivamente ao decorrer do período experimental, evidenciando a existência de um processo fibrogênico nos tecidos lesionados em relação à tecidos controles.

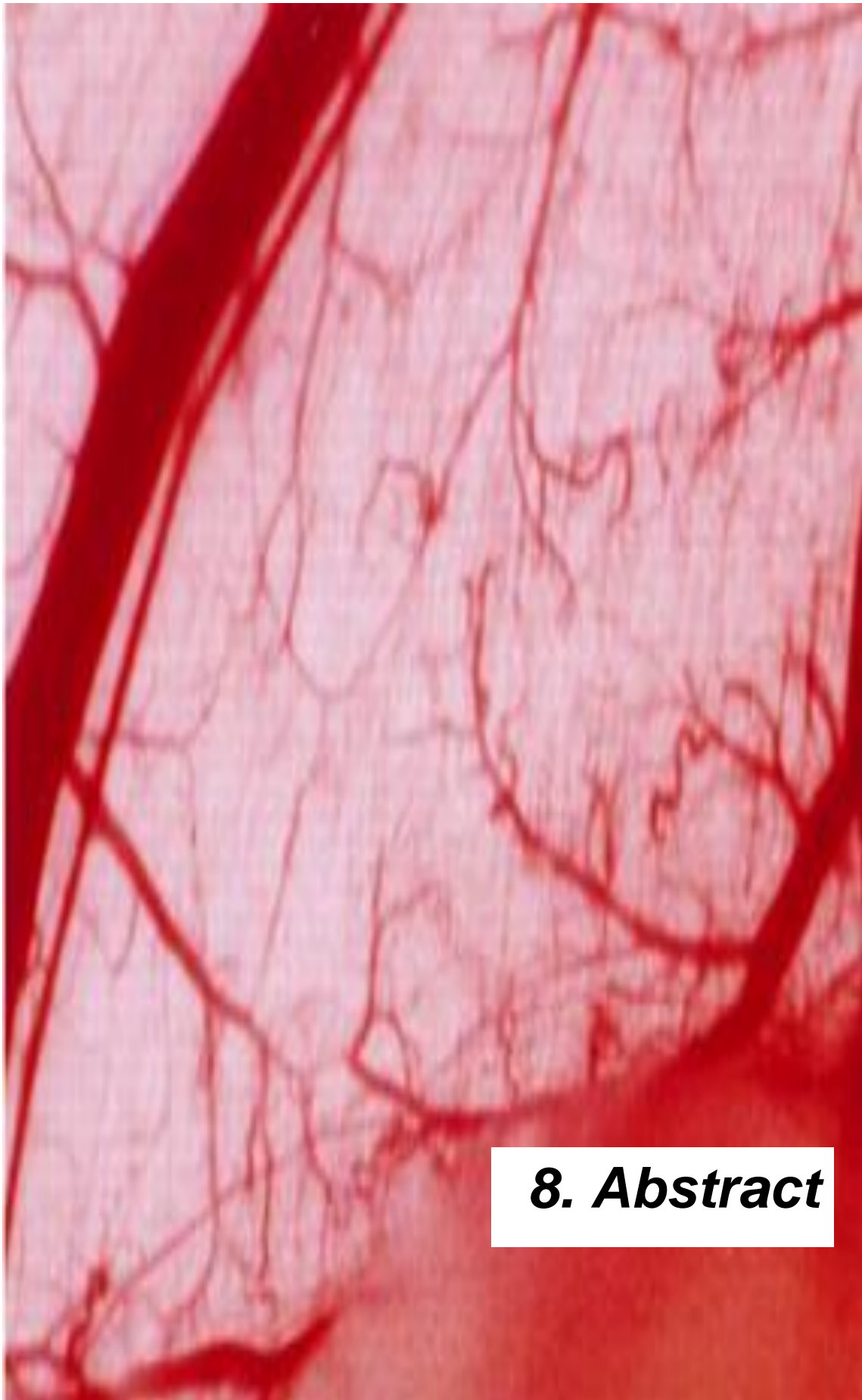
Os resultados obtidos que avaliaram a dinâmica temporal das respostas angiogênica, inflamatória e fibrogênica revelaram que esta abordagem experimental pode ser útil como um modelo para a avaliação de novos biomateriais, bem como para investigar os efeitos de potenciais compostos moduladores sobre os principais componentes do reparo/regeneração muscular.



