

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**  
**UNIFAL-MG**

**PABLO GOMES FERREIRA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MEMBRANA DE LÁTEX DE *Hevea brasiliensis* NO**  
**REPARO DE DEFEITO DA PAREDE ABDOMINAL DE RATO**

**ALFENAS-MG**

**2007**

**PABLO GOMES FERREIRA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MEMBRANA DE LÁTEX DE *Hevea brasiliensis* NO  
REPARO DE DEFEITO DA PAREDE ABDOMINAL DE RATO**

**Dissertação apresentada ao  
Programa de Mestrado em Ciências  
Farmacêuticas da UNIFAL-MG, como  
parte dos requisitos para obtenção do  
título de mestre.**

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

**ALFENAS-MG**

**2007**

## UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL/MG

## PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

A comissão examinadora, abaixo-assinada, aprova a dissertação "AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MEMBRANA DE LÁTEX DE *Hevea brasiliensis* NO REPARO DE DEFEITO DA PAREDE ABDOMINAL DE RATO", elaborada por Pablo Gomes Ferreira, como requisito parcial para conclusão do Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Banca examinadora:

---

—  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa - Orientadora UNIFAL/MG

---

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

---

—  
Prof. Dr. João Evangelista Fiorine - UNIFENAS

Alfenas, 15 de fevereiro de 2007.

Aos meus pais com quem aprendi que é preciso ter sonhos, acreditar neles e ter coragem suficiente para realizá-los, bem como todo amor e carinho sempre oferecidos a mim.

À minha irmã por todo o apoio e amor sempre presentes na minha caminhada.

Aos meus familiares e amigos pelo constante incentivo.

À Profa. Dra. Cibele pela orientação e amizade que significam muito para mim, além dos ensinamentos que só um grande mestre é capaz de dar e ao qual levarei sempre iluminando minha jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa, pela orientação, dedicação, paciência e respeito na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Renato Miranda de Melo, pelo auxílio na aplicação e execução dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Uchôa Junqueira pelo apoio e paciência de nos receber em sua residência dando sempre valiosas diretrizes.

E a todos que contribuíram na elaboração deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 JUSTIFICATIVA.....	11
3 OBJETIVO.....	12
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
4.1 Membrana de látex natural.....	13
4.2 Hérnia incisional.....	8
4.3 Reparo da hérnia incisional.....	10
4.3 Cicatrização tecidual.....	12
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
5.1 Modelo experimental.....	17
5.2 Procedimento cirúrgico para produção do defeito na parede abdominal.....	17
5.3 Análise morfológica.....	18
5.4 Extração de proteínas e eletroforese.....	19
5.5 Western blotting .....	19
5.6 Análise estatística.....	20
6 RESULTADOS.....	21
6.1 Desenvolvimento da Hérnia Incisional.....	21
6.2 Análise morfológica.....	22
6.2.1 Análise macroscópica.....	22
6.2.2 Análise hiotológica.....	22
6.3 Western blotting .....	26
7 DISCUSSÃO.....	28
8 CONCLUSÃO.....	33
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34



## RESUMO

A hérnia incisional (HI) é uma das complicações tardias das laparotomias, podendo acometer até 20% dos pacientes operados. A utilização de próteses representou um avanço sem precedentes no reparo da HI. Contudo, não há ainda tratamento ideal para o reparo e prevenção desse mal. A membrana de látex da seringueira demonstrou atividade cicatrizante e angiogênica em estudos *in vitro* e *in vivo*. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da membrana de látex sobre o reparo da parede abdominal lesada de ratos. Foram utilizados ratos machos Wistar com peso de  $340 \pm 20$  g, nos quais foi induzido um defeito na parede abdominal de 1 x 2 cm, tendo a linha alba ao centro. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: Controle (sem reparo) e Látex (reparo com a membrana) e submetidos à eutanásia aos 3, 5, 7 e 28 dias após a indução do defeito. Os fragmentos da parede abdominal foram retirados, divididos em duas partes e utilizados para análise histológica e bioquímica. A análise histológica revelou que o látex induziu a proliferação de vasos sanguíneos, o aumento de fibras musculares novas e a regeneração tecidual. Observou-se ainda o aumento da densidade de fibroblastos e deposição de colágeno, o que é importante para determinar o aumento da resistência a forças tensoras no tecido cicatricial, evitando a deiscência da ferida e a instalação da HI. Houve aumento gradual de deposição e organização das fibras colágenas durante o período de estudo. O látex induziu ainda a expressão dos fatores de crescimento celular, FGF-2 e TGF $\beta$ ; a diminuição da expressão de IGF e PDGF e não alterou a expressão de TGF $\alpha$ . A regeneração tecidual requer a influência de fatores de crescimento celular e uma seqüência de eventos celulares, que resultam na regulação celular, com proliferação, sobrevivência e diferenciação. Assim, a modulação de fatores de crescimento pela membrana de látex, parece ter contribuído positivamente para a regeneração do defeito da parede abdominal. Conclui-se que a membrana de látex da seringueira, quando usada para reconstrução da parede abdominal de ratos, permite a regeneração tecidual, a formação de tecido conjuntivo fibroso de reparação, podendo ser utilizada efetivamente na hernioplastia.

**Palavras chave:** Biomembrana de látex; Cicatrização; Extrato vegetal; Hérnia incisional; Regeneração tecidual.

## ABSTRACT

The incisional hernia (IH) formation is one complication after abdominal surgery, affecting up to 20% of the reoperated patients. The use of prosthesis increased the repair of IH, however there is not yet an ideal treatment to repair or prevent the IH. The latex membrane from rubber tree has demonstrated to be cicatrizing and angiogenic, both in *in vitro* and *in vivo* studies. The aim of this work was to evaluate the effect of the latex membrane on the repair of the injured abdominal wall of rats. Male Wistar rats with  $340 \pm 20$  g were used and it was induced an abdominal wall defect with 1 x 2 cm and the alba line at the centre. The animals were divided into two experimental groups: Control (without repair) and Latex (with membrane repair) and were euthanized at 3, 5, 7 e 28 days after the defect induction. The abdominal wall fragments were removed, divided into two parts and used for histological and biochemical analysis. The histological analysis revealed that the latex membrane induced blood vessels proliferation, new muscle fiber formation and tissue regeneration. It was also observed a fibroblast density and collagen deposition increasing that is important to increase the resistance to tension forces and prevent the incision dehiscence and IH formation. There was also a gradual increasing on the deposition and organization of collagen fibers during the experiment. The latex membrane induced the expression of cellular growth factors, FGF-2 and TGF $\beta$ ; decreased the expression of IGF and PDGF and did not alter the TGF $\alpha$  expression. Tissue regeneration requires the influence of growth factors in a sequence of cellular events that results on the cell regulation, proliferation, surviving and differentiation. The modulation of growth factor by the latex membrane may have contributed positively to the abdominal wall defect regeneration. It can be concluded that the latex membrane from rubber tree, when used to reconstruct the rat abdominal wall, allows tissue regeneration, fiber connective tissue formation and may be used effectively in hernioplasty.

**Keywords:** Latex biomembrane; Cicatrization; Vegetal extract; Incisional hernia; Tissue regeneration.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato  
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético  
FGF: Fator de crescimento de fibroblasto  
HI: Hérnia incisional  
IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina  
kDa: quilodalton  
NBT: Nitroblue tetrazólio  
PBS: Tampão fosfato salina  
PDGF: Fator de crescimento derivado de plaqueta  
PVDF: Fluoreto de polivinilideno  
TGF $\alpha$ : Fator de crescimento transformante alfa  
TGF $\beta$ : Fator de crescimento transformante beta  
Tris: Tri-hidróxi-metil-amino metano

## 1 INTRODUÇÃO

A membrana de látex extraído da seringueira foi desenvolvida no Laboratório de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em 1994 e desde então tem sido estudada como substituto de vasos, esôfago, pericárdio e no reparo de úlceras cutâneas. Esta membrana se mostrou biocompatível e angiogênica, estimulando a regeneração tecidual. Contudo, ainda não está bem estabelecido se a membrana de látex é eficiente no reparo da parede abdominal.

As lesões da parede abdominal podem levar à hérnia incisional (HI), que é uma das complicações tardias das laparotomias, podendo acometer até 20% dos pacientes operados. Em geral, é detectada no decorrer do primeiro ano após a cirurgia, mesmo depois da aparente consolidação da ferida abdominal. Ela ocorre pelo afastamento progressivo das bordas músculo-aponeuróticas, mantendo-se íntegros a pele, as fâscias musculares e o peritônio parietal que, juntos, compõem o saco herniário. Para dentro deste, migra o conteúdo abdominal, durante os esforços físicos ou quando o paciente assume a posição ortostática, provocando o abaulamento da cicatriz. Além de desconfortável e antiestética, a HI predispõe a outras patologias. Após o reparo de uma HI, quando se faz apenas a aproximação das bordas do anel herniário, com suturas, de 25 a 50% dos pacientes podem apresentar recidiva. Nos casos mais complexos, são necessárias re-operações programadas, associadas ao uso de antimicrobianos e de fisioterapia respiratória adjuvante, hospitalizações prolongadas, muitas vezes sob cuidados intensivos.

O reparo da HI com a utilização de próteses, sob a forma de malhas ou telas, reduz a taxa de recidiva, mas traz também complicações, muitas delas graves e de difícil tratamento. Isso tem motivado a investigação de materiais menos reativos, especialmente de origem biológica, para serem utilizados no tratamento da HI.

## 2 JUSTIFICATIVA

A membrana de látex da seringueira possui efeito angiogênico e demonstrou estimular a regeneração tecidual, entretanto, o seu efeito sobre a regeneração da parede abdominal ainda não está bem esclarecido. O defeito da parede abdominal leva ao desenvolvimento da hérnia incisional (HI). A HI acomete muitas pessoas submetidas à cirurgia abdominal e, até o momento, o tratamento para esse mal é apenas cirúrgico. Contudo, o reparo definitivo da HI ainda não está estabelecido, mesmo com o uso de próteses, a taxa de complicações com os métodos atuais de reparo permanece expressiva, afastando os pacientes de suas atividades habituais. Desta forma, há a necessidade de estudos sobre métodos e técnicas que possam contribuir para o tratamento e a prevenção da HI.

Tendo em vista que a membrana de látex natural apresenta atividade estimuladora da regeneração tecidual, os resultados do presente trabalho poderão contribuir para determinar se esta membrana pode ser utilizada como tratamento auxiliar no reparo da HI, bem como servir para embasar protocolos mais eficientes para o tratamento clínico. É importante destacar que o látex é de origem vegetal, constituindo-se de matéria-prima nacional e de baixo custo, sem risco de transmissão de patógenos e com grande potencial de aplicabilidade clínico-social.

### 3 OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da membrana de látex sobre o reparo da parede abdominal lesada de ratos.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- 2.1 Induzir um defeito padronizado na parede abdominal de rato;
- 2.2 Avaliar a cicatrização da parede abdominal lesada após tratamento com a membrana de látex;
- 2.3 Verificar se a membrana de látex induz a angiogênese;
- 2.4 Determinar se a membrana de látex modula a expressão de fatores de crescimento celular FGF, TGF $\beta$ , IGF, PDGF e TGF $\alpha$ .

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Membrana de látex natural

A seringueira pertence ao gênero *Hevea* (Euphorbiaceae), com 11 espécies, das quais *Hevea brasiliensis* (Willd. ex. ADR. de Juss) Müell. Arg. é a mais produtiva e plantada comercialmente, com superior qualidade de látex.

O gênero *Hevea* é originário da região amazônica (latitudes 7°N a 15°S), sendo que a área de plantios comerciais de *H. brasiliensis* compreende de 24°N (China) até 25°S (São Paulo, Brasil). É uma árvore de hábito ereto, podendo atingir 30 m de altura total sob condições favoráveis, iniciando aos 4 anos a produção de sementes e aos 6-7 anos (quando propagada por enxertia) a produção de látex (borracha). Esta pode se prolongar por 30-35 anos, com aproveitamento de madeira para processamento mecânico e energia (galhos), ao final deste período. A seringueira desenvolve-se bem em solos de textura leve, profundos e bem drenados, ligeiramente ácidos (pH 4,5-5,5), em altitudes até 600 m.

A borracha natural é uma matéria prima estratégica, formando com o aço e o petróleo um dos alicerces industriais da humanidade. Cerca de 80% da produção mundial é proveniente de pequenas propriedades rurais do sudeste asiático (Tailândia, Indonésia e Malásia) e, aproximadamente, 70% da produção total vai para a indústria de pneumáticos. O Brasil, de primeiro e único exportador de borracha natural no início do século XX, hoje importa 63% do seu consumo interno, produzindo 1,36% do total mundial, ocupando a 9ª posição entre os produtores mundiais.

