

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**  
**DEPARTAMENT DE CIRURGIA**  
**VALL D'HEBRON INSTITUT DE RECERCA – HOSPITAL**  
**UNIVERSITARI VALL D'HEBRON**



---

**DESREGULACIÓ PROTEOLÍTICA I INFLAMATÒRIA  
TISSULAR EN L'HÈRNIA INCISIONAL ABDOMINAL  
HUMANA. PAPER DEL FIBROBLAST COM A  
POSSIBLE FACTOR DE RISC INDEPENDENT I NOVA  
DIANA TERAPÈUTICA.**

---

**TESI PRESENTADA PER JORDI GUILLEM MARTÍ**

**PER OPTAR AL GRAU DE DOCTOR**

**DIRECTORS DE LA TESI DOCTORAL:**

**DRA. M<sup>a</sup> ANTÒNIA    DRA. M<sup>a</sup> TERESA    DR. MANEL ARMENGOL**  
**ARBÓS VIA            QUILES PÉREZ            CARRASCO**

**BARCELONA, SETEMBRE DE 2012**



**ALS MEUS PARES, PER DONAR-M'HO TOT**

**AL MEU GERMÀ, PER SER-HI SEMPRE**

**I A TU**



## AGRAÏMENTS

Encara que la majoria de vegades la vida es basa en decisions preses amb antelació i cuidadosament estudiades, algunes vegades en prenem de ràpides sense tenir temps de preveure'n les conseqüències. En aquestes ocasions potser obra el subconscient o potser és una part del conscient, que desconexem, qui actua amb rapidesa reunint tota la informació possible. En tot cas, aquestes decisions són les que donen emoció a les nostres vides, potser amb un toc de bogeria, però a vegades poden canviar-la per complert.

Aquell gener de 2005 em dirigia cap a la planta 14 de l'edifici materno-infantil de l'hospital universitari de la Vall d'Hebron. Aquella parada de metro, on mai havia baixat, es convertiria en la més visitada durant els propers 5 anys. Després de prendre la decisió, accelerada, de realitzar pràctiques en el grup de recerca d'Enginyeria de Teixits de la URB, em dirigia a realitzar una entrevista prèvia. Aquell dia em vaig quedar convençut que aquella decisió accelerada i sense saber què fer amb la meua vida, canviaria el meu futur com tantes altres vegades. I certament, aquelles pràctiques van canviar tant el meu concepte de la investigació que em van empènyer a realitzar la tesi doctoral, sobre un tema que em va apassionar d'inici, i que avui arriba a la seva culminació sobre el paper.

Però tots aquests anys, de penes i glòries, formen indubtablement un camí acompanyat de persones meravelloses, que han contribuït a la realització d'aquesta tesi i a la meua formació, professional i personal. Per tant, és moment d'agrair a totes aquestes persones i, sobretot, donar-los les gràcies per ser-hi en tots i cadascun dels moments d'aquesta etapa:

En primer lloc, als meus directors de tesi. Al Dr. Manel Armengol, per dipositar la seva confiança en mi, per confiar en una tesi biològica en el món de la cirurgia, i per donar-me tants i tants consells acadèmics i pràctics. A la Dra. Maria Teresa Quiles, per introduir-me en el món del laboratori i ensenyar-me totes les tècniques, i alhora ajudar a formar-me com a investigador. I en especial, a la Dra. Maria Antònia Arbós, la meua mentora en el món de la investigació. Per la seva dedicació, rigor científic i perseverança. Per educar-me científicament de manera excel·lent, no tindrè mai prou paraules per agrair-li. Moltes gràcies per confiar en mi des del inici!

També, un agraïment per a tota la gent amb qui vaig compartir la primera etapa a la interminablement esfèrica planta 14, on sempre s'elegia la ruta més llarga per arribar als llocs. Als meu companys de pràctiques, que hi van aterrar al mateix temps, la

basca Eider i l'esbojarrat Ferran. Als companys del primer laboratori: a l'al·lota accelerada Tònia, a la Marta Monge (per compartir tants i tants biquinis i cafès, i tantes rialles!), a la Marina (per acompanyar-me en l'etapa inicial del doctorat, i també pels cafès!) i al Dr. Miguel Abal (Forza Depor!). I com no, en especial al Ramon. Per ensenyar-me tot el que sé, per les interminables tardes de western, per treballar al mateix equip, per tenir sempre una visió positiva i irònica de la vida, i per passar de ser un company de feina a ser un amic. Gràcies! I també, a la resta de gent d'aquella etapa: el Guillermo (sempre rient) i la Neus, l'Albert i el Jesús (inseparables), el Tomàs i el Toni (doctorands de la vella escola), a la Marta Tec (per tanta dedicació, per fer-ho tot bé i per ser una gran persona), l'Andreas i el Pep. I, finalment, als doctors Jaume Reventós, Rosana Pacciucci i Francina Munell.

Però aquella etapa va acabar prematurament i, després d'un senyor trasllat, va donar lloc a la nova etapa al laboratori 122 del Institut de Recerca. I aquesta nova etapa va anar acompanyada dels vells i nous companys de feina.

Una menció especial per al laboratori 120, amb tantes hores de conversa i rialla acumulada. A l'Eva, per compartir tantes hores a dins i a fora de la feina, per convertir-se en una amiga i per riure sempre. No deixis mai de fer-ho! A la Marta Llauri, per dedicar-te tant a la ciència i per compartir la primera decepció acadèmica, jeje, i tantes converses. A la Núria, per ser tant natural i riallera, i compartir els dies de màster i els esmorzars. A la Raquel, pel seu entusiasme i la seva visió positiva. I finalment, a la Marta Garcia. Per entendre'ns tant ràpid, com qui ja fa anys que es coneix, per compartir pensaments i per compartir tantes i tantes hores. Per ser com ets.

També agrair a les persones que es van incorporar a la URB en la nova etapa. A la Marta Redbull, per ser tant pràctica i eficient. A l'Ana Barbosa i l'Ana Masià, la Lide (no pierdas ese humor!), la Marta Sesé, la Irene, la Tais, la Bea, el Pako, l'Aintzane i a tothom que em deixi. Buf, fa tants anys ja! I és clar, a la Neus. Llàstima que ens vam conèixer tant tard, però vam fer un bonica amistat!

Òbviament, no em descuido de vosaltres pallussos. Al Valentí, el Jordi (Romerals), la Lorena, la Marian, la Marta Garcia Bellmunt i l'abuelito Marotta. Per formar un grup inseparable que encara avui dura, una gran amistat!! Per tots els xuut xut i els guinyé als passadissos, els té amb llimona de la màquina, el Xavi fent postures de Matrix o egípcies, el de la perilla del lavabo, la papallona, el Jaume Gol de senyor, el Josep Quer Comor?, el Dr. Zoidberg, les contaminacions de la panadera, la xolo-

moto, el Garraforma i Can Juan, el calamar i tota la secció d'ultramarins, i tantes i tantes frases i situacions que vam viure. I perquè us estimo, que coi.

També un agraïment per a un grup de futbolistes d'elit que va començar la seva etapa al velòdrom de la vall d'Hebron i després va passar a delectar el públic del club hispano-francès per, finalment, gestar un equip que ha adquirit grans conquestes a la Meiland. Moltes gràcies a tots els components de l'equip Ecogen FC, i en especial al David Selva (i les fotos sèries), al Javi Hernández (casi como el del Barça, incluso en juego), Vicente Peg Adidas, Julian (Dios, no puedo parar de reir con éste hombre) i David Jr.

Als components de la UCTS: al Ricardo (gràcies pels arrays!), a la Paqui (ai, quins rècords amb tanta eficiència de la real time!), a la Irene, a la Fàtima, a la Mari Ángeles i, en especial, a la Marta Valeri per tantes, tantes i tantes hores al confocal, de imatges i de converses és clar!

També als components de la UEB: a l'Àlex Sánchez i, en especial, al Josep Lluís Mosquera per tanta dedicació amb les dades dels arrays.

Un especial agraïment per al meu apreciadíssim company de pis durant tota la tesi. A tu Pau, per totes les interminables hores d'intercanvis de coneixement. Per entendre'ns i compartir pis amb tanta facilitat, no és fàcil trobar algú com tu!! I per seguir sent un amic després, i poder formar part d'un grup d'amics tant especials: el Marc, el Miki, el Willy, el Baró, el Xino, el Xano, la Maria, la Mariona, el Xeic, el Kapi, el Moreno, el Mancini i el Cinto. Gràcies per ser com sou!!!

A tota la gent de Linyola que han crescut amb mi i m'han format com a persona. Al Pérez i la Èlia, a l'Àlex i la Marta, al Robert i la Montse, al Kubala i la Raquel, al Gerard i la Imma, al Teixi, al Torrades, al Nando, al Perito, i a tots els que em deixo.

Finalment, a la meva família. Als meus pares, per donar-ho tot per mi. Per confiar en mi i abocar la vostra vida sobre la meva. Per deixar-me escollir sempre i donar-me la oportunitat de treballar en allò que m'agrada. I per educar-me de la millor manera possible. I a tu Roger, per ser-hi sempre. Per protegir-me (potser a vegades massa, jeje) i per ensenyar-me allò que no sabia. I per obrir el camí.

L'etapa al Institut ha acabat per donar pas a una nova etapa a la Universitat. I en aquesta nova etapa he conegut a persones excel·lents amb qui espero compartir

grans anys. No us puc dedicar aquí moltes línies, perquè no formeu part d'aquesta tesi, però sí que us agraeixo l'acolliment. Estic segur que ens ho passarem bé.

I finalment a tu Maria, per donar la volta que li faltava a la meua vida.



# ÍNDEX



## **I.- ÍNDEX**

<b>ÍNDEX DE FIGURES.....</b>	<b>PAG 19</b>
<b>ÍNDEX DE TAULES.....</b>	<b>PAG 25</b>
<b>ABREVIATURES.....</b>	<b>PAG 29</b>

## **II.- INTRODUCCIÓ**

### **1.- PROCÉS QUIRÚRGIC DE L'HÈRNIA.**

<b>PROBLEMÀTICA.....</b>	<b>PAG 33</b>
--------------------------	---------------

### **2.- HÈRNIA**

<b>2.1.- DEFINICIÓ.....</b>	<b>PAG 34</b>
-----------------------------	---------------

<b>2.2.- TIPUS.....</b>	<b>PAG 34</b>
-------------------------	---------------

#### **2.3.- HÈRNIA INCISIONAL**

<b>2.3.1.- DEFINICIÓ.....</b>	<b>PAG 34</b>
-------------------------------	---------------

<b>2.3.2.- FACTORS DE RISC.....</b>	<b>PAG 35</b>
-------------------------------------	---------------

<b>2.3.3.- CAUSES DE L'HÈRNIA.....</b>	<b>PAG 36</b>
--	---------------

<b>2.3.4.- TRACTAMENT.....</b>	<b>PAG 37</b>
--------------------------------	---------------

### **3.- PARET ABDOMINAL**

<b>3.1.- ANATOMIA.....</b>	<b>PAG 37</b>
----------------------------	---------------

<b>3.2.- APONEUROSIS O FÀSCIA.....</b>	<b>PAG 38</b>
--	---------------

<b>3.3.- MÚSCUL ESQUELÈTIC.....</b>	<b>PAG 39</b>
-------------------------------------	---------------

### **4.- EL TEIXIT CONNECTIU**

<b>4.1.- DESCRIPCIÓ.....</b>	<b>PAG 41</b>
------------------------------	---------------

<b>4.2.- FUNCIONS.....</b>	<b>PAG 42</b>
----------------------------	---------------

<b>4.3.- TIPUS.....</b>	<b>PAG 42</b>
-------------------------	---------------

<b>4.4.- COMPONENTS DEL TEIXIT CONNECTIU.....</b>	<b>PAG 42</b>
---	---------------

#### **4.5.- MATRIU EXTRACEL·LULAR**

<b>4.5.1.- DESCRIPCIÓ.....</b>	<b>PAG 43</b>
--------------------------------	---------------

<b>4.5.2.- FUNCIONS.....</b>	<b>PAG 43</b>
------------------------------	---------------

4.5.3.- COMPOSICIÓ	
4.5.3.1.- COL·LAGEN.....	PAG 45
4.5.3.2.- GLICOSAMINOGLICANS.....	PAG 50
4.5.3.3.- PROTEOGLICANS.....	PAG 52
4.5.4.- METABOLISME DE LA MEC	
4.5.4.1.- MMPs.....	PAG 54
4.5.4.2.- TIMPs.....	PAG 65
4.5.4.3.- REGULACIÓ MMPs/TIMPs.....	PAG 66
4.6.- CÈL·LULES QUE SECRETEN LA MEC	
4.6.1.- TIPUS.....	PAG 68
4.6.2.- EL FIBROBLAST.....	PAG 68
4.6.3.- FUNCIONS DEL FIBROBLAST.....	PAG 71
4.7.- INTERACCIÓ CÈL·LULA – MATRIU	
4.7.1.- ADHESIÓ.....	PAG 72
4.7.2.- PROLIFERACIÓ.....	PAG 74
4.7.3.- APOPTOSI.....	PAG 75
4.7.4.- INFLAMACIÓ.....	PAG 76
5.- BIOMATERIALS	
5.1.- HISTÒRIA.....	PAG 78
5.2.- TIPUS DE MALLES.....	PAG 80
5.3.- INTERACCIÓ CÈL·LULA – MATERIAL.....	PAG 82
5.4.- RESPOSTA CEL·LULAR.....	PAG 84
<b>III.- JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL.....</b>	<b>PAG 87</b>
<b>IV.- HIPÒTESI.....</b>	<b>PAG 91</b>
<b>V.- OBJECTIUS.....</b>	<b>PAG 95</b>

## **VI.- MATERIAL I MÈTODES**

### **1.- PACIENTS**

#### **1.1.- SUBJECTES D'ESTUDI**

**1.1.1.- CASOS..... PAG 101**

**1.1.2.- CONTROLS..... PAG 102**

**1.2.- CRITERIS D'EXCLUSIÓ..... PAG 102**

### **2.- MOSTRES**

**2.1.- BIÒPSIES..... PAG 102**

**2.2.- ANÀLISIS HISTOLÒGICS..... PAG 103**

#### **2.3.- CULTIU CEL·LULAR**

**2.3.1.- MATERIAL DE CULTIUS..... PAG 103**

**2.3.2.- OBTENCIÓ..... PAG 103**

**2.3.3.- MANTENIMENT DELS CULTIUS..... PAG 104**

**2.3.4.- CREIXEMENT CEL·LULAR..... PAG 104**

### **3.- MÈTODES DE BIOLOGIA MOLECULAR**

#### **3.1.- EXTRACCIÓ D'RNA**

**3.1.1.- TEIXIT..... PAG 105**

**3.1.2.- CÈL·LULES..... PAG 106**

**3.2.- QUANTIFICACIÓ D'RNA..... PAG 106**

**3.3.- VALORACIÓ DE LA QUALITAT DE L'RNA.. PAG 107**

**3.4.- RT-PCR SEMIQUANTITATIVA..... PAG 107**

**3.5.- RT-PCR SEMIQUANTITATIVA MÚLTIPLE.. PAG 110**

**3.6.- PCR EN TEMPS REAL..... PAG 112**

#### **3.7.- ARRAYS D'EXPRESSIÓ**

**3.7.1.- QUALITAT DEL XIP..... PAG 120**

##### **3.7.2.- PROCESSAT I ANÀLISI**

**ESTADÍSTIC..... PAG 120**

**3.7.3.- SIGNIFICAT BIOLÒGIC..... PAG 122**

#### 4.- MÈTODES BIOQUÍMICS

##### 4.1.- EXTRACCIÓ DE PROTEÏNA

4.1.1.- TEIXIT..... PAG 123

##### 4.1.2.- CÈL·LULES

4.1.2.1.- EXTRACTE CEL·LULAR..... PAG 124

4.1.2.2.- MEDI CEL·LULAR..... PAG 124

4.2.- CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNA..... PAG 125

4.3.- QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNA..... PAG 126

4.4.- ELECTROFORESI..... PAG 127

4.5.- IMMUNOTRANSFERÈNCIA..... PAG 131

4.6.- ZIMOGRÀFIA I ZIMOGRÀFIA REVERSA..... PAG 135

#### 5.- MÈTODES DE BIOLOGIA CEL·LULAR

##### 5.1.- IMMUNOFLUORESCÈNCIA

5.1.1.- MÈTODE..... PAG 136

5.1.2.- PROLIFERACIÓ..... PAG 139

5.2.- APOPTOSI..... PAG 140

#### 6.- BIOMATERIALS

6.1.- MALLA DE POLIPROPILÈ..... PAG 141

##### 6.2.- MÈTODES DE CARACTERITZACIÓ FÍSICA

6.2.1.- TOPOGRÀFIA..... PAG 141

6.2.2.- ABSORBIBILITAT..... PAG 144

##### 6.3.- MÈTODES BIOLÒGICS

6.3.1.- ADSORCIÓ DE PROTEÏNA..... PAG 148

6.3.2.- TRACTAMENT PREVI..... PAG 148

6.3.3.- TEST DE CITOTOXICITAT..... PAG 148

##### 6.3.4.- SEMBRA I CREIXEMENT DE

CÈL·LULES..... PAG 149

6.3.5.- ASSAIG DE VIABILITAT..... PAG 150

6.3.6.- IMMUNOFLUORESCÈNCIA..... PAG 150

6.3.7 APOPTOSI.....	PAG 151
<b>7.- MÈTODES ESTADÍSTICS</b>	
7.1.- ANÀLISI ESTADÍSTIC GENERAL.....	PAG 151
7.2.- ANÀLISI DE DADES MULTIVARIANTS	
7.2.1.- ANÀLISI DE COMPONENTS PRINCIPALS.....	PAG 152
7.2.2.- ANÀLISI DE REGRESSIONS MÚLTIPLES.....	PAG 153
<b>VII.- RESULTATS</b>	
<b>CAPÍTOL I: DESREGULACIÓ DE LA SENYALITZACIÓ INFLAMATÒRIA I LA RELACIÓ MMPs/TIMPs EN ELS TEIXITS DE L'HÈRNIA INCISIONAL HUMANA</b>	
1.- PACIENTS.....	PAG 159
2.- DESESTRUCTURACIÓ I PÈRDUA DE LA MATRIU EXTRACEL·LULAR.....	PAG 160
3.- METABOLISME DE LA MATRIU EXTRACEL·LULAR	
3.1.- NIVELLS DE COL·LAGEN.....	PAG 163
3.2.- AUGMENT DELS NIVELLS DE METAL·LOPROTEASES DE MATRIU.....	PAG 166
3.3.- DISMINUCIÓ EN ELS NIVELLS DELS INHIBIDORS TISSULARS DE LES METAL·LOPROTEASES DE MATRIU.....	PAG 169
3.4.- DESREGULACIÓ EN LA RELACIÓ MMPs/TIMPs.....	PAG 171
4.- SENYALITZACIÓ PRO-INFLAMATÒRIA.....	PAG 173
5.- CONJUNT DE MOLÈCULES QUE CONTROLLEN EL PROCÉS.....	PAG 175

**CAPÍTOL II: PERFILS D'EXPRESSIONI GÈNICA DELS FIBROBLASTS DE FÀSCIA I DE MÚSCUL ESQUELÈTIC EN L'HÈRNIA INCISIONAL HUMANA**

<b>1.- PACIENTS.....</b>	<b>PAG 183</b>
<b>2.- XIPS D'EXPRESSIONI GÈNICA</b>	
<b>2.1.- VALIDACIÓ.....</b>	<b>PAG 185</b>
<b>2.2.- L'EXPRESSIONI GÈNICA DELS FIBROBLASTS D'APONEUROSIS DE PACIENTS AMB HÈRNIA INCISIONAL ÉS DIFERENT A LA DELS PACIENTS CONTROL.....</b>	<b>PAG 186</b>
<b>2.3.- L'EXPRESSIONI GÈNICA DELS FIBROBLASTS DE MÚSCUL ESQUELÈTIC DE PACIENTS AMB HÈRNIA INCISIONAL ÉS DIFERENT A LA DELS PACIENTS CONTROL.....</b>	<b>PAG 193</b>
<b>2.4.- RUTES ALTERADES</b>	
<b>2.4.1.- GENE ONTOLOGY.....</b>	<b>PAG 197</b>
<b>2.4.2.- KEGG.....</b>	<b>PAG 200</b>
<b>2.4.3.- INGENUITY PATHWAY ANALYSIS..</b>	<b>PAG 201</b>
<b>3.- ELS GENS COMPROVATS PER PCR EN TEMPS REAL CORRELACIONEN AMB ELS RESULTATS DELS XIPS D'EXPRESSIONI GÈNICA.....</b>	<b>PAG 208</b>
<b>4.- AGRECÀ.....</b>	<b>PAG 210</b>
<b>5.- REELINA.....</b>	<b>PAG 213</b>
<b>6.- CHITINASE 3-LIKE 1.....</b>	<b>PAG 217</b>
<b>7.- NOUS CONTROLS ENDÒGENS PER ALS FIBROBLASTS PROCEDENTS D'APONEUROSIS I MÚSCUL ESQUELÈTIC.....</b>	<b>PAG 223</b>



**CAPÍTOL III: INFLUÈNCIA DEL POLIPROPILÈ EN LES PROPIETATS CEL·LULARS DELS FIBROBLASTS DE FÀSCIA EN L'HÈRNIA INCISIONAL HUMANA**

<b>1.- PACIENTS.....</b>	<b>PAG 227</b>
<b>2.- PROPIETATS FÍSQUES DEL BIOMATERIAL</b>	
<b>2.1.- TOPOGRAFIA.....</b>	<b>PAG 228</b>
<b>2.2.- ANGLE DE CONTACTE I ENERGIA LLIURE DE SUPERFÍCIE.....</b>	<b>PAG 229</b>
<b>3.- ADSORCIÓ DE PROTEÏNA.....</b>	<b>PAG 230</b>
<b>4.- TOXICITAT DE L'AGAROSA.....</b>	<b>PAG 231</b>
<b>5.- DISMINUCIÓ DEL NOMBRE DE FIBROBLASTS D'HÈRNIA.....</b>	<b>PAG 231</b>
<b>6.- CITOTOXICITAT.....</b>	<b>PAG 232</b>
<b>7.- CANVIS EN ELS PERFILS DE MOLÈCULES D'ADHESIÓ</b>	
<b>7.1.- REDISTRIBUCIÓ DE LA VINCULINA.....</b>	<b>PAG 234</b>
<b>7.2.- DESAPARICIÓ DE LA TENSINA.....</b>	<b>PAG 236</b>
<b>8.- CANVIS EN MOLÈCULES DEL CITOESQUELET</b>	
<b>8.1.- REORGANITZACIÓ DE L'ACTINA.....</b>	<b>PAG 238</b>
<b>8.2.- REORGANITZACIÓ DE LA VIMENTINA.....</b>	<b>PAG 240</b>
<b>9.- DISMINUCIÓ EN LA PROLIFERACIÓ DELS FIBROBLASTS.....</b>	<b>PAG 242</b>
<b>10.- AUGMENT DE L'APOPTOSI EN CONTACTE AMB LA MALLA DE POLIPROPILÈ.....</b>	<b>PAG 244</b>

**VIII.- DISCUSSIÓ**

<b>CAPÍTOL I.....</b>	<b>PAG 249</b>
<b>CAPÍTOL II.....</b>	<b>PAG 252</b>
<b>CAPÍTOL III.....</b>	<b>PAG 258</b>

**IX.- CONCLUSIONS..... PAG 265**

**X.- BIBLIOGRAFIA..... PAG 271**

## INTRODUCCIÓ

<b>FIGURA I1.- PROCÉS DE FORMACIÓ D'UNA HÈRNIA.....</b>	<b>PAG 35</b>
<b>FIGURA I2.- ESQUEMA DE L'ANATOMIA DE LA PARET ABDOMINAL. ....</b>	<b>PAG 38</b>
<b>FIGURA I3.- ESQUEMA DE LA CONTRACCIÓ MUSCULAR.....</b>	<b>PAG 40</b>
<b>FIGURA I4.- REPETICIONS PERIÒDIQUES EN LA CADENA DE COL·LAGEN.....</b>	<b>PAG 46</b>
<b>FIGURA I5.- AGREGACIÓ DE LES MOLÈCULES DE COL·LAGEN.....</b>	<b>PAG 48</b>
<b>FIGURA I6.- ARBRE FILOGENÈTIC DELS DIFERENTS TIPUS DE MMPs.....</b>	<b>PAG 56</b>
<b>FIGURA I7.- ORIGEN I FUNCIONS DEL FIBROBLAST EN CONDICIONS NORMALS I PATOLÒGIQUES.....</b>	<b>PAG 70</b>

## MATERIAL I MÈTODES

<b>FIGURA M1.- COMPARACIÓ ENTRE ELS DOS TIPUS DE PCR EN TEMPS REAL.....</b>	<b>PAG 113</b>
<b>FIGURA M2.- CORBA DE DISSOCIACIÓ D'UN AMPLICÓ.....</b>	<b>PAG 117</b>
<b>FIGURA M3.- EXEMPLE DE CORBA D'AMPLIFICACIÓ DE PCR EN TEMPS REAL.....</b>	<b>PAG 118</b>
<b>FIGURA M4.- VOLUMS PER PREPARAR EL GEL SEPARADOR.....</b>	<b>PAG 129</b>
<b>FIGURA M5.- VOLUMS PER PREPARAR EL GEL CONCENTRADOR.....</b>	<b>PAG 130</b>
<b>FIGURA M6.- ESQUEMA DEL MUNTATGE DE TRANSFERÈNCIA.....</b>	<b>PAG 132</b>
<b>FIGURA M7.- ESQUEMA DEL FUNCIONAMENT D'UN INTERFERÒMETRE.....</b>	<b>PAG 142</b>
<b>FIGURA M8.- REPRESENTACIÓ TRIDIMENSIONAL DE LES D'INTERFERÈNCIA.....</b>	<b>PAG 143</b>

<b>FIGURA M9.- REPRESENTACIÓ GRÀFICA DELS PARÀMETRES DE RUGOSITAT ANALITZATS.....</b>	<b>PAG 144</b>
<b>FIGURA M10.- ESQUEMA D'UN SÒLID HIDROFÍLIC I D'UN SÒLID HIDROFÒBIC.....</b>	<b>PAG 145</b>
<b>FIGURA M11.- ANGLE DE CONTACTE I ENERGIES LLIURES QUE PARTICIPEN EN LA INTERACCIÓ ENTRE UNA GOTA I UNA SUPERFÍCIE SÒLIDA.....</b>	<b>PAG 146</b>

## **RESULTATS**

<b>FIGURA R1.- IMATGES REPRESENTATIVES DE LES SECCIONS TENYIDES AMB HEMATOXILINA/EOSINA.....</b>	<b>PAG 161</b>
<b>FIGURA R2.- IMATGES REPRESENTATIVES DE LES SECCIONS TENYIDES AMB TRICRÒMIC DE MASSON.....</b>	<b>PAG 162</b>
<b>FIGURA R3.- IMATGES REPRESENTATIVES DE LES SECCIONES TENYIDES AMB BLAU D'ALCIAN.....</b>	<b>PAG 163</b>
<b>FIGURA R4.- IMATGES REPRESENTATIVES DELS GELS D'AGAROSA DELS PRODUCTES DE LES PCRS SEMIQUANTITATIVES DE COL·LÀGENS.....</b>	<b>PAG 164</b>
<b>FIGURA R5.- ANÀLISI GRÀFICA DE LES PCR SEMIQUANTITATIVES I LES IMMUNOTRANSFERÈNCIES (IT) DELS COL·LÀGENS.....</b>	<b>PAG 165</b>
<b>FIGURA R6.- IMATGES REPRESENTATIVES DE LES IMMUNOTRANSFERÈNCIES DELS COL·LÀGENS.....</b>	<b>PAG 166</b>
<b>FIGURA R7.- IMATGES REPRESENTATIVES DELS GELS D'AGAROSA DELS PRODUCTES DE LES PCRS SEMIQUANTITATIVES DE LES MMPs.....</b>	<b>PAG 167</b>
<b>FIGURA R8.- ANÀLISI GRÀFICA DE LES PCR SEMIQUANTITATIVES, LES IMMUNOTRANSFERÈNCIES (IT) I LES ZIMOGRÀFIES DE LES MMPs.....</b>	<b>PAG 167</b>
<b>FIGURA R9.- IMATGES REPRESENTATIVES DE LES ZIMOGRÀFIES PER DETECTAR LES MMPs.....</b>	<b>PAG 168</b>
<b>FIGURA R10.- IMATGES REPRESENTATIVES DELS GELS D'AGAROSA DELS PRODUCTES DE LES PCRS SEMIQUANTITATIVES DELS TIMPs.....</b>	<b>PAG 169</b>