## **7. Conclusões**

## **7. CONCLUSÕES**

- Os resultados deste estudo mostram pela primeira vez uma combinação de metodologias para avaliar a angiogênese inflamatória no músculo esquelético induzida por uma matriz sintética.
- O implante de matriz sintética foi capaz de induzir um processo inflamatório na musculatura abdominal, evidenciado por um predomínio de neutrófilos em uma fase aguda e acúmulo de macrófagos em uma fase mais tardia do processo.
- O implante de esponja induziu um processo de fibrose no músculo abdominal, evidenciado pelo aumento da deposição de colágeno nos tecidos avaliados.
- O curso temporal do processo das respostas angiogênica, inflamatória e fibrogênica associadas a implantes sintéticos se sobrepõem ao longo do período experimental estudado. No entanto, ainda é possível identificar fases do processo de cicatrização/reparo da musculatura lesionada.
- A abordagem experimental deste estudo apresenta potencial valor na investigação de compostos modulares dos componentes de reparo e regeneração da musculatura esquelética.
- O trabalho em suma demonstra que o implante de esponja, mimetizando um implante sintético, induz não só uma reação granulomatosa do tipo corpo estranho, como também uma reação inflamatória no músculo esquelético adjacente.



**8. Abstract**

---

## **8. ABSTRACT**

Injury of skeletal abdominal muscle wall is a common medical condition and implantation of synthetic or biological material is a procedure to repair musculofascial defects. We proposed to characterize the dynamics of inflammatory cell recruitment, newly formed blood vessels, cytokine production and fibrogenesis in the abdominal skeletal muscle in response to polyether-polyurethane sponge implants in mice. At 2, 4, 7 and 10 days after implantation the muscle tissue underneath the sponge matrix was removed for the assessment of the angiogenic response (hemoglobin content, vascular endothelial growth factor and morphometric analysis of the number of vessels) and inflammation (myeloperoxidase and *N*-acetyl- $\beta$ -*D*-glucosaminidase activities, cytokines). In addition, muscle fibrogenesis was determined by the levels of TGF- $\beta$ 1 and collagen deposition. Hemoglobin content, wash out rate of sodium fluorescein (indicative of blood flow) and the number of vessels increased in the abdominal muscle bearing the synthetic matrix in comparison with the intact muscle. Neutrophil recruitment peaked in the muscle at day 2, followed by macrophage accumulation at day 4 post-injury. The levels of the cytokines, VEGF, TNF- $\alpha$ , CCL-2/JE were higher in the injured muscle compared with the intact muscle and peaked soon after muscle injury (days 2 to 4). Collagen levels were higher in sponge-bearing muscle compared with the non-bearing tissue soon after injury (day 2). The implantation technique together with the inflammatory and vascular parameters used in this study revealed



inflammatory, angiogenic and fibrogenic events and mechanisms associated with skeletal muscle responses to synthetic implanted materials.

Key words: implant/muscle interface, cytokines, collagen, blood flow



**9. *Referências Bibliográficas***

## **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALBINI, A.; TOSETTI, F.; BENELLI, R.; *et al.* Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Research*, v.65, n.23: 10637-41, 2005.

ANDERSEN, P.; HENRIKSSON, J. Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise. *The Journal of Physiology*, v.270: 677-690, 1977.

ANDERSON, J.M. Biological responses to materials. *Annual Review of Material Research*, v.31: 81-110, 2001.

ANDRADE, S.P.; FAN, T.P.D.; LEWIS, G.P. Quantitative in vivo studies on angiogenesis in rats sponge model. *British Journal of Experimental Pathology*, v.68: 755-766, 1987.

ANDRADE, S.P.; MACHADO, R.D.P.; TEIXEIRA, A.S.; *et al.* Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. *Microvascular Research*, v.54: 253-261, 1997.

ANDRADE, S.P.; FERREIRA, M.A.N.D. The sponge model of angiogenesis. *Angiogenesis Protocols*, Nottingham, p. 295-304, 2009.

APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; COLVILLE-NASH, *et al.* Temporal and spatial immunolocalization of cytokines in murine chronic granulomatous tissue. *Laboratory Investigations*, v.69, n.4: 405-414, 1993.