A expansão da área de florestas plantadas de seringueira no Brasil, a partir do seu habitat amazônico, procurou ocupar as chamadas áreas de escape, ou seja, áreas sem problemas com doenças foliares, em especial o mal-das-folhas, causado pelo fungo *Microcyclus ulei* (P. Hern v. Arx). No País, na área tradicional, atualmente a heveicultura estende-se pela Amazônia Tropical Úmida, Mato Grosso e Bahia. Em regiões não tradicionais, a seringueira é cultivada nos Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Maranhão, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, Minas Gerais e São Paulo (IAPAR, 2006).

Plantios pioneiros de seringueira em Minas Gerais vieram demonstrar que a heveicultura, considerada restrita às áreas úmidas da Amazônia, poderia se estender para regiões com regime hídrico caracterizado por um período seco definido e com elevado déficit hídrico. A partir da década de 80, o cultivo de *H. brasiliensis* entrou em franca expansão no Estado de Minas Gerais, em regiões que por possuírem condições edafoclimáticas

desfavoráveis ao ataque do mal-das-folhas foram consideradas áreas de escape. O zoneamento ecológico para a cultura da seringueira no Estado de Minas Gerais apresenta uma grande área climaticamente favorável ao desenvolvimento da cultura. No entanto, a heveicultura efetivamente se expandiu no Triângulo Mineiro, Zona da Mata, Rio Doce e Alto São Francisco (ORTOLONI, 1985; RUFINO, 1986).

A borracha natural é uma matéria-prima agrícola importante, utilizada em indústrias como a pneumática, a de autopeças e de produtos bélicos. É utilizada também em artefatos leves como luvas cirúrgicas, preservativos, chupetas, solados e couro vegetal e, recentemente, como biomaterial para aplicação médica (THOMAZINI et al., 1997; FRADE et al., 2001; IAPAR, 2006). Desde 1994, o látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* vem sendo pesquisado no Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Uma biomembrana tem sido produzida pela polimerização do poliisopreno endógeno, presente na emulsão aquosa láctea da seringueira, por evaporação a baixa temperatura, preservando a conformação terciária das proteínas presentes no látex. Os cuidados especiais tomados na polimerização fazem com que a biomembrana adquira uma microarquitetura particular, com uma superfície natural, que permite a aderência celular e estimula vários tipos celulares, especialmente, os polimorfonucleares. Esta biomembrana pode ser produzida na forma laminar ou em vários formatos preparados a partir de moldes especiais na confecção de próteses (THOMAZINI et al., 1997; MRUÉ, 2000, NEVES-JÚNIOR et al., 2006).

Tem sido demonstrado que a membrana de látex é um indutor de cicatrização de parede esofágica de cão, lesada experimentalmente, além de produzir um acentuado aumento na vascularização (neoangiogênese); epitelização (epitélio pseudoestratificado); neoformação granular submucosa e de fibras musculares (Mrué, 1996). A biocompatibilidade da membrana de látex foi demonstrada através de implantes *in vivo* em cães (LCHAT et al., 1997; MRUÉ et al., 2004).

A membrana de látex também se mostrou adequada para a substituição parcial do pericárdio de cães, em observação de até 345 dias, propiciando a regeneração do pericárdio nativo, após ressecção de um retalho elíptico (SADER et al., 2000). Em estudo piloto que envolveu a aplicação da biomembrana em úlcera venosa crônica foram observados sinais evidentes de estímulo à granulação que puderam ser visualizados no paciente, clínica e histopatologicamente, a partir do 15º dia de tratamento com a biomembrana. Com estes resultados, ficou evidente o efeito estimulador do látex no reparo tecidual, sobretudo por sua ação indutora da angiogênese (FRADE et al., 2001).



Este biomaterial usado como implante transitório em miringoplastias, melhorou o processo de revascularização da membrana timpânica remanescente, com fechamento da mesma em pacientes de 7 a 76 anos (OLIVEIRA et al., 2003) e, ainda, favoreceu a cicatrização conjuntival e a neoangiogênese em coelhos (PINHO et al., 2004). A utilização da membrana de látex com polilisina a 0,1% na herniorrafia perineal unilateral em um cão da raça Poodle, de 10 anos de idade, deixou uma base tecidual que permitiu a correção do processo e o biomaterial foi removido aos cinco meses de observação (PAULO et al., 2005).

Apesar de bem demonstrado o efeito cicatrizante da membrana de látex em vários tecidos, o seu efeito sobre a correção de defeito da parede abdominal é ainda controverso. Paulo et al. (2005) estudaram o efeito da membrana de látex com e sem polilisina a 0,1% na reconstrução de defeitos iatrogênicos da parede abdominal de ratos. Os autores verificaram que, apesar da formação de tecido conjuntivo fibroso de reparação, similarmente ao observado quando se utiliza a tela de marlex, houve extrusão da membrana de látex e deiscência das feridas de todos os animais.

Os componentes do látex responsáveis por seu efeito cicatrizante e angiogênico não estão ainda determinados. Mendonça (2004) demonstrou que uma proteína presente no látex da seringueira é a provável biomolécula responsável pela atividade indutora da regeneração tecidual. O extrato obtido a partir do látex (soro) da seringueira foi tratado com  $\text{NH}_4\text{OH}$  (2 a 7%), submetido a uma primeira etapa de purificação em coluna de DEAE-celulose e eluição com tampão bicarbonato de amônio/ cloreto de sódio. Desta cromatografia foram obtidas três frações que foram dialisadas e liofilizadas. O efeito destas frações sobre a permeabilidade vascular foi realizado pelo teste de Miles, sendo a fração I a mais ativa. As frações I e II apresentaram maior atividade indutora de angiogênese. Após aquecimento e tratamento com proteases, a amostra perdeu a atividade angiogênica e sobre a permeabilidade vascular. Assim, o estudo demonstrou que a fração I foi angiogênica, induziu o aumento da permeabilidade vascular e foi quimicamente identificada como sendo protéica.

#### **4.2 Hérnia incisional**

A parede abdominal é essencialmente músculo-aponeurótica, revestida, de ambos os lados, por fâscias, tecido adiposo e epitelial, numa configuração homóloga (espelhada). É responsável pela manutenção da postura, além da contenção e dinâmica viscerais, envolvendo, sobretudo, os aparelhos: digestivo, geniturinário e respiratório. Por conter tantos órgãos e não dispor de um arcabouço ósseo protetor, um grande número de doenças e traumatismos pode acometer a parede abdominal, do que decorrem inúmeras intervenções

cirúrgicas neste segmento corpóreo. Muitas são as complicações decorrentes de uma laparotomia, entre elas as aderências, que podem levar à obstrução intestinal e à hérnia incisional ou eventração (LÁZARO-DA-SILVA e PIMENTA, 2004).

A laparotomia mediana é a que mais freqüentemente se associa à HI, consistindo mesmo em fator de risco para o desenvolvimento dessa complicação tardia (GRANTCHAROV e ROSENBERG, 2001; O'DWYER e COURTNEY, 2003). Com a incisão da linha alba, ocorre a desinserção das aponeuroses dos músculos laterais do abdome (oblíquo externo, oblíquo interno e transversos), que ali decussam. Como resultado, as fibras desses músculos podem sofrer encurtamento, hipotrofia e degeneração gordurosa, sendo que as aponeuroses também podem se retrair, provocando o afastamento dos músculos reto do abdome (FLAMENT et al., 1995; FLAMENT et al., 1998). Essas alterações podem ser detectadas já no primeiro mês pós-operatório (POLLOCK e EVANS, 1989). Isso favorece a protrusão visceral através do anel herniário, assim formado, mediante qualquer esforço físico ou ao ortostatismo. O equilíbrio de forças entre essa tração lateral e a resistência contraposta pela cicatriz na linha alba irá determinar o tamanho do anel herniário e, conseqüentemente, da HI (FLAMENT et al., 1998; KORENKOV et al., 2001).

Independente da via de acesso mediana figuram, também, como fatores de risco para o desenvolvimento da HI, a obesidade (GOLDSTEIN, 2002), as alterações metabólicas do tecido conjuntivo (BOEMI et al., 1999), a infecção do sítio cirúrgico (CASSAR e MUNRO, 2002; MILLIKAN, 2003) e o tabagismo (CANNON e READ, 1981). A pressão intra-abdominal, normalmente baixa, contribui muito pouco para a formação da HI (FLAMENT et al., 1998). A deiscência total ou completa da ferida abdominal, normalmente seguida de evisceração, também predispõe tais pacientes ao desenvolvimento da HI, mesmo quando a resutura é realizada empregando-se os pontos totais (GISLASON e VISTE, 1999).

As repercussões fisiopatológicas das grandes hérnias vão além de um mero defeito parietal. O diafragma não mais encontra a resistência das vísceras, que se alojam no saco herniário (perda de domicílio). Com essa diminuição da pressão intra-abdominal, ele diminui suas incursões até hipotrofiar-se, o que, aliado ao enfraquecimento irreversível da parede abdominal (perda do efeito-prensa), reflete negativamente na mecânica ventilatória, com movimentos paradoxais (RIVES et al., 1973). Essa queda pressórica também se faz sentir nas vísceras ocas, nas grandes veias do abdome (porta e cava inferior) e na coluna lombar, propiciando à constipação, a dificuldade de micção, a diminuição do retorno venoso ao coração e as lombalgias. As aderências víscero-parietais ao saco herniário colaboram para a irreduzibilidade do conteúdo herniado, além de favorecerem a obstrução intestinal. A

trombose dos vasos da pele causa as distrofias e mesmo as úlceras cutâneas, que ficam localizadas no ápice da eventração. A consequência dessas alterações equivale à incapacidade profissional, em graus variados, elevando ainda mais o custo social dessa doença (FLAMENT et al., 1998).

Estudos de biologia molecular têm evidenciado a existência de alterações no tecido conjuntivo de pacientes acometidos por HI primária e, sobretudo, recidivada. Isto se deve à menor quantidade de colágeno do tipo I (ColI), em relação ao do tipo III (ColIII), no tecido conjuntivo desses pacientes. Essa desproporção pode decorrer da destruição aumentada do primeiro, a partir da ativação de metaloproteinases da matriz, ou por aumento anômalo da expressão gênica do ColIII (ZHENG et al., 2002). A diminuição da síntese local de fatores de crescimento celular, as alterações nas moléculas de adesão entre os fibroblastos e as fibras colágenas e de outras moléculas da matriz também já foram demonstradas (BOEMI et al., 1999; ROSCH et al., 2003). Isso tem reflexos na resistência do conjuntivo como um todo, especialmente o das aponeuroses, diminuindo a resistência à tração e, conseqüentemente, o poder de sustentação ou de contenção da parede abdominal.

#### **4.3 Reparo da hérnia incisional**

Até o momento, não há técnica, material de sutura nem prótese ideais para a prevenção e reparo da HI (MILLIKAN, 2003). O tratamento da HI de grandes proporções é complexo, uma vez que uma gama de fatores está envolvida em sua etiopatogenia e fisiopatologia.

A tentativa de se tratar as HI medianas pela simples aproximação dos músculos retos do abdome e, conseqüentemente do anel herniário, no plano mediano, resulta em tensão excessiva na linha de sutura, o que faz a recidiva atingir níveis inaceitavelmente altos, de até 50% (FLAMENT et al., 1998; LUIJENDIJK et al., 2000; CASSAR e MUNRO, 2002; O'DWYER e COURTNEY, 2003).

A laparorrafia em bloco, mediante sutura contínua a pelo menos 1 cm das bordas, com pontos espaçados a 1 cm, tem se mostrado eficaz na redução das taxas tanto de deiscência quanto de HI (MELO, 1996; RUCINSKI et al., 2001; VAN'T RIET et al., 2002; MILLIKAN, 2003).

A dificuldade de correção da HI motivou a busca por tecidos substitutivos, com a resistência das aponeuroses, para o seu tratamento. Foram utilizadas a dura-máter humana (LEX e RAIÁ, 1971), o pericárdio bovino, as fâscias toraco-abdominal e lata (DISA et al.,

1996; DISA et al., 2001) e mesmo a pele (KAMA et al., 1999; KORENKOV et al., 2001). Contudo, não houve sucesso na utilização clínica desses tecidos.