**FIGURA R11.- ANÀLISI GRÀFICA DE LES PCR SEMIQUANTITATIVES, LES IMMUNOTRANSFERÈNCIES (IT) I LA ZIMOGRÀFIA REVERSA DELS TIMPs..... PAG 170**

**FIGURA R12.- IMATGES REPRESENTATIVES DE LES IMMUNOTRANSFERÈNCIES I LA ZIMOGRÀFIA REVERSA PER DETECTAR ELS TIMPs..... PAG 171**

**FIGURA R13.- RELACIONS ENTRE MMPs/TIMPs EN ELS TRANSCRITS DE APONEUROSIS I MÚSCUL ESQUELÈTIC..... PAG 172**

**FIGURA R14.- IMATGES REPRESENTATIVES DELS GELS D'AGAROSA DELS PRODUCTES DE LES PCRs SEMIQUANTITATIVES DE LES MOLÈCULES PRO-INFLAMATÒRIES..... PAG 173**

**FIGURA R15.- ANÀLISI GRÀFICA DE LES PCR SEMIQUANTITATIVES I LES IMMUNOTRANSFERÈNCIES (IT) DELS MOLÈCULES PRO-INFLAMATÒRIES..... PAG 174**

**FIGURA R16.- IMATGES REPRESENTATIVES DE LES IMMUNOTRANSFERÈNCIES DE LES MOLÈCULES PRO-INFLAMATÒRIES..... PAG 175**

**FIGURA R17.- GRÀFICA DE LA POSICIÓ DE CADA MOLÈCULA EN CADASCUN DELS COMPONENTS PRINCIPALS (CP) PER A CADA TEIXIT EN ELS PACIENTS AMB I SENSE HI..... PAG 176**

**FIGURA R18.- GRÀFIC DELS ERRORS ESTÀNDARD DELS XIPS ABANS I DESPRÉS D'ELIMINAR ELS DOS XIPS QUE NO VAN SUPERAR EL FILTRATGE..... PAG 185**

**FIGURA R19.- XARXA DE MORFOLOGIA DE LA CÈL·LULA, DESENVOLUPAMENT CEL·LULAR I MALALTIA CARDIOVASCULAR DE L'IPA A PARTIR DEL LLISTAT DE GENS DIFERENCIALMENT EXPRESSATS EN ELS FIBROBLASTS PROCEDENTS DE L'APONEUROSIS DE PACIENTS AMB HI..... PAG 203**

**FIGURA R20.- XARXA DE CICLE CEL·LULAR, ASSEMBLATGE I ORGANITZACIÓ CEL·LULAR, I REPLICACIÓ, RECOMBINACIÓ I REPARACIÓ DEL DNA DE L'IPA A PARTIR DEL LLISTAT DE GENS DIFERENCIALMENT EXPRESSATS EN ELS FIBROBLASTS PROCEDENTS DE L'APONEUROSIS DE PACIENTS AMB HI..... PAG 204**

<b>FIGURA R21.- XARXA DE CÀNCER, CREIXEMENT I PROLIFERACIÓ CEL·LULAR, I DESENVOLUPAMENT DE L'ORGANISME DE L'IPA A PARTIR DEL LLISTAT DE GENS DIFERENCIALMENT EXPRESSATS EN ELS FIBROBLASTS PROCEDENTS DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC DE PACIENTS AMB HI.....</b>	<b>PAG 206</b>
<b>FIGURA R22.- XARXA DE CÀNCER, DESENVOLUPAMENT CEL·LULAR, I CREIXEMENT I PROLIFERACIÓ CEL·LULARS DE L'IPA A PARTIR DEL LLISTAT DE GENS DIFERENCIALMENT EXPRESSATS EN ELS FIBROBLASTS PROCEDENTS DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC DE PACIENTS AMB HI.....</b>	<b>PAG 207</b>
<b>FIGURA R23.- IMMUNOTRANSFERÈNCIES DE AGC1.....</b>	<b>PAG 211</b>
<b>FIGURA R24.- <i>FOLD CHANGE</i> (FC) DE AGC1 EN LES DIFERENTS TÈCNiques UTILITZADES.....</b>	<b>PAG 211</b>
<b>FIGURA R25.- MOLÈCULES QUE INTERACCIONEN AMB L'AGC1.....</b>	<b>PAG 213</b>
<b>FIGURA R26.- IMMUNOTRANSFERÈNCIES DE RELN.....</b>	<b>PAG 214</b>
<b>FIGURA R27.- IMMUNOFLUORESCÈNCIA DE RELN.....</b>	<b>PAG 215</b>
<b>FIGURA R28.- <i>FOLD CHANGE</i> (FC) DE RELN EN LES DIFERENTS TÈCNiques UTILITZADES.....</b>	<b>PAG 215</b>
<b>FIGURA R29.- MOLÈCULES QUE INTERACCIONEN AMB LA RELN.....</b>	<b>PAG 216</b>
<b>FIGURA R30.- RUTA DE SENYALITZACIÓ DE RELN EN NEURONES.....</b>	<b>PAG 217</b>
<b>FIGURA R31.- IMMUNOTRANSFERÈNCIES DE CHI3L1.....</b>	<b>PAG 218</b>
<b>FIGURA R32.- IMMUNOFLUORESCÈNCIA DE CHI3L1.....</b>	<b>PAG 219</b>
<b>FIGURA R33.- <i>FOLD CHANGE</i> (FC) DE CHI3L1 EN LES DIFERENTS TÈCNiques UTILITZADES.....</b>	<b>PAG 220</b>
<b>FIGURA R34.- MOLÈCULES QUE INTERACCIONEN AMB LA CHI3L1.....</b>	<b>PAG 221</b>
<b>FIGURA R35.- RUTA DE SENYALITZACIÓ DE ONCOSTATIN M QUE REGULA L'EXPRESSIÓ DE CHI3L1 I ALTRES MOLÈCULES.....</b>	<b>PAG 222</b>
<b>FIGURA R36.- IMMUNOTRANSFERÈNCIES DE SEC63 I DE DESMINA.....</b>	<b>PAG 223</b>
<b>FIGURA R37.- PERCENTATGE DE PROTEÏNA ADSORBIDA EN EL POLIESTIRÈ I EL POLIPROPILÈ.....</b>	<b>PAG 230</b>

**FIGURA R38.-** PERCENTATGE DE VIABILITAT DELS MONÒCITS THP-1 CULTIVATS EN PRESENÇA O ABSÈNCIA D'AGAROSA AL 2%.... PAG 231

**FIGURA R39.-** CREIXEMENT DELS FIBROBLASTS EN CONTACTE AMB LA MALLA DE POLIPROPILÈ..... PAG 232

**FIGURA R40.-** IMATGES DE LES TINCIONS AMB CALCEÏNA I ETHD-1 ALS FIBROBLASTS SEMBRATS EN POLIESTIRÈ O POLIPROPILÈ..... PAG 233

**FIGURA R41.-** PERCENTATGE DE CÈL·LULES MORTES EN EL POLIESTIRÈ I EN EL POLIPROPILÈ..... PAG 234

**FIGURA R42.-** IMATGES DE LES TINCIONS PER VINCULINA I DAPI ALS FIBROBLASTS SEMBRATS EN POLIESTIRÈ I POLIPROPILÈ..... PAG 235

**FIGURA R43.-** IMATGES DE LES TINCIONS PER TENSINA I DAPI ALS FIBROBLASTS SEMBRATS EN POLIESTIRÈ I POLIPROPILÈ..... PAG 237

**FIGURA R44.-** IMATGES DE LES TINCIONS PER ACTINA I DAPI ALS FIBROBLASTS SEMBRATS EN POLIESTIRÈ I POLIPROPILÈ..... PAG 239

**FIGURA R45.-** IMATGES DE LES TINCIONS PER VIMENTINA I DAPI ALS FIBROBLASTS SEMBRATS EN POLIESTIRÈ I POLIPROPILÈ..... PAG 241

**FIGURA R46.-** PERFIL DE CREIXEMENT DELS FIBROBLASTS DURANT ELS TRES PRIMERS PASSIS DESPRÉS DE L'EXTRACCIÓ A PARTIR DE LA BIÒPSIA..... PAG 242

**FIGURA R47.-** IMATGES DE LES TINCIONS PER BRDÜ I DAPI ALS FIBROBLASTS SEMBRATS EN POLIESTIRÈ O POLIPROPILÈ..... PAG 243

**FIGURA R48.-** PERCENTATGE DE PROLIFERACIÓ DELS FIBROBLASTS EN EL POLIESTIRÈ I EN EL POLIPROPILÈ..... PAG 244

**FIGURA R49.-** IMATGES DE LES TINCIONS PER TUNEL I DAPI ALS FIBROBLASTS SEMBRATS EN POLIESTIRÈ O POLIPROPILÈ..... PAG 245

**FIGURA R50.-** PERCENTATGE D'APOPTOSI DELS FIBROBLASTS EN EL POLIESTIRÈ I EN EL POLIPROPILÈ..... PAG 246





## INTRODUCCIÓ

<b>TAULA I1.- CARACTERÍSTIQUES DELS 12 COL·LÀGENS MÉS ESTUDIATS.....</b>	<b>PAG 48</b>
<b>TAULA I2.- TIPUS DE GLICOSAMINOGLICANS (GAGs) DESCRITS I LA SEVA LOCALITZACIÓ MÉS HABITUAL.....</b>	<b>PAG 51</b>
<b>TAULA I3.- DIFERENTS TIPUS DE MMPs I ELS SEUS SUBSTRATS.....</b>	<b>PAG 58</b>
<b>TAULA I4.- EFECTES D'ALGUNES DE LES CITOQUINES EN L'EXPRESSIÓ DE LES MMPs I ELS TIMPs.....</b>	<b>PAG 68</b>
<b>TAULA I5.- PROPIETATS D'UN MATERIAL I INFORMACIÓ SUPERFICIAL QUE APORTEN.....</b>	<b>PAG 84</b>

## MATERIAL I MÈTODES

<b>TAULA M1.- ESQUEMA BASE DE LES PCRS REALITZADES.....</b>	<b>PAG 109</b>
<b>TAULA M2.- ENCEBADORS UTILITZATS EN L'AMPLIFICACIÓ GÈNICA PER RT-PCR.....</b>	<b>PAG 110</b>
<b>TAULA M3.- GENS AMPLIFICATS EN LA RT-PCR SEMIQUANTITATIVA MÚLTIPLE.....</b>	<b>PAG 111</b>
<b>TAULA M4.- ESQUEMA DE LA RT-PCR MÚLTIPLE.....</b>	<b>PAG 112</b>
<b>TAULA M5.- ENCEBADORS UTILITZATS EN LA PCR EN TEMPS REAL.....</b>	<b>PAG 115</b>
<b>TAULA M6.- ESQUEMA DE LA PCR EN TEMPS REAL.....</b>	<b>PAG 116</b>
<b>TAULA M7.- RANG EFECTIU DE SEPARACIÓ DE LES PROTEÏNES.....</b>	<b>PAG 127</b>
<b>TAULA M8.- ANTICOSSOS PRIMARIS UTILITZATS PER DETECTAR LES PROTEÏNES ESPECÍFIQUES EN LES IMMUNOTRANSFERÈNCIES.....</b>	<b>PAG 133</b>
<b>TAULA M9.- ANTICOSSOS SECUNDARIS UTILITZATS EN LES IMMUNOTRANSFERÈNCIES.....</b>	<b>PAG 134</b>
<b>TAULA M10.- ANTICOSSOS PRIMARIS UTILITZATS EN LA IMMUNOFLUORESCÈNCIA.....</b>	<b>PAG 138</b>

**TAULA M11.- ANTICOSSOS SECUNDARIS EMPRATS EN LA IMMUNOFLUORESCÈNCIA..... PAG 138**

**TAULA M12.- TENSIONS SUPERFICIALS I LES SEVES COMPONENTS (EN mN/M) DELS 4 LÍQUIDS UTILITZATS EN L'ANÀLISI DE L'ANGLE DE CONTACTE..... PAG 147**

## **RESULTATS**

**TAULA R1.- CARACTERÍSTIQUES DELS PACIENTS INCLOSOS EN L'ESTUDI..... PAG 160**

**TAULA R2.- FACTORS DE CÀRREGA DE CADASCUNA DE LES MOLÈCULES PER A LES DUES COMPONENTS PRINCIPALS..... PAG 179**

**TAULA R3.- ANÀLISI DE REGRESSIONS MÚLTIPLES EN SENTIT INVERS..... PAG 180**

**TAULA R4.- CARACTERÍSTIQUES DELS PACIENTS INCLOSOS EN L'ESTUDI..... PAG 184**

**TAULA R5.- GENS DIFERENCIALMENT EXPRESSATS EN ELS FIBROBLASTS D'APONEUROSIS DE PACIENTS AMB HI..... PAG 187**

**TAULA R6.- GENS DIFERENCIALMENT EXPRESSATS EN ELS FIBROBLASTS DE MÚSCUL ESQUELÈTIC DE PACIENTS AMB HI..... PAG 193**

**TAULA R7.- PROCESSOS IDENTIFICATS ENTRE ELS GENS DIFERENCIALMENT SOBRE-EXPRESSATS EN ELS FIBROBLASTS PROCEDENTS DE L'APONEUROSIS DE PACIENTS AMB HI SEGONS EL *GENE ONTOLOGY*..... PAG 198**

**TAULA R8.- PROCESSOS IDENTIFICATS ENTRE ELS GENS DIFERENCIALMENT INFRA-EXPRESSATS EN ELS FIBROBLASTS PROCEDENTS DE L'APONEUROSIS DE PACIENTS AMB HI SEGONS EL *GENE ONTOLOGY*..... PAG 199**

**TAULA R9.- PROCESSOS IDENTIFICATS ENTRE ELS GENS DIFERENCIALMENT SOBRE-EXPRESSATS EN ELS FIBROBLASTS PROCEDENTS DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC DE PACIENTS AMB HI SEGONS EL *GENE ONTOLOGY*..... PAG 199**

**TAULA R10.-** PROCESSOS IDENTIFICATS ENTRE ELS GENS DIFERENCIALMENT INFRA-EXPRESSATS EN ELS FIBROBLASTS PROCEDENTS DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC DE PACIENTS AMB HI SEGONS EL *GENE ONTOLOGY*..... PAG 200

**TAULA R11.-** RUTES ALTERADES OBTINGUDES MITJANÇANT *KEGG* A PARTIR DELS GENS DIFERENCIALMENT EXPRESSATS..... PAG 201

**TAULA R12.-** RUTES ALTERADES IDENTIFICADES MITJANÇANT EL SOFTWARE *INGENUITY PATHWAYS ANALYSIS* EN ELS FIBROBLASTS DE L'APONEUROSIS DELS PACIENTS AMB HI..... PAG 202

**TAULA R13.-** RUTES ALTERADES IDENTIFICADES MITJANÇANT EL SOFTWARE *INGENUITY PATHWAYS ANALYSIS* EN ELS FIBROBLASTS DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC DELS PACIENTS AMB HI..... PAG 205

**TAULA R14.-** GENS COMPROVATS PER PCR EN TEMPS REAL..... PAG 209

**TAULA R15.-** CARACTERÍSTIQUES DELS PACIENTS INCLOSOS EN L'ESTUDI..... PAG 228

**TAULA R16.-** PARÀMETRES DE RUGOSITAT SUPERFICIAL DE LES MALLES DE POLIPROPILÈ I EL POLIESTIRÈ..... PAG 229

**TAULA R17.-** ANGLES DE CONTACTE PARÀMETRES CALCULATS DE TENSÍO SUPERFICIAL DEL POLIPROPILÈ I EL POLIESTIRÈ..... PAG 229



---

# ABREVIATURES

- ACAN (AGC 1): AGRECÀ
- BCA: ÀCID BICINCONÍNIC
- BRDU: 5-BROMO-2'-DEOXYURIDINE
- BSA: ALBÚMINA SÈRICA BOVINA
- cDNA: DNA COMPLEMENTARI
- CHI3L1: QUITINASA-3 SIMILAR A 1
- cRNA: RNA CÒPIA
- DAPI: 4',6-DIAMIDINO-2-PHENYLINDOLE
- DES: DESMINA
- DMEM: DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM
- DNA: ÀCID DESOXIRIBONUCLEIC
- FAK: CINASA D'ADHESIONS FOCALS
- FBS: SÈRUM BOVÍ FETAL
- FC: FOLD CHANGE
- GAGs: GLICOSAMINOGLICANS
- GO: GENE ONTOLOGY
- HI: HÈRNIA INCISIONAL
- IL: INTERLEUCINA
- IPA: INGENUITY PATHWAYS ANALYSIS
- ISEL: IN SITU END LABELING
- KEGG: KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES
- MEC: MÀTRIU EXTRACEL·LULAR
- mRNA: RNA MISSATGER
- PBS: TAMPÓ FOSFAT SALÍ
- PCA: ANÀLISI DE COMPONENTS PRINCIPALS
- PCNA: ANTIGEN NUCLEAR DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR
- PCR: REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA
- PFA: PARAFORMALDEHID
- PFAK: CINASA D'ADHESIONS FOCALS FOSFORILADA
- PP: POLIPROPILÈ
- PS: POLIESTIRÈ
- RELN: REELINA
- RNA: ÀCID RIBONUCLEIC

- **RNASES: RIBONUCLEASES**
- **RT-PCR: *REVERSE TRANSCRIPTION PCR***
- **SDS: SODIUM DODECYL SULFATE**
- **SEM: ERROR ESTÀNDARD DE LA MITJA**
- **TAC: TOMOGRAFIA AXIAL COMPUTADA**
- **TCA: ÀCID TRICLORACÈTIC**
- **TdT: TERMINAL DEOXYNUCLEOTYDIL TRANSFERASE**
- **TGF- $\beta$ : FACTOR DE CREIXEMENT TRANSFORMANT**
- **TNF- $\alpha$ : FACTOR DE NECROSI TUMORAL**
- **TUNEL: TdT-MEDIATED dUTP NICK END LABELING**
- **$\alpha$ -SMA: ACTINA ALFA DE MÚSCUL LLIS**

# INTRODUCCIÓ





### **1.- Procés quirúrgic de l'hèrnia. Problemàtica.**

L'hèrnia incisional (HI) abdominal és un problema clínic i socio-sanitari freqüent. És una complicació quirúrgica que afecta a pràcticament el 20% dels pacients que han estat operats mitjançant laparotomia abdominal (1,2), sigui quina sigui la naturalesa de l'operació (càncer de còlon, apendicectomia, trauma abdominal, cesària, etc.). A més, la incidència real podria estar subestimada, ja que entre un 8-29% de les HI són asimptomàtiques i no poden ser detectades sense un examen físic minuciós (3,4) o fins i tot requerir d'una tomografia axial computada (TAC)(5). Aquesta elevada incidència acumulada, juntament amb una gran reincidència en els pacients tractats per HI (un 35% en la primera reparació i un 38% en la segona) (2), suposa una despesa important per al Sistema Nacional de Salut. A més, alguns factors com la durada de l'operació (6) poden allargar el post-operatori, de manera que el pacient ha de passar més temps a l'hospital.

El problema, a més, afecta també a la vida quotidiana del pacient. Tot i que el símptoma més evident és l'aparició d'una protuberància, aquesta pot trigar en aparèixer, de manera que els pacients esdevenen portadors silencis. Durant aquest temps, els pacients poden experimentar un seguit de símptomes com dolor, malestar, nàusees, vòmits i, fins i tot, la incapacitat de tenir moviments intestinals. Aquests símptomes solen aparèixer durant la realització d'activitats d'esforç. Quan el malestar o les nàusees esdevenen contínues o severes, existeix una elevada probabilitat que l'hèrnia hagi atrapat o estrangulat les vísceres, fet que requereix d'una intervenció d'urgència.

## 2.- Hèrnia

### 2.1.- Definició

L'hèrnia es defineix com la protrusió d'un teixit o d'un òrgan fora de la cavitat on s'ubica habitualment. Se sol formar quan, per diferents motius, es produeix la disrupció del teixit fibromuscular i cedeix a la pressió del teixit o òrgan que sostenia.

### 2.2.- Tipus

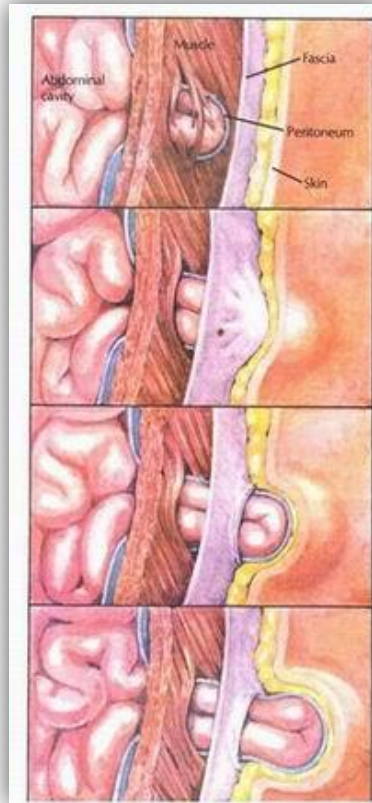
Hi ha molts tipus d'hèrnia en funció de la seva localització i de l'òrgan o teixit afectat:

- Abdominal: Apareix quan les visceres emergeixen per orificis preestablerts anatòmicament (inguinal, umbilical, etc.) o els produïts circumstancialment (incisional).
- De hiat: Es dóna quan part de l'estómac s'introdueix al tòrax, a través del forat que hi ha al diafragma.
- Discal: Es dóna quan part del disc intervertebral es desplaça cap a la medul·la espinal i la pressiona, produint lesions neurològiques derivades.
- Cerebral: És una protrusió del cervell cap a estructures intercraneals deguda a un augment en la pressió intracraneal.

### 2.3.- Hèrnia incisional

#### 2.3.1.- Definició

L'HI abdominal, també anomenada eventració, és un tipus específic d'hèrnia que es produeix en la zona on s'ha produït una incisió, freqüentment la línia mitja abdominal, secundària a una operació quirúrgica abdominal (colecistectomies, tractament de tumors de colon o recte, apendicitis, cesàries, etc.), i n'és la complicació més freqüent. Apareix quan el teixit connectiu (de fàscia i/o de múscul esquelètic) es deteriora i provoca la pèrdua de funcions biològiques i mecàniques, que acaben en una ruptura eventual de la paret de l'abdomen, que cal tractar quirúrgicament (Figura I1).



**Figura II.** Procés de formació d'una hèrnia. Extret de Medicalook (n.d.). Hernia – Symptoms, causes, diagnosis and treatment. De [http://www.medicallook.com/Digestive\\_system/Hernia.html](http://www.medicallook.com/Digestive_system/Hernia.html)

### 2.3.2.- Factors de risc.

Es tracta d'un desordre complex i probablement multifactorial, del qual no es coneixen ni les bases moleculars ni cel·lulars. Es coneix una sèrie de factors de risc que es divideixen principalment en dos grups:

1.- Condicions intrínseques dels pacients, que poden associar-se a una cicatrització alterada: edat, diabetis, tabaquisme, obesitat o infecció de la ferida (7). De fet, la infecció és una de les causes més importants en la formació d'una hèrnia (8). També s'hi inclou l'història familiar.

2.- Condicions associades a la tècnica quirúrgica: El tipus d'incisió elegit durant una intervenció depèn de la preferència del cirurgià, però també ve determinat per les circumstàncies del pacient. A més, el tipus de sutura elegit per realitzar el tancament també juga un paper important en el procés de cicatrització (9).

### 2.3.3.- Causes de l'hèrnia.

La majoria d'HI apareixen en pacients sense historial familiar de defectes en la reparació de ferides (10), fet que implica que se'ls considera candidats quirúrgics sans. Aquests pacients acaben desenvolupant una HI, tot i no presentar defectes de cicatrització. Una de les explicacions que més força havia pres per justificar aquesta discordança és la **hipòtesi d'alteracions en la mecano-transducció**. Aquesta hipòtesi postula que la ruptura mecànica inicial del teixit generada durant la laparotomia induiria un defecte biològic que seria el mecanisme causal de la gènesi de l'HI (11,12). Aquesta ruptura resultaria en la pèrdua de la mecano-transducció, procés pel qual les cèl·lules transformen l'estímul mecànic en senyals químics. Aquest mecanisme és essencial en molts processos fisiològics, com la propiocepció, el tacte o l'oïda, així com en els processos de reparació de les ferides (13,14). Components de les adhesions focals cel·lulars, per exemple, exhibeixen funcions duals bioquímiques i físiques que estan modulades per la força del micro-ambient. Sembla que existiria una arquitectura jeràrquica que manté les cèl·lules i la matriu extracel·lular (MEC) en homeòstasis mecànica i una disrupció de la integritat estructural podria comportar o contribuir a defectes en la reparació de les ferides. Un estudi recent ha demostrat que l'aplicació d'una força mecànica sobre fibroblasts procedents de rata estimula la seva proliferació, l'orientació perpendicular a la direcció de la força, a més d'una major i més ràpida contracció del col·lagen (15). En canvi, quan els fibroblasts són alliberats d'aquest estímul mecànic, perden aquestes propietats adquirides resultant en la incapacitat de reparar la ferida, amb la consegüent formació de l'HI.

Excepte alguns casos amb infeccions greus o dehiscències de la sutura, la formació d'una HI sol ser un procés lent, que pot arribar a trigar anys. Aquesta aparició tardana, més relacionada amb factors intrínsecs dels pacients, juntament amb l'elevada reincidència suggereix que hi pot haver una disfunció biològica subjacent, almenys en un subgrup de pacients. És per això que recentment s'està parlant de la **hipòtesi d'una biologia de l'hèrnia** (10,16), la qual postula que el deteriorament de la paret abdominal es deu a anomalies de la MEC del teixit connectiu. Aquesta

hipòtesi es basa en l'associació entre desordres del teixit connectiu i la predisposició a una formació d'HI. D'aquesta manera, un primer mecanisme biològic proposat va ser relacionar un metabolisme anormal del col·lagen amb l'HI (17-19). De tota manera, estudis recents postulen que aquesta anomalia aniria més enllà, afectant als enzims encarregats del seu metabolisme, les metal·loproteases de matriu (MMPs) (20).

Ambdues hipòtesis podrien ser vàlides i fins i tot compatibles, fet que porta a pensar que una combinació de les dues seria plausible. És a dir, la ferida generada durant l'operació quirúrgica posaria al descobert els defectes intrínsecs del pacient i/o molècules retingudes a la MEC, desencadenant la formació de l'HI al llarg del temps.

#### **2.3.4.- Tractament**

El mètode més estès actualment per el tractament de les eventracions és l'ús de malles protèsiques. Aquestes exerceixen de reforç a la paret abdominal i li disminueixen la càrrega, de manera que permeten una millor cicatrització (21). Tot i que les malles han aconseguit disminuir la reparació de les HI, la taxa de recurrència segueix essent encara massa elevada, i l'aparició, en alguns casos, de complicacions posteriors al tractament qüestionen el seu èxit a llarg termini (22,23). És per això que el sector de producció de malles protèsiques es troba immers en una auge investigadora important, buscant nous constructes a partir de canvis en la mida dels porus o dels filaments dels materials existents que puguin accelerar el tancament de l'HI. Aquesta informació es troba més extensament explicada en l'apartat 5 d'aquesta introducció.