ARAUJO, F.A.; ROCHA, A.A.; FERREIRA, M.A.N.D.; *et al.* Implant-induced intraperitoneal inflammatory angiogenesis is attenuated by fluvastatin. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v.38, n.4: 262-268, 2011.

ARBÓS, M.A.; FERRANDO, J.M.; VIDAL, J.; *et al.* Early effects of exogenous arginine after the implantation of prosthetic material into the rat abdominal wall. *Life Sciences*, v.67: 2493-2512, 2000.

ARROYO, A.G.; IRUELA-ARISPEM, A. Extracellular matrix, inflammation and the angiogenic response. *Cardiovascular Research*, v.86, n.2: 226-235, 2010.

ASSI, K.; PATTERSON, S.; DEDHAR, S.; *et al.* Role of epithelial integrin-linked kinase in promoting intestinal inflammation: effects on CCL2, fibronectina and the T cell repertorie. *BMC Immunology*, v.1: 12-42, 2011.

AUSPRUNK, D.H. & FOLKMAN, J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvascular Research*. v.14: 53-65, 1977.

BAILEY, T.S.; ZISSER, H.C.; GARG, S.K. Reduction in hemoglobin A1C with real-time continuous glucose monitoring: results from a 12-week observational study. *Diabetes Technology & Therapeutics*, v.9, n.3: 203-10, 2007.

BALDWIN, K.M.; HADDAD, F. Skeletal muscle plasticity, cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *American Journal Physical Medicine & Rehabilitation*, v.81, S40-S51, 2002.

BANNO, T.; GAZEL, A.; BLUMENBERG, M. Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *The Journal of Biological Chemistry*, v.279, n.31: 32633-32642, 2004.

BARCELOS, L.S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A.S.; *et al.* Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL-2 in model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflammation Research*, v.53, n.10: 576-584, 2004.

BARCELOS, L.S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A.S.; *et al.* Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *The Journal of Leukocyte Biology*, v.78, n.2: 352-358, 2005.

BELCASTRO, A.N.; ARTHUR, G.D.; ALBISSER, T.A.; *et al.* Heart, liver and skeletal muscle myeloperoxidase activity during exercise. *Journal of Applied Physiology*, v.80: 1331-1335, 1996.

BELO, A.V.; BARCELOS, L.S.; FERREIRA, M.A.N.D.; *et al.* Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice. *Life Sciences*, v.74, n.23: 2827-2837, 2004.

BELO, A.V.; LELES, F.; BARCELOS, L.S.; *et al.* Murine chemokine CXCL2/KC is a surrogate marker for angiogenic activity in the inflammatory granulation tissue. *Microcirculation*, v.12: 597-606, 2005.

BENEST, A.V.; BATES, D.O. Measurement of angiogenic phenotype by use of two-dimensional mesenteric angiogenesis assay. *Methods in Molecular Biology*, v.467: 251-270, 2009.

BERNARDINI, G.; RIBATTI, D.; SPINETTI, G.; *et al.* Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *Journal of Immunology*, v. 273: 83-101, 2003.

BEST, T.M.; FIEBIG, R.; CORR, D.T. *et al.* Free radical activity, antioxidant enzyme, and glutathione changes with muscle stretch injury in rabbits. *Journal of Applied. Physiology*, v.87: 74-84, 1999.

BISCHOFF, J. Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. *Trends in Cell Biology*, v.5: 60-74, 1995.

BONNIAUD, P.; MARGETTS, P.J.; ASK, K.; *et al.* TGF- $\beta$  and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *Journal of Immunology*, v.175, n.8: 5390-5395, 2005.

BRADSHAW, A.D.; REED, M.J.; CARBON, J.G.; *et al.* Increased fibrovascular invasion of subcutaneous polyvinyl alcohol sponges in SPARC-null mice. *Wound Repair and Regeneration*, v.9: 522-30, 2001.

BROWN, M.D.; HUDLICKÁ, O. Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases. *Angiogenesis*, v.6: 1-14, 2003.

BUCKINGHAM, B.; CASWELL, K.; WILSON, D.M. Real-time continuous glucose monitoring. *Current Opinion Endocrinology Diabetes and Obesity*, v.14, n.4: 288-95, 2007.