Com a introdução do polipropileno e de outros materiais sintéticos (AMID, 1999), sob a forma de malhas ou telas, passíveis de esterilização e com biocompatibilidade satisfatória, as taxas de recidiva dessas hérnias foram reduzidas para níveis até então nunca alcançados. Apesar do impacto que causaram nos índices de cura da doença, também são relatadas muitas complicações decorrentes do uso dessas próteses, sobretudo com as de polipropileno, as mais utilizadas. O uso de próteses pode causar efeitos indesejáveis como obstruções e as fístulas digestivas, a dor crônica e o enrijecimento da parede abdominal, que restringe os movimentos do tronco (LÁZARO-DA-SILVA, 1992; KLOSTERHALFEN et al., 1998; KLINGE et al., 1998; AYDOS et al., 1999; KLINGE et al., 1999; SCHUMPELICK, 2001). Além disso, o grau de fibrose é diretamente proporcional à intensidade da reação inflamatória, induzida pela prótese. O mecanismo pelo qual as próteses estimulam a reação inflamatória e a formação de seromas é ainda pouco conhecido. Contudo, os materiais aloplásticos podem modular a síntese de citocinas e fatores de crescimento celular, bem como estimular respostas individuais aos biomateriais, que levam à deficiência de regeneração tecidual e exacerbação da reação inflamatória (SCHACHTRUPP et al., 2003; DI VITA et al., 2005a, 2005b, 2006).

O tratamento ideal seria um método que combinasse as vantagens do reparo com tecido local e com telas, determinando baixas incidências de complicações locais e de recidiva (KORENKOV et al., 2005).

A modulação dos níveis de fatores de crescimento na ferida é um importante mecanismo, pelo qual o reparo tecidual é regulado (ROBSON et al., 2004). A administração de fatores de crescimento celular, tais como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento do fibroblasto (FGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e fator de crescimento transformante (TGF) pode estimular a angiogênese, a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno, aumentando a estabilidade tecidual (HUNT et al., 1984; MUSTOE et al., 1987; VOGT et al., 2000).

Em um estudo experimental em ratos, Franz et al. (2001) observaram redução significativa da HI após aplicação tópica de TGF $\beta_2$ . Tem sido demonstrado que este fator de crescimento é essencial para a reparação tecidual, especialmente, da fáscia (MUSTOE et al., 1987; WANG et al., 1999; KUHN et al., 2001). Dubay et al. (2004) verificaram que o tratamento da incisão abdominal com FGF preveniu a formação da HI. Neste estudo, os autores inseriram um bastão de polímero de poligalactona impregnado com FGF-2, promovendo a liberação contínua deste fator de crescimento. Robson et al., (2004) obtiveram

a diminuição da formação da HI, impregnando a incisão fascial com  $TGF\beta_2$ , FGF e interleucina- $1\beta$ . A solução aquosa de PDGF e IGF não apresentou efeito sobre a formação da HI.

Assim, a busca de materiais naturais (biológicos), não apenas como substituto ou reforço da parede abdominal, mas para direcionar o crescimento celular se torna crescente na tentativa de se evitar as conseqüências deletérias do uso de próteses sintéticas.

#### **4.4 Cicatrização tecidual**

Com o rompimento da integridade tecidual logo se inicia o processo de reparo, que compreende uma seqüência de eventos moleculares que objetivam restaurar o tecido lesado. Esse processo tem sido dividido em três fases que se sobrepõem de forma contínua e temporal: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelagem (CLARK, 1996).

Após a ocorrência do ferimento, inicia-se a fase inflamatória, com o extravasamento sanguíneo que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas. A coagulação sanguínea e agregação plaquetária geram um tampão, rico em fibrina, que além de restabelecer a hemostasia e formar uma barreira contra a invasão de microorganismos, organiza uma matriz provisória necessária para a migração celular (WERNER e GROSE, 2003). As plaquetas, essenciais à formação deste tampão hemostático, também secretam múltiplos mediadores, incluindo fatores de crescimento liberados na área injuriada. Além disso, as plaquetas também ativam a cascata da coagulação, onde a trombina induz a desgranulação plaquetária liberando fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante- $\beta$  ( $TGF-\beta$ ), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento transformante- $\alpha$  ( $TGF-\alpha$ ), além de glicoproteínas adesivas como a fibronectina e trombospondina, que são importantes constituintes da matriz extracelular provisória (ARNOLD e WEST, 1991). Nesta fase ocorre o aporte de células inflamatórias, neutrófilos e macrófagos, no local da injúria. Além das funções de fagocitose de bactérias, fragmentos celulares e corpos estranhos, as células inflamatórias produzem fatores de crescimento que preparam a ferida para a fase proliferativa, quando fibroblastos e células endoteliais serão recrutados (CLARK, 1996).

A fase de proliferação inicia-se por estimulação mitogênica e quimiotática do  $TGF-\alpha$  e EGF. Tão importante quanto a epitelização, nesta fase do processo de reparo, é a formação do chamado tecido de granulação, nome dado principalmente, pela característica granular devida à presença de capilares neoformados (FRADE, 2003). A angiogênese é um processo dinâmico, finamente regulado por sinais presentes, tanto no soro, quanto na matriz

extracelular local (RISAU, 1997) e ocorre na matriz do leito da ferida com a migração e estimulação mitogênica das células endoteliais (ARNOLD e WEST, 1991). Este constitui, portanto, um complexo processo, que envolve mediadores solúveis, interações célula-célula e célula-matriz extracelular, bem como forças biomecânicas (PAPETTI e HERMAN, 2002). As diversas etapas podem ser assim descritas: aumento da permeabilidade vascular e deposição de fibrina extravascular; desarranjo da parede vascular, com remoção dos pericitos; degradação da membrana basal e da matriz extracelular; migração da célula endotelial através da matriz extracelular remodelada; proliferação da célula endotelial; formação de estruturas tubulares; inibição da proliferação e migração da célula endotelial; reconstituição da membrana basal; maturação dos complexos juncionais; construção da parede vascular, através do recrutamento e diferenciação de células murais, pericitos e células de músculo liso e estabelecimento de fluxo sanguíneo no novo vaso (RISAU, 1997; PEPPER, 2001; PAPETTI e HERMAN, 2002; AUERBACH et al., 2003).

A indução da angiogênese deve-se à ativação local de genes que codificam fatores solúveis difusíveis ou à liberação de fatores de crescimento, que subsequentemente atuam sobre a população de células microvasculares do local, bem como ao decréscimo local de fatores angiostáticos. As moléculas angiogênicas incluem: FGF-1, FGF-2, VEGF, TGF- $\beta$ , angiogenina, angiotropina, angiopoetina-1 e trombospondina (FOLKMAN e D'AMORE, 1996; DOR et al., 2002). Alguns fatores tais como: a baixa tensão de oxigênio (DETMAR et al., 1997), a ativação da COX2 (SALCEDO et al., 2000), níveis elevados de ácido lático e aminas bioativas (REMENSNYDER e MAJNO, 1968) também podem estimular a angiogênese. Muitas das moléculas mencionadas acima são proteínas e parecem induzir a angiogênese de forma indireta, estimulando a produção de FGF-2 e VEGF por macrófagos e células endoteliais.

O VEGF, principal fator angiogênico, exerce sua atividade biológica predominantemente através de receptores transmembrânicos com atividade tirosina quinase presente nas células endoteliais, e participa como um mediador chave da angiogênese. A família de proteínas VEGF, atualmente inclui VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e o fator de crescimento placentário (PLGF) (WERNER e GROSE, 2003). O VEGF-A é uma glicoproteína homodimérica, cujas subunidades se mantêm unidas por duas pontes dissulfeto, é sintetizada a partir de “splicing” alternativo, sob a forma de sete isoformas que contêm de 121 a 206 aminoácidos (FERRARA, 2001; BATES e HARPER, 2003; LI et al., 2003). Dentre estas, destacam-se os VEGF121, VEGF165, VEGF189 e VEGF206 como isoformas predominantes (TISCHER et al., 1991; JINGJING et al., 1999). Estas diferentes

isoformas apresentam atividades biológicas similares, mas diferem em suas propriedades de ligação à heparina e à matriz extracelular (PARK et al., 1993). As isoformas menores (121 a 165 aminoácidos) são secretadas na forma solúvel, enquanto as maiores possuem domínios transmembrânicos, ficando inicialmente associadas às células, de onde são liberadas e ativadas por proteólise.

A família dos FGF compreende 22 membros de estrutura homóloga, apresentando-se como pequenos polipeptídios com um núcleo central contendo 140 aminoácidos. A maioria dos membros dessa família possui um amplo espectro mitogênico. Eles estimulam a proliferação de várias células de origem mesodérmica, ectodérmica e também, endodérmica. Além dos efeitos mitogênicos, os FGF regulam a migração e diferenciação de suas células-alvo, apresentando também função citoprotetora, o que aumenta a sobrevivência das células sobre condições adversas (WERNER, 1998; ORNITZ e ITOH, 2001; WERNER e GROSE, 2003). Estes compostos apresentam cerca de 18 kDa, de cadeia simples e não-glicosilados. Eles transmitem seus sinais através de 4 receptores de FGF de alta afinidade, proteínas quinases transmembrânicas (FGFR-1 ao FGFR-4), os quais se ligam aos FGF com diferentes afinidades. Uma das características do FGF-1 e FGF-2 é que eles interagem fortemente com moléculas semelhantes a proteoglicanas, como o sulfato de heparana, presentes na matriz extracelular (FOLKMAN et al., 1988), o que estabiliza os FGF, protegendo-os frente a desnaturação térmica e proteolítica, além de limitar sua difusibilidade. Desta forma, estas moléculas atuam como um reservatório para fatores pró-angiogênicos. Porém, nem o uso de peptídeo sinal clássico para a secreção, nem o mecanismo de liberação destes fatores de crescimento foram completamente esclarecidos (WERNER e GROSE, 2003).

O FGF-1 (FGF ácido) e o FGF-2 (FGF básico) estão preferencialmente implicados no processo da angiogênese (FOLKMAN e SHING, 1992; ORNITZ e ITOH, 2001). Esses fatores são sintetizados por vários tipos celulares envolvidos na angiogênese e cicatrização, incluindo células inflamatórias (BAIRD et al., 1985), células endoteliais (SCHWEIGERER et al., 1987) e fibroblastos da derme (KANDEL et al., 1991). Eles agem sobre as células endoteliais de forma parácrina, liberados a partir da matriz extracelular, ou de forma autócrina, quando liberados pelas próprias células endoteliais (SCHWEIGERER et al., 1987). Durante a formação do tecido de granulação, o FGF-2 promove a migração celular através de receptores de superfície para integrinas, os quais medeiam a ligação das células endoteliais à matriz extracelular (SEPP et al., 1994).

O TGF- $\beta$  é um importante mediador da cicatrização devido aos seus efeitos multipotentes. Apresenta-se como o principal modulador da angiogênese durante a

cicatrização, por regular a proliferação celular, migração, formação do tubo capilar e deposição da matriz extracelular. Três isoformas do TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3) são expressas em mamíferos, possuindo uma seqüência de aminoácidos com alta homologia. São sintetizadas como precursores, usualmente sendo secretados como uma proteína complexa ligada ao TGF- $\beta$ . Este é liberado da proteína, extracelularmente, via clivagem proteolítica (ROBERTS, 1998). Todas as isoformas ligam-se aos mesmos receptores de TGF:  $\beta$  I (TGF- $\beta$ RI),  $\beta$  II (TGF- $\beta$ RII) e  $\beta$  III (TGF- $\beta$ RIII). Os receptores TGF- $\beta$ RI e TGF- $\beta$ RII, apresentam atividade de serinas-treoninas quinases, enquanto o último, TGF- $\beta$ RIII, parece ser um receptor não-sinalizante (ROBERTS, 1998). As isoformas do TGF- $\beta$  possuem sua expressão regulada de forma distinta em diferentes tipos celulares, e em vários estágios do desenvolvimento celular, o que parece sugerir funções biológicas distintas (KINGSLEY, 1994). O TGF- $\beta$ 3, mas não o TGF- $\beta$ 1, protege as células da apoptose induzida (LI et al., 1999). *In vitro*, estes fatores de crescimento apresentam-se como estimuladores da mitose de fibroblastos, mas por outro lado, inibem a proliferação de muitas outras células, incluindo queratinócitos. Além disso, os TGF- $\beta$ s são potentes estimuladores da expressão de proteínas da matriz extracelular e de integrinas (MASSAGUÉ, 1990).