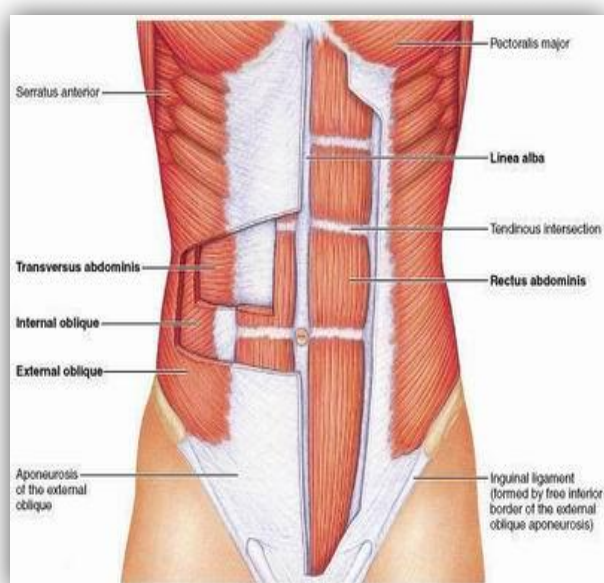
De tota manera, la millor eina mèdica sempre ha estat la prevenció. Estudiar a fons els motius pels quals es generen les HI pot posar de manifest quins són els mecanismes que n'han desencadenat la formació i, per tant, poder actuar en la seva prevenció.

### **3.- Paret abdominal**

#### **3.1.- Anatomia**

L'abdomen és la porció del cos situada entre el tòrax i la pelvis, en mamífers, que conté la cavitat abdominal, separada de la toràcica pel diafragma. La paret abdominal és l'estructura encarregada de mantenir les vísceres al seu interior. La

pressió a la que es veu sotmesa aquesta paret abdominal, en gran part degut al pes dels intestins, és molt gran. Gràcies a les seves propietats mecàniques (24), la paret abdominal és capaç de suportar aquesta pressió i, a la vegada, gràcies a la seva elasticitat (25) pot realitzar moviments sense comprometre la seva estructura. Està formada principalment per múscul esquelètic abdominal, envoltat d'aponeurosi o fàscia, innervacions i vasos sanguinis (Figura I2). Qualsevol defecte en la paret abdominal pot causar la seva fallida i, en conseqüència, comprometre la seva funció.



**Figura I2:** Esquema de l'anatomia de la paret abdominal. Extret de Medicalook (n.d.). Abdominal muscles – Medicalook human anatomy. De [http://www.medicalook.com/human\\_anatomy/organs/Abdominal\\_muscles.html](http://www.medicalook.com/human_anatomy/organs/Abdominal_muscles.html)

### 3.2.- Aponeurosi o fàscia

És una varietat de tendó, amb menor irrigació i innervació, en forma de làmina aplanada. Està formada principalment per fibres de teixit connectiu i fibroblasts. La seva funció principal es la de donar suport mecànic al teixit muscular, ossos, òrgans, nervis i vasos sanguinis, que envolta i aïlla. És responsable també de mantenir la integritat estructural i d'absorbir impactes i té un paper important en els processos hemodinàmics i bioquímics, proveint un medi per a la comunicació intercel·lular (26).

S'ha descrit també com a segona defensa front els agents patògens i infecciosos, després de la pell. Quan es produeix una lesió, és el primer implicat en crear un ambient per a la reparació tissular, alliberant un conjunt de molècules que serviran de químio-atraients i estimularan la proliferació i activació de les cèl·lules implicades en el procés (27).

La fàscia es divideix en tres capes:

- superficial: és subcutània, i alguns no la consideren fàscia.
- profunda: de teixit connectiu fibrós i dens, envolta músculs, ossos, etc.
- i visceral: que manté els òrgans en la seva posició. La capa més superficial dels òrgans està formada per fàscia, que en alguns casos és una fàscia especialitzada (meninges al cervell, pericardi al cor, pleura als pulmons, etc.)

La fàscia profunda, a la vegada, es divideix en:

- endomisi: rodeja les cèl·lules musculars, envoltant cadascuna de les seves fibres.
- perimisi: cobreix les fibres musculars i permet el seu moviment.
- epimisi: envolta tot el múscul.

Els pocs estudis que hi ha sobre l'HI se centren en l'aponeurosi (28), deixant de banda el múscul esquelètic. Com s'ha comentat abans, els estudis se centren principalment en els components de la MEC que la conformen i en algunes de les molècules implicades en el seu metabolisme. Poc es té en compte la seva capacitat d'emmagatzemar molècules que poden ser alliberades en produir-se una ferida i/o una lesió. L'aponeurosi ha estat també estudiada en molts altres desordres del teixit connectiu (connectivo-paties) com el lupus eritematós, esclerodèrmia, fascitis difusa, etc. (29,30), així com en altres hèrnies (com la inguinal; (31)).

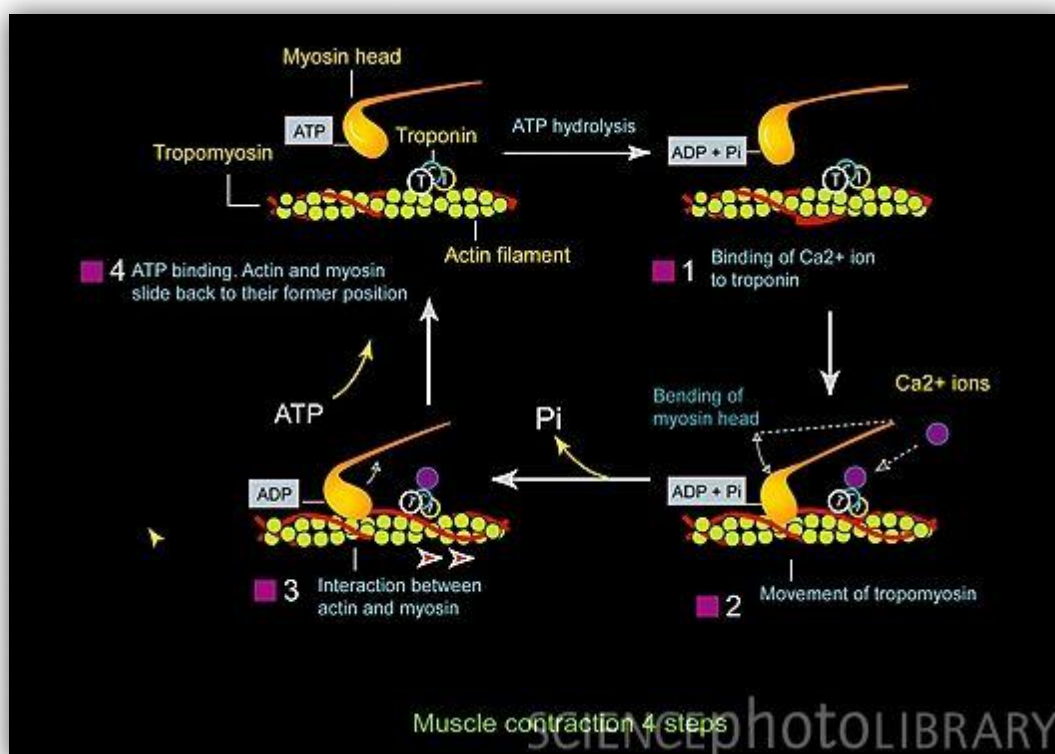
### **3.3.- Múscul esquelètic**

El múscul és un òrgan contràctil format per teixit muscular i envoltat per una membrana de teixit conjuntiu. La seva funció principal és la de proporcionar moviment, gràcies a la seva unitat funcional, la fibra muscular.

Hi ha tres tipus de múscul:

- Estriat o esquelètic: conforma pràcticament el 40% del cos i és de moviment voluntari.
- Llis o visceral: forma part de les parets de les vísceres i és de moviment involuntari.
- Cardíac: present només al cor, és de naturalesa estriada modificada, però de moviment involuntari.

El múscul estriat conforma la musculatura esquelètica del cos i la seva funció principal és el moviment voluntari d'aquesta. Aquest moviment es dona mitjançant la troponina C, un complex que es troba a les fibres d'actina que conformen la fibra muscular i que respon a l'alliberament de calci produït per un estímul nerviós (Figura I3). El calci, unit a la troponina C produeix un canvi de conformació de la troponina T, que afavoreix l'apilament dels caps de la miosina produint la contracció (32).



**Figura I3.** Esquema de la contracció muscular. Extret de Leroy, F (n.d.). *Muscle contraction artwork.* De Biocosmos/Science Photo Library, <http://www.sciencephoto.com/media/150071/enlarge>



A més de produir moviment, el múscul també té altres funcions, com donar estabilitat articular, protegir, mantenir la postura o mantenir òrgans o teixits en la seva posició. En aquest sentit, sembla que el múscul esquelètic podria tenir un paper actiu en la contenció de les vísceres a la seva posició habitual, i qualsevol alteració podria provocar-ne la fallida i, per tant, desembocar en una hèrnia. Quan es produeix una fallida mecànica, el múscul s'atrofia, i es donen processos de fibrosis i canvis en els tipus de fibres musculars, produint un canvi en la distribució de les fibres musculars obliqües i una disminució de l'àrea en la secció transversal de les fibres musculars (33). Aquests canvis es traduirien en una pèrdua de les propietats elàstiques i un augment en la rigidesa, desembocant en una ruptura eventual del teixit.

El múscul és un òrgan amb una adaptabilitat molt gran, capaç de modificar el seu contingut i la seva forma en relativament poc temps. És un òrgan especialment sensible a estímuls pro inflamatoris, que li poden acabar produint una fallida tissular i una pèrdua de massa (34-36). El múscul esquelètic s'ha identificat com un òrgan amb funcions endocrines, capaç de sintetitzar, alliberar i actuar com a reservori de multitud de molècules inflamatòries, anomenades mioquines (37,38). De fet, les cèl·lules musculars no són considerades un tipus de cèl·lula immunològica, però després d'un estímul inflamatori poden actuar com a font cel·lular de mediadors inflamatoris, alliberant una gran varietat de citoquines pro-inflamatòries, quimiocines i molècules d'adhesió cel·lular, contribuint al manteniment i amplificació de la inflamació local (39). A més, *in vitro* s'ha observat que els mioblasts humans són capaços de respondre a estímuls inflamatoris augmentant o induint l'expressió de les interleucines (IL) IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-8, IL-15, i altres molècules com el factor de necrosi tumoral (TNF- $\alpha$ ) o el factor de creixement transformant (TGF- $\beta$ ) (40,41).

## **4.- El teixit connectiu**

### **4.1.- Descripció**

El teixit connectiu o conjuntiu és un conjunt heterogeni de teixits orgànics que comparteixen un origen comú a partir del mesènquima embrionari originat del mesoderma.

### 4.2.- Funcions

La seva funció principal és donar consistència a altres teixits, però també és essencial en la comunicació entre teixits, generant una integració sistèmica de l'organisme (42).

Durant el desenvolupament embrionari i fetal, el teixit mesenquimal (teixit connectiu embrionari) va madurant i diferenciant-se, no sols cap als diferents tipus de teixit connectiu, sinó també cap a teixit muscular.

### 4.3.- Tipus

El teixit connectiu pot dividir-se en diferents tipus, que s'agrupen en dos tipus principals: el teixit connectiu especialitzat i el teixit connectiu no especialitzat. En el teixit connectiu especialitzat s'hi inclouen els teixits connectius amb funcions pròpies i característiques de cadascun (teixit adipós, teixit cartilaginós, teixit ossi, etc.) mentre que en el teixit connectiu no especialitzat s'hi inclouen la resta de teixits connectius sense funcions pròpies que els diferenciïn.

El teixit connectiu dens, o fibrós, regular és el tipus de teixit connectiu no especialitzat que forma els tendons, aponeurosis (o fàscies) i lligaments. Són estructures que generalment reben tracció en la direcció en la qual s'orienten les seves fibres.

En les aponeurosis trobem fibres de col·lagen, majoritàriament, paral·leles les unes a les altres, però ordenades en capes i en disposició ortogonal, és a dir, amb un angle de 90° entre una capa i l'altra. De tota manera, existeix un gran nombre de components diversos que conformen el teixit connectiu.

### 4.4.- Components del teixit connectiu

Com tot teixit, el teixit connectiu està format per cèl·lules i components extracel·lulars associats. Els components extracel·lulars – coneguts genèricament com MEC – són la substància fonamental i les fibres, mentre que les cèl·lules del teixit connectiu poden ser immòbils (residents) o lliures (circulants).

## 4.5.- Matriu extracel·lular

### 4.5.1.- Descripció

La MEC és la substància intercel·lular, produïda per les pròpies cèl·lules, que forma part d'un teixit. És un medi d'integració fisiològic, de naturalesa bioquímica complexa, en el que es troben immerses les cèl·lules.

La MEC és un component present en el micro-ambient de tots els tipus cel·lulars, per bé que la seva composició i les relacions espacials entre cèl·lula i MEC poden diferir en funció del teixit. Les cèl·lules poden trobar-se completament envoltades per MEC, com els condrocits i els fibroblasts, o només contactar amb la MEC en una de les superfícies, com les cèl·lules endotelials i epitelials. A més, en alguns teixits només una proporció de les cèl·lules es troba exposada a la MEC, com en els epitelis estratificats.

### 4.5.2.- Funcions

Contràriament al que es pensava abans, se sap actualment que la MEC no només té la funció de **donar suport mecànic i estructural** a les cèl·lules. De tota manera, aquesta es descriu com la funció principal, i s'atribueix a la composició de cada MEC. Les fibres de les proteïnes que conformen cada MEC poden donar rigidesa o elasticitat al teixit, en funció dels requeriments d'aquest. Cada MEC de cada teixit està especialitzada en suportar un tipus d'estrès mecànic: tensió, compressió, rotació i/o la combinació de tots (43). Es considera que la quantitat i composició de la MEC de cada teixit no només ve condicionada pels mecanismes de programació cel·lular i els factors de creixement, sinó també pel tipus i la magnitud de l'estrès mecànic al que està sotmès el teixit (44,45).

Un gran nombre d'estudis donen suport a la idea que la MEC juga un **paper important en processos cel·lulars** com el creixement cel·lular, la diferenciació i el comportament cel·lular (46-48). Aquestes funcions es poden explicar per dos propietats principals de la MEC. En primer lloc, les característiques mecàniques de la MEC, com la rigidesa o l'elasticitat, són captades per les cèl·lules mitjançant les seves adhesions focals i es transmeten a través de les molècules del citoesquelet, produint canvis en la regulació de les funcions vitals (49,50). I en segon lloc, les propietats bioquímiques dels components de la MEC, també juguen un paper destacat en la regulació cel·lular. Aquestes propietats bioquímiques s'atribueixen a la capacitat

d'alguns dels components cel·lulars de retenir factors de creixement (51), d'interaccionar amb les cèl·lules a través de seqüències específiques d'adhesió (s'explicarà amb més detall més endavant) i de retenir altres molècules com molècules inflammatòries (52). Aquests components de la MEC capaços de generar una resposta cel·lular, i no només d'actuar com a components estructurals, es denominen proteïnes matricel·lulars (53).

La MEC és crítica en **la transmissió de força i la resposta elàstica**. Canvis estructurals, bioquímics, cel·lulars i funcionals poden contribuir al deteriorament de les propietats mecàniques (54). Els canvis estructurals es poden deure a un augment en la concentració de col·lagen o a un canvi en les fibres elàstiques. Els canvis bioquímics es poden atribuir a un decrement en el recanvi del col·lagen acompanyat d'una acumulació potencial de fragments entrecruats de col·lagen, mediat per enzims, i una glicació dels extrems del col·lagen. Els canvis cel·lulars poden incloure una alterada mecano-transducció, respostes inflammatòries retardades i un canvi en els moduladors de la MEC. No se sap, però, quin o quins mecanismes exactes poden acabar desencadenant l'HI, per bé que la majoria de treballs, com ja s'ha comentat, l'atribueixen a una mala producció de col·lagen juntament amb una mecano-transducció alterada (10).

### 4.5.3.- Composició

La MEC està formada principalment per una barreja complexa, que varia en funció del teixit, de proteïnes fibroses, glicoproteïnes, proteoglicans i glicosaminoglicans (GAGs). Les variacions en les quantitats relatives dels diferents tipus de macromolècules de la MEC i la manera en què estan organitzades dóna lloc a una enorme diversitat de formes de MEC, cadascuna adaptada als requeriments funcionals de cada teixit (55).

La presència de proteoglicans genera una substància fonamental gelificada i altament hidratada on s'integren les proteïnes fibroses (55). El gel de GAGs resisteix les forces compressives a la que està sotmesa la MEC i, al mateix temps, permet la ràpida difusió de nutrients, metabòlits i hormones entre la sang i les cèl·lules dels teixits. Les proteïnes fibroses com les fibres de col·lagen enforteixen i ajuden a l'organització de la matriu, mentre que les fibres elàstiques proporcionen resiliència (56). Finalment, moltes de les proteïnes de la MEC permeten l'adhesió d'altres proteïnes o

factors de creixement, així com l'adhesió cel·lular en les localitzacions apropiades (57).

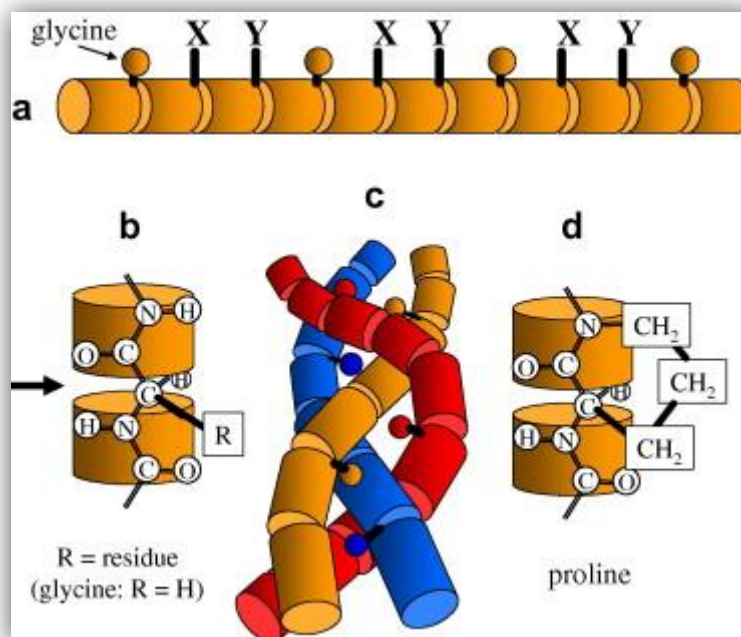
La qualitat d'una MEC té, per tant, repercussió en la funcionalitat d'aquesta. Defectes en la síntesi d'alguna de les molècules de la MEC, o en la renovació d'aquesta, s'han identificat com els responsables d'un gran nombre de malalties anomenades malalties del teixit connectiu. De tota manera, no es coneixen les causes reals de la majoria d'aquestes malalties. Algunes d'aquestes malalties són heretables (Síndrome de Marfan (58), Osteogènesi imperfecta (59), Síndrome de Ehlers-Danlos (60), etc), mentre que d'altres van acompanyades de desordres autoimmunes (Artritis reumàtica (61), malaltia de Crohn (62), esclerosi sistèmica (63), etc.). Aquests darrers es deuen a una activació exagerada dels sistemes inflamatoris, que tenen una repercussió sobre les molècules que conformen la MEC (52).

Com s'introdueix més endavant, l'organització tridimensional de la MEC està dirigida per les cèl·lules que la secreten (64,65). És a dir, l'orientació del citoesquelet a l'interior de la cèl·lula pot controlar l'orientació de la matriu produïda a l'exterior. Per tant, la transmissió d'esdeveniments de l'interior a l'exterior cel·lular i de l'exterior a l'interior cel·lular és clau per al destí, tant de la cèl·lula com de la MEC que secreta.

#### **4.5.3.1.- Col·lagen**

Els col·làgens són una família de proteïnes fibroses presents en tots els animals multicel·lulars. El col·lagen és la proteïna més abundant de la MEC i pot representar el 25-35% de la massa total proteica d'un mamífer.

Una molècula de col·lagen és una molècula llarga, rígida i estructurada en triple hèlix. Aquesta triple hèlix està formada per tres cadenes polipeptídiques de col·lagen, anomenades cadenes alfa ( $\alpha$ ), unides una sobre l'altra en forma d'hèlix (Figura I4; (66)). Els col·làgens són proteïnes riques en prolina i glicina, aminoàcids responsables de la formació de la triple hèlix. La prolina té un anell que estabilitza la conformació helicoidal en cada cadena  $\alpha$ , mentre que la glicina permet l'empaquetament de les tres cadenes per formar la superhèlix.



**Figura I4.** Repeticions periòdiques en la molècula de col·lagen. (a) Cada tres residus apareix una glicina. Els altres residus, X i Y solen ser prolina o hidroxiprolina. (b) La glicina és l'aminoàcid més petit, amb un hidrogen com a cadena lateral. (c) La triple hèlix requereix de la presència de residus de glicina a l'interior. (d) La prolina i la hidroxiprolina tenen residus que connecten les cadenes polipeptídiques, donant rigidesa a la triple hèlix. Extret de Fratzl P and Weinkamer R *Nature's hierarchical materials*. Prog Mater Sci. 2007; 52 (8): 1263-1334.

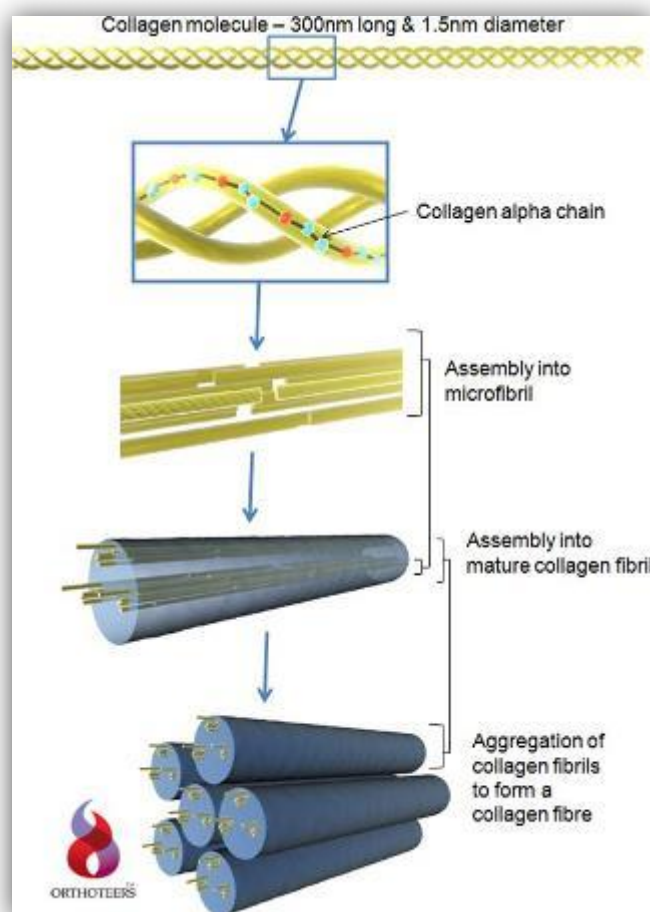
S'han identificat fins a 30 gens que codifiquen per col·làgens diferents. Aquests gens codifiquen per proteïnes que es combinen de diferents maneres per generar els diferents tipus de col·làgens que es poden trobar en els diferents teixits. Tot i que en principi les diferents combinacions dels gairebé 30 gens identificats podrien generar fins a 10.000 molècules triple helicoidals de col·lagen, només s'han trobat uns 20 tipus de col·làgens (Taula I1; (67)). Els col·làgens més abundants del teixit connectiu són els tipus I, II, III i V (68).

Tipus	Fórmula molecular	Símbol del gen	Localització
I	$[\alpha 1(I)]_2[\alpha(I)]$	COL1A1, COL1A2	pell, tendó, os, lligaments, còrnea, òrgans interns.
II	$[\alpha 1(II)]_3$	COL2A1	cartílag, disc intervertebral, notocorda, humor vitri de l'ull
III	$[\alpha 1(III)]_3$	COL3A1	pell, múscul, vasos sanguinis, òrgans interns
IV	$[\alpha 1(IV)]_2[\alpha 2(IV)]$	COL4A1 a COL4A6	totes les làmines basals
V	$[\alpha 1(V)][\alpha 2(V)][\alpha 3(V)]$	COL5A1, COL5A2, COL5A3	Teixits intersticials, associat al tipus I
VI	$[\alpha 1(VI)][\alpha 2(VI)][\alpha 3(VI)]$	COL6A1, COL6A2, COL6A3	Teixits intersticials, associat al tipus I
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	COL7A1	Epitelis
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_3$	COL8A1, COL8A2	Algunes cèl·lules endotelials
IX	$[\alpha 1(IX)][\alpha 2(IX)][\alpha 3(IX)]$	COL9A1, COL9A2, COL9A3	Cartílag, associat al tipus II
X	$[\alpha 1(X)]_3$	COL10A1	Cartílag hipertròfic i mineralitzat
XI	$[\alpha 1(XI)][\alpha 2(XI)][\alpha 3(XI)]$	COL11A1, COL11A2	Cartílag
XII	$\alpha 1(XII)$	COL12A1	Interacciona amb els tipus I i III

**Taula II.** Característiques dels 12 col·làgens més estudiats. La fórmula indica quins tipus de cadenes  $\alpha$  conté cada molècula de col·lagen. Adaptat de Alberts, B *et al* (2002). *Molecular Biology of the Cell, 4th edition*. New York: Garland Science i de King, MW (Març 2012). *The extracellular matrix (ECM)*, de The Medical Biochemistry Page, <http://themedicalbiochemistrypage.org/extracellularmatrix.php>

Cada cadena polipeptídica de col·lagen és generada en forma de pro-pèptid a l'interior cel·lular, amb aminoàcids addicionals als dos extrems. Aquests aminoàcids tenen dues funcions principals. En primer lloc, guien la formació intracel·lular de la triple hèlix de la molècula de col·lagen. I en segon lloc, eviten la formació intracel·lular de les *fibril·les* de col·lagen, fet que seria catastròfic per la cèl·lula. Un cop la molècula de pro-col·lagen surt a l'exterior cel·lular, és transformada a molècula de col·lagen per l'activitat enzimàtica específica de proteases extracel·lulars. La molècula de col·lagen generada és molt poc soluble i tendeix a agregar-se amb altres molècules, generant polimers altament ordenats, anomenats *fibril·les* de col·lagen. Aquestes *fibril·les* són estructures primes, d'uns 10-300 nm de diàmetre, i allargades (varis  $\mu\text{m}$ ) que són visibles mitjançant microscopi electrònic.

Les *fibril·les* de col·lagen també es poden agregar formant les *fibres* de col·lagen, estructures altament empaquetades de varis  $\mu\text{m}$  de diàmetre (Figura I5).



**Figura I5.** Agregació de les molècules de col·lagen.

Les triple hèlixs s'agreguen per formar *fibril·les*, que a la vegada poden agregar-se per generar les *fibres*. Extret de Kaiser, S. *Rotator cuff tendon properties*. De Rotator Cuff Exercises, <http://www.rotator-cuff-therapy-exercises.com/rotator-cuff-tendon>

Les fibres de col·lagen generen estructures amb una elevada resistència a la tracció. Aquesta resistència es deu a la capacitat que té el col·lagen per allargar les *fibril·les* quan es veu sotmès a una força de tracció (69,70). Cada molècula de col·lagen, a més, resisteix més o menys força. Per això, cada teixit té major abundància d'un tipus concret de col·lagen (Taula I1). La majoria de teixits dels òrgans interns tenen una predominança de col·làgens intersticials, de tipus I i tipus III. El col·lagen de



tipus I es caracteritza per conferir força i rigidesa, ja que es compacta en *fibril·les* molt denses. Es troba en grans quantitats en els tendons (71). En canvi, el col·lagen de tipus III dóna elasticitat al teixit, ja que genera *fibril·les* dispersades i íntimament associades a altres components de la MEC. Es troba en grans quantitats en la pell, especialment en processos de reparació de ferides (72).

Les forces a les que es troba sotmès un teixit, a la vegada, són essencials per a la síntesi i remodelació del col·lagen. És per això que, en els processos de cicatrització la renovació del col·lagen ve guiada per les forces de tensió generades en la ferida (73,74). Aquestes forces estimulen la proliferació i activació de les cèl·lules de la MEC, que secreten noves molècules de la MEC (75,76). La qualitat d'aquesta nova MEC, així com el diàmetre de les *fibres* generades, sembla determinant en l'activació de les cèl·lules que ajudaran a la reparació del teixit (77). En aquest sentit, durant les primeres etapes de la cicatrització es genera un teixit de granulació amb predominança de col·lagen de tipus III. Aquest teixit té una força de tracció petita i una elevada elasticitat. Posteriorment, aquesta ferida evoluciona cap a un teixit cicatritzant madur, un teixit rígid i amb predominança de col·lagen de tipus I. Així doncs, durant el procés de cicatrització es passa d'un teixit amb una ràtio col·lagen tipus I/tipus III baixa a un teixit amb una ràtio elevada. Els desordres associats a una pèrdua de la estructura tissular, com les fibrosis pulmonars o cardíques, estan associats a un canvi en la ràtio de col·lagen tipus I/tipus III degut a un augment en el col·lagen tipus I (78).