BURKE, P. A.; DENARDO, S.J. Antiangiogenic agents and their promising potential in combined therapy. *Critical Reviews Oncology/ Hematology*, v.39, n.1-2: 155-71, 2001.

BURNS, N.K.; JAFFARI, M.V.; RIOS, C.N.; *et al.* Non-cross-linked porcine acellular dermal matrices for abdominal reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v.125, n.1: 167-76, 2010.

BURY, T.B.; PIRNAY, F. Effect of prolonged exercise on neutrophil myeloperoxidase secretion. *International Journal of Sports Medicine*, v.16, n.6: 410-412, 1995.

CALLAHAN, T.D.; NATALE, A. Catheter ablation of atrial fibrillation. *The Medical Clinics North America*, v.92, n.1: 179-201, 2008.

CAMPOS, P.P.; ANDRADE, S.P.; MORO, L.; *et al.* Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. *Histology Histopathology*, v.21: 1263-70, 2006.

CAMPOS, P.P.; BAAKHLE, Y.S.; ANDRADE, S.P. Mechanisms of wound healing responses in lupus-prone New Zealand White mouse strain. *Wound Repair and Regeneration*, v.16, n.3: 416-424, 2008.

CHARGÉ, S.P.B.; RUDNICKI, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological Reviews*, v.84: 209-238, 2004.



COLLINS, R.A.; GROUNDS, M.D. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in skeletal muscle regeneration. Studies in TNF-alpha ( $\bar{t}$ ) and TNF-alpha ( $\bar{t}$ )/LT- alpha ( $\bar{t}$ ) mice. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v.49, n.8: 989-1001, 2001.

CUMMING, B.D.; MCELWAIN, D.L.S.; UPTON, Z. A mathematical model of wound healing and subsequent scarring. *Journal of the Royal Society Interface*, v.7: 19-34, 2010.

DAROUICHE, R.O. Treatment of infections associated with surgical implants. *The New England Journal of Medicine*, v.350: 1422-1429, 2004.

DEBORD, J.R. The historical development of prosthetics in hernia surgery. *Surgical Clinics of North America*, v. 78: 973-1006, 1998.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, v.9: 283–289, 2004.

DRABKIN, D.L.; AUSTIN, J.H. Spectrophotometric constants common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 98: 719–733, 1932.

ECKERMANN, J.M.; CHEN, W.; JADHAV, V.; *et al.* Hydrogen is neuroprotective against surgically induced brain injury. *Medical Gas Research*, v.1, n.1: 1-7, 2011.

EGGINTON, S.; ZHOU, A.L.; BROWN, M.D.; *et al.* Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle. *Cardiovascular Research*, v.49: 634-646, 2001.

FERREIRA, M.A.N.D.; BARCELOS, L.S.; CAMPOS, P.P.; *et al.* Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFK-KO). *British Journal of Pharmacology*, v.141, n.7: 1185-1192, 2004.

FLINTROP, M.; MODI, M.R.; RITTER, A.B. *et al.* Respiratory muscle length and strength in patients with chronic abdominal distension. *Respiration*, v.64, n.1: 66-72, 1997.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*, v.1, n.1: 27-31, 1995.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v.27, n.288: 373-376, 1980.

GALLET, P.; PHULPIN, B.; MERLIN, J.L.; *et al.* Long-term alterations of cytokines and growth factors expression in irradiated tissue and relation with histological severity scoring. *PLoS ONE*, v.6, n.12: 1-10, 2011.

GERIS, L.; SCHUGART, R.; OOSTERWICK, H.V. In silico design of treatment strategies in wound healing and bone fracture healing. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, v.368: 2683-2706, 2010.

GOBIN, A.S.; BUTLER, C.E.; MATHUR, A.B. Repair and regeneration of the abdominal wall musculofascial defect using silk fibroin-chitosan blend. *Tissue Engineering*, v.12: 3383-94, 2006.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological samples. *Analytical Biochemistry*, v.126: 131-138, 1982.

GRIFFOEN, A. & MOLEMA, G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacological Reviews*, v.52, n.2: 237-268, 2000.

GRIZZI, F.; *et al.* Quantitative evaluation and modeling of two-dimensional neovascular network complexity: the surfac fractal dimension. *BMC Cancer*, 5:14, 2005.