Imediatamente após a ocorrência da lesão, grandes quantidades de TGF- $\beta$ 1 são liberadas pelas plaquetas (ASSOLIAN et al., 1983) a fim de agirem como quimiotáticos para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos. Estes tipos celulares também servem para aumentar o nível de TGF- $\beta$ 1 dentro da ferida. O TGF- $\beta$  é secretado na forma ativa e latente, que é sequestrado na matriz, de onde é liberado no decorrer do processo de reparação tecidual pela ação de enzimas proteolíticas (ROBERTS e SPORN, 1996). Outra função importante dos TGF- $\beta$  é a estimulação da re-epitelização e formação do tecido de granulação. Apesar deste fator de crescimento inibir a proliferação dos queratinócitos, eles induzem a expressão de integrinas necessárias à migração destas células que cruzam a matriz provisória da lesão, rica em fibronectina (GAILIT et al., 1994; ZAMBRUNO et al., 1995).

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I e IGF-II) são potentes estimuladores da mitose e sobrevivência de vários tipos celulares, exercendo sua função de forma autócrina, parácrina ou mesmo endócrina. Suas ações são mediadas pelo receptor tipo I de IGF, que apresenta atividade tirosina quinase de forma semelhante ao receptor de insulina. Diversos estudos têm demonstrado um efeito benéfico da utilização de IGF exógeno durante a cicatrização, particularmente, quando combinado a outros fatores de crescimento (WERNER e GROSE, 2003).



## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Modelo experimental

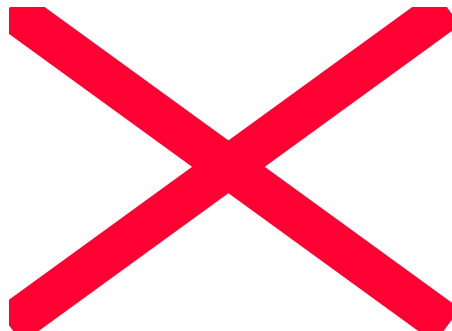
Neste trabalho foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos pesando  $300 \pm 20$  g, obtidos do Biotério da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), os quais foram mantidos em caixas de polietileno individuais, com livre acesso a água filtrada e ração comercial. Foi induzido um defeito na parede abdominal dos ratos, que não foram tratados (controle) ou foram tratados com uma membrana de látex comercial (Biocure®). Como os animais foram analisados após 3, 5, 7 e 28 dias, obtiveram-se 8 grupos experimentais, com 5 animais por grupo: C3, controle analisado após 3 dias; C5, controle analisado após 5 dias; C7, controle analisado após 7 dias; C28, controle analisado após 28 dias; L3, látex analisado após 3 dias; L5, látex analisado após 5 dias; L7, látex analisado após 7 dias e L28, látex analisado após 28 dias. Foram realizadas análises morfológica e bioquímica (expressão de FGF, TGF $\beta$ , IGF, PDGF e TGF $\alpha$ ) após 3, 5 e 7 dias e apenas morfológica após 28 dias.

Este trabalho teve a aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa Animal da UNIFAL-MG (Processo n. 76/2006).

### 5.2 Procedimento cirúrgico para produção do defeito na parede abdominal

Os animais tiveram seu peso aferido e foram anestesiados com solução de xilazina e cetamina, na proporção de 1:1 e na dose de 0,2 mL/100g de peso corpóreo, administrada por via intra-peritoneal (MELO et al., 2005). A seguir, a face ventral do abdome foi depilada e a anti-sepsia realizada com solução de álcool a 70% (v/v).

Em todos os animais foi realizada uma incisão transversa da pele supra-púbica de 2,0 cm, com bisturi. A pele e o tecido subcutâneo foram separados do plano muscular por dissecção com tesoura. Então, um fragmento de látex comercial, envolvendo o estrato muscular, foi introduzido. Nos animais do grupo controle, a pele foi fechada por uma membrana de látex comercial. A membrana foi fixada com fio de sutura monofilamentar de polipropileno.



Os animais foram examinados diariamente, sendo suspensos pela cauda para inspeção da ferida cirúrgica e constatação macroscópica da hérnia incisional ou de outras complicações da ferida.

### 5.3 Análise morfológica

Aos 3, 5, 7 e 28 dias após a indução do defeito na parede abdominal, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento da anestesia. A seguir foi feita a verificação macroscópica para a presença de aderências na área do defeito. Os achados macroscópicos foram anotados em protocolo próprio, de acordo com os critérios de quantificação de aderências proposta por Moreno et al. (1996) com modificações (Tabela 1). Avaliou-se também a área ocupada pelas aderências.

**Tabela 1.** Critérios para a quantificação (grau) de aderências à parede abdominal de rato, após a indução de defeito.

<b>Critério</b>		<b>Pontos*</b>
Sem aderências		1
Sítios de aderência	epíplon	1
	intestino	2
	Epíplon, intestino e pele	3
Vascularização	não	0
	sim	1
Tipo	Frouxa, de caráter fibrinoso, facilmente desfeita	1
	Firme, resistente à manipulação	2

\* 1, grau mínimo e 6, grau máximo de aderências.

A região do defeito da parede abdominal foi, então, recortada e seccionada ao meio. Os fragmentos craniais foram utilizados para extração de proteínas. Os fragmentos caudais foram utilizados para análise histológica, para determinar a extensão da regeneração e reparo. Os fragmentos foram fixados, durante 24 h, em solução de paraformaldeído a 4 % (p/v), preparada em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, contendo NaCl 0,85 % (p/v). Em seguida, os fragmentos foram desidratados, incluídos em parafina e foram obtidos cortes transversais, com 3 µm de espessura, que foram corados com Pricossírius e hematoxilina (JUNQUEIRA et al. 1979). O número de vasos sangüíneos, de fibras musculares novas e área ocupada por tecido conjuntivo foi determinado por morfometria, utilizando-se área teste de 0,0625 mm<sup>2</sup> e sistema de análise de imagem constituído por microscópio óptico acoplado a uma microcâmera digital e monitor. Foram analisados 15 campos aleatórios para cada grupo

experimental. O número de células/0,0625 mm<sup>2</sup> foi expresso como densidade celular e a área ocupada pelo tecido conjuntivo/0,0625 mm<sup>2</sup> foi expressa como densidade de conjuntivo (MELO et al., 2005).

#### **5.4 Extração de proteínas e eletroforese**

A borda (2 mm) dos fragmentos craniais da parede abdominal foi recortada, pesada e homogeneizada em homogeneizador de tecidos em 3 volumes de tampão Tris-HCl 30 mM, pH 7,5, contendo sacarose 250 mM, KCl 30 mM, EDTA 5 mM, ditioneitol (DTT) 10 mM, fenil-metilfluoridosulfóxido (PMSF) 50 µg/mL, benzamidina 100 µM e antipaína 50 µM, de acordo com o método descrito por Paula et al. (2005). A seguir o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 min e o sobrenadante contendo as proteínas foi coletado. As proteínas foram precipitadas durante 12 h com acetona gelada a -18°C. A seguir as amostras foram centrifugadas e o precipitado dissolvido em tampão de amostra de eletroforese, Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, ditioneitol 100 mM, dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1,25% (p/v), glicerol a 15% (v/v) e azul de bromofenol a 0,006% (p/v). Antes da aplicação no gel de eletroforese as proteínas foram dosadas pelo método de Peterson (1977). As amostras contendo 10 µg de proteína foram fervidas por 1 min e separadas em gel de poliacrilamida-SDS contendo 12% de acrilamida (v/v), de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). O padrão de peso molecular utilizado nas eletroforeses foi composto por miosina (205 kDa), β-galactosidase (116 kDa), fosforilase-B (97 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). A corrida eletroforética foi executada por 1h a 30 mA e em seguida o gel foi corado com azul de Coomassie R250, por 30 min, em agitador mecânico. O gel foi descorado com solução de ácido acético:metanol:água (5:2,5:42,5).

#### **5.5 Western blotting**

A expressão de FGF2, TGFβ, IGF, PDGF E TGFα foi determinada por Western blotting, como descrito por Towbin et al. (1979). Após a corrida eletroforética as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF, após o que foram fixadas e bloqueadas em tampão fosfato salina (PBS) 0,01 M pH 7,1, contendo 2% (p/v) de leite em pó, durante 1 h. A seguir a membrana foi lavada em Tween 20 a 0,05% (v/v) em PBS (PBST) e incubada com o primeiro anticorpo diluído em PBST contendo 2% (p/v) de leite em pó, durante 1 h. Após esse procedimento foram feitas as seguintes lavagens: três vezes em PBST durante 5 min, duas

vezes com solução de sais contendo NaCl 1M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e Tween 20 0,05% durante 5 min. A membrana foi incubada com o segundo anticorpo conjugado com fosfatase alcalina e feitas três lavagens com PBST durante 5 min, duas lavagem com sais durante 5 min e três lavagens com PBS durante 5 min. A revelação das bandas foi realizada após incubação com tampão veronal 0,15M, pH 9,6, contendo 1,25 mg BCIP, NBT 5mg/mL em dimetilformamida e MgCl<sub>2</sub> 4mM.

### **5.6 Análise estatística**

Os achados macroscópicos de aderências foram submetidos ao Teste Exato de Fisher, tendo como nível mínimo de significância 0,05. Os dados obtidos para os demais experimentos realizados foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, quando  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Desenvolvimento da HI

Em todos os animais dos grupos C7 e C28 a HI se desenvolveu, com anel e saco herniários bem configurados. Os animais dos grupos L7 e L28 não desenvolveram a HI (Figura 1). Nos grupos controle 3 e 5 foi observado o início da formação da HI, com o saco herniário ainda pouco desenvolvido, o que não ocorreu nos grupos L3 e L5.

**A**

**B**



**Figura 1.** Região ventral de ratos aos 28 dias após a indução de defeito da parede abdominal. **A**, controle; **B**, látex. A seta evidencia o abaulamento do abdome, provocado pelo defeito da parede abdominal, característico da hérnia incisional. Notar em B que não houve formação da hérnia incisional.

### 6.2 Análise morfológica

### 6.2.1 Análise macroscópica

A verificação macroscópica para a presença de aderências na área do defeito mostrou que houve diferenças de características e área ocupada pelas aderências entre os grupos controle e látex (Tabela 2). O grupo controle apresentou principalmente aderências firmes, consistindo de epíplon e intestino, os quais se apresentaram também aderidos à pele. Houve predomínio de vascularização nas aderências dos grupos controle em torno e principalmente no centro do local do defeito. Na maioria dos animais dos grupos látex, a membrana de látex apresentou-se recoberta pelo epíplon, que estava frouxamente aderido e sem vascularização. Nos grupos látex observou-se que o epíplon aderiu-se às bordas da lesão.

**Tabela 2.** Comparação das características e área de aderências macroscópicas entre os grupos controle e látex após 3, 5, 7 e 28 da indução do defeito da parede abdominal de ratos.

Característica das aderências	Grupos							
	C3*	L3	C5	L5	C7	L7	C28	L28
Grau	4,00±0,00 <sup>a</sup>	2,00±0,00 <sup>b</sup>	5,20±0,02 <sup>c</sup>	2,80±0,02 <sup>b</sup>	6,00±0,00 <sup>c</sup>	2,60±0,24 <sup>b</sup>	6,00±0,00 <sup>c</sup>	1,00±0,66 <sup>d</sup>
Área (%)	100,0±0,0 <sup>a</sup>	100,0±0,0 <sup>a</sup>	100,0±0,0 <sup>a</sup>	100,0±0,0 <sup>a</sup>	100,0±0,0 <sup>a</sup>	55,0±5,0 <sup>b</sup>	55,0±5,0 <sup>b</sup>	10,0±6,1 <sup>c</sup>

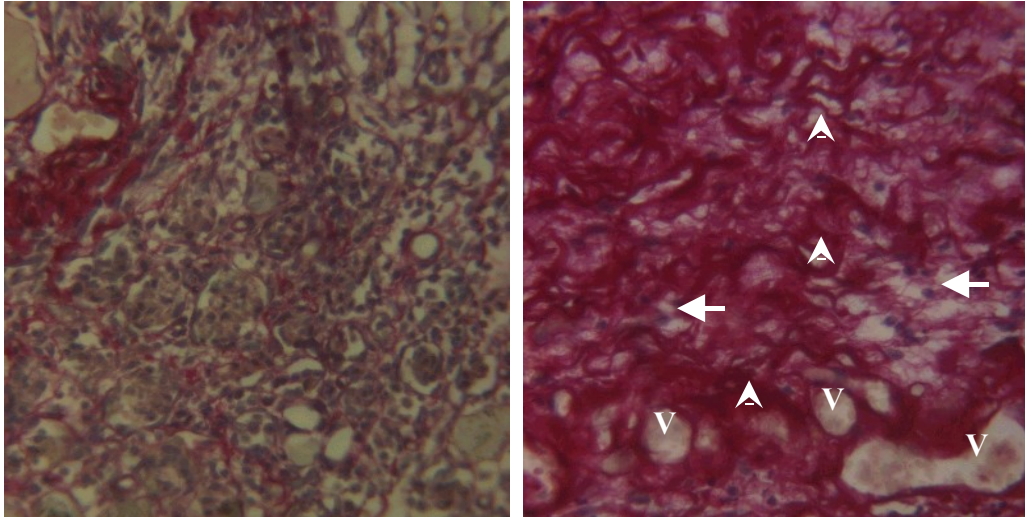
\* Média ± erro padrão da média, N= 5. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste Exato de Fisher.