Durant la darrera dècada, molts treballs han relacionat l'HI amb un decrement en la ràtio de col·lagen tipus I/tipus III, en favor d'un augment en el col·lagen de tipus III. Aquesta associació es va iniciar arrel de tres idees principals. En primer lloc, s'havia trobat una menor quantitat d'hidroxiprolina en els fibroblasts cultivats a partir de fàscies (79). En segon lloc, s'ha relacionat algunes malalties degudes a defectes en el col·lagen, com el síndrome de Marfan (80), el síndrome de Ehlers-Danlos (81) o l'aneurisma (82) amb un risc més elevat a patir una hèrnia. I, finalment, s'ha trobat també una ràtio col·lagen tipus I/tipus III disminuïda en pacients amb hèrnies inguinals (83). Aquesta ràtio col·lagen tipus I/tipus III es va trobar inicialment alterada en la pell dels pacients amb HI i amb HI recurrent (17). Posteriorment s'ha trobat alterada en la fàscia de pacients amb HI, fins i tot en comparar-la amb la pell de pacients sans (84), un teixit suposadament més elàstic i amb major abundància de col·lagen tipus III. Aquest fenotip es manté en els fibroblasts de la pell de pacients amb HI i HI recurrent cultivats *in vitro* (85) i fins i tot en els pacients que han sigut

tractats amb una pròtesi al·loplàstica (86). Tot i que primerament s'atribuïa aquest decrement a un possible defecte en la síntesi del col·lagen (17), més recentment s'ha relacionat amb el metabolisme d'aquest i els enzims implicats (84,87). No obstant, es desconeix quin és el responsable/responsables d'aquest defecte en la MEC dels pacients amb HI, ni tampoc si aquest defecte és causa o efecte. Per això, manquen estudis que aprofundeixin en el metabolisme del col·lagen en mostres dels teixits implicats en l'HI en pacients humans.

### 4.5.3.2.- Glicosaminoglicans.

Els GAGs són heteropolisacàrids llargs, no ramificats, formats per unitats repetitives de disacàrids. Cada disacàrid conté un aminosucre (*N*-acetilgalactosamina, GalNac, o *N*-acetilglucosamina, GlcNac) i un àcid urònic (glucorònic o idurònic). Com que la majoria d'aquest sucres poden estar sulfatats o carboxilats, els GAGs són molècules amb càrregues molt negatives. Es coneixen diferents tipus de GAGs, en funció de la seva composició, el tipus d'unió entre els sucres i el nombre i la localització dels grups sulfatats (Taula I2).

GAG	Localització
Àcid hialurònic	Fluid sinovial, humor vitri, MEC de teixit connectiu
Sulfat de condroitina	Cartílag, os, vàlvules cardíques
Sulfat de heparina	Membranes basals, components de les superfícies cel·lulars
Heparina	Component dels grànuls intracel·lulars dels mastòcits de les artèries dels pulmons, el fetge i la pell
Sulfat de dermatan	Pell, vasos sanguinis i vàlvules cardíques
Sulfat de ceratina	Còrnea, os, cartílag agregat amb sulfats de condroitina

**Taula I2.** Tipus de glicosaminoglicans (GAGs) descrits i la seva localització més habitual. Adaptat de King, MW (Juliol 2012). *Glycosaminoglycans and Proteoglycans*.

De The Medical Biochemistry Page,  
<http://themedicalbiochemistrypage.org/glycans.php>

Els GAGs són molècules rígides, que no es poden plegar com ho faria una proteïna, i a la vegada són molt hidrofòbiques. Això produeix que els GAGs es pleguin formant estructures altament voluminoses, que generen gels fins i tot a baixes concentracions. La càrrega extremament negativa atreu un gran nombre de cations que, a la vegada, atreu un gran volum d'aigua. Així, els GAGs afavoreixen la

hidratació de la MEC, produint una pressió de turgència que permet que suporti forces compressives, en contrast amb el col·lagen que resisteix forces de tracció.

Els GAGs constitueixen menys del 10% del pes total de les proteïnes fibroses del teixit connectiu. No obstant això, com que formen gels porosos i hidratats, omplen la major part dels espais buits de la MEC, conferint suport mecànic al teixit. Es troben principalment a la superfície o al voltant de la cèl·lula.

A més de donar suport estructural a les cèl·lules i el teixit, els GAGs s'han relacionat amb processos de migració cel·lular. Durant el desenvolupament embrionari, en processos on es requereix la migració cel·lular, i.e. la formació del cor o la còrnea, s'han trobat alts nivells d'àcid hialurònic (88,89). Aquest és un GAG especial, ja que no conté sulfatacions i tots els seus disacàrids són idèntics. A més, no se sol trobar unit a cap proteïna de la MEC i té un sistema de secreció complex. També s'han identificat alts nivells de GAGs durant el procés de reparació d'una ferida. Durant les dues primeres setmanes, l'àcid hialurònic es produeix en alts nivells permetent la migració cel·lular. En les etapes posteriors, hi ha un augment d'altres GAGs com el sulfat de condroitina i el sulfat de dermatan, que proveeixen de l'assistència necessària per a la re-polimerització de les molècules de col·lagen per formar de nou les *fibril·les* madures (90). En aquest sentit, en alguns treballs s'ha utilitzat l'àcid hialurònic per al tractament de la reparació de les ferides i la cicatrització (91-93). També s'ha utilitzat la combinació de l'àcid hialurònic amb altres GAGs per a la fabricació de materials per a la reparació de ferides (94). Recentment s'ha observat que la fixació de GAGs en aquests biomaterials poden tenir un efecte beneficiós al disminuir la reacció de cos estrany i, per tant, facilitar la integració tissular (95). La presència de GAGs sembla que proveiria de nous polisacàrids a l'hoste, que podria utilitzar per generar un microambient apropiat per a la senyalització cel·lular (96).

Hi ha molts pocs estudis on es relacioni els nivells de GAGs i l'HI. En un estudi es va detectar baixos nivells de GAGs després de l'ús d'una malla comercial (97). Com que després de la implantació d'aquesta malla en rates es va observar signes inflamatoris com la presència d'infiltrats cel·lulars, es va postular que la menor quantitat de GAGs, junt amb menor quantitat de col·lagen IV, podrien ser els causants d'aquesta inflamació. Per bé que en aquest treball no es va identificar el mecanisme implicat, s'ha observat que els GAGs podrien jugar un paper important en els processos inflamatoris, també inicials a la reparació d'una ferida, i en la comunicació intercel·lular mitjançant quimiocines i altres molècules (98,99). Finalment, també s'ha

observat que l'ús d'implants de polipropilè amb una combinació de col·lagen i GAGs redueix la formació d'adhesions abdominals i estimula la formació de teixit connectiu quan s'implanten en porcs amb HI generada quirúrgicament (100).

### 4.5.3.3.- Proteoglicans

Els proteoglicans són molècules de la MEC formades per un nucli proteic unit covalentment a una o més cadenes de GAGs. De fet, la majoria de GAGs excepte l'àcid hialurònic es troben units a proteïnes a la MEC. Els proteoglicans són més abundants en la MEC que les glicoproteïnes. Es diferencien principalment per la naturalesa, la quantitat i la disposició de les cadenes laterals de sucres. Per definició, almenys un dels sucres de les cadenes laterals dels proteoglicans és un GAG. Les glicoproteïnes contenen oligosacàrids ramificats i relativament curts, mentre que els proteoglicans contenen oligosacàrids no ramificats i de cadenes molt llargues. Això converteix els proteoglicans en molècules enormes. De fet, els proteoglicans tenen potencial per generar una heterogeneïtat infinita de molècules (101). Això es deu a que un mateix nucli proteic pot variar en el nombre i en el tipus de cadenes de GAGs. És per això que se'ls atribueix una gran multitud de funcions.

Aquesta gran heterogeneïtat dificulta la identificació i classificació dels proteoglicans, almenys respecte als sucres units. S'han identificat un gran nombre de proteoglicans, en funció del nucli proteic, sense característiques estructurals comuns entre ells. Per això, es pot considerar els proteoglicans com un grup altament divers de glicoproteïnes altament glicosilades de la MEC, amb funcions que poden ser dirigides tant pel seu nucli proteic com per les seves cadenes laterals de GAGs. Es fa difícil pensar que aquesta elevada diversitat de molècules només tingui la funció d'hidratar l'espai entre i al voltant de les cèl·lules. Com s'ha comentat abans, els GAGs poden formar gels de diferent mida de porus i de diferent càrrega. En funció dels requeriments del teixit, la presència d'uns tipus de proteoglicans o uns altres podria regular el trànsit de molècules i cèl·lules.

De tota manera, es creu que els proteoglicans tenen un paper molt important en la senyalització química entre cèl·lules. Aquesta funció s'atribueix a la capacitat dels proteoglicans de retenir algunes molècules, com certs factors de creixement, proteases o inhibidors de proteases, podent estimular o impedir la seva activitat. La regulació d'aquesta activitat es pot produir de diferents maneres. En primer lloc, poden retenir les molècules prop del lloc on s'han secretat, evitant la seva acció paracrina i/o endocrina (102). En segon lloc, poden bloquejar estèricament el centre

actiu de la molècula (103). En tercer lloc, poden actuar com a reservori de proteïnes per una alliberació retardada (104). En quart lloc, poden protegir algunes molècules de la degradació proteica (105). I finalment, poden concentrar les proteïnes per millorar la presentació als receptors de membrana cel·lular (106).

Aquesta retenció de molècules també s'ha identificat durant la resposta inflamatòria. Per exemple, els proteoglicans que contenen sulfat de heparina són capaços de retenir quimiocines a la paret dels vasos d'una zona inflamada (107). D'aquesta manera, les quimiocines poden quedar a la zona durant més temps, estimulants la migració de les cèl·lules inflamatòries cap al teixit.

De tota manera, no tots els proteoglicans se secreten a la MEC. Alguns són components de la membrana citoplasmàtica, de manera que el seu nucli actiu queda inserit en aquesta (108). Alguns d'aquests proteoglicans de membrana, com els sindecans, poden actuar com a co-receptors col·laborant amb els receptors clàssics en la unió a la MEC i la iniciació de la resposta a estímuls de la MEC (109). Diferents treballs han revelat que aquests proteoglicans tenen papers destacats en el creixement, l'adhesió, la migració i el metabolisme cel·lular (110-112).

A més, els proteoglicans són molècules molt importants durant el desenvolupament de l'organisme, ja que proveeixen d'un ambient de creixement per a les cèl·lules. S'ha observat, mitjançant animals genoanul·lats, que durant aquesta etapa són essencials en la regulació de rutes de senyalització claus (113-116).

No s'ha estudiat cap relació entre els proteoglicans i l'HI. En canvi, sí que s'ha observat una certa correlació entre la degradació o la menor expressió d'alguns proteoglicans i altres tipus d'hèrnia, com la intervertebral. En aquest sentit, s'ha observat una sobre-expressió o sobre-activació d'alguns dels enzims que remodelen els GAGs dels proteoglicans, com les heparanases (117) o les agrecanases (118). Aquesta alliberació dels GAGs podria jugar un paper important en la formació d'aquestes hèrnies, ja que alliberaria també els factors de creixement o factors inflamatoris que retenen, i influiria en els processos de proliferació i migració cel·lulars. No obstant, no es coneix quin o quins factors estimulen l'activació d'aquests enzims, tot i que alguns resultats indiquen que les forces de càrrega que suporten el teixit (119) o alguns processos inflamatoris via TNF- $\alpha$  (120) o IL-1 (121) podrien ser els causants. També s'ha observat que la menor expressió d'alguns proteoglicans està relacionada amb aquesta hèrnia intervertebral (122).

### 4.5.4.- Metabolisme de la MEC.

La regulació del metabolisme de la MEC és crítica en una gran varietat de processos biològics fonamentals. Aquest mecanisme és molt important durant el desenvolupament embrionari, en la formació dels teixits. Durant aquests estadis es dona un recanvi ràpid en les molècules de la MEC que permet la migració de les cèl·lules (123). La degradació de la MEC en zones localitzades és també molt important en processos patològics com la infecció o el dany tissular, en el que es requereix la migració de les cèl·lules del sistema immunològic (124). Això també es dona en molts càncers, on la degradació de la MEC és molt activa degut a les necessitats de creixement; i també en les cèl·lules canceroses que migren (metàstasi) (125). La migració cel·lular es pot donar gràcies a que la proteòlisi de la matriu genera diferents situacions:

1.-: La degradació de la matriu fa que les cèl·lules puguin circular amb més facilitat (126).

2.-: La proteòlisi d'alguns components de la MEC pot posar al descobert seqüències proteiques, abans ocultes, que promoguin l'adhesió cel·lular, la migració o ambdós (127-129).

3.-: Les cèl·lules poden migrar degut a que la proteòlisi pot produir que perdin l'ancoratge a la MEC (130).

4.-: Es poden alliberar proteïnes de senyalització extracel·lular que estimulin la migració (51).

A més, i encara que les MECs dels teixits d'un organisme adult semblin estructures estàtiques, es troben en constant però lent recanvi, de manera que les molècules de la MEC es sintetitzen i degraden constantment.

Els components de la MEC es degraden mitjançant enzims proteolítics (proteases) alliberats localment per les pròpies cèl·lules de la MEC. S'han descrit dos grups d'enzims que engloben la majoria d'aquestes proteases: les metal·loproteases de matriu (MMPs) i les serina proteases. Les MMPs, la majoria de proteases de la MEC, depenen de la presència d'un catió metàl·lic al seu centre actiu, mentre que les

serina proteases tenen una serina altament reactiva al seu centre actiu. Els dos grups de proteases cooperen en la degradació de proteïnes de la MEC. La majoria de les proteases són alliberades a la MEC, però algunes estan integrades a la membrana cel·lular.

La degradació de la MEC és un procés extremadament controlat, ja que podria tenir repercussions fatals en el manteniment de la integritat tissular i la viabilitat cel·lular (131). Es coneixen almenys tres mecanismes bàsics per controlar les proteases que degraden els components de la MEC:

- *Activació local:* Moltes proteases s'alliberen a la MEC com a precursors inactius que s'activen localment quan és necessari, mitjançant l'ús d'altres proteases que es regulen a través de factors de senyalització (132-134).
- *Retenció per receptors de membrana:* Moltes cèl·lules tenen receptors de membrana capaços de retenir i confinar les proteases de matriu als llocs on són necessàries.
- *Secreció d'inhibidors:* L'acció de les proteases sobre la matriu es realitza només en zones específiques gràcies a la presència de varis inhibidors de proteases. Aquests inhibidors inclouen la família dels inhibidors tissulars de metal·loproteases (TIMPs) i els inhibidors de serina proteases (serpines). Aquests inhibidors s'uneixen específicament a la proteasa activa bloquejant el seu centre actiu. Els inhibidors de proteases se secreten als marges de les zones actives de degradació de MEC per protegir la MEC no involucrada i, a la vegada, protegir les proteïnes de la superfície de la membrana necessàries per a la adhesió i la migració.

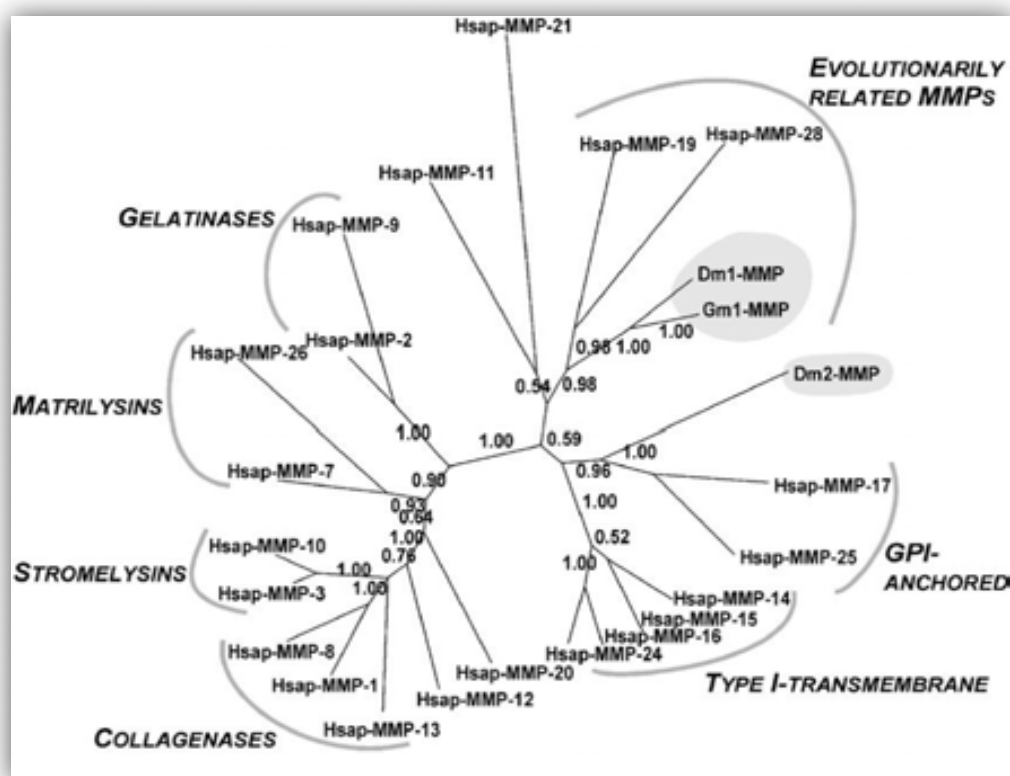
De tota manera, la regulació de l'activitat de les proteases és un procés molt més complicat que sovint es dóna mitjançant més d'un dels mecanismes explicats (135).

Com ja s'ha comentat, s'ha observat recentment que el metabolisme de la MEC podria jugar un paper important en la gènesi i la progressió de l'HI. De tota manera, encara no es coneix quins són els processos i les molècules implicades en aquest metabolisme.

#### 4.5.4.1.- MMPs

Les metal·loproteases de matriu (MMPs) són proteases secretades a la MEC o com a proteïnes transmembrana capaces de produir la proteòlisi dels components proteics de la MEC. Les MMPs requereixen de la presència d'un ió metàl·lic al seu centre actiu, generalment zinc (136). Les MMPs són secretades com a pro-enzims inactius que requereixen de l'eliminació del pèptid amino-terminal, conegut com a interruptor de cisteïna, que amaga l'àtom de zinc del centre actiu (137). Un cop està al descobert, aquest ió metàl·lic activa una molècula d'aigua, que actua com a nucleòfil per produir un atac al grup carbonil del pèptid diana, produint el trencament de l'enllaç peptídic.

S'han descobert més de 20 tipus de MMPs en els mamífers, que es divideixen en diferents grups (Figura I6; (138)).



**Figura I6.** Arbre filogenètic dels diferents tipus de MMPs en els insectes *Galleria mellonella* (Gm) i *Drosophila melanogaster* (Dm) i en l'*Homo sapiens* (Hsap). Extret de Altincicek B, Vilcinskis A. *Identification of a lepidopteran matrix metalloproteinase with dual roles in metamorphosis and innate immunity*. Dev Com p Immunol. 2008; 32(4): 400-9.



Les MMPs tenen especificitats diferents per varies molècules de la MEC, a més de produir la proteòlisi d'altres components que es poden trobar a la MEC però que no en formen part, com factors de creixement, proteïnes inflammatòries, receptors de membrana o, fins i tot, altres MMPs (Taula I3).

Group	Protease	MMP Number	EC Number	Chromosome location (human)	Matrix substrates	Bioactive substrates	Bioactivity
Collagenases	Collagenase (-1)  (tissue collagenase interstitial collagenase)	MMP-1	3.4.24.7	11q22-q23	Native collagen types: I>I>II, VII, X	MCP-1	Partial loss of agonist
					Gelatin	MCP-3	Agonist to antagonist
					Aggrecan	MCP-4	Agonist to antagonist
					Link protein	Stromal cell-derived factor (SDF)	Inactivation
					Entactin	Pro-1L-1	Activation
					Tenascin	1L-1	Degradation
					Perlecan	IGF-BP-2	Active IGF release
						IGF-BP-3	Active IGF release
						Perlecan	Active FGF release
						Pro-TNF- $\alpha$	Soluble active TNF- $\alpha$
						Pro-MMP-1	MMP-1 activation
						Pro-MMP-2	MMP-2 activation
						$\alpha$ 1-proteinase inhibitor	Inactivation
$\alpha$ 1-antichymotrypsin	Inactivation						
$\alpha$ 2-macroglobulin							
Collagenase-2  (neutrophil collagenase)	MMP-8	3.4.24.34	11q21-q22	Native collagen types: I>I>II, VII, X	MCP-1	Partial loss of agonist	
				Gelatin	Pro-TNF- $\alpha$	Soluble active TNF- $\alpha$	
				Entactin	L-selection	Release	
				Aggrecan	IGF-BP	Active IGF release	
				Tenascin	Pro-MMP-8	MMP-8	
				$\alpha$ 1-proteinase inhibitor	Inactivation		
$\alpha$ 2-macroglobulin							
Collagenase-3	MMP-13		11q22.3	Native collagen types: I>I>I>I, VII, X	MCP-3	Agonist to antagonist	
				Gelatin	SDF	Inactivation	
				Entactin	Pro-TNF- $\alpha$	Soluble active TNF- $\alpha$	
				Tenascin	Pro-MMP-9	MMP-9 activation	
				Aggrecan	Pro-MMP-13	MMP-13 activation	
				$\alpha$ 1-antichymotrypsin	Inactivation		
$\alpha$ 2-macroglobulin							
Collagenase-4, xCol4 (Xenopus) (no known human homologue)	MMP-18			Native collagen type I, II, III			
				Gelatin			

**Taula I3.** Diferents tipus de MMPs i els seus substrats. Extret de Overall, C. *Mammalian MMPs and Substrates*. De The Overall Lab, University of British Columbia (Canada), [http://www.clip.ubc.ca/mmp\\_timp\\_folder/mmp\\_substrates.shtm](http://www.clip.ubc.ca/mmp_timp_folder/mmp_substrates.shtm)

Group	Protease	MMP Number	EC Number	Chromosome location (human)	Matrix substrates	Bioactive substrates	Bioactivity
Gelatinases	Gelatinase A	MMP-2	3.4.24.24	16q13	Denatured collagens (gelatin)	SDF	Inactive SDF
	(72-kDa gelatinase, 72-kDa type IV collagenase)				Native collagen types: I, IV, V, VII, X, XI Elastin Fibronectin Laminin-5 Aggrecan Brevican Neurocan BM-40 Decorin Vitronectin	MCP-3 Pro-TGF- $\beta$ 1 Pro-TNF- $\alpha$ Pro-IL-1 $\beta$ IGFBP-3 IGFBP-5 FGFR-1 Big endothelin-1 Pregnancy zone protein Substance P Decorin IGFBP Galectin-3	Agonist to antagonist Active TGF- $\beta$ 1 Soluble active TNF- $\alpha$ Active IL-1 $\beta$ Bioavailable IGF Bioavailable IGF FGFR-1 ectodomain -> vasoconstrictor Active TGF- $\beta$ release Active IGF release Degraded (loss of macrophage chemoattraction?) MMP-1 MMP-2 MMP-13 Inactivation MMP-13 Inactivation MMP-13 $\alpha$ 1-proteinase inhibitor $\alpha$ 2-macroglobulin
	Gelatinase B	MMP-9	3.4.24.35	20q11.2-q13.1	Denatured collagens (gelatin) Native collagen types: I, IV, V, VII, X, XI Elastin Fibronectin Laminin Aggrecan Link protein Vitronectin	SDF Pro-IL-8 CTAP-III/NAP-2 GRO $\alpha$ PF-4 Pro-TNF- $\alpha$ Pro-TGF- $\beta$ 1 Pro-IL-1 $\beta$ Cell-surface IL-2R $\alpha$ FGF-R1 Plasminogen Galectin-3 ? Pro-MMP-2 Pro-MMP-9 Pro-MMP-13 $\alpha$ 1-proteinase inhibitor $\alpha$ 2-macroglobulin	Inactivation Active IL-8 Degraded Degraded Degraded Soluble active TNF- $\alpha$ Active TGF- $\beta$ 1 Active IL-1 $\beta$ Release of IL-2R $\alpha$ Shedding Angiostatin Degraded Bioavailable VEGF MMP-2 MMP-9 MMP-13 Inactivation

**Taula I3 (segueix).** Diferents tipus de MMPs i els seus substrats. Extret de Overall, C. *Mammalian MMPs and Substrates*. De The Overall Lab, University of British Columbia (Canada), [http://www.clip.ubc.ca/mmp\\_timp\\_folder/mmp\\_substrates.shtml](http://www.clip.ubc.ca/mmp_timp_folder/mmp_substrates.shtml)

Group	Protease	MMP Number	EC Number	Chromosome location (human)	Matrix substrates	Bioactive substrates	Bioactivity
Stromelysins	Stromelysin-1 (Proteoglycanase)	MMP-3	3.4.24.17	11q23	Aggrecan	MCP-1	Partial inactivation
					Laminin	MCP-2	Agonist to antagonist
					Fibronectin	MCP-3	Agonist to antagonist
					Non triple helical regions of native collagen types: II, III, IV, V, IX, X, XI	MCP-4	Agonist to antagonist
					Gelatin	SDF	Inactivation
					Entactin	Pro-TNF- $\alpha$	Soluble active TNF- $\alpha$
					Perlecan	L-selection	Shedding
					Decorin	Pro-HB-EGF	HB-EGF
					Tenascin	Pro-IL-1 $\beta$	1L-1 $\beta$
					Vitronectin	Perlecan	FGF release
					Fibrin/fibrinogen	Decorin	TGF- $\beta$ release
					Link protein	Plasminogen	Angiostatin
					Elastin	E-cadherin	E-cadherin ectodomain
						IGFBP-3	Active IGF
						Pro-MMP-1	MMP-1
						Pro-MMP-3	MMP-3
						Pro-MMP-7	MMP-7
	Pro-MMP-8	MMP-8					
	Pro-MMP-9	MMP-9					
	Pro-MMP-13	MMP-13					
	$\alpha$ 1-proteinase inhibitor	Inactivation					
	$\alpha$ 1-antichymotrypsin	Inactivation					
	$\alpha$ 2-macroglobulin						
Stromelysin-2	MMP-10	3.4.24.22	11q22.3-q23	Gelatin type I, III, IV, V	Pro-MMP-1	MMP-1	
				Fibronectin	Pro-MMP-8	MMP-8	
				Proteoglycan	Pro-MMP-10	MMP-10	
Stromelysin-3	MMP-11		22q11.2	Fibronectin	IGFBP-1	Active IGF release	
				Laminin	$\alpha$ 1-proteinase inhibitor	Inactivation	
				Aggrecan	$\alpha$ 2-macroglobulin		

**Taula I3 (segueix).** Diferents tipus de MMPs i els seus substrats. Extret de Overall, C. *Mammalian MMPs and Substrates*. De The Overall Lab, University of British Columbia (Canada), [http://www.clip.ubc.ca/mmp\\_timp\\_folder/mmp\\_substrates.shtml](http://www.clip.ubc.ca/mmp_timp_folder/mmp_substrates.shtml)

Group	Protease	MMP Number	EC Number	Chromosome location (human)	Matrix substrates	Bioactive substrates	Bioactivity	
Matrilysins	Matrilysin (PUMP-1)	MMP-7	3.4.24.23	11q21-q22	Fibronectin	Pro- $\alpha$ -defensin	$\alpha$ -Defensin	
					Laminin	Cell surface bound Fas-L	Soluble Fas-L	
					Non helical segments of native collagen types: IV, V, IX, X, XI	Pro-TNF- $\alpha$	Soluble active TNF- $\alpha$	
					E-cadherin	E-cadherin	Bioactive E-cadherin ectodomain	
					Gelatin		$\beta$ 4 integrin shedding	
					Aggrecan	$\beta$ 4 integrin	Angiostatin	
					Entactin	Plasminogen	Active TGF- $\beta$ release	
					Tenascin	Decorin	MMP-1 activation	
					Vitronectin	Pro-MMP-1	MMP-2 activation	
					Fibrin/fibrinogen	Pro-MMP-2	MMP-7 activation	
							Pro-MMP-7	MMP-9 activation
							Pro-MMP-9	Inactivation
							$\alpha$ 1-proteinase inhibitor	
							$\alpha$ 2-macroglobulin	
Matrilysin-2, Endometase	MMP-26	11p15	Native type IV collagen	IGFBP-1	Active IGF release			
			Gelatin	Pro-MMP-9	MMP-9 activation			
			Fibronectin	$\alpha$ 1-proteinase inhibitor	Inactivation			
			Fibrin/fibrinogen					