GUSTAFSSON, T. Vascular remodeling in human skeletal muscle. *Biochemical Society Transactions*, v.39: 1628-1632, 2001.

HIBBS, J.B.Jr.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z.; *et al.* Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.157, n.1: 87-94, 1988.

HIRCHI, K.K.; DÁMORE, P.A. Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. *EXS*, v.79: 419-429, 1997.

HOLLISTER. S.J. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*, v.4, n.7, p.518-24. Review. *Erratum in: Nature Materials*. v.5, n.7: 590, 2005.

HU, D.E.; HILEY, C.R.; SMITHER, R.L.; *et al.* Correlation of <sup>133</sup>Xe clearance, blood flow and histology in the rat sponge model for angiogenesis. *Laboratory Investigation*, v.72, n.3: 601-610, 1995.

HUDLICKÁ, O. & TYLER, K.R. Angiogenesis – the growth of vascular system. *Academic press inc (London) LTD*. P.1-15 e 115-149, 1986.

HUDLICKÁ, O.; BROWN, M.; EGGINTON, S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiological Reviews*, v.72: 369-417, 1992.

INGBER, D. In search of cellular control: signal transduction in context. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.30, n.31: 232-237, 1998.

JACKSON, J.R.; SPEED, M.P.; KIRCHER, C.H.; *et al.* The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *The FASEB Journal*, v.11: 457-465, 1997.

JAIN, R.H. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine*, v.9: 685-693, 2003.

JARVINEN, T.A.; KÄÄRIÄINEN, M.; JÄRVINEN, M.; *et al.* Muscle injuries. *The Current Opinion of Rheumatology*, v.12: 155-161, 2000.

JENSEN, L.; SCHJERLING, P.; HELLSTEN, Y. Regulation of VEGF and bFGF mRNA expression and other proliferative compounds in skeletal muscle cells. *Angiogenesis*, v.7: 255-267, 2004.

JORGENSEN, L.N. Collagen deposition in the subcutaneous tissue during wound healing in humans: a model evaluation. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, v.115: 1-56, 2003.

KÄÄRIÄINEN, M.; JÄRVINEN, T.; JÄRVINEN, M.; *et al.* Relation between myofibers and connective tissue during muscle repair. *Scandinavian Journal of Medicine & Sciences in Sports*, v.10, p.332-337, 2000.

KAUHANEN, S.; SALMI, A.; von BOQUSLOWSKI, K.; *et al.* Satellite cell proliferation, reinnervation and revascularization in human free microvascular muscle flaps. *The Journal of Surgery Research*, v.115, n.2: 191-199, 2003.

KOBAYASHI, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, v.88, n.6: 1157-1162, 2010.

KOVACS, E.J. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunology Today*, v.12, n.1: 17-23, 1991.

KROLL, J.; EPTING, D.; KERN, K.; *et al.* Inhibition of Rho-dependent kinases ROCK I/II activates VEGF-driven retinal neovascularization and sprouting angiogenesis. *The American Journal of Physiology*, v.296: 893-899, 2009.

LASCHKE, M.W.; HÄUFEL, J.M.; THORLACIUS, H.; *et al.* New experimental approach to study host tissue response to surgical mesh materials *in vivo*. *Journal of Biomedical Material Research A*, v.74, n.4: 696-704, 2005.

LASCHKE, M.W.; HÄUFEL, J.M.; SCHEUER, C.; *et al.* Angiogenic and inflammatory host response to surgical meshes of different mesh architecture and polymer composition. *Journal of Biomedical Material Research B*, v.91, n.2: 497-507, 2009.

LEASK, A.; ABRAHAM, D.V. TGF- $\beta$  signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal*, v.18, n.7: 816-827, 2004.

LEHTO, M.; JÄRVINEN, M.; NELIMARKKA, O. Scar formation after skeletal muscle injury. A histological and autoradiographical study in rats. *Archives of Orthopedic and Trauma Surgery*, v.104: 366-370, 1986.

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

LIN, S.J.; BUTLER, C.E. Subtotal thigh flap and bioprosthetic mesh reconstruction for large composite abdominal wall defects. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v.125, n.4: 1146-56, 2010.

MALINDA, K.M. In vivo matrigel migration and angiogenesis assay. *Methods in Molecular Biology*, v.467: 287-294, 2009.