### 6.2.2 Análise histológica

A análise histológica do estrato músculo-aponeurótico da parede abdominal realizada aos 3 dias após a indução do defeito, no grupo controle, mostrou a presença de infiltrado inflamatório, composto por neutrófilos e macrófagos, principalmente, no interior da espessa rede de fibrina e escassos feixes de fibras colágenas, fibroblastos, vasos sangüíneos e fibras musculares novas. No grupo látex observou-se infiltrado inflamatório menos evidente que no controle, com delgada cápsula fibrosa ao redor da membrana de látex, com abundantes fibras colágenas e vasos sangüíneos (Figura 2).

**A**

**B**



**Figura 2.** Fotomicrografia de parede abdominal de rato aos 3 dias após a indução do defeito, corado com picrissírius-hematoxilina. **A**, controle; **B**, látex. Notar em B o reduzido infiltrado inflamatório (seta maior), feixes colágeno (seta menor) e capilares calibrosos (V). Aumento 400x.

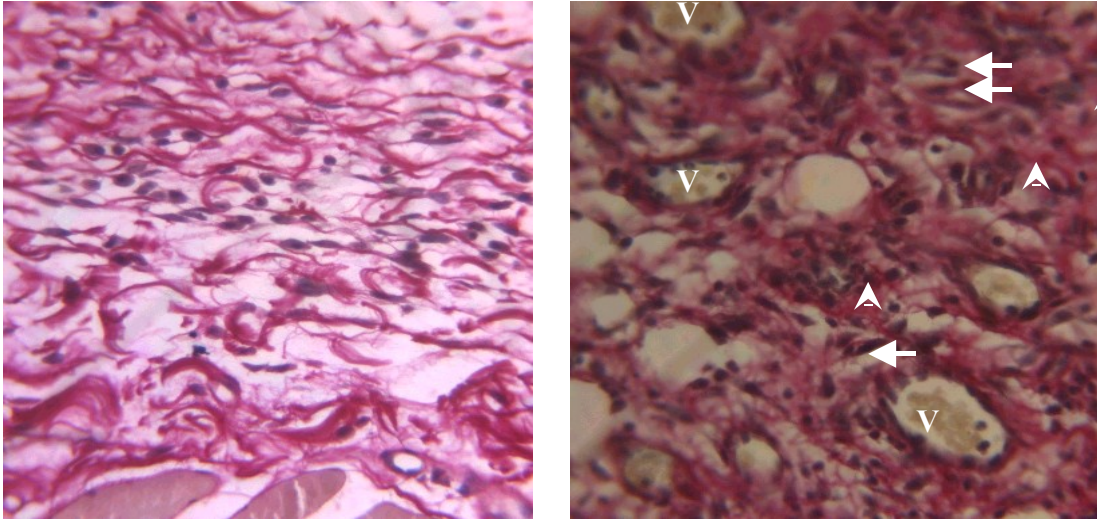
Aos 5 dias após a indução do defeito na parede abdominal observou-se que no grupo controle o tecido de granulação, feixes colágenos e capilares foram menos evidentes que no grupo látex (Figura 3).

No grupo C7 observou-se a presença de tecido conjuntivo pouco denso, caracterizado por esparsos feixes de fibras colágenas, vasos sangüíneos e tecido muscular adjacente. Nos animais do grupo látex observou-se a presença de tecido muscular neoformado, caracterizado por fibras arredondadas e núcleo centralizado bem como inúmeros feixes de fibras colágenas organizadas no tecido conjuntivo, permeadas por vasos sangüíneos (Figura 4).

A avaliação aos 28 dias mostrou, no grupo C28, a ausência de infiltrado inflamatório, tecido conjuntivo evidente, com feixes de fibras colágenas e escassas fibras musculares novas. Todos os animais dos grupos controle desenvolveram a hérnia incisional. Nos animais do grupo látex o tecido conjuntivo é mais evidente, repleto de fibras colágenas organizadas, numerosos fibroblastos e vasos sangüíneos (Figura 5). Neste grupo a parede abdominal se reconstituiu completamente, não tendo sido observada a formação da hérnia incisional.

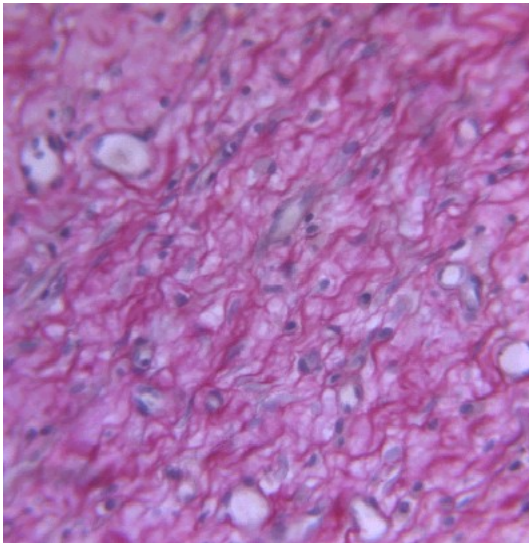
**A**

**B**

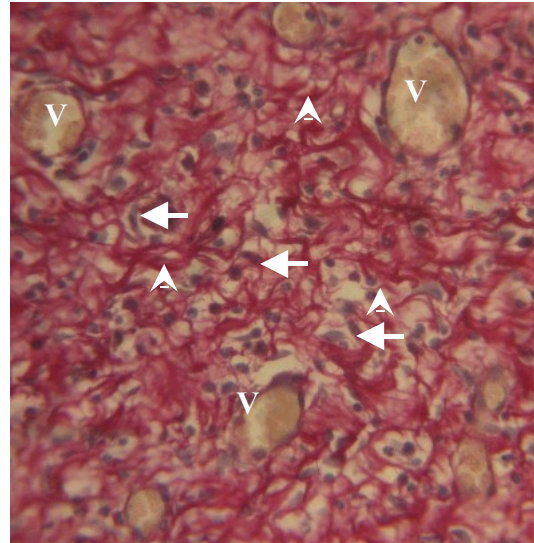


**Figura 3.** Fotomicrografia de parede abdominal de rato aos 5 dias após a indução do defeito, corado com picrissírius-hematoxilina. **A**, controle; **B**, látex. Notar em B numerosos fibroblastos (seta maior), feixes colágeno (seta) e capilares calibrosos (V). Aumento 400x.

**A**



**B**

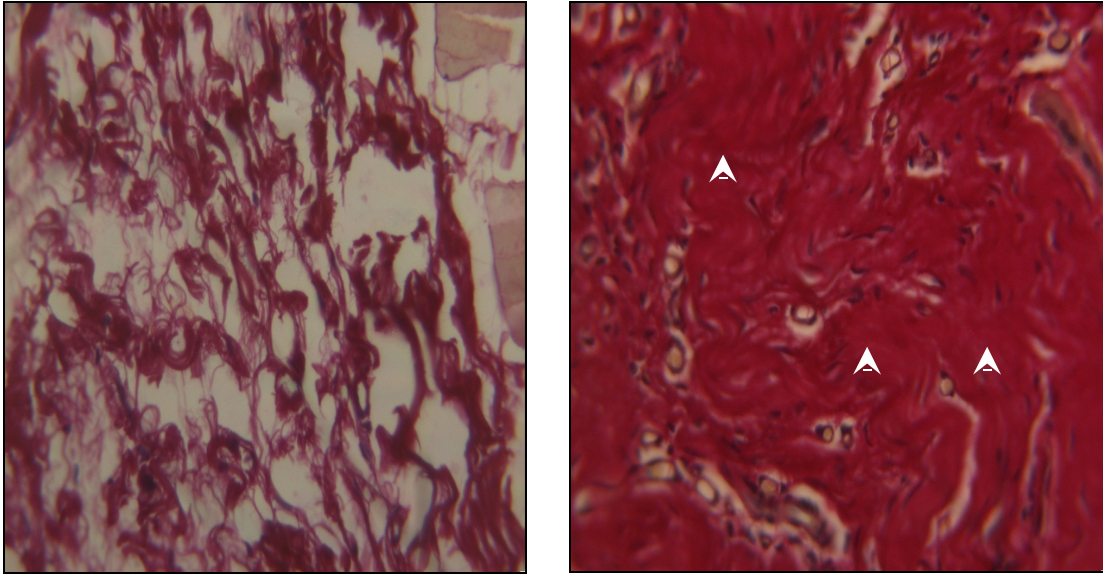


**Figura 4.** Fotomicrografia de parede abdominal de rato aos 7 dias após a indução do defeito, corado com picrissírius-hematoxilina. **A**, controle; **B**, látex. Notar em B numerosos fibroblastos (seta maior), feixes colágeno (seta menor) e capilares calibrosos (V). Aumento 400x.

**A**

**B**





**Figura 5.** Fotomicrografia de parede abdominal de rato aos 28 dias após a indução do defeito, corado com picrissírius-hematoxilina. **A**, controle; **B**, látex. Notar em B o tecido conjuntivo evidente (seta). Aumento 400x.

A análise morfométrica mostrou que em todos os tempos analisados a membrana de látex induziu o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da densidade de vasos sanguíneos, fibras musculares novas e de tecido conjuntivo (Tabela 3).

**Tabela 3.** Densidade de vasos sangüíneos, fibras musculares novas e de tecido conjuntivo da parede abdominal de ratos do grupo controle (C) e látex (L), aos 3, 5, 7 e 28 dias após a indução do defeito.

Grupo	Densidade*		
	Vasos sangüíneos	Fibras musculares novas	Tecido conjuntivo
C3	0,73 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,26 <sup>a</sup>	4,06 ± 0,57 <sup>a</sup>
L3	3,27 ± 0,65 <sup>b</sup>	4,73 ± 0,90 <sup>b</sup>	6,98 ± 0,78 <sup>b</sup>
C5	1,40 ± 0,32 <sup>a</sup>	1,73 ± 0,57 <sup>a</sup>	3,30 ± 0,28 <sup>a</sup>
L5	4,33 ± 0,35 <sup>b</sup>	5,27 ± 0,86 <sup>b</sup>	8,63 ± 0,29 <sup>c</sup>
C7e	1,93 ± 0,30 <sup>a</sup>	1,27 ± 0,47 <sup>a</sup>	6,30 ± 0,31 <sup>a</sup>
L7	4,60 ± 0,35 <sup>b</sup>	6,47 ± 1,10 <sup>b</sup>	2,52 ± 0,14 <sup>c</sup>
C28	0,73 ± 0,23 <sup>a</sup>	1,53 ± 0,42 <sup>a</sup>	1,89 ± 0,64 <sup>a</sup>
L28	4,73 ± 1,14 <sup>b</sup>	7,67 ± 0,97 <sup>b</sup>	6,48 ± 0,56 <sup>b</sup>

\* Média ± erro padrão da média, N= 15. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

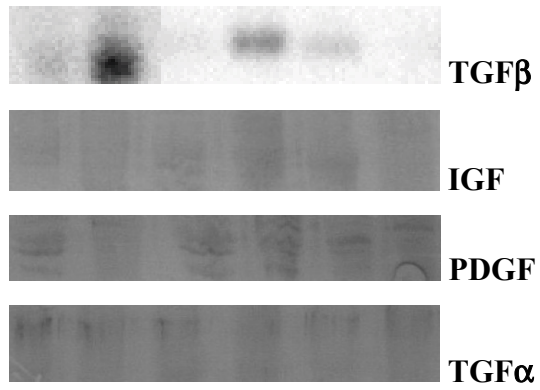
### 6.3 Western blotting

O Western blotting revelou que a membrana de látex aumentou a expressão de FGF2 e TGF $\beta$ , especialmente no grupo L3; diminuiu a expressão de PDGF e a expressão de IGF e não alterou a expressão de TGF $\alpha$  (Figura 6).