**Taula I3 (segueix).** Diferents tipus de MMPs i els seus substrats. Extret de Overall, C. *Mammalian MMPs and Substrates*. De The Overall Lab, University of British Columbia (Canada), [http://www.clip.ubc.ca/mmp\\_timp\\_folder/mmp\\_substrates.shtm](http://www.clip.ubc.ca/mmp_timp_folder/mmp_substrates.shtm)

Group	Protease	MMP Number	EC Number	Chromosome location (human)	Matrix substrates	Bioactive substrates	Bioactivity				
Membrane-anchored MMPs	MT1-MMP	MMP-14		14q11-q12	Native collagen types:	MCP-3	Agonist to antagonist				
					I, II, III	SDF	Inactivation				
					Gelatin	Cell-surface CD44	CD44 release				
					Fibronectin	Cell-surface tissue transglutaminase (tTG)	tTG release				
					Vitronectin	Pro-TNF- $\alpha$					
					Aggrecan	Pro-MMP-2	Soluble active TNF- $\alpha$				
						Pro-MMP-13	MMP-2				
						$\alpha$ 1-proteinase inhibitor	MMP-13				
						$\alpha$ 2-macroglobulin	Inactivation				
						MT2-MMP	MMP-15	16q13-q21	Proteoglycan	Pro-MMP-2	MMP-2
										Cell-surface bound tTG	tTG release
					MT3-MMP	MMP-16	8q21	Native type III collagen	Pro-MMP-2	MMP-2	
Fibronectin	Cell-surface bound tTG	Release of tTG									
	Pro-TNF- $\alpha$	Soluble active TNF- $\alpha$									
MT4-MMP	MMP-17	12q24.3	Gelatin	Pro-MMP-2	MMP-2						
				Fibrin/fibrinogen	Pro-TNF- $\alpha$	Soluble active TNF- $\alpha$					
MT5-MMP	MMP-24	20q11.2	Fibronectin	Pro-MMP-2	MMP-2						
				Proteoglycans							
					Gelatin						
MT6-MMP, Leukolysin	MMP-25	16p13.3	Native type IV collagen	Pro-MMP-2	MMP-2						
				Gelatin	Pro-MMP-9	MMP-9					
				Fibronectin	$\alpha$ 1-proteinase inhibitor	Inactivation					
				Proteoglycans (DSPG, CSPG)							
					Laminin-1						
Fibrin/fibrinogen											

**Taula 13 (segueix).** Diferents tipus de MMPs i els seus substrats. Extret de Overall, C. *Mammalian MMPs and Substrates*. De The Overall Lab, University of British Columbia (Canada), [http://www.clip.ubc.ca/mmp\\_timp\\_folder/mmp\\_substrates.shtm](http://www.clip.ubc.ca/mmp_timp_folder/mmp_substrates.shtm)

Group	Protease	MMP Number	EC Number	Chromosome location (human)	Matrix substrates	Bioactive substrates	Bioactivity
Other MMPs	Metalloelastase (Macrophage elastase)	MMP-12	3.4.24.65	11q22.2- q22.3	Elastin	Plasminogen	Angiostatin
					Fibronectin	Pro-TNF- $\alpha$	Soluble active TNF- $\alpha$
					Laminin	$\alpha$ 1-proteinase inhibitor	Inactivation
						Proteoglycan	
						Fibrin/fibrinogen (myelin basic protein)	
	RASI, Stromelysin-4	MMP-19		12q14	Native type IV collagen Gelatin		
					Laminin		
					Fibronectin		
					Tenascin		
					Entactin		
				Aggrecan			
				COMP			
				Fibrin/fibrinogen			
	Enamelysin	MMP-20		11q22.3	Amelogenin COMP Aggrecan		
	XMMP (Xenopus)	MMP-21			no substrates defined		
	CMMP (chicken)	MMP-22a,b/			no substrates defined		
	(human homologue)	MMP-27		11q24	no substrates defined		
	CA-MMP	MMP-23		1p36.3	Gelatin		
	Epilysin	MMP-28		17q11.2	no substrates defined		

**Taula I3 (segueix).** Diferents tipus de MMPs i els seus substrats. Extret de Overall, C. *Mammalian MMPs and Substrates*. De The Overall Lab, University of British Columbia (Canada), [http://www.clip.ubc.ca/mmp\\_timp\\_folder/mmp\\_substrates.shtm](http://www.clip.ubc.ca/mmp_timp_folder/mmp_substrates.shtm)

La funció principal de les MMPs és la remodelació de la MEC, però aquesta remodelació és també necessària per a poder generar un microambient a través del qual les cèl·lules puguin migrar. És per això que les MMPs tenen papers essencials en processos fisiològics com el desenvolupament embrionari, l'angiogènesi i la reparació de la ferida degut a la seva capacitat de trencar tots els tipus de proteïnes de la MEC (137,139-141). Aquestes funcions s'han estudiat en un gran nombre de treballs, i la gran majoria s'han descobert en generar animals genoanul·lats per alguna de les MMPs o dels TIMPs (142).

La degradació de la MEC no és l'única funció de les MMPs, ja que s'ha descrit que són potents moduladors de la inflamació i la immunitat innata dels mamífers (143,144). Això es deu a que els substrats de les MMPs no són només molècules de la MEC, sinó que com s'ha comentat poden ser altres molècules com factors inflamatoris (Taula I3).

A més, la degradació de la MEC genera petits fragments solubles de les proteïnes de la MEC que poden tenir efectes sobre l'adhesió, la proliferació, la migració, o l'apoptosi cel·lular. Aquests fragments, denominats matriquines (129), poden unir-se a diferents receptors de membrana de la família de les citoquines, les quimiocines, o de factors de creixement, amb menor afinitat que els seus substrats habituals, però desencadenant reaccions similars (128,145). Algunes matriquines, anomenades matricriptines, contenen regions actives amagades que requereixen de la proteòlisi per quedar exposades (146). Encara que les matriquines són molècules solubles, la seva acció sol ser local i controlada (128,147).

La sobre-expressió o sobre-activació de les MMPs s'ha relacionat amb un gran nombre de processos patològics, molts d'ells relacionats amb processos inflamatoris. S'ha observat un augment en vàries de les MMPs en l'artrosi reumàtica (148,149), en l'arteriosclerosi (150), en l'aneurisma (151) i en un gran nombre de càncers (152).

A més, la seva regulació desequilibrada pot resultar en una excessiva degradació de la MEC i està associada a malalties destructives com la artritis reumàtica i la progressió tumoral. Aquesta regulació s'explica amb més detall més endavant.

Així doncs, les MMPs estan involucrades en una gran quantitat de funcions i processos. Per tant, la funció de les MMPs no és simplement degradar o remodelar la

MEC, sinó que tenen la funció de mantenir la homeòstasi del microambient extracel·lular.

L'expressió de les MMPs està modulada per factors de creixement, citoquines i hormones (133,153-155). Les interaccions entre la cèl·lula i la MEC i canvis en el citoesquelet també poden influir en l'expressió de les MMPs (156).

Alguns dels treballs que parlen d'una biologia de l'HI i d'una alteració en el metabolisme de la MEC, parlen també d'alteracions en els nivells d'algunes MMPs (20). En aquest sentit, els resultats obtinguts a vegades varien, molt probablement degut a l'origen de les mostres. Per exemple, s'ha observat que l'expressió de MMP-2 no mostra diferències entre pacients amb HI recurrent i pacients sans quan es miren els nivells en fibroblasts extrets de pell (157). En canvi, s'ha observat una sobreexpressió de MMP-2 quan s'analitza la fàscia d'una zona allunyada de la zona del forat herniari (158). També s'ha observat discordances en l'expressió de MMP-1 i MMP-13 en la fàscia de pacients amb HI (84,158). De tota manera, aquests treballs només parlen d'alguna o algunes de les MMPs, sense aprofundir en els mecanismes ni en els causants d'aquestes alteracions. A més, la heterogeneïtat de la procedència de les mostres dificulta obtenir hipòtesis concloents, de manera que manquen estudis on s'analitzi el paper de les diferents MMPs en els teixits implicats en l'HI.

A més de les MMPs, hi ha una altra família de metal·loproteases de matriu anomenades *A Disintegrin And Metalloprotease* (ADAM). Aquestes ADAMs es troben ancorades a la membrana plasmàtica i produeixen la proteòlisi de proteïnes de membrana, alliberant els dominis externs. Aquesta activitat és essencial en un gran nombre de processos fisiològics com la migració, la proliferació, el desenvolupament, l'angiogènesi o la reparació de les ferides. Això es deu a que els fragments alliberats de les proteïnes de la membrana poden realitzar funcions que estaven inhibides o amagades (159). Un gran nombre de molècules són diana de les ADAMs, com el TNF- $\alpha$ , alguns receptors de factors de creixement com el receptor del factor de creixement epidermal (EGFR) o del factor de creixement fibroblàstic (FGFR), molècules d'adhesió com cadherines o selectines, etc.



#### **4.5.4.2.- TIMPs**

Els inhibidors tissulars de les MMPs (TIMPs) són proteïnes sintetitzades i secretades per les cèl·lules de la MEC. La seva funció principal és inhibir l'activitat de les MMPs i impedir així una excessiva degradació de les molècules de la MEC. Són proteïnes relativament curtes, amb un domini N-terminal encarregat d'inhibir les MMPs. Aquest domini actua com a agent quelant del ió metàl·lic de les MMPs, repel·lint la molècula d'aigua del centre actiu.

S'han descrit quatre TIMPs en humans: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4. Virtualment, cadascuna d'elles és capaç d'inhibir totes les MMPs (excepte que TIMP-1 no inhibeix la MT1-MMP) formant un complex estequiomètric 1:1. De tota manera, el grau d'inhibició de cada TIMP varia en funció de quina MMP inhibeix, amb diferències d'especificitat entre les TIMPs (160,161). Les TIMPs són també diferents en solubilitat i en la regulació de la seva expressió. A més d'inhibir les MMPs, els TIMPs són capaços de formar complexos amb les pro-MMPs, impeding l'activació d'algunes MMPs (162-164).

Un gran nombre de tipus cel·lulars són capaços de secretar les diferents TIMPs, incloent els fibroblasts (165), els queratinòcits (165), les cèl·lules epitelials i endotelials, els osteoblasts (166), els condrocits (167), les cèl·lules del múscul llis i moltes cèl·lules tumorals (168).

L'expressió dels TIMPs està regulada per diferents molècules amb accions autocrines/paracrines com els factors de creixement (FGF, EGF, o el factor de creixement derivat de plaquetes PDGF), el sèrum i algunes citoquines (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ). Aquesta regulació es dona al nivell transcripcional i està controlada per diferents elements de resposta situats en la zona promotora del gen, incloent AP-1, SP-1, etc. (169,170). La regió AP-1 està regulada per alguns dels agents que activen algunes MMPs, suggerint que aquesta regió és crítica en la regulació coordinada de les MMPs i els TIMPs davant diversos estímuls (169). De tota manera, les MMPs i els TIMPs es poden regular tant de manera coordinada com recíprocament. Per exemple, algunes interleucines estimulen a la vegada l'expressió de MMPs i TIMPs, mentre que el TGF- $\beta$  estimula l'expressió de TIMP-1 i inhibeix l'expressió de les MMPs (171).

S'han atribuït un gran nombre de funcions als TIMPs. Tot i que la majoria d'aquestes funcions es deuen a la inhibició de les MMPs, els TIMPs també participen en processos cel·lulars per mecanismes independents a la inhibició de MMPs. Així, s'ha observat que poden promoure el creixement cel·lular d'un gran nombre de cèl·lules (172-174). A més, també sembla que podrien tenir efectes anti-apoptòtics (175-177) i anti-angiogènics (178,179).

S'ha observat que la sobre-expressió dels TIMPs inhibeix la migració d'alguns tipus de cèl·lules (180), mentre que la infra-expressió dels TIMPs afavoreix la angiogènesi (181) suggerint la importància abans descrita de les MMPs en la migració.

No s'ha analitzat cap dels TIMPs descrits en l'àmbit de l'HI, ni tant sols en l'hèrnia. Només un treball situa la TIMP-1 com a possible molècula efectiva en la reparació de l'hèrnia discal, tot i que només en revisa la possible implicació en la patologia (182).

#### **4.5.4.3.- Regulació MMPs/TIMPs**

L'equilibri entre les MMPs i els TIMPs és crucial per al manteniment de l'homeòstasi de la MEC i, en conseqüència, de la integritat tissular. Aquest equilibri, que es pot modificar en certes condicions fisiològiques o patològiques, està controlat al nivell transcripcional a través de factors de creixement, hormones i molècules inflammatòries (Taula I4; (183)).

Molècula	MMPs	TIMPs
TNF-a	↑	↑↓a
EGF	↑	↑
PDGF	↑	↑
bFGF	↑	ND
IL-1	↑	↑
IL-6	↑	↑
VEGF	↑	ND
CD40	↑	ND
Phorbol esters	↑	↑
Corticosteroids	↓	ND
Retinoic acid	↓	↑
Heparin	↓	ND
IL-4	↓	↓
TGF-b	↑↓b	↑
IFN-g	↑↓c	ND

**Taula I4.** Efectes d'algunes de les citoquines en l'expressió de les MMPs i els TIMPs. ↑ indica sobre-regulació; ↓ indica infra-regulació; ND indica no determinat; (a) indica que depèn de la dosi; (b) indica que augmenta l'expressió de MMP-2 i MMP-9 i disminueix l'expressió de MMP-1 i MMP-3; (c) indica que depèn del tipus cel·lular. Extret de Creemers E *et al.* *Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction. A new approach to prevent heart failure?* *Circ Res.* 2001; 89(3): 201-10.

Un augment en la quantitat de les MMPs, estimulat per una major expressió, o en l'activitat degut a una menor expressió i/o activitat dels TIMPs, és característic de situacions en que es requereixi de processos de remodelació actius, i.e. la reparació d'una ferida (184). De tota manera, si aquest desequilibri es perllonga en el temps es pot produir una desestructuració de la MEC que pot conduir a una situació patològica, i.e. molts tipus de càncers (130), problemes cardiovasculars (185,186) o malalties inflamatòries cròniques (187,188).

En canvi, un augment en la quantitat o activitat dels TIMPs produeix una davallada en l'activitat fisiològica de les MMPs que pot conduir també a processos patològics, com la fibrosi del teixit (189,190). La fibrosi és dóna quan el procés de reparació de la ferida esdevé crònic i es produeix una excessiva deposició de components de la MEC. Això desemboca en una destrucció de l'arquitectura normal del teixit i una pèrdua de les seves funcions (191). Aquesta resposta pot venir determinada per tres factors. En primer lloc, degut a que l'estímul o la lesió esdevenen constants. En segon lloc, es pot deure a una excessiva síntesi de col·lagen i altres components de la MEC. I finalment, a una davallada en l'activitat de les MMPs (192).

La relació entre els nivells de MMPs i de TIMPs és un reflex de l'estat en què es troba la MEC d'un teixit. Per tant, un desequilibri en aquesta relació pot indicar alguna patologia i donar indicis de quins podrien ser els factors implicats.

### **4.6.- Cèl·lules que secreten la MEC**

#### **4.6.1.- Tipus**

La MEC dels teixits connectius sol ocupar una gran part del teixit, i envolta les cèl·lules que la secreten i que ocupen una petita part. Generalment, les cèl·lules derivades del mesènquima són les encarregades de generar aquesta MEC. En la majoria de teixits connectius, el fibroblast és la cèl·lula que secreta i regula la MEC. En alguns teixits connectius concrets, les macromolècules de la MEC són secretades per cèl·lules especialitzades de tipus fibroblàstic, com els condroblasts en el cartílag (193) o els osteoblasts en l'os (194).

#### **4.6.2.- El fibroblast**

El fibroblast és la cèl·lula més comú del teixit connectiu, però en canvi és la menys especialitzada de la família de cèl·lules d'aquest teixit. El fibroblast és la cèl·lula més versàtil d'aquesta família, amb la capacitat de transformar-se en qualsevol dels altres membres (195).

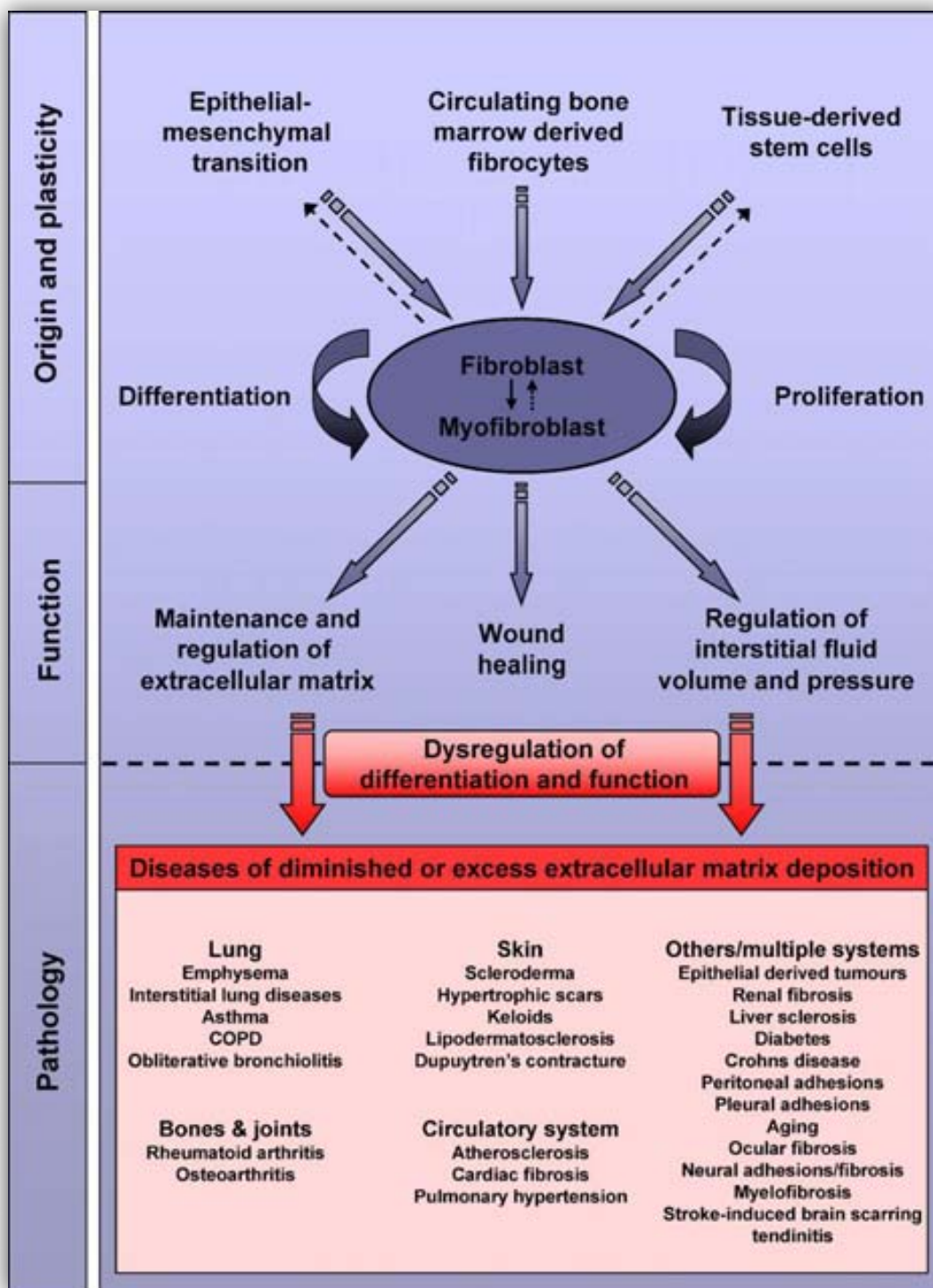
Els fibroblasts són, en general, cèl·lules relativament grans, amb forma de fus i amb el citoplasma en forma d'estrella. Tenen un nucli gran, generalment amb un o dos nuclèols. De tota manera, són cèl·lules morfològicament heterogènies, amb multitud d'aparences que depenen de la seva localització i activitat, des de fibroblasts no contràctils fins a fibroblasts contràctils passant per un gran nombre de fenotips

intermedis (196). Els fibroblasts de diferents zones del cos són intrínsecament diferents, però aquesta diferència de morfologies sovint pot coexistir en una mateixa zona, amb fibroblasts actius (amb abundància de reticle endoplasmàtic rugós) i fibroblasts inactius. A més, tenen la capacitat de passar d'un estat a un altre ràpidament.

Els fibroblasts poden provenir de diferents orígens (Figura I7; (197)):

- En primer lloc, poden originar-se en la *transició epitelí-mesènquima*, un procés que es dona durant el desenvolupament i alguns tipus de càncer. En aquest procés, les cèl·lules epitelials perden el seu fenotip diferencial i l'adhesió i secreten MMPs que els permeten migrar (198). Sembla que aquest canvi fenotípic podria donar lloc als fibroblasts (199).
- En segon lloc, els fibroblasts podrien tenir el seu origen en les cèl·lules mare mesenquimals del moll d'os. Aquestes cèl·lules, que es poden trobar circulants, són capaces de diferenciar-se en un gran nombre de cèl·lules, incloent els fibroblasts (200,201). De tota manera, hi ha certes controvèrsies en la diferència real entre aquests tipus de cèl·lules i els fibroblasts, ja que comparteixen un gran nombre de característiques (202).
- I finalment, recentment s'ha observat que en els teixits hi ha una població de cèl·lules mare mesenquimals (203) que podrien ser l'origen dels fibroblasts (204).

Els fibroblasts són un tipus cel·lular amb una elevada plasticitat, versatilitat i diversitat d'orígens. Aquestes propietats expliquen la seva diversitat fenotípica i, a la vegada, indiquen que juga un paper central en processos fisiològics i patològics del teixit connectiu.



**Figura 17.** Origen i funcions del fibroblast en situacions normals i patològiques. Extret de McAnulty RJ. *Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease*. Int J Biochem Cell Biol. 2007; 39(4): 666-71.

### **4.6.3.- Funcions del fibroblast**

El fibroblast és la cèl·lula encarregada de produir i mantenir la homeòstasi de la MEC del teixit on resideix. Són cèl·lules molt actives metabòlicament, que sintetitzen i secreten la major part dels components de la MEC, especialment col·làgens, però també proteoglicans i altres molècules. A més, sintetitzen les molècules que degraden i remodelen la MEC, majoritàriament les MMPs, i també els seus inhibidores, els TIMPs, per tal de regular el metabolisme de la MEC.

A més, els fibroblasts són capaços de regular el volum i la pressió del fluid intersticial del teixit (205). D'aquesta manera, són capaços d'augmentar o disminuir aquesta pressió jugant un paper essencial en el desenvolupament de l'edema en el procés inflamatori.

Finalment, els fibroblasts juguen un paper molt important en la reparació i regeneració de les ferides. Després de la formació d'una ferida, els fibroblasts procedents dels orígens abans descrits, són reclutats i s'activen, canviant el seu fenotip cap a un estat transitori anomenat myofibroblast. Els myofibroblasts, un estat intermedi entre fibroblast i cèl·lula del múscul llis, expressen un marcador característic anomenat actina alfa del múscul llis ( $\alpha$ -SMA), que li dona contractilitat. Aquest myofibroblast és molt actiu i sintetitza i secreta grans quantitats de molècules de la MEC sota el control dels mediadors alliberats per les cèl·lules inflamatòries i/o els propis fibroblasts. Després de remodelar aquesta nova MEC mitjançant la secreció de MMPs i TIMPs, la resolució d'aquesta MEC és necessària per evitar el procés de fibrosi (192). Després d'aquesta resolució, els myofibroblasts desapareixen, majoritàriament degut a que les forces mecàniques de la nova MEC estimulen la seva apoptosi (74).

Moltes de les malalties i dels desordres associats a una disminució o un excés en la deposició de col·lagen estan relacionats amb un desequilibri entre la resposta de reparació de la lesió i la funció del fibroblast. Aquestes lesions poden incloure agressions ambientals, infeccions, traumàtiques/mecàniques o autoimmunes. Així, aquelles malalties on el fibroblast pot jugar un paper central poden afectar a qualsevol òrgan o teixit del cos (Figura I7). Aquestes malalties associades a un augment o disminució en la deposició de MEC, o a la contracció del teixit o a una desregulació en el metabolisme de la MEC resulten en una pèrdua de l'arquitectura tissular i de les seves funcions. A més, en alguns casos on els òrgans vitals hi estan

implicats poden conduir a la mort, mentre que en els altres casos poden dificultar o impedir la vida normal del pacient.

Finalment, la desregulació de les diferents fases de la resposta de reparació d'una lesió, incloent una agressió crònica i/o constant, una resposta inflamatòria descontrolada, un balanç desequilibrat entre el metabolisme i la deposició de MEC, i una persistència de myofibroblasts i/o de fenotips alterats de fibroblasts poden contribuir a una reparació tissular aberrant i, en conseqüència, a una complicació de la ferida.

### **4.7.- Interacció cèl·lula-matriu**

L'organització tridimensional dels components de la MEC està controlada per les cèl·lules que la secreten, a través del seu citoesquelet. El citoesquelet d'actina és capaç de promoure l'assemblatge de proteïnes secretades de la MEC, com el col·lagen o la fibronectina, en *fibril·les*, i de promoure la seva orientació.

Les cèl·lules reconeixen i interaccionen amb aquestes molècules de la MEC a través de les integrines, uns receptors de membrana que comuniquen amb proteïnes del citoesquelet. La cèl·lula reconeix seqüències de les proteïnes de la MEC i s'hi uneix, generant una tensió que exposa seqüències amagades d'aquestes proteïnes que afavoreixen que s'uneixin les molècules entre elles, afavorint la polimerització i assemblatge de les molècules de la MEC.

Existeix una intercomunicació constant entre les cèl·lules i les molècules de la MEC, de manera que la qualitat i composició de la MEC és un reflex de l'estat en què es troben les cèl·lules. Aquesta comunicació no tant sols estimula la formació d'una correcta MEC, sinó que a la vegada influeix en processos cel·lulars com l'adhesió, la proliferació o l'apoptosi.

#### **4.7.1.- Adhesió**

L'adhesió cel·lular és el procés mitjançant el qual una cèl·lula es pot ancorar a una superfície. Això li permet mantenir-se immòbil i poder realitzar les seves tasques en una localització determinada. El trencament d'aquesta adhesió permet a la cèl·lula poder migrar quan li sigui convenient, però també pot conduir a la seva mort.



El procés d'adhesió es dona a través de proteïnes de la MEC. Algunes de les proteïnes de la MEC contenen seqüències peptídiques concretes, anomenades regions d'adhesió cel·lular (molt freqüentment, contenen el tripèptid Arginina-Glicina-Àcid aspàrtic, -RGD-), que són reconegudes per unes proteïnes d'adhesió cel·lular que es troben inserides en la membrana cel·lular. Aquestes proteïnes, anomenades integrines, actuen com a receptors de la matriu i generen una connexió entre la MEC i el citoesquelet. Les molècules d'integrina estan formades per dues glicoproteïnes transmembrana, anomenades subunitats  $\alpha$  i  $\beta$ , que es troben unides de manera no covalent. Existeixen 18 subunitats  $\alpha$  i 8 subunitats  $\beta$  que es poden combinar generant 24 molècules d'integrina, amb funcionalitats específiques a causa de les diferents especificitats de lligand (206).