MARQUES, S.M.; CAMPOS, P.P.; CASTRO, P.R. *et al.* Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. *Microvascular Research*, v.82: 246-252, 2011.

MATSUMOTO, T.; OKAZAKI, M.; NAKAHIRA, A.; *et al.* Modification of apatite materials for bone tissue engineering and drug delivery carries. *Current Medicinal Chemistry*, v.14, n.25: 2726-33, 2007.

MCDONALD, B.; PITTMAN, K.; MENEZES, G.B.; *et al.* Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, v.330, n.6024: 362-366, 2010.

MENDES, J.B.; ROCHA, M.A.; ARAÚJO, F.A.; *et al.* Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. *Microvascular Research*, v.78: 265-271, 2007.

MENDES, J.B.; ROCHA, M.A.; ARAÚJO, F.A.; *et al.* Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. *Microvascular Research*, v.78, n.3: 265-271, 2009.

MIGNATTI, P.; RIFKIN, D.B. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme & Protein*, v.49, n.1-3:117-137, 1996.



MITCHELL, R.N.; COTRAN, R.S. Acute and chronic inflammation. *In. Robbins Basic Pathology*, Philadelphia: Saunders, p. 33-60, 2002.

MORAIS, J.M.; PAPADIMITRAKOPOULOS, F.; BURGESS, D.J. Biomaterials/tissue interactions: Possible solutions to overcome foreign body response. *The AAPS Journal*, v.12, n.2: 188-196, 2010.

MORRIS, S.M.Jr.; BILLIAR, T.R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *The American Journal of Physiology*, v.288: 829-839, 1994.

MOSES, M.A. The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells*, v.15: 180-189, 1997.

MOURA S.A.; LIMA, L.D.; ANDRADE, S.P.; *et al.* Local drug delivery system: inhibition of inflammatory angiogenesis in a murine sponge model by dexamethasone-loaded polyurethane implants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.100, n.7: 2886-2895, 2011.

MURPHY, K.E.; HALL, C.L.; MCCUE, S.W.; *et al.* A two - compartment mechanochemical model of the roles of transformins growth factor  $\beta$  and tissue tension in dermal wound healing. *Journal of Theoretical Biology*, v.272: 145-159, 2011.

MUTOH, T.; LAMM, W.J.; EMBREE, L.J. *et al.* Abdominal distension alters regional pleural pressures and chest wall mechanics in pigs in vivo. *Journal of Applied Physiology*, v.70, n.6: 2611-2618, 1991.

NASH, G.F.; WALSH, D.C.; KAKKAR, A.K. The role of the coagulation system in tumor angiogenesis. *The Lancet*, v.2: 608-614, 2001.

NAYAK, B.S.; SANDIFOR, S.; MAXWELL, A. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda cetrifolia* L. Leaf. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, v.6, n.3, p.351-356, 2009.

NGUYEN, H.X.; TIDBALL, J.G. Expression of a muscle-specific, nitric oxide synthase transgene prevents muscle membrane injury and reduces muscle inflammation during modified muscle use in mice. *The Journal of Physiology*. v.550: 347-356, 2003.

NIU, X.F.; SMITH, C.W.; KUBES, P. Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. *Circulation Research*, v.74, n.6: 1133-1140, 1994.

NUNES, P.S.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R.L.C.; CAVALCANTE, D.R.R.; *et al.* Collagen-based films containing liposome- loaded usnic acid as dressing for

dermal burn healing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Epub, jan, 2011.

O'DWYER, P.J.; KINGSNORTH, A.N.; MOLLOY, R.G.; *et al.* Randomized clinical trial assessing impact of a lightweight or heavyweight mesh on chronic pain after inguinal hernia repair. *British Journal of Surgery*, v.92: 166-170, 2005.

OLFERT, I.M.; BREEN, E.C.; MATHIEU-COSTELLO, O.; *et al.* Skeletal muscle capillary and angiogenic mRNA levels after exercise training in normoxia and chronic hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, v.91: 1176-1184, 2001.

PAGE, S.H.; WRIGHT, E.K.Jr.; GAMA, L.; *et al.* Regulation of CCL-2 expression by an upstream TALE homeodomain protein-binding site that synergizes with the site created by the A-25786 SNP. *PLoS ONE*, v.6, n.6: 1-8, 2011.