C3 L3 C5 L5 C7 L7



FGF2



**Figura 6.** Expressão de FGF2, TGFβ, IGF, PDGF e TGFα em animais controle (C) e tratados com membrana de látex aos 3, 5 e 7 dias após a indução do defeito da parede abdominal, avaliada por Western blotting.

## 7 DISCUSSÃO

A correção de defeitos da parede abdominal é um dos grandes problemas cirúrgicos, cuja solução ainda parece estar longe de ser encontrada. Praticamente todas as espécies animais, incluindo o homem, são susceptíveis a esta afecção, a qual causa um enorme impacto na saúde física, independente da espécie abordada. Apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas e no desenvolvimento de material de sutura e de implantes, os defeitos da parede abdominal continuam a ser um problema para os cirurgiões. Embora os materiais protéticos sejam frequentemente indicados, a ocorrência de infecção, extrusão e recidivas podem limitar o seu uso e não existe nenhuma técnica preventiva ou reconstrutiva universalmente aceita (MILLIKAN, 2003; RUDMIK et al., 2006).

A eleição do procedimento cirúrgico reconstrutivo da parede abdominal deve considerar que, em geral, há perda dos diferentes planos anatômicos que a constituem. A função perdida de suporte deve ser restabelecida e, sempre que possível, a pele deve estar disponível para a cobertura total dos planos restaurados. A parede abdominal é uma estrutura dinâmica, cuja importância reside no papel fundamental que ela exerce sobre as funções respiratória e digestiva (GIROTTO et al., 2003) e as bases para sua reconstrução devem seguir os critérios de DiBello et al. (1996), ou seja prevenir a eventração visceral; incorporar o remanescente da parede abdominal; prover suporte muscular dinâmico; promover a aproximação livre de tensão e assegurar que a parede reconstruída tenha sua força aumentada ao longo do tempo.

Materiais sintéticos ou biológicos têm sido comparados ou sugeridos para uso clínico e experimental em diversas espécies. O material substitutivo para ser considerado ideal deve ser de baixo custo de produção, ser de fácil manipulação, promover o crescimento dos tecidos do hospedeiro, permitir que o tecido cicatricial tenha força igual ao tecido normal, ser resistente às infecções, não induzir resposta inflamatória exacerbada, não promover a formação de aderências e fístulas e não ter suas características físicas alteradas pelos líquidos tissulares, tendo ainda que ser flexível, inerte, poroso e resistente (CERISE et al., 1974; ARNAUD et al., 1977). Os implantes comumente utilizados na reconstrução da parede abdominal podem reunir apenas uma ou outra destas características (PREVEL et al., 1995). Material sintético implantado na parede abdominal, em contato com as alças intestinais, acarreta o risco de erosão visceral, infecção e formação de fístulas. A eliminação do implante também pode ocorrer (GIROTTO et al., 2003). Assim, as complicações decorrentes do uso de material protético para reconstrução da parede abdominal podem advir

das propriedades físicas do implantado bem como das variações da técnica de implantação (LEBER et al., 1998).

Nesse contexto o presente trabalho avaliou o efeito da tela de látex na prevenção da formação da hérnia incisional. A escolha deveu-se às observações clínicas e experimentais citadas na literatura. O material foi doado conseqüentemente de fácil aquisição e a sua implantação não apresentou dificuldades técnicas. Sua superfície é lisa e sua consistência é macia, permitindo a inserção da agulha sem tensão. Por ser elástica, é possível a sua adaptação sobre o leito receptor. Cabe ressaltar que este é um material de origem vegetal, constituindo-se de matéria-prima nacional e de baixo custo, sem risco de transmissão de patógenos, pois se trata de material esterilizado.

O látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) desde muito tempo é utilizado para fins industriais. A biomembrana de látex da seringueira, com finalidade terapêutica foi desenvolvida por Coutinho-Netto no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto/SP, em 1994 (MRUÉ et al., 2004). O primeiro resultado da sua utilização experimental como substituto do esôfago cervical de cães foi publicado dois anos mais tarde (MRUÉ, 1996). A literatura disponível é escassa, mas já fornece alguns elementos que permitem a avaliação do seu emprego experimental em diferentes tecidos.

Neste trabalho ficou demonstrado que a utilização da tela de látex previne a formação da hérnia incisional, mesmo quando ocorre o afastamento das bordas do defeito na parede abdominal, pois nenhum dos animais dos grupos látex apresentou HI. Ao contrário do obtido no grupo controle, no qual foi observado desde o início até a consolidação da HI.

Estímulos traumáticos ao peritônio, como isquemia tecidual, infecção, radiação e reação a corpos estranhos, processos comuns no pré e pós-operatório, predisõem à formação de aderências nessa serosa (MIRANDA et al., 2001). A aderência após uma cirurgia é a causa mais prevalente de obstrução aguda e recidivante de intestino delgado e um infortúnio persistente após cirurgia abdominal e pélvica. A lesão peritonal decorrente desses estímulos nocivos suscita uma reação inflamatória serossangüínea que leva aos depósitos de fibrina. A fibrinólise inadequada permite que a proliferação de fibroblastos produza aderências fibrosas.

Os resultados deste trabalho mostraram que nos animais dos grupos látex houve diminuição da área de aderência e estas, quando ocorreram, foram frouxas, desfazendo-se facilmente com a manipulação. Além disso, houve apenas adesão de epíplon, sendo estas menos graves que as observadas nos grupos controle, especialmente, aos 28 dias, nos quais houve adesão de epíplon, intestino e estes se aderiram também à pele suprajacente. A aderência de víceras acarreta entre outros problemas, a possibilidade de falhas funcionais e

fisiológicas nos órgãos envolvidos. A adesão no grupo látex ocorreu principalmente na borda da lesão. O fio de sutura, sendo um corpo estranho, pode ter contribuído para esta formação. Provavelmente, a menor intensidade de aderências induzidas pelo látex deve-se à sua estrutura, composta por cadeias poliisoprênicas longas, com pontes cruzadas de enxofre e proteínas e fosfolípídeos naturais do látex. Os poliisoprenóis são naturalmente encontrados nos tecidos dos animais superiores, na forma de cadeias maiores, tais como esqualeno, ubiquinona e dolicol (LACHAT et al., 1997). Segundo Fagundes et al. (2002), quanto maior a cadeia do adesivo cirúrgico, menor a indução de aderências.

A incorporação do material implantado pelos tecidos adjacentes com pouca ou nenhuma reação inflamatória ou de corpo estranho é para Kama et al. (1999) uma das condições para que um implante seja considerado ideal. No presente trabalho foi notado que o látex induziu a regeneração tecidual e as alterações histológicas em todos os períodos avaliados foram compatíveis com processo de regeneração tecidual normal (controle).

Quando implantes são usados para substituição fascial da parede abdominal, o processo cicatricial normal que ocorre ajuda na ancoragem do material nos tecidos. Quando uma malha não absorvível é implantada, ocorre a deposição de colágeno dentro e ao redor dos filamentos desta, resultando numa cicatriz encapsulante. Com a maturação da cicatriz há contração e distorção do e ao redor do implante, o que pode resultar em um padrão cicatricial anormal (RABELO et al., 2004). No presente trabalho as próteses não foram extruídas, mas sim encapsuladas e no período de estudo não houve sinais de contração ou distorção do implante.

A análise histológica revelou que o látex induziu a proliferação de vasos sangüíneos, sendo, portanto, angiogênica. Isto propiciou o maior aporte de nutrientes e O<sub>2</sub>, o que provavelmente contribuiu para a regeneração tecidual, com aumento de fibras musculares novas. Observou-se ainda o aumento de fibroblastos e deposição de colágeno, o que é importante para determinar o aumento da resistência à forças tensoras no tecido cicatricial, evitando a deiscência da ferida e a instalação da HI. Houve aumento gradual de deposição e organização das fibras colágenas durante o período de estudo. A reação celular induzida pelo látex foi provavelmente induzida devido às proteínas do látex (AZÔR, 2004).

Resultados semelhantes foram obtidos por Mrué et al. (2004), que avaliaram a biocompatibilidade da membrana de látex e esta, quando implantada tecido subcutâneo de cão não sofreram extrusão e estimularam a regeneração tecidual. Sader et al. (2000) utilizaram a membrana de látex como substituto parcial do pericárdio de cães. Os autores observaram que nos grupos em que este foi utilizado, a ocorrência de aderências aos tecidos adjacentes foi

menor do que no grupo controle, tendo havido regeneração completa do pericárdio subjacente à membrana de látex, com características semelhantes às do pericárdio original. Neoformação epitelial semelhante ao epitélio esofágico nativo bem como neoformação muscular, porém com fibras em quantidades inferiores e menos longas foram os achados de Mrué (2000), que reconstruiu parcialmente o esôfago cervical de cães com retalhos de látex com polilisina 0,1%. Entretanto todos os animais eliminaram as próteses através do tubo digestivo. A membrana de látex induziu também a regeneração de artérias. Freitas (2001) comparou arterioplastias femorais em cães com próteses laminares de látex sem e com polilisina 0,1%, com controle de veia cefálica autóloga no membro contra-lateral. Os autores notaram que as coberturas celulares das neointimas foram semelhantes entre os grupos, com maior proliferação miointimal naqueles que receberam as biomembranas de látex. Havia ainda a presença de uma matriz fibrinoconjuntiva de suporte que não foi evidenciada nos retalhos venosos. Azôr (2004) promoveu tratamento experimental de peritoneostomia em coelhos, com membranas de látex polimerizadas a 60°C e a 100°C, relatando a ajustabilidade do implante à parede abdominal, a eliminação do implante entre o 12º e o 14º e a neoformação tecidual na área recoberta, sendo que os melhores resultados advieram do uso das membranas polimerizadas a 60°C. O autor não relatou presença de fistula, mas por outro lado pode constatar aderências as quais foram creditadas ao contato visceral com as membranas.

Frade et al. (2001), baseados nos resultados obtidos após tratamento de úlceras cutâneas flebopáticas crônicas no homem sugeriram que o látex apresenta a propriedade de indução da neovascularização. O presente trabalho confirma esta observação, pois foi obtida maior densidade de vasos sanguíneos nos animais do grupo látex em comparação ao controle, indicando angiogênese.

O presente trabalho evidenciou que o látex induziu a expressão de fatores de crescimento celular, FGF e TGF $\beta$ . A regeneração tecidual requer a influência de fatores de crescimento celular e uma seqüência de eventos celulares, que resultam na regulação celular, com proliferação, sobrevivência e diferenciação (EHRHARDT; MORGAN (2005); WAGERS et al., 2005). O FGF apresenta 9 isoformas, sendo que as isoformas 1, 2, 4, 6 e 9 estimulam a proliferação de células satélite, mas atenua a diferenciação (HAWKE; GARRY, 2001). A agregação plaquetária, no sítio da lesão libera TGF $\beta$ , que ativa os fibroblastos e estes produzem FGF-2 que estimula a angiogênese. O TGF $\beta$  é quimiotático para neutrófilos e macrófagos, que ativados produzem vários fatores de crescimento, citocinas além de fagocitarem patógenos e os restos teciduais no local da lesão (SINGER; CLARK, 1999).

Assim, neste trabalho o aumento da expressão de TGF $\beta$  e FGF, provavelmente, contribuíram para a angiogênese observada, bem como para a estimulação da proliferação de fibras musculares e fibroblastos e para a atividade sintética destes. Como o aumento da expressão de TGF $\beta$  e FGF não persistiu por muito tempo, mas foi predominante aos 3 dias, isso garantiu que a regeneração tecidual do grupo látex fosse normal e mais rápida que o controle.

O TGF $\alpha$  deriva, dentre outras células, dos macrófagos ativados; o PDGF (e suas diferentes formas) e os FGFs são os principais mitógenos para os fibroblastos. O PDGF age sinergicamente com as proteínas da matriz extracelular para promover a migração celular. O FGF é, também, um mitógeno para as células endoteliais e potente angiogênico. O TGF $\beta$  é ativo na inibição da proliferação celular e indução de diferenciação da célula. O IGF é um fator de crescimento estruturalmente relacionado à insulina. É a proteína primária envolvida na resposta das células ao hormônio de crescimento. Assim, exerce seu efeito sobre vários tipos celulares, estimulando a proliferação, sobrevivência e diferenciação (CLARK, 1996). Assim, a modulação do IGF, PDGF e TGF $\alpha$  pela membrana de látex, parece ter contribuído positivamente para a regeneração do defeito da parede abdominal.