Quan una integrina s'uneix a una proteïna de la MEC, la cua citoplasmàtica de la subunitat  $\beta$  interacciona amb una multitud de proteïnes intracel·lulars d'ancoratge, i.e. tal·lina,  $\alpha$ -actinina, vinculina, formant un agregat proteic extremadament complex anomenat complex d'adhesió (207). El complex d'adhesió interacciona de manera molt feble amb la MEC, ja que sinó la cèl·lula quedaria massa adherida. Per això, aquest complex d'adhesió és capaç de reclutar altres complexos d'adhesió, generant agrupaments. D'aquesta manera, la cèl·lula s'adhereix a la MEC mitjançant una gran multitud d'adhesions febles.

Un cop la cèl·lula reconeix la MEC, es desencadena una cascada d'esdeveniments a la part citoplasmàtica de la membrana cel·lular. S'activen un seguit de fosforilacions que acaben en la fosforilació de la kinasa d'adhesions focals (FAK). Aquesta proteïna té un paper central en la transducció del senyal, i es troba fosforilada quan els complexos d'adhesió maduren generant adhesions focals (208).

Les adhesions focals es troben, a més, en contacte directe amb les proteïnes del citoesquelet, com l'actina. La transducció del senyal segueix a través de la contracció i/o canvis en la polimerització dels filaments del citoesquelet, que a la vegada connecten amb el nucli (207,209). En un primer moment, s'estimulen canvis locals en el citoplasma proper al contacte cèl·lula-matriu, però a curt/mitjà termini pot desencadenar canvis en l'expressió gènica. Aquests canvis globals poden influir en multitud de processos cel·lulars com la proliferació, la diferenciació, la migració, l'activació o la mort cel·lular (210).

L'adhesió cel·lular és un procés crític en la supervivència de la majoria de les cèl·lules eucariotes. Per moltes d'aquestes cèl·lules, la senyalització mitjançant integrines és essencial i quan perden el contacte amb la MEC poden entrar en apoptosi (211-213).

### 4.7.2.- Proliferació

La proliferació cel·lular és el procés pel qual les cèl·lules augmenten el seu nombre. Aquest procés es dona gràcies a la divisió cel·lular, en la que a partir d'una cèl·lula se'n generen dues d'identiques. Durant el procés de divisió cel·lular, anomenat cicle cel·lular, el DNA de la cèl·lula original es duplica i posteriorment el citoplasma es divideix en dos, per generar dues cèl·lules iguals.

Les cèl·lules d'un organisme es divideixen només quan es requereixen més cèl·lules. Aquest creixement i divisió no només depèn de la presència de nutrients i de l'adhesió a la MEC, sinó que les cèl·lules necessiten un estímul extracel·lular. Aquest estímul sol ser secretat per cèl·lules veïnes o cèl·lules circulants en forma de molècules que activen el cicle cel·lular. Aquestes molècules, anomenades mitògens, solen ser factors de creixement que poden ser retinguts, com ja s'ha comentat, per les molècules de la MEC. De fet, la majoria de teixits tenen una taxa de creixement molt lenta, degut a la retenció d'aquests mitògens a la MEC. Aquests mitògens retinguts a la MEC es denominen també stormones.

Quan els mitògens retinguts a la MEC són alliberats, ja sigui per una lesió o per canvis en la remodelació induïts hormonalment, poden produir una activació local de la proliferació. De tota manera, aquesta estimulació depèn de la composició de la MEC (214,215) i de les propietats mecàniques d'aquesta (216,217).

Per altra banda, hi ha altres molècules de senyalització extracel·lular que poden inhibir la proliferació. Els més estudiats són els membres de la família del TGF- $\beta$ , que inhibeixen la proliferació d'un gran nombre de tipus cel·lulars, ja sigui bloquejant la progressió del cicle cel·lular o estimulant l'apoptosi. De fet, la mida d'un òrgan o teixit està delimitada en molts casos per una senyalització inhibidora del cicle cel·lular.

Finalment, les matriquines alliberades pel metabolisme de la MEC també poden tenir un efecte sobre el cicle cel·lular (218,219).

### **4.7.3.- Apoptosi**

El nombre de cèl·lules d'un teixit no es regula exclusivament controlant la proliferació, sinó que també es regula a través de la mort cel·lular. Quan les cèl·lules no són necessàries, s'activa un suïcidi programat intracel·lularment. Aquest procés es coneix també com apoptosi, i és el procés pel qual les cèl·lules moren d'una manera controlada, alliberant el seu contingut citoplasmàtic en forma de vesícules que es van degradant (220). D'aquesta manera, no s'alliberen tots els components com en una lisi o necrosi, evitant una mort massiva de les cèl·lules veïnes. Tot i així, la mort d'una cèl·lula per apoptosi pot alliberar factors pro-apoptòtics que poden induir la mort en cèl·lules veïnes sensibles a aquests estímuls.

Durant l'apoptosi, s'activa una cascada d'activació intracel·lular mitjançant una família de proteases anomenades caspases. Aquestes proteases són alliberades en la seva forma inactiva, anomenada pro-caspasa, i activen una cascada d'amplificació per proteòlisi. S'han identificat un gran nombre de molècules que regulen el procés d'apoptosi, incloent les molècules de la MEC. Aquestes molècules de la MEC poden retenir les molècules de senyalització extracel·lular, igual que les que regulen la proliferació, i alliberar-les en determinades situacions. Aquestes molècules que regulen l'apoptosi poden ser factors de creixement o molècules inflamatòries.

També s'ha observat que la disrupció de la MEC és un potent inductor de l'apoptosi (221-223), molt probablement degut a la pèrdua de contacte entre la cèl·lula i la MEC. La manca d'adhesió a un substrat estimula la mort de la majoria de cèl·lules eucariotes a través dels receptors de MEC, generalment integrines (224). Sembla que alguns dels fragments alliberats durant la degradació de la MEC, anomenats matriquines, podrien també influir en l'apoptosi bloquejant les integrines o el lloc d'unió d'aquestes (225). A més, la càrrega mecànica també sembla influir en l'apoptosi cel·lular (226,227).

L'apoptosi és un procés comú durant el desenvolupament, la regeneració tissular normal, l'atròfia endocrina o la selecció negativa del sistema immunològic (228,229). Tot i així, també és present en condicions anormals com l'exposició a agents citotòxics, la hipòxia, la infecció viral o varis processos degeneratius crònics, i.e. Alzheimer, Parkinson (230-232).

Així doncs, la desestructuració de la MEC d'un teixit pot regular l'apoptosi de tres maneres diferents: modulant la presència de factors apoptòtics, influint en el contacte cèl·lula-matriu i, finalment, a través de la variació de la càrrega mecànica que suporta el teixit.

### 4.7.4.- Inflamació

La inflamació és un procés inevitable i necessari per a la reparació de les ferides i la restauració d'un teixit danyat. La reparació d'una ferida és un procés dinàmic que involucra interaccions complexes entre molècules de la MEC, mediadors solubles, varies cèl·lules residents i subtipus de cèl·lules inflamatòries (233). L'objectiu principal d'aquesta reparació és recuperar la homeòstasi i la integritat tissular. Per aconseguir-ho, el procés de reparació segueix tres fases fonamentals: la inflamació, la formació de teixit i la remodelació del teixit (234).

Durant la fase inflamatòria es dona infiltració de cèl·lules leucocitàries a la zona danyada. Aquestes cèl·lules secreten un conjunt de molècules de senyalització (citocines i factors de creixement) que seran les responsables de dirigir els moviments cel·lulars i tissulars necessaris per a la reparació (235). Aquestes molècules tenen uns efectes considerables en la migració cel·lular, la proliferació i la diferenciació de les cèl·lules residents encarregades de la reparació tissular i, en definitiva, en la qualitat final del teixit reparat (236). Durant la reparació tissular, es dona una formació de teixit granulós que cobreix la zona de la ferida i restaura la integritat tissular. La síntesi, la remodelació i la deposició de molècules estructurals de la MEC és clau en la reparació i progressió de la reparació de la ferida (27).

Després de la fase inflamatòria, s'han d'eliminar les cèl·lules reclutades i les cèl·lules mortes. Aquest procés està regulat principalment per la desaparició dels senyals de supervivència secretats per les cèl·lules de l'estroma, conduint a l'apoptosi i la fagocitosis de les cèl·lules mortes (237). Els mecanismes mitjançant els quals es regula aquest procés solen incloure la secreció de molècules amb efectes antiinflamatoris que disminueixen l'expressió de quimiocines, com la IL-10 (169) o el TGF- $\beta$  (238), o que actuen d'antagonistes de citocines, com el receptor antagonista de IL-1 (239) o el receptor soluble de TNF- $\alpha$  (240,241). Si aquest procés no té èxit, la inflamació esdevé crònica i es dona una persistència de mediadors inflamatoris, una hiperplàsia tissular i, finalment, una destrucció tissular (242).

En els teixits connectius, el fibroblast és la cèl·lula encarregada de la reparació tissular i juga un paper important en els processos inflamatoris. Les molècules secretades per les cèl·lules inflamatòries activen els fibroblasts que, a més d'encarregar-se de la reparació tissular, secreten citocines i quimiocines que regulen el microambient cel·lular i el comportament de les cèl·lules immunològiques (243). Els fibroblasts, a més, interaccionen amb les cèl·lules inflamatòries a través dels lligands CD40 (244), que activen el factor de transcripció NF- $\kappa$ B encarregat del control de la síntesi d'alts nivells de interleucines i citocines (245). Aquests mecanismes han d'estar altament regulats per tal de prevenir la sobre-estimulació del sistema immunitari, ja que comportaria a una inflamació persistent i crònica. La producció inapropiada de molècules immuno-moduladores per part dels fibroblasts evita la transició des d'una inflamació aguda a una correcta resposta immunològica, conduint a una inflamació crònica persistent (246).

Se sap amb certesa que els fibroblasts aïllats d'un teixit afectat o danyat són fenotípicament diferents dels fibroblasts aïllats de teixits sans de la mateixa zona anatòmica (247,248). De fet, s'ha observat que els fibroblasts procedents d'un teixit inflammat són diferents dels d'un teixit no inflammat (249), suggerint que la inflamació modifica profundament el fenotip i la funcionalitat del fibroblast. Aquesta modificació fenotípica és estable en absència d'estimulació externa i durant varis passatges en cultiu *in vitro*.

L'estudi de l'expressió gènica mitjançant l'ús de xips d'expressió gènica és una eina molt útil per observar aquestes modificacions en el fenotip dels fibroblasts induïdes per l'entorn tissular alterat. De tota manera, la immensitat de dades generades és enorme i cal estudiar a fons el seu significat per tal de descobrir noves rutes que aportin nous coneixements per a l'estudi d'una malaltia o alteració.

## **5.- Biomaterials**

El mètode més utilitzat per al tractament de l'HI és l'ús de malles quirúrgiques acompanyades del tancament lliure de tensió. A diferència del tancament amb sutura, que requeria que el teixit hagués de suportar una força tensional alta, aquest mètode ha permès reduir la taxa de recurrència de l'HI (250,251), tot i que encara segueix sent alta, fins al 34% (252). En la majoria de casos, però, l'ús de malles només sembla retardar l'aparició de l'HI (250) i com la majoria d'estudis són a curt termini, la taxa de recurrència podria estar subestimada. A més, en alguns casos pot

anar acompanyada de complicacions com infeccions, adhesió als intestins, formació de fístules o obstruccions intestinals (253). És per això que se segueix investigant en la millora dels tipus de malles existents per tal d'evitar les recurrències, les complicacions post-operatòries i el malestar del pacient.

### 5.1.- Història

La història de la reparació de l'hèrnia segueix paral·lela a la història de la cirurgia. L'hèrnia, que prové del mot *hernios*, assignat per Hipòcrates, ja apareixia en els manuscrits més antics de l'Egipte faraònic. De fet, algunes de la mòmies han sigut descobertes amb hèrnies i algunes suposadament tractades amb sutures, encara que hi ha certes controvèrsies al respecte (254,255).

Durant els següents anys es va anar aprofundint en el coneixement de l'hèrnia, però el seu tractament sovint es reduïa als casos en que la vida en podia dependre, mitjançant l'ús de sutures amb materials diversos. A partir de l'any 1870, quan Lister va introduir la cirurgia antisèptica, es va poder aprofundir en les tècniques quirúrgiques. De fet, un dels seus alumnes, Marcy, va realitzar amb èxit una operació d'hèrnia amb sutura profunda. Posteriorment, l'any 1906 von Mickulicz va introduir l'asèpsia a la cirurgia, afavorint el desenvolupament de la cirurgia moderna de l'hèrnia. Durant el segle XIX, es va seguir investigant amb tancaments amb tensió de l'hèrnia utilitzant diferents tipus de sutures. De tota manera, es van identificar taxes de mortalitat significants, associades a problemes de sèpsies, peritonitis, hemorràgies i varis errors quirúrgics (256). A més, les recurrències als 4 anys eren pràcticament el 100%.

Posteriorment, Bassini va aplicar diferents mètodes que van revolucionar el tractament de les hèrnies. Va proposar l'ús de la fàscia durant la sutura, la reconstrucció fisiològica dels teixits i l'ús de sutures no absorbibles de seda (257). Les taxes de mortalitat i infecció van ser les més baixes fins al moment. De tota manera, es va començar a observar que el tancament amb tensió realitzat per Bassini produïa dolor al pacient i podia conduir a recurrència al lloc operat. Alguns autors van investigar en l'ús d'una incisió relaxant, que no generés tanta tensió a la zona operada (258,259).

Una alternativa per disminuir la tensió a la zona reparada és l'ús de material forani. Durant els finals del segle XIX i inicis del segle XX es va utilitzar diferents tipus de fàscies per a la reparació de les hèrnies (260-262). Se sap actualment que l'ús de

fàscia autòloga o heteròloga té certs desavantatges. Per exemple, hi ha una disponibilitat limitada i requereixen d'una intervenció addicional que pot augmentar la morbiditat (263).

Posteriorment es va començar a usar materials metàl·lics, com la plata, el tàntal, o l'acer inoxidable, per al tractament de l'hèrnia com a malles primitives (264-266). El problema és que en molts casos es fragmentava el material, es donava erosió del teixit i no s'evitava la recurrència de l'hèrnia.

El descobriment dels polímers sintètics, per William Carothers al 1935, va revolucionar la reparació de l'hèrnia mitjançant l'ús del niló (267). La biocompatibilitat del niló el va convertir en el material idoni per al sargit de les hèrnies, ja que la reacció tissular era mínima i la reparació de la ferida era satisfactòria en tots els casos, en comparació amb les tècniques anteriors. De tota manera, el tancament amb sutura seguia tenint els problemes derivats de la tensió que havia de suportar el teixit. A més, sembla que les sutures produeixen la isquèmia del teixit i altres problemes en el punt de sutura (268).

Així doncs, l'ús d'un material protèsic (per reduir les tensions) format per un polímer sintètic (amb mínima resposta tissular) reuniria les condicions ideals per a la reparació de l'hèrnia. En aquest sentit, en els darrers anys s'ha buscat un biomaterial "ideal" per a la cirurgia. Aquest biomaterial hauria de reunir diferents criteris (269-271): no s'hauria de modificar pels fluids tissulars; hauria de ser químicament inert; no hauria de desencadenar una resposta inflamatòria o de cos estrany; no hauria de ser carcinogen; no hauria de desencadenar al·lèrgia o hipersensibilitat; s'hauria de poder fabricar en qualsevol forma; i s'hauria de poder esterilitzar.

Un altre gran avenç en el tractament de l'hèrnia va ser l'operació lliure de tensió, aplicada inicialment per Lichtenstein en hèrnia inguinal (272). Aquest mètode es basa en no forçar l'aproximació dels teixits del defecte, sinó que es col·loca la malla al seu interior i es sargeix a l'aponeurosi. S'ha observat que el lloc de col·locació de la malla pot influir considerablement en la seva integració. En aquest sentit la inserció en la zona pre-aponeuròtica és millor que en la superfície peritoneal (estrat profund) ja que millora la colonització i activació cel·lulars, estimula el dipòsit de col·lagen i millora la formació de nous vasos capil·lars (273). Finalment es sargeix la pell, sense tensar ni múscul ni aponeurosi. D'aquesta manera, la malla és qui suportarà la

pressió intra-abdominal. A més, aquest mètode es va millorar en aplicar una malla molt més gran que el defecte (274).

Finalment, el darrer gran avenç en el tractament de l'hèrnia ha estat l'operació mitjançant laparoscòpia (275,276). Aquesta tècnica de mínima invasió es basa en la introducció de diferents cànules a través de petites incisions. Aquestes cànules contenen un càmera a través de la qual el cirurgià pot observar l'operació, a més de poder introduir diferents estris per operar. El fet de generar petites incisions permet disminuir la pressió que la ferida generada ha de suportar i disminueix en gran mesura les complicacions post-operatòries (277-279).

### **5.2.- Tipus de malles.**

S'ha utilitzat un gran nombre de tipus de malles polimèriques per al tractament de les hèrnies que, amb el temps, s'han anat descartant. Aquests polímers inclouen les malles de niló (280), les fibres de carboni (281), el Teflon o politetrafluoroetilè (PTFE; (282,283)) o les esponges de polivinil (284,285).

Actualment hi ha tres tipus de pròtesis polimèriques que s'utilitzen àmpliament: la malla de polièster, la malla de polipropilè i el pedaç de PTFE expandit (e-PTFE).

El polièster s'utilitza en combinació amb l'etilenglicol i l'àcid tereftàlic per formar un compost anomenat Dacron. L'empresa Ethicon (Somerville, NJ, USA) el va utilitzar per fabricar una malla que va sortir al mercat amb el nom comercial Mersilene. S'ha utilitzat àmpliament en el tractament de les hèrnies abdominals (134,276,286,287). Tot i que té una elevada adaptabilitat, flexibilitat i tolerància als teixits i a les infeccions (288), el seu ús va disminuir des de que les malles de polipropilè es van popularitzar.

Les malles de polipropilè van ser utilitzades inicialment per Usher (289-291), sota el nom de Marlex 50. Posteriorment es va desenvolupar una versió millorada, anomenada Marlex, que va ser comercialitzada per Bard (Bellerica, MA, USA). Altres empreses la fabriquen amb altres noms com Prolene (Ethicon) o Surgipro (US Surgical Corporation, Norwalk, CT, USA). Aquesta malla és la més popular en el tractament quirúrgic de les hèrnies. Un gran nombre d'estudis han demostrat la seva validesa, fins i tot en presència de reaccions inflamatòries (134,292-294). Les malles de polipropilè indueixen una resposta inflamatòria que augmenta a l'augmentar la



mida de la malla (295). És per això que es recomana no implantar-les en contacte amb els intestins o utilitzar alternatives per evitar l'adhesió (296,297).

Plunkett va descobrir per error el PTFE al 1938. Posteriorment, l'empresa Sumitoma Electric Industries (Osaka, Japó) va descobrir un mètode per expandir el PTFE millorant enormement la seva resistència mecànica. Finalment, l'empresa Gore i Associats (Flagstaff, AZ, USA) va refinar el mètode i va obtenir un e-PTFE en forma de fulla anomenat Gore-Tex. S'ha demostrat que un pedaç de e-PTFE pot ser més resistent que les malles de Marlex o de Mersilene (298) i té una força de retenció de la sutura similar. S'ha demostrat que el seu ús en la reparació de l'hèrnia és beneficiós (299-301), encara que en alguns casos es produeixen adhesions intestinals (302,303).

Recentment, s'està estudiant amb noves malles de material biològic. En aquest sentit, existeixen modificacions de les malles més utilitzades amb molècules adsorbides que puguin millorar l'adhesió i/o la implantació, i.e. amb col·lagen (296), factors de creixement com el FGF (304) o diverses molècules bioactives (305). De tota manera, els resultats són en alguns casos contradictoris i/o no concloents. També s'han utilitzat malles de polímers sintètics bioabsorbibles que semblen millorar la cicatrització, estimulants la formació de nou teixit i l'angiogènesi (306). Finalment, les malles de pell de porc o humanes decel·lularitzades, per disminuir la resposta immunològica, semblen tenir un potencial terapèutic prometedor. La seva resistència a la tensió, similar a les altres malles i al teixit, la seva menor adhesió als intestins, la seva incorporació al teixit de l'hoste sense complicacions majors i amb bona neovascularització, i la menor propensió a infeccions les fan bons candidats (307-310). De tota manera, la resposta immunològica encara no està ben definida (311,312), i la dificultat del procés d'obtenció i el preu han frenat el seu ús clínic.

També s'ha millorat la integració de les malles mitjançant l'administració de tractaments amb molècules com l'arginina (313), que en combinació amb la malla indueixen canvis subtils en la composició de la MEC que incideixen en característiques estructurals i bioquímiques d'aquesta, augmentant les forces de tensió i disminuint la rigidesa.

### 5.3.- Interacció cèl·lula – material

La interacció entre una cèl·lula i una superfície és un mecanisme crucial per a la supervivència de la cèl·lula. El procés és exactament el mateix que es dona en la interacció entre la cèl·lula i la MEC abans detallat. Per tant, la cèl·lula interacciona indirectament amb el material a través de les proteïnes d'adhesió que s'hi adsorbeixen, mitjançant les integrines. De fet, quan un material és implantat, ràpidament es recobreix de proteïnes i altres molècules de la sang i fluids intersticials. A través d'aquestes proteïnes, les cèl·lules s'adhereixen a la superfície del biomaterial i el poden colonitzar. Els processos posteriors a aquesta colonització acabaran desembocant en una integració tissular o una encapsulació, encara que a vegades poden desembocar en reaccions adverses que poden portar al rebuig del biomaterial.

Hi ha varis factors que poden influir en l'adsorció proteica i, per tant, en l'adhesió i la supervivència cel·lular. Existeix un gran nombre de paràmetres que poden descriure la superfície d'un biomaterial (Taula I5; (314)), però no es coneix amb exactitud quin o quins són els factors determinants. Els factors més estudiats són la composició química, la topografia i l'absorbibilitat. Un biomaterial implantat no només ha d'afavorir l'adsorció proteica de les molècules de la sang i altres fluids intersticials, sinó que a més ha de presentar les regions proteiques essencials d'aquestes proteïnes adsorbides en una correcta conformació i orientació, per tal de fer-les funcionals (315).

Propietat	Tipus d'informació físico-química
Composició química	Composició atòmica Estat químic dels elements
Estructura	Cristal·linitat
Ordre	Inclusions
Desordre	Espais lliure Límits cristal·lins
Morfologia	Formes 2D i 3D de les característiques superficials
Textura	Àrea superficial específica
Rugositat	Porositat
Forma	
Energia de superfície	Absorbibilitat Energia superficial
Propietats elèctriques	Potencial de superfície Càrregues superficials
Mecànica	Elasticitat/plasticitat Forces compressives i de tensió en les capes superficials

**Taula I5.** Propietats d'un material i informació superficial que aporten. Adaptat de Fabrizio-Homan DJ, Cooper SL. *A comparison of the adsorption of three adhesive proteins to biomaterial surfaces.* J Biomater Sci Polym Ed. 1991; 3(1): 27-47.

La rugositat o topografia, és a dir, la morfologia d'un substrat, té una gran influència en l'adhesió i l'espargiment cel·lular (316,317), però també en processos com l'orientació o la migració (318,319). Indirectament, pot tenir influència en altres processos com la proliferació, l'apoptosi i la diferenciació (320,321). Aquesta influència sembla que podria tenir dues explicacions. En primer lloc, un augment en la rugositat superficial genera un increment en l'àrea superficial. Per tant, quan major és l'àrea superficial major és la quantitat de proteïna que s'hi pot adsorbir (322). I en segon lloc, hi ha evidències que suggereixen que els canvis en el perfil de les adhesions focals estimulen una reorganització del citoesquelet que desemboca en els diferents processos biològics (323,324). De tota manera, la relació directa entre la rugositat i la regulació dels processos cel·lulars no està del tot clara. Hi ha un gran nombre d'estudis que han relacionat la rugositat amb el comportament cel·lular. De tota manera, la interpretació dels resultats és complicada degut a la diversitat de mètodes i paràmetres utilitzats per caracteritzar la topografia superficial. A més, el tipus de cèl·lula utilitzat també sembla influir en els resultats. Algunes cèl·lules prefereixen superfícies llises i altres cèl·lules les prefereixen rugoses. Finalment, sembla que la rugositat d'un biomaterial és també important per a la integració tissular, ja que

estimula la formació de teixit al seu voltant i augmenta la interacció biomecànica a la interfície (325,326).

S'ha observat que l'adsorció de proteïnes a una superfície depèn també de la naturalesa hidrofòbica o hidrofílica, de manera que una superfície hidrofòbica pot adsorbir uns tipus de proteïnes diferents a les que adsorbeix una superfície hidrofílica (327). Algunes proteïnes poden ser adsorbides pels dos tipus de superfícies, però poden perdre la seva funcionalitat en alguna d'elles degut a la conformació que adopten (328). El caràcter hidrofílic o hidrofòbic d'una superfície ve determinat per la capacitat d'interaccionar amb l'aigua. Una superfície hidrofòbica és aquella que repel·leix les molècules d'aigua, minimitzant el contacte, mentre que una superfície hidrofílica és aquella que atreu les molècules d'aigua, establint interaccions en forma de ponts d'hidrogen. L'absorbibilitat d'un material ve determinada per les interaccions de càrrega amb la superfície i els canvis de conformació que sofreix una proteïna. En principi, degut al major nombre de possibles interaccions que afavoreixen l'adsorció, les superfícies hidrofòbiques sembla que adsorbeixen més proteïnes que les hidrofíliques (329), ja que aquestes tenen la major part de possibles interaccions ocupades per molècules d'aigua.

### **5.4.- Resposta cel·lular**

Tot i que alguns estudis *in vitro* han demostrat canvis en el comportament cel·lular segons els tipus de malla, la majoria utilitzen línies cel·lulars enlloc de fibroblasts humans. Per tant, falten estudis que comparin la interacció entre les cèl·lules humanes de pacients amb HI i els diferents tipus de malles.

S'ha observat que el tipus de material polimèric pot influir de manera diferent en la proliferació i/o l'apoptosi dels fibroblasts (330,331). A més, sembla que la mida dels porus de les malles podria ser determinant en la reacció inflamatòria de cos estrany. De tota manera, aquest efecte no s'ha observat *in vitro*, sinó que sembla que els fibroblasts reaccionarien més a malles compostes per més d'un polímer, augmentant la síntesi de molècules inflamatòries (332). Per altra banda, alguns estudis han analitzat la producció de components de la MEC dels fibroblasts sembrats sobre de malles (333) o de molècules implicades en el seu metabolisme (157). Per tant, el recobriment cel·lular *in vitro* de les diferents malles quirúrgiques és un procediment viable per a l'estudi del comportament cel·lular. De tota manera, la majoria d'estudis se centren només en analitzar alguns processos cel·lulars, i.e. proliferació i apoptosi,

sense aprofundir en els mecanismes moleculars implicats, i.e. adhesió cel·lular o adsorció proteica. També s'ha postulat que el pre-recobriment de les malles amb fibroblasts del mateix pacient podria condicionar la superfície de la malla i disminuir la reacció inflamatòria i la formació de fístules, augmentant les probabilitats d'èxit de la implantació (333).

D'altra banda, s'han realitzat nombrosos estudis d'implantació de malles quirúrgiques en animals d'experimentació. Molts d'aquests estudis serveixen per avaluar noves tècniques quirúrgiques i, a la vegada, analitzar la resposta de l'organisme a la implantació. S'ha observat que la implantació de malles polimèriques sol conduir a respostes inflamatòries que depenen del tipus de polímer (334). La majoria de treballs, però, se centren en estudiar els principals problemes de la integració de la malla, com la formació d'adhesions intra-abdominals (335,336), sense descriure cap mecanisme que relacioni el tipus de material amb la resposta provocada. A més, tot i que els models animals utilitzats poden desenvolupar HI molt similars a les humanes (337), no deixen de ser defectes abdominals induïts en animals amb un metabolisme diferent a l'humà.

El gran nombre de malles disponibles al mercat dificulta l'elecció de la més idònia per a cada tipus de malalt. Sovint, l'elecció del material protèsic es basa en principis econòmics i/o en les preferències personals del cirurgià (338,339). Manquen estudis homogenis que avaluin el comportament cel·lular dels fibroblasts dels teixits implicats en la HI cultivats sobre els diferents tipus polimèrics de malles quirúrgiques, per poder seleccionar la millor malla en funció de la seva resposta biològica.



# JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL





L'HI abdominal és una de les complicacions més freqüents posteriors a una intervenció quirúrgica abdominal. L'elevat nombre d'intervencions d'aquest tipus que es realitza als hospitals, junt amb l'elevada incidència i reincidència de l'HI, són els responsables que aquest desordre generi una despesa important per al Sistema Nacional de Salut.

Encara que generalment la seva aparició s'ha atribuït a factors tècnics durant l'operació, hi ha evidències creixents que suggereixen que, almenys en un subgrup de pacients, podria haver-hi una alteració del teixit connectiu subjacent que permetria parlar d'una biologia de l'hèrnia. Tot i que alguns treballs han demostrat alteracions específiques del metabolisme del col·lagen, encara no s'han analitzat a fons aquestes alteracions com en altres tipus d'hèrnies ben caracteritzades, e.g. l'hèrnia inguinal. De tota manera, l'evidència de factors de risc del propi pacient o altres factors determinants, com la infecció, que podrien afavorir la seva aparició, posa de manifest que el problema va més enllà d'un desordre en el col·lagen. Per tant, és necessari un coneixement més profund dels mecanismes cel·lulars i moleculars que desencadenen la formació i progressió de l'HI per tal de poder trobar estratègies de diagnòstic i/o prevenció.

El fibroblast és la cèl·lula majoritària del teixit connectiu i probablement la cèl·lula més implicada en la integració dels biomaterials en la paret abdominal. Com que controla la síntesi i el metabolisme de la MEC, i és capaç de canviar el seu fenotip en resposta a multitud d'estímuls, cal tenir-lo present com a potencial agent causal de la malaltia i possible diana terapèutica. Com que és capaç de mantenir alteracions en el seu fenotip induïdes per una malaltia o un desordre durant un cert període de temps en cultiu cel·lular *in vitro*, la identificació del seu perfil d'expressió gènica mitjançant xips d'expressió gènica pot revelar nous gens i noves vies de senyalització cel·lulars i moleculars alterades que permetin un millor coneixement del procés de l'HI i obrin noves rutes de tractament terapèutic.

El tractament per a l'HI més utilitzat i amb més èxit és l'ús de malles quirúrgiques que suporten gran part de la tensió que genera la paret abdominal i permeten una millor cicatrització. De tota manera, les taxes de reincidència segueixen essent elevades i a llarg termini el seu èxit es podria posar en dubte. Per això, els diferents tipus de malles que hi ha al mercat són susceptibles de millora. L'ús de models animals no reflecteix el curs natural de les hèrnies incisionals i, per tant, no són models útils per a l'etiopatogènia de l'HI, encara que són útils per avaluar noves malles quirúrgiques. Els estudis *in vitro* són una estratègia alternativa interessant que permeten la possibilitat d'avaluar la interacció entre un tipus de cèl·lula específica i un tipus de material concret. Tot i que hi ha estudis que han utilitzat fibroblasts procedents d'altres zones, e.g. la pell, els estudis mitjançant l'ús de fibroblasts procedents de la zona implicada en el procés i, a més, dels fibroblasts alterats de pacients amb HI pot posar de manifest com interactuen amb els materials i com aquests afecten la seva funcionalitat per tal d'esbrinar com modificar els biomaterials per a millorar la seva integració.

**HIPÒTESI**



El principal mecanisme de formació de l'HI és la pèrdua de la integritat mecànica del teixit estructural de la paret de l'abdomen. De tota manera, els mecanismes cel·lulars i moleculars que desencadenen aquesta formació són desconeguts i es suggereix que es tracta d'un desordre heterogeni i multifactorial on el metabolisme de la MEC juga un paper decisiu. A més, la manca de models experimentals apropiats (animals i *in vitro*) que permetin estudiar els mecanismes inicials de la malaltia obliga a desenvolupar estudis observacionals per a generar noves hipòtesis de la malaltia.

En base a aquestes consideracions, en aquesta tesi es plantegen les següents hipòtesis:

- A més d'una alteració en el metabolisme de la MEC, la fisiopatologia de la HI podria estar relacionada amb trastorns específics del teixit derivats d'una regulació alterada dels mecanismes d'inflamació i proteòlisi que, alhora, podrien contribuir a la transformació permanent dels fibroblasts, comportant alteracions en el seu fenotip i la seva funcionalitat i la conseqüent remodelació anòmala de la MEC i la ruptura del teixit.
- Els fibroblasts activats podrien iniciar i/o perpetuar una alteració de la MEC, modulada per cascades de senyalització que encara estan per definir. La identificació d'aquestes rutes podria obrir la possibilitat d'intervenir en el microentorn dels teixits que formen part de la paret abdominal i obrir noves dianes d'intervenció terapèutica.
- La integració dels biomaterials utilitzats per a la reparació i substitució de teixits tous és susceptible de ser millorada a l'escala micro- i nano-mètrica, tenint en compte el fenotip i la funcionalitat diferencial dels fibroblasts de pacients amb HI.



**OBJECTIUS**





L'objectiu principal de la present tesi és millorar el coneixement del procés de formació de l'HI a través de la identificació de les alteracions que afecten els teixits que conformen la paret abdominal a nivell cel·lular i molecular per tractar de generar una hipòtesi de la malaltia que permeti abordar-la des de noves estratègies diagnòstiques i terapèutiques. També, millorar el coneixement de la resposta cel·lular al tractament amb malles quirúrgiques per identificar les rutes implicades en la biointegració per tractar d'aportar nous coneixements per a la millora dels biomaterials en el tractament de la HI.

Els objectius específics d'aquesta tesi són:

- 1.- Caracteritzar alteracions en el metabolisme de la MEC del múscul esquelètic i l'aponeurosi de la paret abdominal de biòpsies de pacients amb HI i, més concretament, en algunes de les metal·loproteases de matriu i els seus inhibidors, així com identificar possibles rutes inflamatòries alterades que puguin estar associades a aquesta desregulació en els pacients amb HI.
- 2.- Analitzar el perfil transcripcional dels fibroblasts primaris de múscul esquelètic i aponeurosi de la paret abdominal de pacients amb i sense HI, mitjançant xips d'expressió gènica i validar alguns dels gens diferencialment expressats, que puguin tenir rellevància en el marc de la HI, mitjançant PCR en temps real, immunotransferència i immunofluorescència.
- 3.- Comparar la resposta cel·lular (adhesió, proliferació i apoptosi) *in vitro* de fibroblasts primaris de pacients amb i sense HI en contacte amb una malla de polipropilè comunament utilitzada per al tractament de la HI.



# **MATERIAL I MÈTODES**



## **1.- Pacients**

Les mostres es van seleccionar a partir d'un banc de teixits que emmagatzema biòpsies d'aponeurosi i de múscul esquelètic de pacients amb HI i pacients control sense HI (més de 150). Aquestes biòpsies es van recollir al Departament de Cirurgia de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron per un cirurgià especialitzat, durant la intervenció quirúrgica. A més, altres dades dels pacients com les comorbiditats, l'edat o el sexe es van enregistrar per tal de seleccionar les mostres adients per als estudis.

A causa de la limitació de teixit, alguns pacients van ser utilitzats per uns estudis i d'altres per uns altres, sempre arribant a un nombre mínim per tenir uns resultats estadístics prou significatius.

### **1.1.- Subjectes d'estudi**

Tots els pacients van signar un informe de consentiment mitjançant el qual se'ls va informar que participarien en l'estudi.

#### **1.1.1.- Casos**

Pacients que desenvolupen per primer cop una HI, no aguda, i que, per tant, no se'ls ha tractat amb malla quirúrgica. L'hèrnia es diagnostica per examen físic i/o visual. Van ser pacients que van desenvolupar una hèrnia després d'haver-los extirpat un càncer de colon o recte o d'haver-los practicat una colecistectomia, una operació d'apendicitis, una cesària, haver patit un trauma abdominal, etc. Totes les hèrnies seleccionades pels estudis es localitzen a la zona mitja de l'abdomen (eventració supraumbilical, infraumbilical, laparo-mitja, periclostòmica, periileostòmica o subcostal).

### 1.1.2.- Controls

Les biòpsies es van obtenir de donants voluntaris que van ser operats, no d'urgència, de cirurgia abdominal digestiva (adenocarcinoma o neocarcinoma de recte, de colon, de sigma, de cec, d'ovari, de bufeta o limfoma).

### 1.2.- Criteris d'exclusió

- Pacients amb infeccions prèvies en la ferida.
- Malalties endocrino-metabòliques, com malaltia obstructiva crònica (EPOC), diabetis, hipertensió arterial, cardiopatia, etc.
- Malalties inflamatòries sistèmiques, com malaltia de Crohn, malaltia inflamatòria intestinal, arteriosclerosi, etc.
- Malalties del teixit connectiu, com el síndrome de Marfan, el síndrome de Ehlers-Danlos, l'osteogènesi imperfecta, etc.
- Malalties autoimmunes del teixit connectiu, com el Lupus Eritematos Sistèmic, l'Artritis Reumàtica, l'Escleroderma, etc.

## 2.- Mostres

### 2.1.- Biòpsies

Les mostres es van obtenir d'aponeurosi i de múscul esquelètic de la paret abdominal dels pacients. En els pacients amb HI, es van obtenir a més de 8 cm del defecte principal, eludint el denominat anell herniari, zona activa de remodelació i cicatrització. Es van evitar també les zones amb necrosi i teixit de granulació.

Les biòpsies es van submergir en medi *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) complementat amb 20% de sèrum boví fetal (FBS) fins a l'arribada al laboratori, on es van dividir en múltiples peces. Una part va ser fixada en formalina al 10% per tècniques histològiques, una altra es va congelar en nitrogen líquid per als anàlisis d'àcids ribonucleics (RNA) i proteïna, i una altra per a l'establiment de cultius primaris de fibroblasts.

## **2.2.- Anàlisis histològics**

Les preparacions histològiques es van realitzar al departament de Patologia de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron, per un patòleg especialitzat.

Es van tallar les biòpsies en seccions fines i consecutives de 4 µm. Es van tenyir les seccions amb hematoxilina i eosina per visualitzar la morfologia del teixit, amb tricròmic de Masson per determinar els col·làgens de la MEC i amb blau d'alcian per determinar el contingut en GAGs. Es van seguir protocols utilitzats habitualment en la pràctica clínica.

## **2.3.- Cultiu cel·lular**

A partir de les biòpsies d'aponeurosi i de múscul esquelètic dels pacients, es van obtenir els cultius primaris de fibroblast.

### **2.3.1.- Material de cultius**

Tot el material de cultius emprat prové de la casa comercial Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Es va utilitzar el medi DMEM amb alt contingut en glucosa (5 g/L), amb piruvat sòdic com a font energètica i amb L-glutamina inclosa. Aquest medi es va complementar amb FBS provinent d'un mateix estoc en tot el treball. També es va afegir una barreja comercial de penicil·lina i estreptomicina com a antibiòtics d'ampli espectre a concentració final de 100 U/ml i 100 µg/ml, respectivament. Es va utilitzar el tampó HEPES a una concentració final de 20 mM com a solució tamponadora del medi, per evitar canvis bruscs de pH deguts al CO<sub>2</sub> produït per les cèl·lules.

### **2.3.2.- Obtenció**

Els cultius primaris de fibroblasts es van obtenir adaptant un protocol d'obtenció d'explants (340) i adaptat al nostre laboratori (341). Les biòpsies es van trossejar en fragments d'uns 3 mm<sup>3</sup> i es van submergir, durant tota la nit i a 4°C, en tripsina al 0,625% en tampó fosfat salí (PBS). A aquesta temperatura la tripsina manté un mínim d'activitat que no arribarà a destruir la membrana cel·lular, però permetrà digerir el teixit. El sobrenedant es va passar a un tub nou i es va centrifugar, quedant les cèl·lules al precipitat. Aquest es va ressusprendre en medi DMEM complementat al 20% de FBS i sembrat en un flascó. Els fragments resultants de la primera digestió van ser sotmesos a una segona digestió amb tripsina, durant una hora i a

37°C. El sobrenedant resultant es va processar igual que l'anterior i les cèl·lules resultants es van sembrar en un nou flascó. Finalment, els fragments resultants es van trossejar en fragments d'1 mm<sup>3</sup> i es van dipositar en un nou flascó, on es va afegir medi al dia següent, per facilitar l'adhesió dels fragments al poliestirè.

### 2.3.3.- Manteniment dels cultius

Els fibroblasts es van mantenir en una atmosfera humida, a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub> i 99% d'humitat, en un incubador ubicat a la sala de cultius.

El medi no es va canviar fins després de dues setmanes de l'obtenció dels fibroblasts. A partir d'aquest moment, el medi es va canviar dos cops per setmana, tant en el primer passi com en la resta.

Els fibroblasts es van mantenir en medi DMEM complementat amb 20% d'FBS fins al primer passi. Després, es van mantenir sempre amb medi al 10% d'FBS, excepte en moments puntuals per determinats experiments.

Les cèl·lules es van passar abans d'arribar a la confluència, per evitar la inhibició de la proliferació per contacte. El procés es va realitzar afegint tripsina (Invitrogen) al 0,25% i a 37°C, colpejant suaument el flascó per tal d'accelerar-lo. Després d'assegurar microscòpicament que les cèl·lules no es trobaven adherides, es va aturar la reacció amb medi DMEM complementat amb 10% d'FBS i es van recollir les cèl·lules. Es va centrifugar 5 minuts a 1500 rpm per eliminar la tripsina i es van sembrar els fibroblasts en el doble de la superfície inicial.

Un cop els fibroblasts arribaren al tercer passi es van congelar amb criopreservant (Dimetilsulfòxid, DMSO, al 10%) fins al seu ús per a cadascuna de les tècniques. En totes les tècniques, es van utilitzar fibroblasts que es trobessin entre els passis 3 i 6, ja que més enllà podrien perdre el fenotip diferencial i, fins i tot, podrien entrar en senescència. Aquest fenomen ja va ser descrit als anys 60 per Leonard Hayflick (342) i és per això que també s'anomena "límit Hayflick".

### 2.3.4.- Creixement cel·lular

Per tal d'avaluar diferències en el creixement entre els fibroblasts de pacients amb i sense HI, es va comptar el nombre de cèl·lules en cada passi (amb cambra de Neubauer) i el temps, en dies, entre passi i passi. A partir d'aquestes dades es va



obtenir el nombre de duplicacions dels fibroblasts de pacients amb o sense HI, a partir de la següent fórmula:

$$\text{Nombre de duplicacions} = \log_2 (\text{Nombre de cèl·lules finals} / \text{Nombre de cèl·lules inicials})$$

A més, també es va poder deduir el nombre de dies necessaris per a doblar la població de fibroblasts segons la fórmula:

$$\text{Dies en duplicar} = \text{Dies totals} / \text{Nombre de duplicacions}$$

### **3.- Mètodes de Biologia Molecular**

A continuació es detallen els mètodes utilitzats per a l'avaluació dels nivells d'expressió gènica dels pacients amb HI respecte als pacients control sense HI.

#### **3.1.- Extracció d'RNA**

El procediment és comú per a l'anàlisi posterior per reacció en cadena de la polimerasa (PCR) semiquantitativa, per PCR en temps real i per xips d'expressió gènica, tot i que difereix lleument en funció de l'origen de la mostra: teixit o cultiu cel·lular.

##### **3.1.1.- Teixit**

El mètode d'extracció d'RNA que es va utilitzar en les biòpsies d'aponeurosi i de múscul esquelètic no és més que una adaptació del mètode de separació en fenol:cloroform (343). Aquest mètode es basa en afegir cloroform a un homogenat cel·lular o tissular que s'hagi obtingut amb una solució que contingui fenol. Els dos líquids són immiscibles, i la fase orgànica reté les proteïnes i la fase aquosa reté l'RNA. Entre les dues fases (interfase) hi queda una fase de color blanquinós on es troba el DNA.

Es van pesar aproximadament 100 mg de teixit, que es van submergir en TRIzol (Invitrogen) a 1 ml per cada 100 mg de teixit. Aquest tampó ja conté el fenol, a més d'altres components que estableixen l'RNA, com l'isotiocianat de guanidina (desnaturalitza proteïnes, com les ribonucleases -RNases-). El teixit es va homogeneïtzar mitjançant un homogeneïtzador Polytron PT 10-35 (Kinematica AG; Lucerne, Suïssa) i es va centrifugar a 12.000 x g durant 10 minuts i a 4°C per

eliminar el material insoluble. Al sobrenedant es va afegir cloroform a una relació 1:5 respecte al TRIzol i, després d'agitar, es va centrifugar a 12.000 x g durant 15 minuts i a 4°C.

Un cop separades les fases, la fase aquosa es va barrejar amb un volum d'etanol al 70 % i es va transferir a una columna de purificació d'RNA, del RNeasy Mini Kit (Qiagen; Hilden, Alemanya). Aquestes columnes contenen una membrana de silici amb la capacitat de retenir selectivament l'RNA d'alt pes molecular (>200 bases), de manera que es purifica el RNA missatger (mRNA). Els contaminants s'eliminen mitjançant centrifugació i amb varis rentats. Es va seguir el protocol de la casa comercial i es va eluir l'RNA en un volum final de 30 µl d'aigua estèril i lliure d'RNases.

### 3.1.2.- Cèl·lules

Per a l'extracció d'RNA dels cultius primaris de fibroblasts es va seguir el protocol de Qiagen de les columnes de purificació d'RNA RNeasy Mini Kit, ja que la lisi directa sobre les cèl·lules és més senzilla i no requereix d'un homogeneïtzador mecànic.

Quan les cèl·lules van arribar a semiconfluència en un flascó de 75 cm<sup>2</sup> (entre 1-1.5 x 10<sup>6</sup> cèl·lules) es van desenganxar de la placa amb tripsina al 0.25 % i es van centrifugar 5 minuts a 1500 rpm. El sediment es va tractar amb 0.4 ml de tampó de lisi RLT (proporcionat pel kit) amb 2-mercaptoetanol (redueix els ponts disulfur, desnaturant irreversiblement les RNases alliberades durant la lisi cel·lular) diluït 100 cops. L'homogenat es va passar per una xeringa de 21G (0.8 mm de diàmetre; repetint 10 vegades) per solubilitzar el DNA i, igual que en el teixit, es va seguir el protocol recomanat pel fabricant de l'RNeasy Mini Kit (Qiagen), eluint l'RNA en 30 µl d'aigua estèril i lliure d'RNases.

### 3.2.- Quantificació d'RNA

L'RNA es va quantificar utilitzant el NanoDrop ND-100 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE, USA). L'aparell quantifica l'absorbància de la mostra a 260 nm, longitud d'ona que absorbeix l'RNA i proporciona la quantitat d'RNA (en ng/µl) segons la fórmula adaptada de la llei de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon \times l \times c$$

On  $A$  és l'absorbància mesurada a 260 nm,  $\epsilon$  és el coeficient d'extinció molar de l'RNA [ $0.025 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{cm}^{-1}$ ],  $l$  és la longitud de mostra que ha de travessar la llum (generalment, 1 cm) i  $c$  és la concentració d'RNA. Reordenant la fórmula queda que multiplicar l'absorbància per un factor de 40 acaba resultant en la concentració d'RNA en ng/ $\mu\text{l}$ . És a dir, una densitat òptica de 1 es correspon a 40 ng/ $\mu\text{l}$ .

L'aparell també dóna una idea de la contaminació de la mostra, a partir de l'absorbància a 280 nm (contaminació per proteïnes; la ràtio 260:280 ha de ser propera a 2) o l'absorbància a 230 nm (contaminació per fenols, tiocianats i altres components orgànics; la ràtio 260:230 també ha de ser propera a 2).

### **3.3.- Valoració de la qualitat de l'RNA**

La qualitat de l'RNA s'ha demostrat recentment que és crítica en l'anàlisi de l'expressió gènica (344), ja que com més degradat es troba un RNA més problemes pot donar en realitzar un array o una PCR. Tradicionalment, la qualitat de l'RNA es valorava separant-lo en un camp elèctric en un gel d'agarosa i observant les bandes dels RNAs ribosòmics 28s i 18s. Recentment, algunes empreses han dissenyat sistemes d'electroforesi microfluídics basats en aquesta tècnica, com el 2100 BioAnalyzer (Agilent; Santa Clara, CA, USA). Aquest sistema conté 12 microgels d'agarosa on se separen les mostres i, mitjançant un software, les dades passen a un ordinador des de on són analitzades. El programa, transforma en una gràfica la intensitat dels RNAs ribosòmics 28s i 18s, i mitjançant l'altura i amplitud d'aquestes bandes dóna un valor de qualitat de l'RNA denominat RIN (RNA Integrity Number). Aquest algoritme assigna valors d'integritat de l'RNA compresos entre 1 i 10, de més degradat a intacte, respectivament (Agilent; 5989-1165EN).

Aquest RIN ha de ser sempre el màxim possible, tot i que algunes tècniques (i.e. PCR semiquantitativa) són menys sensibles que d'altres (i.e. xips d'expressió gènica) a certa degradació.

### **3.4.- RT - PCR semiquantitativa**

La RT - PCR (*Reverse Transcription - PCR*) és una tècnica que permet amplificar específicament un gen i quantificar-ne la seva expressió. Es basa en una primera etapa de retrotranscripció, en la que es copia el mRNA a DNA complementari (cDNA); i una segona etapa en la què, mitjançant uns encebadors específics per un gen diana, s'amplifica el gen i es detecta en un gel d'agarosa.

Per a la fase de retrotranscripció, es va utilitzar la retrotranscriptasa SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) seguint el protocol de la casa comercial per a un volum de 20 µl de reacció:

- Es va barrejar 1 µg d'RNA amb aigua lliure d'RNases fins a un volum de 10 µl. Es va afegir 1 µl de Random Primers (100 ng/µl) i 1 µl de dNTPs (10 mM cadascun) i es va escalfar a 65°C durant 5 min, deixant refredar posteriorment en gel.
- Es va preparar una barreja amb 4 parts de 5x First-Strand Buffer, 2 parts de DTT (0.1 M) i 1 part de RNaseOUT (40 unitats/ µl) i es va afegir 7 µl a l'RNA diluït.
- Es va deixar a 25°C durant 2 minuts i es va afegir 1 µl de retrotranscriptasa (200 unitats) i es va deixar 10 minuts a 25°C.
- Es va escalfar a 42°C durant 50 minuts per dur a terme la transcripció inversa.
- Es va escalfar a 70°C durant 15 minuts per inactivar per desnaturalització l'enzim.
- Es va deixar a 4°C durant almenys 15 minuts i es va afegir Ribonucleasa H, incubant a 37°C durant 20 minuts, per eliminar l'RNA complementari.
- Finalment, el cDNA resultant es va dividir en alíquotes i es va congelar a -20°C fins al seu ús.

En l'etapa d'amplificació de cDNA es va usar la *Taq DNA Polymerase, recombinant* (Invitrogen), seguint els passos indicats. En primer lloc, i com que la PCR segueix una cinètica saturable (especificat en l'apartat 3.5), per a cada parella d'encebadors es va realitzar una reacció a 20, 25, 30 i 35 cicles, per identificar en quin punt la reacció encara era exponencial i es podia detectar. A partir d'aquesta identificació, la PCR amb totes les mostres es va realitzar en aquest nombre de cicles, en un volum final de 25 µl. Per bé que la tècnica s'ha de posar a punt per a cada gen, principalment en la quantitat d'encebadors, de MgCl<sub>2</sub>, de temperatura d'aparellament i nombre de cicles, el protocol bàsic de PCR usat va ser:

- Es va preparar una barreja amb els següents volums per a cada mostra:
  - 2.5 µl de tampó de PCR 10x sense magnesi.
  - 0.5 µl de dNTPs (10 mM cadascun).
  - 0.75 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM
  - 1.25 µl d'encebador esquerre.
  - 1.25 µl d'encebador dret.
  - 17.45 µl d'aigua estèril.
  
- D'aquesta barreja, es passà 23.7 µl a cadascun dels tubs, on s'afegí 1 µl de la mostra corresponent.
  
- Es van escalfar els tubs a 94°C durant 4.5 minuts i s'hi va afegir 0.3 µl de Taq DNA Polymerase (5U/µl) a cadascun. Aquest pas es fa per evitar que els encebadors s'uneixin a altres gens, reduint les amplificacions inespecífiques i s'anomena *Hot-Start PCR*.
  
- Finalment, es va seguir la següent reacció (Taula M1) en un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf; Hamburg, Alemanya):

Etapa	Temperatura (°C)	Temps (segons)	Cicles
Desnaturalització	94	30	1
Desnaturalització	94	45	
Anellament	*	30	**
Extensió	72	30	
Extensió final	72	10 min.	1
Refredament	4	∞	-

**Taula M1.** Esquema base de les PCRs realitzades.

\* Aquesta temperatura depèn de la parella d'encebadors. S'ha intentat dissenyar sempre els encebadors per poder fer la reacció propera a 60°C. Aquesta temperatura ha de ser sempre 2-3°C inferior a la temperatura d'aparellament de la parella d'encebadors, que a més, ha de ser similar entre ells.

\*\* El nombre de cicles de la fase d'amplificació és el que es determina mitjançant les proves inicials abans descrites.

El producte final de l'amplificació es va barrejar amb 5 µl de tampó de càrrega 6x (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.15% Orange G, 60% glicerol, 60 mM EDTA) i es va congelar a

-20°C fins al seu ús o es va separar en un camp elèctric en un gel d'agarosa al 2% en TBE (89 mM Trizma base, 89 mM àcid bòric, 2 mM EDTA) i impregnat en bromur d'etidi.

Els gels es van visualitzar i quantificar per densitometria mitjançant l'aparell GelDoc i el programa Quantity One Quantitation Software (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA).

Els gens amplificats per RT-PCR semiquantitativa i els seus corresponents encebadors es poden trobar a la Taula M2. El gen que codifica la proteïna ribosòmica RPL19 (345) es va utilitzar com a control endogen per a relativitzar els resultats.

Grup	Gen	Seqüència primer esquerre 5'→3' (exó)	Seqüència primer dret 5'→3' (exó)	Mida amplió	Acc. Number
Col·lagens	<i>COL1A1</i>	GTCTTCTGGCCCTCTGGTG (40)	TCGCCCTGTCGCTGTCTCA (45)	390	NM_000088
	<i>COL3A1</i>	CAGGGGCCCCAGGACTTAGAG (30)	GGGCCAGGAGGACCAATAGGT (33)	249	NM_000090
	<i>COL4A1</i>	CAATGCCCTTCTGTTCTGC (51)	GTGGACGGCGTAGGCTTCTT (53~54)	451	NM_001845
MMPs	<i>MMP2</i>	ACATCAAGGGCATTGAGAG (8)	TGAACCGGTCCTGAAGAAG (9~10)	168	NM_004530
	<i>MMP9</i>	GGGAAAGATGCTGCTGTCA (11)	TCAACTCACTCCGGGAACTC (13)	202	NM_004994
	<i>MMP14</i>	GCAGAAGTTTTACGGCTTGC (2)	CTTGGGGGTGTAATTCTGGA (4)	199	NM_004995
	<i>TACE/ADAM-17</i>	TCATTGACCAGCTGAGCATC (17)	CGCAGGAAAGGGTTGATAA (20)	233	NM_003183
TIMPs	<i>TIMP1</i>	CTGCGGATACTCCACAGGT (3)	GTTTGCAGGGGATGGATAAA (5)	209	NM_003254
	<i>TIMP2</i>	GATGCACATCACCTCTGTG (4)	GTGCCCGTTTCATGTTCTCT (5)	196	NM_003255
	<i>TIMP3</i>	CTGACAGTGCAGTCTATGA (3~4)	AGTCAAAAGCAAGGCAGGT (5)	165	NM_000362
	<i>TIMP4</i>	CTTGGTGCAGAGGGAAAGTC (4)	GGCTGAACGATGTTCAACAAA (5)	249	NM_003256
Citoquines i receptors	<i>TNFA</i>	CAGAGGGCCTGTACCTCATC (2)	GGAAGACCCCTCCAGATAG (4)	219	NM_000594
	<i>TNFSFR1A</i>	GTGCCTACCCAGATTGAGA (7)	TGTCGATTTCCCAAAACAA (8~9)	175	NM_001065
	<i>TNFSFR1B</i>	GGAAACTCAAGCCTGCACCTC (4)	TGCAAAATCCGTGGATGAA (5)	224	NM_001066
	<i>IL-6</i>	CCACACAGACAGCCACTCAC (2)	TTTACCAGGCAAGTCTCCT (3)	217	NM_000600
Ribosomal	<i>RPL19</i>	CAATGCCAACTCCCGTCAGC (1~2)	CTTGTCTCTTCTCCTTGG (6)	487	NM_000981

**Taula M2.** Encebadors utilitzats en l'amplificació gènica per RT-PCR.

### 3.5.- RT-PCR semiquantitativa múltiple

Basada en els principis de la PCR, la PCR múltiple o *multiplex* se'n diferencia perquè en ella s'amplifiquen dos o més gens a la vegada, que es visualitzen en un mateix gel. El concepte pot resultar fàcil, però a la pràctica comporta molt problemes. En primer lloc, la temperatura d'aparellament de tots els encebadors ha de ser similar, i això no és fàcil en una seqüència d'uns 20 nucleòtids. En segon lloc, la quantitat de MgCl<sub>2</sub> varia per cada fragment que s'amplifica i trobar les condicions idònies es complicat. I en tercer lloc, i el més limitat, els gens que s'amplifiquen han d'expressar-se a nivells similars, doncs la PCR es farà a un nombre de cicles fixes. Aquestes limitacions desemboquen en una conclusió definitiva: els inconvenients augmenten proporcionalment al nombre de gens a amplificar.