PALMER, R.M.; REES, D.D.; ASHTON, D.S.; *et al.* L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.153, n.3: 1251-1256, 1988.

PAPPAS, N. An introduction to materials in medicine. *Biomaterials Science*, 60-64, 1996.

PELOSI, L.; GIACINTI, C.; NARDIS, C.; *et al.* Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines. *The FASEB Journal*, v. 21, n.7: 1393-1402, 2007.

PEPPER, M.S. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis and vessel wall integrity. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v.8: 21-43, 1983.

PIERCE, G.F.; MUSTOE, T.A.; ALTROCK, B.W.; *et al.* Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *Journal Cellular Biochemistry*, v.45, n.4: 319-26, 1991.

PUNCHARD, N.A.; WHELAN, C.J.; ADCOCK, J. The journal of inflammation. *Journal of inflammation*, v.1, n.1: 1-4, 2004.

RAMOS, G.C.; FERNANDES, D.; CHARÃO, C.T.; *et al.* Apoptotic mimicry: phosphatidylserine liposomes reduce inflammation through activated receptor (PPAR) *in vivo*. *British Journal of Pharmacology*, v.151, n.6: 844-850, 2007.

RATNER, B.; HOFFMAN, A.; SCHOEN, F.; *et al.* Ed. Biomaterials Science. *An Introduction to Materials in Medicine*. Ed., Academic Press, 1996.

REYNOLDS, L.P.; KILLILEA, D.S.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the female reproductive system. *The FASEB Journal*, v.6: 886-892, 1992.

RICKERT, D.; MOSES, M.A.; KELCH, L.S.; *et al.* The importance of angiogenesis in the interactions between polymeric biomaterials and surrounding tissue. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, v.28: 175-181, 2003.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, v.386: 671-74, 1997.

RISSANEN, T.T.; VAJANTO, I.; HILTUNEN, M.O. *et al.* Expression of vascular endothelial growth and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Fk-1) in ischemic skeletal muscle and its regeneration. *American Journal of Pathology*, v.160, n.4: 1393-1403, 2002.

ROBINSON, T.N.; CLARKE, J.H.; WALSH, M.D. Major mesh related complications following hernia repair: Events reported to the Food and Drug Administration. *Surgical Endoscopy*, v.19: 1556-60, 2005.

RODERO, M.P.; KHOSROTEHRANI, K. Skin wound healing modulation by macrophages. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v.3, n.7: 643-53, 2010.

SALGADO, A.J.; COUTINHO, O.P.; REIS R.L. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*, v.4, n.8: 743-65, 2004.

SANDISON, J.C. A new method for the microscopic study of living growing tissues by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anatomical Record*, v.28: 281-287, 1924.

SCKELL, A.; KLENKE, F.M. The cranial bone window model: studying angiogenesis of primary and secondary bone tumors by intravital microscopy. *Methods in Molecular Biology*, v.467, 343-355, 2009.

SCKELL, A.; LEUNING, M. The dorsal skinfold chamber: studying angiogenesis by intravital microscopy. *Methods in molecular biology*, v.467: 305-317, 2009.

SCOTT, N.W.; McCORMACK, K.; GRAHAM, P.; *et al.* Open mesh versus non-mesh for repair of femoral and inguinal hernia. *Cochrane Databases Systematic Review*. 4: CD002197, 2002.

SHIREMAN, P.K.; CONTRERAS-SHANNON, V.; OCHOA, O.; *et al.* MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. *Journal of Leukocyte Biology*, v,81, n.3: 775-785, 2007.

SHNYDER. S.D. Use of the hollow fibre assay for studies of tumor neovasculature. *Methods in Molecular Biology*, v. 467: 331-342, 2009.

SHWEIKI, D.; ITIN, A.; SOFFER, D. *et al.* Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, v.29, n.359: 843-845, 1992.

SIEMINSKI, A.L.; GOOCH, K.L. Biomaterial-microvasculature interactions. *Biomaterials*, v.21, n.22: 2232-41, 2000.

SOUZA, C.E.; MAITRA, D.; SAED, G.M.; *et al.* Hypochlorous acid-induced heme degradation from lactoperoxidase as a novel mechanism of free iron release and tissue injury in inflammatory diseases. *PLoS ONE*, v.6, n.11: 1-12, 2011.