Este biomaterial atende, pelo menos em parte, as condições ideais de um implante, ou seja, é de baixo custo de produção e de fácil manipulação, o que pode ser constatado uma vez que ele é flexível e se ajustou adequadamente à parede abdominal dos ratos nos quais ele foi implantado. Ele ainda apresenta uma superfície lisa e não aderente, não promoveu deiscência da ferida e não foi extruído. Assim, a membrana de látex parece ser eficiente para utilização em hernioplastias e seu mecanismo de ação inclui a modulação da expressão de fatores de crescimento celular, estimulando a regeneração tecidual. Entretanto um estudo por período de tempo maior, a utilização de outros tipos de animais, a verificação de aspectos de rejeição são necessários para elucidar o mecanismo de atuação e validar o uso da membrana de látex na prática clínica.



## **8 CONCLUSÃO**

Foi induzido um defeito padronizado na parede abdominal de ratos. A membrana de látex da seringueira, quando usada para reconstrução da parede abdominal de ratos, permite a regeneração tecidual, a formação de tecido conjuntivo fibroso de reparação, podendo ser utilizada efetivamente na hernioplastia. O seu mecanismo de ação inclui a modulação da expressão de fatores de crescimento celular FGF, TGF $\beta$ , IGF e PDGF.

## 9 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AMID, P.K. Biomaterials: classification, technical, and experimental aspects. In: **Incisional Hernia**. SCHUMPELICK, V.; KINGSNORTH, A.N. ed. Berlin: Springer-Verlag; p.160-168, 1999.
- ARNAUD, J.P.; ELO, Y.R.; ADLOFF, M.; GRENIER, J.F. Critical evaluation of prosthetic materials in repair of abdominal wall hernias. **Am. J. Surg.**, v. 133, p. 338-345, 1977.
- ARNOLD, F.; WEST, D.C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacol. Ther.**, v. 52, p. 407-422, 1991.
- ASSOIAN, R.K.; KOMORIYA, A.; MEYERS, C.A.; MILLER, D.M.; SPORN, M.B. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. **J. Biol. Chem.**, v.258, p. 7155-7160, 1983.
- AUERBACH, R.; LEWIS, R.; SHINNERS, B.; KUBAI, L.; AKHTAR, N. Angiogenesis assay: a critical overview. **Clin. Chem.**, v. 49, p. 32-40, 2003.
- AYDOS, R.D.; SILVA, I.S.; GOLDENBERG, S.; GOLDENBERG, A.; SIMÕES, M.J.; TAKITA, L.C.; NIGRO, A.J.T. Estudo comparativo do efeito das telas de politetrafluoretileno expandido e de polipropileno, colocadas por laparoscopia, em hérnias ventrais produzidas em coelhos. **Acta Cir Bras.**, v.14, p.59-64, 1999.
- AZÔR AF. Tratamento de peritonostomia com biomembrana de látex natural –Estudo experimental em coelhos. [tese-doutorado] Universidade de São Paulo-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2004.
- BATES, D.O.; HARPER, S.J. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factor. **Vascular Pharmacology.**, v. 39, p. 225-237, 2003.
- BOEMI, L.; ALLISON, G. M.; GRAHAM, W. P.; KRUMMEL, T. M.; EHRlich, H. P. Differences between scar and dermal cultured fibroblasts derived from a patient with recurrent abdominal incision wound herniation. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.104, p.1397-1405, 1999.
- CANNON, D.J.; READ, R.C. Metastatic emphysema: a mechanism for acquiring inguinal herniation. **Ann. Surg.**, v.194, p.270-278, 1981.
- CASSAR, K.; MUNRO, A. Surgical treatment of incisional hernia. **Br. J. Surg.**, v.89, p.534-545, 2002.
- CERISE, E.J.; BUSUTTIL, R.W.; GRAIGHEAD, C.C.; OGDEN, I.I.W.W. The use of mersilene mesh in repair of abdominal wall hernias. **Ann. Surg.**, v. 181, p. 728-734. 1974.
- CLARK, R.A.F. **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2 ed. N.Y., Plenum Press, 1996.

DETMAR, M; BROWN, LF; BERSE, B; JACKMAN, RW; ELICKER, BM; DVORAK, HF; CLAFFEY, KP. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. **J. Invest. Dermatol.**, v. 108, p. 263-268. 1997.

DIBELLO JN, MOORE JH. Sliding myofascial flap of the rectus abdominus muscles for the closure of recurrent ventral hernias. **Plast Reconstr Surg.**, v. 98, p. 464-469, 1996.

DISA, J.J.; KLEIN, M.H.; GOLDBERG, N.H. Advantages of autologous fascia versus synthetic patch abdominal reconstruction in experimental animal defects. **Plast. Reconst. Surg.**, v.97, p.806-807, 1996.

DISA, J.J.; CHIARAMONTE, M.F.; GIROTTO, J.A.; KLEIN, M.H.; GOLDBERG, N.H. Advantages of autologous fascia versus synthetic patch abdominal reconstruction in experimental animal defects (follow up). **Plast. Reconst. Surg.**, v.108, p.2086-2087, 2001.

DI VITA, G.; PATTI, R.; D'AGOSTINO, P.; ARCOLEO, F.; CARUSO, G.; ARCARA, M.; DAVI, V.; CILLARI, E. Serum VEGF and b-FGF profiles after tension-free or conventional hernioplasty. **Langenbecks Arch. Surg.**, v. 390, p. 528-533, 2005.

DI VITA, G.; PATTI, R.; D'AGOSTINO, P.; FERLAZZO, V.; ANGILERI, M.; SIELI, G.; BUSCEMI, S.; CARUSO, G.; ARCARA, M.; CILLARI, E. Modifications in the production of cytokines and growth factors in drainage fluids following mesh implantation after incisional hernia repair. **Am. J. Surg.**, v. 191, p. 785-790, 2006.

DI VITA, G.; PATTI, R.; VETRI, G.; ROMANO, P.; D'AGOSTINO, P.; CARUSO, G.; FERLAZZO, V.; ARCOLEO, F.; SAMMARTANO, S.; SIELI, G.; CILLARI, E. Production of VEGF and b-FGF in drainage fluid from patients undergoing incisional hernia repair. **Chir. Ital.**, v. 57, p. 471-477, 2005.

DOR, Y.; DJONOV, V.; ABRAMOVITCH, R.; ITIN, A.; FISHMAN, G.I.; CARMELIET, P.; GOELMAN, G.; KESHET, E. Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. **EMBO J.**, v. 21, p. 939-1947, 2002.

DUBAY, D.A.; WANG, X.; KUHN, M.A.; ROBSON, M.C.; FRANZ, M.G. The prevention of incisional hernia formation using a delayed-release polymer of basic fibroblast growth factor. **Ann Surg.**, v. 240, p. 179-186, 2004.

EHRHARDT J, MORGAN J. Regenerative capacity of skeletal muscle. **Curr Opin Neurol.**, v. 18, p. 548-553, 2005.

FAGUNDES DJ, TAHA MO, RIVOIRE HC. Adesivos cirúrgicos: revisão e atualização. **JBM**, v. 82, p. 101-103, 2002.

FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 280, p. C1358-66. 2001.

FLAMENT, J. B.; PALOT, J. P.; BURDE, A.; DELATTRE, J. F.; AVISSE, C. Treatment of major incisional hernia. **Probl. Gen. Surg.**, v.12, p.151-158, 1995.

FLAMENT, J. B.; RIVES, J.; PALOT, J. P.; BURDE, A.; AVISSE, C. Major incisional hernia. In: CHEVREL, J. P., editor. **Hernias and Surgery of the Abdominal Wall**, 2<sup>nd</sup>. ed. Berlin: Springer-Verlag. P.128-158, 1998.

FOLKMAN, J; KLAGSBRUN, M; SASSE, J; WADZINSKI, M; INGBER, D; VLODAVSKY, I. A heparin-binding angiogenic protein-basic fibroblast growth factor- is stored within basement membrane. **Am. J. Pathol.**, v. 130, p. 393-400. 1988.

FOLKMAN, J; D'AMORE, PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? **Cell.**, v., 87, p. 1153-1155, 1996.

FOLKMAN, J; SHING, T. Angiogenesis, **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 10931-10934, 1992.

FRADE, A. A.; VALVERDE, R. V.; DE ASSIS, R. V.; COUTINHO-NETTO, J.; FOSS, N. T. Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. **Int. J. Dermatol.**, v. 40, p. 238-240, 2001.

FRADE, M.A.C. **Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico do reparo tecidual na presença da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis***. 2003. 164f. Tese (doutorado em medicina) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

FRANZ, M.G.; KUHN, M.A.; NGUYEN, K.; WANG, X.; KO, F.; WRIGHT, T.E.; ROBSON, M.C. Transforming growth factor b2 lowers the incidence of incisional hernias. **J. Surg. Res.**, v. 97, p. 109-116, 2001.

FREITAS, MAS. Avaliação da prótese de látex natural como remendo em arterioplastias femorais. Estudo experimental em cães. [tese-doutorado] Universidade de São Paulo- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2001.

GAILIT, J; WELCH, MP; CLARK, RA. TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds. **J. Invest. Dermatol.**, v. 103, p. 21-27, 1994.

GISLASON, H.; VISTE, A. Closure of burst abdomen after major gastrointestinal operations: comparison of different surgical techniques and later development of incisional hernia. **Eur. J. Surg.**, v.165, p.958-961, 1999.

GIROTTA JA, CHIARAMONTE M, MENON NG, SINGH N, SILVERMAN R, TUFARO AP, NAHABEDIAN M, GOLDBEG NH, MANSON PN. Recalcitrant abdominal wall hernias: long-term superiority of autologous tissue repair. **Plast Reconstr Surg**, v. 112, p. 106-114, 2003.

GOLDSTEIN, S. L. Mechanisms and metabolic characteristics of hernia formation. **Probl. Gen. Surg.**, v.19, p.1-6, 2002.

GOODNEY, P.P.; BIRKMEYER, C.M.; BIRKMEYER, J.D. Short-term outcomes of laparoscopic and open ventral hernia repair. **Arch. Surg.**, v.137, p.1161-1165, 2002.

GRANTCHAROV, T. P.; ROSENBERG, J. Vertical compared with transverse incisions in abdominal surgery. **Eur. J. Surg.**, v.167, p.260-267, 2001.

HAWKE, T.J.; GARRY, D.J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol**, v. 91, p. 534–551, 2001.

HUNT, T.K.; KNIGHTON, D.R.; THAKRAL, K.K.; GOODSON, W.H.; ANDREWS, W.S. Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. **Surgery**, v. 96, p 48-54, 1984.

IAPAR. O cultivo da seringueira (*Hevea* spp.). Boletim Informativo Instituto Agronômico do Paraná. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Disponível em: <[http://www.iapar.br/zip\\_pdf/cultsering.pdf](http://www.iapar.br/zip_pdf/cultsering.pdf)>. Acessado em 10/12/2006.

JINGJING, L; XUE, Y; AGARWAL, N; ROQUE, RS. Human Muller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, p. 752-59. 1999.

JUNQUEIRA, L.C.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius red and polarization microscopy. **Arch. Histol. Jpn.**, v. 41, p. 267-274, 1978.

KAMA, N.A.; COSKUN, T.; YAVUZ, H.; DOGANAY, M.; REIS, E.; AKAT, A.Z. Autologous skin graft, human dura mater and polypropylene mesh for the repair of ventral abdominal hernias: an experimental study. **Eur. J. Surg.**, v.165, p.1080-1085, 1999.

KANDEL, J; BOSSY-WETZEL, E; RADVANYI, F; KLAGSBRUN, M; FOLKMAN, J; HANAHAN, D. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. **Cell**, v. 66, p. 1095-104. 1991.

KINGSLEY, DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. **Genes Dev.**, v. 8, p. 133-46. 1994.

KLINGE, U.; KLOSTERHALFEN, B.; CONZE, J.; LIMBERG, W.; OBOLENSKI, B.; ÖTTINGER, A.P.; SCHUMPELICK, V. Modified mesh for hernia repair that is adapted to the physiology of the abdominal wall. **Eur. J. Surg.**, v.164, p.951-960, 1998.

KLINGE, U.; KLOSTERHALFEN, B.; MÜLLER, M.; SCHUMPELICK, V. Foreign body reaction to meshes used for the repair of abdominal wall hernias. **Eur. J. Surg.**, v.165, p.665-673, 1999.

KLOSTERHALFEN, B.; KLINGE, U.; SCHUMPELICK, V. Functional and morphological evaluation of different polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair. **Biomaterials.**, v.19, p.2235-2246, 1998.

KORENKOV, M.; PAUL, A.; SAUERLAND, S.; NEUGEBAUER, E.; ARNDT, M.; CHEVREL, J. P.; et al. Classification and surgical treatment of incisional hernia. Results of an expert's meeting. **Langenbecks Arch. Surg.**, v.386, p.65-73, 2001.