STATON, C.A.; STRIBBLING, S.M.; TAZZYMAN, S.; *et al.* Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *International Journal Experimental Pathology*, v.85: 233-248, 2004.

STOCUM, D.L. Bridging the gap: restoration of structure and function in humans. In : Ferretti P, Geraudie J, editors. *Cellular and molecular basis of regeneration*, Chichester: Wiley. p. 411-50, 1998.

TEIXEIRA, A.S.; ARAÚJO, F.A.; FERREIRA, M.A.N.D.; *et al.* Angiogenesis and inflammation in skeletal muscle in response to ascites tumor in mice. *Life Sciences*, v.78: 1637-1645, 2006.

THURASINGAM, T.; XU, Y.Z.; EADIE, K.; *et al.* MAPKAPK- 2 signaling is critical for cutaneous wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, v.130: 278-286, 2010.

TIDBALL, J.G. Inflammatory process in muscle injury and repair. *American Journal of Physiology Regulation Integrative and Comparative Physiology*, v.288: 345-353, 2005.

TIIDUS, P.M. Radical species in inflammation and overtraining. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v.76: 533-538, 1998.

TOUMI, H.; BEST, T.M. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *British Journal of Sports Medicine*, v.37: 284-286, 2003.

TOZER, G.M.; PRISE, V.E.; CUNNINGHAM, V.J. Quantitative estimation of tissue blood flow rate. *Methods in Molecular Biology*, v.467: 271-286, 2009.

TSIROGIANNI, A.; MOUTSOPOULOS, N.M.; MOUTSOPOULOS, M. Wound healing: immunological aspects. *International Journal of the Care of the Injured*, v.37: 5-12, 2006.

VAN AMERONGEN, M.J.; MOLEMA, G.; PLANTINGA, J.; *et al.* Neovascularization and vascular markers in a foreign body reaction to



subcutaneously implanted degradable biomaterial in mice. *Angiogenesis*, v. 5: 173-180, 2002.

WAGNER, P.D. The critical role of VEGF in skeletal muscle angiogenesis and blood flow. *Biochemical Society Transactions*, v.39: 1556-9, 2011.

WARREN, G.L.; HULDERMAN, T.; JENSEN, N.; *et al.* Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *The FASEB Journal*, v.16, n.12: 1630-1632, 2002.

WHITE, F.C.; BLOOR, C.M.; McKIRNAN, M.D.; *et al.* Exercise training in swine promotes growth of arteriolar bed and capillary angiogenesis in heart. *Journal of Applied Physiology*, v.85: 1160-1168, 1998.

WILLIAMS, D.F. Tissue-biomaterial interactions. *Journal of Materials Science*, v. 22: 3421-45, 1987.

WRIGHT, H.L.; MOOTS, R.T.; BUCKNALL, R.C.; *et al.* Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*, v.49: 1618-31, 2010.

XAVIER, D.O.; AMARAL, L.S.; GOMES, M.A.; *et al.* Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.64, n.3: 220-225, 2010.

YAN, Z.; CHOI, S.; LIU, X.; *et al.* Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration. *The Journal of Biological Chemistry*, v.278, n.10: 8826-8836, 2003.

YOSHIDA, S.; ONO, M.; SHONO, T.; *et al.* Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, v.17, n.7: 4015-4023, 1997.

ZHANG, K.; JIANMING, L.; MORI, T.; *et al.* Baicalin increases VEGF expression and angiogenesis by activation the ERR $\alpha$ /PGC-1 $\alpha$  pathway. *Cardiovascr Research*, v.89, p.426-435, 2011.

ZICHE, M.; MORBIDELLI, L. The corneal pocket assay. *Angiogenesis Protocols*. Nittingham, 2009. Cap. 20: 319-329, 2009.

ZIEREN, J.; ZIEREN, H.U.; JACOBI, C.A.; *et al* Prospective randomized study comparing laparoscopic and open tension-free inguinal hernia repair with Shouldice's operation. *American Journal Surgery*, v.175: 330-33, 1988.

ZIMMERLI, W.; SENDI, P. Pathogenesis of implant-associated infection: the role of the host. *Seminars in Immunopathology*. v.33: 295-306, 2011.