KUHN, M.A.; SMITH, P.D.; WACHTEL, T.L.; WRIGHT, T.E.; ROGAZEWSKI, A.; NGUYEN, K.; ROBSON, M.C.; FRANZ, M.G. Abdominal wall repair is delayed during hepatic regeneration. **J. Surg. Res.**, v. 95, p. 54– 60, 2001.

LACHAT, J.J.; MRUÉ, F.; THOMAZINI, J.A.; COUTINHO-NETTO, J. Morphological and biochemical studies of the biocompatibility of membrane manufactured from latex of *Hevea brasiliensis*. **Acta Microsc.**, v. 6, sup. 758, 1997.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-6855, 1970.

LÁZARO DA SILVA, A. Próteses. In: LÁZARO DA SILVA, A. **Hérnias**. São Paulo: Roca. p.1127-37, 1992.

LÁZARO DA SILVA, A.; PIMENTA, L.G. **Hérnia incisional**. Rio de Janeiro: Medsi; P.178-80, 2004.

LEBER GE, GARB JL, ALEXANDER AL, REED WP. Long-term complications associated with prosthetic repair of incisional hernias. **Arch Surg.**, v. 133, p. 378-382, 1998.

LEX, A.; RAIÁ, A. O uso da dura-máter homóloga, consevada em glicerina, no tratamento das hérnias incisionais. **Rev. Paul. Med.**, v.77, p.123-128, 1971.

LI, J; ZHANG, YP; KIRSNER, RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microsc. Res. Tech.**, v. 60. p. 107-14. 2003.

LUIJENDIJK, R.W.; HOP, W.C.J.; TOL, P.; LANGE, D.C.D.; BRAAKSMA, M.M.J.; IJZERMANS, J.N.M.; et al. A comparison of suture repair with mesh repair for incisional hernia. **N Engl J Méd.** 343:392-8, 2000.

MASSAGUÉ, J. The transforming growth factor-beta family. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v. 6, p. 597-641.1990.

MELO, R.M. A técnica de fechamento em massa das incisões abdominais medianas: revisão da literatura. **Ver. Brás. Cir.**, v.86, p.307-312, 1996.

MELO, R.M.; GOUVÊA, C.M.C.P.; DA SILVA, A.L. Efeito do ultra-som na prevenção da hérnia incisional mediana em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, p. 100-108, 2005.

MENDONÇA, R.J. **Caracterização biológica de uma fração angiogênica do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis***. 2004. 47 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

MILLIKAN, K. W. Incisional hernia repair. **Surg. Clin. N. Am.**, v.83, p.1223-1234, 2003.

MIRANDA ML, JESUS-CARLOS P, VAITSMAN GP, LEAL AP, MATHIAS I, MARQUES RG. Prevenção de aderências entre órgãos intra-abdominais e tela sintética em rato com utilização de membrana de sódio-hialuronidase/carboximetil-celulose. **Acta Cir Bras**, v. 16, p. 111, 2001.

MORENO A, AGUAYO JL, ZAMBUDIO G, RAMIREZ P, CANTERAS M, PARRILLA P. Influence of abdominal incision on the formation of postoperative peritoneal adhesions: an experimental study in rats. **Eur J Surg**, v.162, p.181–5, 1996.

MRUÉ, F. **Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina. Aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães.** 2000. 111 p. Tese (Doutorado em medicina) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

MRUÉ, F. **Substituição do esôfago cervical por prótese biossintética de látex - Estudo experimental em cães.** 1996. 114 p. Dissertação (Mestrado em medicina) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.

MRUÉ, F.; COUTINHO-NETTO, J.; CENEVIVA, R.; LACHAT, J.J.; THOMAZINI, J.A.; TAMBELINI, H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Mat. Res.**, v. 41. p. 277-283, 2004.

MUSTOE TA, PIERCE GF, THOMASON A, GRAMATES P, SPORN MB, DEUEL TF Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. **Science**, v. 237, p.1333–1336, 1987.

NEVES-JUNIOR, W. F. P. et al. Influence of fabrication process on the final properties of natural-rubber latex tubes for vascular prosthesis. **Braz. J. Phys.**, v. 36, n. 2b, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-97332006000400021&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-97332006000400021&lng=en&nrm=iso)>. doi: 10.1590/S0103-97332006000400021.

O'DWYER, P. J.; COURTNEY, C. A.; Factors involved in abdominal wall closure and subsequent incisional hernia. **Surg J R Coll Surg Edinb Irel.** 1 February:17-22, 2003.

OLIVEIRA, J.A.A.; HYPPOLITO, M.A.; COUTINHO-NETTO, J.; MRUÉ, F. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 69, p. 649-655, 2003.

ORNITZ, DM; ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome Biol.**, v. 2, p. 1-12, 2001.

ORTOLONI, A.A. Aptidão climática para a cultura da seringueira em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.121, p.8-12, 1985.

PAPETTI, M.; HERMAN, I.M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 282, p. C947-970, 2002.

PARK, JE; KELLER, GA; FERRARA, N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of the extracellular matrix-bound VEGF. **Mol. Biol. Cell.**, v. 4, p. 1317-1326. 1993.

PAULA, F.B.A.; GOUVÊA, C.M.C.P.; ALFREDO; P.P.; SALGADO, I. Protective action of a hexane crude extract of *Pterodon emarginatus* fruits against oxidative and nitrosative stress induced by acute exercise in rats. **BMC Complement Altern Med.**, v. 5, p. 17, 2005.

PAULO, N.M.; SILVA M.A.M.; CONCEIÇÃO, M. Biomembrana de látex natural (*Hevea brasiliensis*) com polilisina a 0,1% para Herniorrafia perineal em um cão. **Acta Scien. Vet.**, v. 33, p. 79-82, 2005.

PEPPER, M.S. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, p. 1104-1117, 2001.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al., which is more generally applicable. **Anal. Biochem.**, v. 83, p. 346-356, 1977.

PINHO, E.C.C.M.; SOUSA, S.J.F.; SCHAUD, F.; LCHAT, J.J.; COUTINHO-NETTO, J. Experimental use of latex biomembrane in conjunctival reconstruction. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 67, p. 27-32, 2004.

POLLOCK, A. V.; EVANS, M. Early prediction of late incisional hernias. **Br J Surg.** 76:953-4, 1989.

PREVEL, C.D.; EPPLEY, B.L., SUMMERLIN. D.J.; JACKSON, J.R.; MCCARTY, M.; BADYLAK, S.F. Small intestinal submucosa: utilization for repair of rodent abdominal wall defects. **Ann. Plast. Surg.**, v. 35, p. 374-380, 1995.

RABELO RE, PAULO NM, SILVA LAF, LIMA CRO, VIU MAO, FERNANDES JJR, ROMANI AF, DAMASCENO AD, ALVES CB, SILVA MAM. Emprego da biomembrana de látex natural com polilisina a 0,1% na hernioplastia umbilical recidivante em bovinos leiteiros. **Braz j Vet Res Anim Sci**; v. 41, p. 233-234, 2004.

REMENSNYDER, JP; MAJNO, G. Oxygen gradients in healing wounds. **Am. J. Pathol.**, v. 52, p. 301-323, 1968.

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

RIVES, J.; LARDENNOIS, B.; PIRES, J.C.; HIBON, J. Les grandes èventrations: importance du volet abdominal et des troubles respiratoires qui lui sont secondaires. **Chirurgie.**, v. 99, p. 547-563, 1973.

ROBERTS, AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. **Miner. Electrolyte Metab.**, v. 24, p. 111-119. 1998.

ROBERTS, AB; SPORN, MB. Transforming growth factor- $\beta$ . In: CLARK, RAF. **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2 ed. N.Y., Plenum Press, p. 275-308, 1996.

ROBSON, M.C.; DUBAY, D.A.; WANG, X.; FRANZ, M.G. Effect of cytokine growth factors on the prevention of acute wound failure. **Wound Repair Regen.**, v. 12, p. 38-43,2004.

ROSCH, R.; JUNGE, K.; KNOPS, M.; LYNEN, P.; KLINGE, U.; SCHUMPELICK, V. Analysis of collagen-interacting proteins in patients with incisional hernias. **Langenbecks Arch. Surg.** v. 387, p. 427-432, 2003.



RUCINSKI, J.; MARGOLIS, M.; PANAGOPOULOS, G.; WISE, L. Closure of the abdominal midline fascia: meta-analysis delineates the optimal technique. **Am. Surg.**, v.67, p.421-426, 2001.

RUDMIK, L.R.; SCHIEMAN, C.; DIXON, E.; DEBRU, E. Laparoscopic incisional hernia repair: a review of the literature. **Hernia**, v. 10, p. 110-119, 2006.

RUFINO, D.T.C. **Zoneamento ecológico para a cultura da seringueira no Estado de Minas Gerais**. Viçosa, MG: UFV, 70p. Tese de Mestrado, 1986.

SADER, S.L.; COUTINHO NETTO, J.; BARBIERI NETO, J.; MAZZETTO, S.A.; ALVES JR., P., VANNI, J.C.; SADER, A.A. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v.15, p.338-344, 2000.

SALCEDO, R.; RESAU, J.H.; HALVERSON, D.; HUDSON, E.A.; DAMBACH, M.; POWELL, D.; WASSERMAN, K.; OPPENHEIM, J.J. Differential expression and responsiveness of chemokine receptors (CXCR1-3) by human microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells. **Faseb J.**, v. 14, p. 2055-2064, 2000.

SCHACHTRUPP, A.; KLINGE, U.; JUNGE, K.; ROSCH, R.; BHARDWAJ, R.S.; SCHUMPELICK, V. Individual inflammatory response of human blood monocytes to mesh biomaterials. **Br. J. Surg.**, v. 90, p. 114-120, 2003.

SCHUMPELICK, V. Does every hernia demand a mesh repair? A critical review. **Hernia.**, v.5, p.5-8, 2001.

SCHWEIGERER, L; NEUFELD, G; FRIEDMAN, J; ABRAHAM, JA; FIDDES, JC; GOSPODAROWICZ, D. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. **Nature**, v. 325, p. 257-59. 1987.

SEPP, NT; LI, LJ; LEE, KH; BROWN, EJ; CAUGHMAN, SW; LAWLEY, TJ; SWERLICK, RA. Basic fibroblast growth factor increases expression of the alpha v beta 3 integrin complex on human microvascular endothelial cells. **J. Invest. Dermatol.**, v. 103, p. 295-99. 1994.

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

THOMAZINI, J.A.; MRUE, F.; COUTINHO-NETTO, J.; LACHAT, J.J.; CENEVIVA, R.; ZBOROWSKI, A.C. Morphological and biochemical characterization of a prosthesis manufactured from natural latex of *Hevea brasiliensis* for medical utilization. **Acta Microsc.**, v. 6, p. 798-799, 1997.

TISCHER, E; MITCHELL, R; HARTMAN, T; SILVA, M; GOSPODAROWICZ, D; FIDDES, JC; ABRAHAM, JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 11947-1194. 1991.

TOWBIN H, STAEHELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VAN'T RIET, M.; STEYERBERG, E.W.; NELLENSTEYN, J.; BONJER, H.J.; JEEKEL, J. Meta-analysis of techniques for closure of midline abdominal incisions. **Br J. Surg.**, v.89, p. 1350-1356, 2002.

VOGT, P.M.; DRUCKE, D.; MUHLBERGER, T.; HOMANN, H.H. STEINAU, H.U. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. **Zentralbl. Chir.** v. 125, p. 65-68, 2000.

WAGERS AJ, CONBOY IM. WERNER, S. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 9, p. 153-165, 1998.

WANG, X.; SMITH, P.; PU, L.L.; KIM, Y.J. KO F.; ROBSON, M.C. Exogenous transforming growth factor b2 modulates collagen I and collagen III synthesis in proliferative scar xenografts in nude rats. **J. Surg. Res.**, v. 87, p. 194-200, 1999.

WERNER, S. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 9, p. 153-165, 1998.

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

ZAMBRUNO, G; MARCHISIO, PC; MARCONI, A; VASCHIERI, C; MELCHIORI, A; GIANNETTI, A; DE LUCA, M. Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing. **J. Cell Biol.**, v. 129, p. 853-65. 1995.

ZHENG, H.; SI, Z.; KASPERK, B.; BHARDWAJ, R.S.; SCHUMPELICK, V.; KLINGE, U.; KLOSTERHALFEN, B. Recurrent inguinal hernia: disease of the collagen matrix? **World J. Surg.**, v.26, p.401-408, 2002.