Tenint en compte aquestes limitacions, es va posar a punt la PCR múltiple *MPCR kit for Human MMP Genes Set-1* (Maxim Biotech Inc, San Francisco, CA, USA). Com aquest equip conté un tampó amb el MgCl<sub>2</sub> a la concentració ideal per aquests gens, es va haver de posar a punt la quantitat de cDNA de partida (les sals de la retrotranscripció poden interferir en la posada a punt), la temperatura d'aparellament i el nombre de cicles.

Els gens amplificats en aquest equip es troben a la Taula M3. El gen GAPDH, present en l'equip, es va utilitzar com a control endogen intern.

Gen	5'/3' Tm	Mida de l'amplicó	No. Accés	Intró insertat
human MMP-1	68°C / 70°C	223 pb	U41078	√
human MMP-3	66°C / 66°C	351 pb	J03209	√
human MMP-7	70°C / 67°C	282 pb	Z11887	√
human MMP-13	68°C / 73°C	416 pb	X75308	√
human Tryptase	69°C / 71°C	184 pb	M33494	√
human GAPDH	66°C / 65°C	500 pb	M33197	√

**Taula M3.** Gens amplificats en la RT-PCR semiquantitativa múltiple.

El protocol que es va utilitzar és el següent:

- Es va fer una barreja amb els següents volums per mostra:
  - 25 µl de tampó barreja MPCR 2x.
  - 5 µl d'encebadors MPCR 10x.
  - 14.5 µl d'aigua estèril.
  
- Es va passar 44.5 µl a cadascun dels tubs on s'afegí
  - Mostra: 2.5 µl de producte d'RT més 2.5 µl d'aigua.
  - Control Positiu: 5 µl del cDNA proporcionat per la pròpia casa comercial.
  - Control Negatiu: 5 µl d'aigua estèril.
  
- Es va escalfar a 96°C durant 2 minuts i es va afegir 0.5 µl de Taq DNA Polymerase (hot-start).

Finalment, es va seguir la següent reacció (Taula M4) en un termociclador *Mastercycler personal* (Eppendorf):

Temperatura (°C)	Temps (minuts)	Cicles
96	1	2
61	4	
94	1	35
61	2	
70	10	1
25	5	1
4	∞	-

**Taula M4.** Esquema de la RT-PCR múltiple.

El producte es va barrejar amb tampó de càrrega 6x i, com en la RT-PCR semiquantitativa, es va visualitzar en un gel d'agarosa al 2%. Els gels es van visualitzar i quantificar per densitometria mitjançant l'equip GelDoc (Bio-Rad).

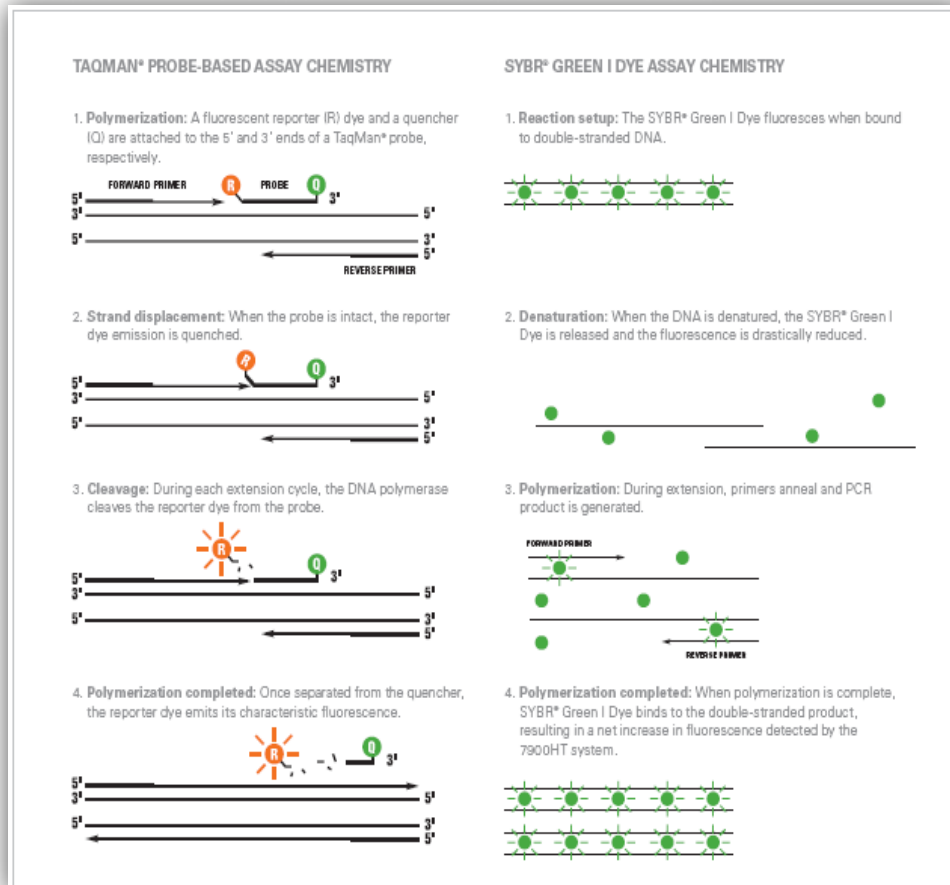
### 3.6.- PCR en temps real

La PCR quantitativa en temps real es basa també en els fonaments de la PCR convencional, amb la diferència que es pot monitorar en cada cicle la quantitat de cDNA gràcies a l'ús de fluorescència. En funció del fluoròfor que s'utilitza, es pot dividir en diferents tipus d'assaig (Figura M1):

- Tècniques basades en sondes específiques que utilitzen un oligonucleòtid marcat fluorescentment. Les més utilitzades són les sondes TaqMan<sup>®</sup>, que es basen en un oligonucleòtid marcat amb un fluorocrom i una molècula anomenada *quencher*. Aquesta molècula evita l'emissió de fluorescència per part del fluorocrom. Aquest oligonucleòtid hibrida al centre de l'amplicó, entre l'encebador esquerre i el dret. Quan la polimerasa arriba a la sonda, l'activitat 5'-3' exonucleasa de la DNA polimerasa l'hidrolitza alliberant el fluorocrom del *quencher*, de manera que s'emet fluorescència. Aquesta tècnica és molt específica, degut a l'ús de dos encebadors i una sonda, però resulta econòmicament més cara.
- Tècniques basades en fluorocroms inespecífics. Es basen en agents intercalants amb alta afinitat per la doble cadena de DNA, com SYBR<sup>®</sup> Green I o Eva Green. En aquest cas només es necessita dos encebadors, fet que fa



que sigui més econòmic, però pot presentar problemes degut a la inespecificitat. La fluorescència es detectarà en el moment de l'amplificació, durant el qual es forma doble cadena de DNA.



**Figura M1.** Comparació entre els dos tipus de PCR en temps real. Extret de Life Technologies (2011). *TaqMan® and SYBR® Green Chemistries*. Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). De <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html>

En aquest treball s'ha utilitzat la tècnica basada en SYBR® Green. Aquest agent intercalant té un espectre d'absorbcíó en el color blau ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) i d'emissió en el color verd ( $\lambda = 522 \text{ nm}$ ).

El RNA es va extreure seguint el protocol de Qiagen de les columnes de purificació d'RNA RNeasy Mini Kit i es va retrotranscriure 1  $\mu\text{g}$  a cDNA mitjançant la SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen). El cDNA obtingut es va dissoldre en

aigua lliure d'RNases fins a una concentració de 2 ng/ $\mu$ l, es va al·liquotar i es va conservar a -20°C fins al seu ús.

Els encebadors utilitzats per a la PCR en temps real (Taula M5) es van seleccionar a partir de la base de dades *Universal Probe Library* (Roche Applied Sciences; Penzberg, Alemanya) i la seva síntesi es va encarregar a la casa comercial Invitrogen. El liofilitzat es va resuspendre en aigua lliure d'RNases a una concentració de 100  $\mu$ M . Es va diluir cada parella d'encebadors en un mateix tub a 10  $\mu$ M cadascun. Per als gens que contenen més d'un transcrit, es van dissenyar encebadors que reconeguessin regions comuns en tots els transcrits.

Gen	Nom complet	Acc. Number	Seqüències dels encebadors (5'->3')
AGC1	Aggrecan 1, Chondroitin sulfate proteoglycan core protein 1 (CSPG1)	NM_001135.1 NM_013227.1	e:CTGGAAAGCTCGTGGTAAAGG d:TCGAGGGTGTAGCGGTGTGA
ANK3	Ankyrin 3, ankyrin G	NM_020987.2 NM_001149.2	e:CAGAGGGTTACATGGGCTTT d:AAGACCTATCCGAACTGAAGGA
CCDC3	Coiled-coil domain containing 3	NM_031455.2	e:TGACTGGGAAA TCCA GGAA G d:GTGGTCCTCCTCCTCA AACA
CHI3L1	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	NM_001276.1	e:CCCAACCTGAA GACTCTCTTGT d:TGTTGGAGCCTA TCTTGGAAA
CPM	Carboxypeptidase M	NM_001874.3 NM_198320.2 NM_001005502.1	e:TACGTGGCAAATATGCATGG d:TGGTTACGAGATATGCAATCAGATG
CTSC	Cathepsin C, Dipeptidyl peptidase I	NM_001814.2 NM_148170.2	e:CGATGTCAA CTGCTCGGTTA d:CCAGAA TTGCCAAGGTCTATC
DES	Desmin	NM_001927.3	e:CGTTCCTTAAGAAAGTGTCATGA d:CTTAGACATGTCCA TCTCCACCT
FKBP11	FK506 binding protein 11	NM_016594.1	e:GGGCTCGAAA CCGAAAAGT d:CGTCCATCTACCAAGCTTCC
IGFBP5	Insulin-like growth factor-binding protein 5	NM_000599.2	e:ATTGTGACCCGAAAGGATTC d:GTTCA TCCCGTACTTGTCC
IL7R	Interleukin 7 receptor-alpha, CD127	NM_002185.2	e:GCTTTGAGGACCAAGATGT d:AGGCCATTTACTCCCAACGAG
MALAT1	Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1	NR_002819.1	e:CCCTCAAGAGAAACAAGAAAGTG d:GGAGAAACA CTCCGATCAACC
PDE5A	Phosphodiesterase 5A, c-GMP specific	NM_001083.3 NM_033430.2 NM_033437.2	e:CTCTAAAAGCA GGCAAAA TTCTAG d:CAGCAA TCAGCAATGCAAGT
PI16	Peptidase inhibitor 16	NM_153370.2	e:TCTCCTGGGACTACTGCTCCT d:GGACA GCTGACCTCTTCAAC
PLA2G4A	Phospholipase A2, group IV, cytosolic, calcium-dependent, alpha	NM_024420.1	e:TGGCCAAACA TCAACTTCAGA d:CTTCTCA GTTTCCCTTGGAA
RAB27B	Ras-associated protein RAB27B	NM_004163.3	e:ACTTTCGGGAAAACGTGTG d:TGCTTCCCTGAAAGTCCAT
RAB8B	Member RAS oncogene family	NM_016530.2	e:GATTCGAAACAATCA CGACA d:TTTGTGATGTCTAGACCA GCAT
RAMP	Regeneration associated muscle protease	NM_015430.2 NM_001001991.1	e:CCTTCTCA TCTGTCTCTTGC d:GCACTCCGACACATGATATT
RELN	Reelin	NM_005045.2 NM_173054.1	e:ACAGTGGA GGAGTGCA TAGTGC d:GGAAA CCGGTA GCACTGG
SBSN	Suprabasin	NM_198538.1	e:TCAACACGCCTTTCATCAAC d:GCCAGTTTGGGCA TGA TGT
SCG2	Secretogranin II, Chromogranin C, Secretoneurin	NM_003469.3	e:GGGAGGAAATATGCTGTGGAG d:GTCTTTGCTTCA GCCATGTTT
SEC63	SEC63 homolog (S.cerevisiae)	NM_007214.3	e:GTTGACAA GGCAAAACAATGG d:TGTTCTCTGCA GCA CAGAT
SEMA3C	Semaphorin 3C, Semaphorin E	NM_006379.2	e:GCCATTCTGTCCAGATTC d:GTGGGTTTCCATGTCTCACA
SGMS2	Sphingomyelin synthase 2	NM_152621.3	e:CTA CCGTGTGCTGGAA TGC d:CCGTTGAACTTTTGCCTGAG
SLC39A8	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8	NM_022154.5	e:CAATTTTCCAACTTATCCAGAGG d:GGTAAAATCCACCAAA CACAGC
SMARCA2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2	NM_003070.3 NM_139045.2	e:GAAGGCTGAGGAGAA TGCA G d:TCTGGCTGTCTCATCTA TGG
SMC2	Structural maintenance of chromosomes 2, chromosome associated protein E (CAPE)	NM_006444.1	e:CTGGAATCAAA GAGAA TGAGCTG d:ACTGCTGTTTTAGTTGGGATAC
SYNGR2	Synaptogyrin 2, Cellugyrin	NM_004710.3	e:GGTGA CCGCTCTTCTCA GC d:CCITCGGGTTGGTGA CTG
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	NM_001078.2 NM_080682.1	e:AACAAAGGCA GAGTACGCAAA d:TCA TATTCACAGAACTGCCTTCC
WSB1	WD repeat and SOCS box-containing 1	NM_015626.8 NM_134265.2	e:CATATGGAGACATCTGATGGAA d:TCGTACCCACCGGTCAAT

**Taula M5.** Encebadors utilitzats en la PCR en temps real. Els gens que tradueixen per més d'un transcrit estan indicats amb més d'un identificador en *Acc. Number*. e: encebador esquerre; d: encebador dret.

L'amplificació es va dur a terme mitjançant el kit Power SYBR® Green PCR Mastermix (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) segons especificacions de la casa. Les proporcions de cada component per a una reacció de 20 µl van ser 10 µl de

mastermix 2X, 6 µl de mix d'encebadors (concentració final de 333 nM cadascun) i 4 µl (8 ng totals) de cDNA. Es va realitzar un triplicat de cada reacció.

A més, es van realitzar dos controls negatius ja en la retrotranscripció: un primer control de la presència de DNA genòmic (inclou RNA però no enzim de retrotranscripció) i un segon control de contaminants externs o formació de primer-dimers (inclou aigua enlloc de RNA).

La reacció de PCR es va realitzar en un termociclador ABI 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Seguint les instruccions de la mastermix de SYBR® Green, la reacció es va realitzar en dos passos, degut a la capacitat de la polimerasa d'amplificar a la mateixa temperatura d'aparellament dels encebadors.

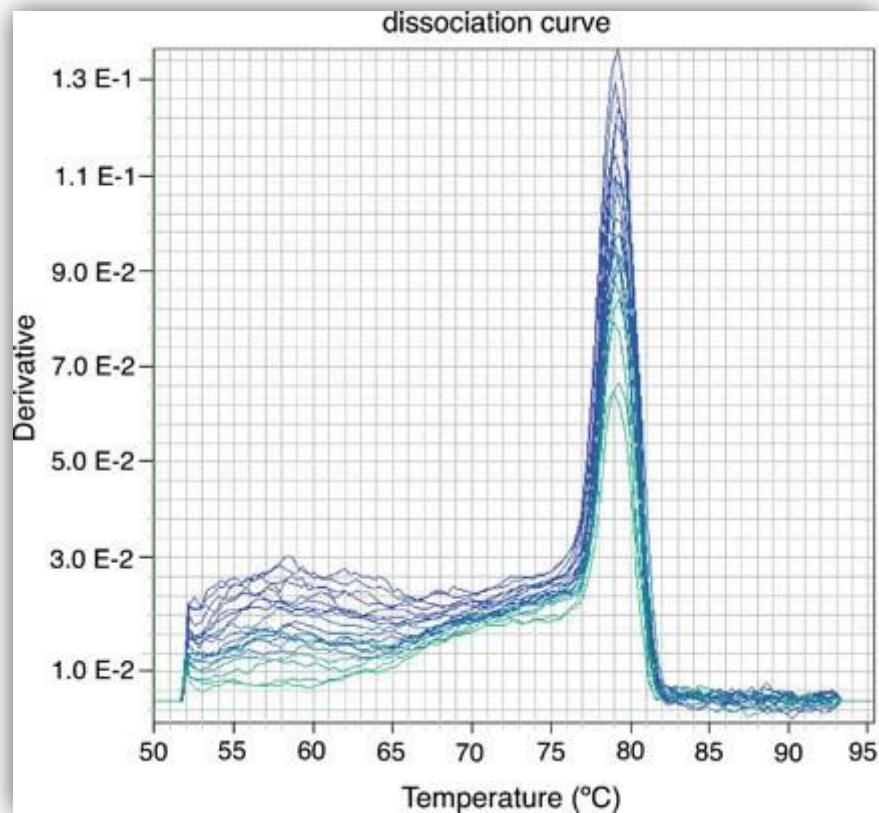
Es va realitzar el següent programa (Taula M6):

Etapa	Temperatura (°C)	Temps (segons)	Cicles
Desnaturalització	95	10 min.	1
Desnaturalització	95	15	40
Anellament/Extensió	60	30	

**Taula M6.** Esquema de la PCR en temps real.

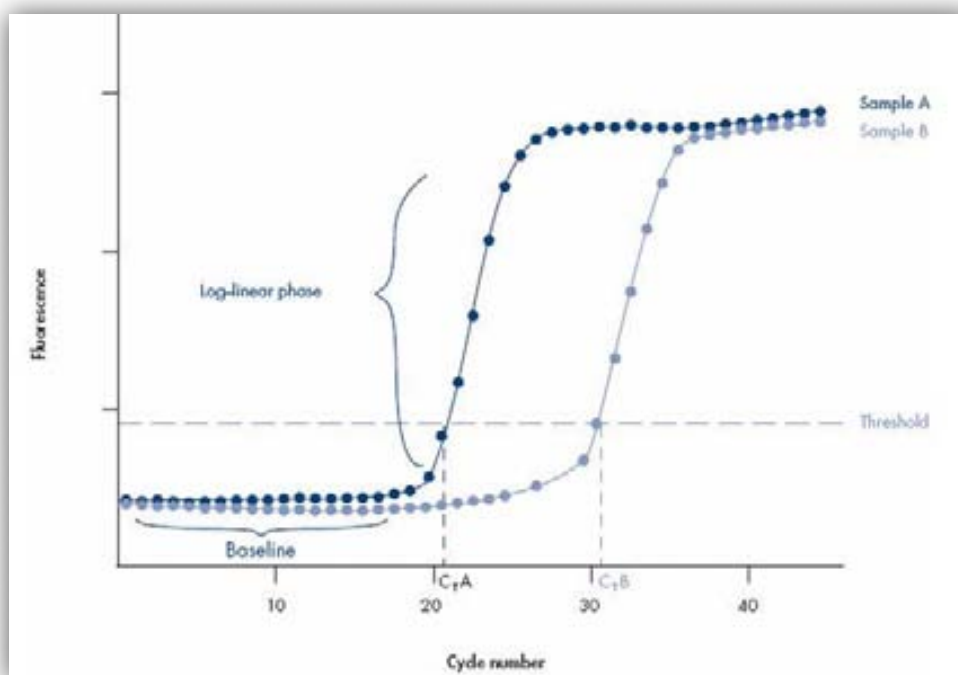
Com que la SYBR® Green és una molècula inespecífica, cal assegurar que l'amplificació és la desitjada. Per això, l'aparell inclou un cicle que permet l'anàlisi de la corba de dissociació (Figura M2; (346)). Aquest procediment es basa en l'anàlisi de la temperatura de fusió (*melting temperature* o  $T_m$ ), que és la temperatura a la qual la meitat de la doble cadena de DNA es troba en monocadena. Aquesta  $T_m$  depèn de la llargada de la molècula de DNA i de la seva composició i, per tant, és concreta per a cada fragment. Així, l'aparell disminueix la temperatura fins a la temperatura d'aparellament dels encebadors i va augmentant lentament, analitzant la fluorescència cada 1°C. A mesura que augmenta la temperatura, el fragment amplificat hibridarà amb el seu complementari, de manera que anirà augmentant la fluorescència fins arribar a la  $T_m$ , punt en el qual comença a disminuir la fluorescència fins que s'ha separat totalment el DNA. D'aquesta manera, en el gràfic obtingut hauria d'aparèixer un únic pic amb una  $T_m$  corresponent a la del fragment amplificat. En cas contrari, els resultats no són vàlids. A més, al final de la reacció, el

volum de PCR es va carregar en un gel d'agarosa al 2% (com en la RT-PCR semiquantitativa) per corroborar l'aparició d'un únic fragment amplificat.



**Figura M2.** Corba de dissociació d'un amplicó. L'aparició d'un únic pic determina especificitat en l'amplificació. Més d'un pic a l'esquerra de l'amplicó indica formació de primer-dimers, mentre que un pic a la dreta podria indicar la presència d'un petit intró. Extret de Wang J *et al.* *Analysis of Mitochondrial DNA Point Mutation Heteroplasmy by ARMS Quantitative PCR*. *Curr Protoc Hum Genet*. 2011 Jan; Chapter 19: Unit 19.6.

Els resultats obtinguts per a cada pou, després d'eliminar el soroll de fons, són similars als d'una corba enzimàtica (Figura M3): hi ha una primera fase lineal, en la que l'augment en la fluorescència equival a l'augment en les molècules de DNA; i una segona fase *plateau*, en la que se satura la reacció degut a l'esgotament de substrats i a l'excés de producte format.



**Figura M3.** Exemple de corba d'amplificació de PCR en temps real. La mostra A té més expressió que la mostra B, perquè es necessita menys cicles per amplificar-la. Extret de Qiagen. *Data Analysis (for Users of QuantiFast and QuantiTect SYBR® Green Kits)*. De [http://www.qiagen.com/resources/info/guidelines\\_rtqpcr/dataanalysis\\_sybr.aspx](http://www.qiagen.com/resources/info/guidelines_rtqpcr/dataanalysis_sybr.aspx)

En aquesta fase lineal és on la diferència en la fluorescència de les diferents mostres equival a la diferència en la seva expressió gènica. Per tant, cal establir un punt de tall, anomenat Ct (*cycle threshold*), que representa el nombre de cicles que necessita una mostra per arribar a una determinada fluorescència. Aquest llindar (*threshold*), que és la línia que travessa totes les corbes d'expressió, és arbitrària i, per tant, cal assegurar que s'està agafant en el rang lineal. A partir dels Ct, es pot obtenir quantes vegades més o quantes vegades menys expressa una mostra un determinat gen respecte a una mostra control. Aquesta relació d'expressió es denomina amb l'anglicisme *fold change* (FC), i s'obté mitjançant la fórmula (347):

$$FC = E_{\text{gen diana}}^{\Delta Ct_{\text{gen diana}} (\text{control} - \text{tractament})} / E_{\text{gen endogen}}^{\Delta Ct_{\text{gen endogen}} (\text{control} - \text{tractament})}$$

On Ct és el valor mitjà per al grup control (sense HI) o per al grup tractament (amb HI) i E és la eficiència de la reacció (quantes vegades augmenta el DNA en cada cicle).

L'eficiència de la reacció, per a cada gen, es va obtenir preparant una corba de dilucions 1/3 a partir d'una mostra concreta de la següent manera:

1		1/3		1/9		1/27		1/81		1/243
21 µl	→	7 µl	→	7 µl	→	7 µl	→	7 µl	→	7 µl
		+		+		+		+		+
		14 µl H <sub>2</sub> O		14 µl H <sub>2</sub> O		14 µl H <sub>2</sub> O		14 µl H <sub>2</sub> O		14 µl H <sub>2</sub> O

A partir d'aquesta corba es van obtenir els Ct de cada dilució, que es van representar gràficament respecte al logaritme de la concentració per linealitzar. A partir del pendent d'aquesta corba amb equació ( $y = mx + n$ ) es pot obtenir l'eficiència de la reacció  $E = 10^{(-1/m)}$  (348). Aquest valor és ideal quan  $E = 2$ , és a dir, en cada cicle es duplica el DNA i es correspon amb una pendent de  $m = -3.32$ . L'eficiència es pot donar també com a percentatge respecte al valor ideal, com a  $(E-1) \times 100$ .

Els resultats es van relativitzar respecte a dos gens endògens per a cada teixit i es va fer una mitja per obtenir el FC final (349).

### 3.7.- Arrays d'expressió

Els xips d'expressió gènica han suposat un gran avanç en el camp de la biologia molecular. Han aportat gran informació respecte a com fan ús del transcriptoma les diferents cèl·lules i els diferents teixits; com es modifica l'expressió gènica davant processos de desenvolupament o davant una situació fisiològica; com varia l'expressió gènica en situacions patològiques; o com varia l'expressió gènica dins una mateixa espècie o entre espècies.

Els xips d'expressió gènica es basen en l'ús d'un gran nombre de petits oligonucleòtids que cobreixen tot el DNA genòmic. Consisteix en sèries de sondes complementàries als transcrits i immobilitzats en una matriu sòlida. Els transcrits es marquen fluorescentment, de manera que la intensitat de fluorescència final s'utilitza com a mesura de l'expressió gènica.

Es va aïllar i cultivar fibroblasts d'aponeurosi i de múscul esquelètic de 5 pacients amb HI i de 5 pacients sense HI (un total de 20 mostres). Un cop expandits fins a pass 5, es va extreure el seu RNA mitjançant l'ús de les columnes RNeasy Mini Kit

(Qiagen) i se'n va comprovar la qualitat utilitzant el 2100 BioAnalyzer d'Agilent. Es va retrotranscriure 1 µg d'RNA a cDNA mitjançant el *One-Cycle cDNA Synthesis Kit* (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA). Després d'eliminar el RNA mitjançant RNasa H, es va sintetitzar la segona cadena de cDNA. El cDNA de doble cadena va servir de patró per a la transcripció *in vitro*. Aquesta transcripció es va fer en presència de la T7 RNA polimerasa i nucleòtids/ribonucleòtids marcats amb biotina, mitjançant el *IVT Labeling Kit* (Affymetrix Inc.) per obtenir el RNA còpia (cRNA). El cRNA marcat amb biotina es va netejar, es va fragmentar i finalment es va hibridar amb el xip *Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChips*<sup>®</sup> (Affymetrix Inc.). Els passos de rentat i escanejat es van realitzar segons el protocol de la casa comercial. Aquest xip conté aproximadament unes 47.000 sondes que cobreixen tot el genoma humà.

L'anàlisi del xip d'expressió gènica es va realitzar a la UCTS i en col·laboració amb la Unitat d'Estadística i Bioinformàtica (UEB) del VHIR.

### 3.7.1.- Qualitat del xip

Es van explorar tots els xips, un a un, per analitzar-ne la qualitat. L'anàlisi de la qualitat de les dades es van realitzar mitjançant el software GCOS (GeneChip Operating Software) de Affymetrix. Es van aplicar els paràmetres algorítmics per defecte i els senyal mesurats per cada grup de sondes es van escalar a un valor de 2.000 per 100 transcrits control, tal i com indica la casa. Els paràmetres de control de qualitat del xip inclouen el soroll de fons, el soroll (RawQ), un nombre consistent de gens detectats, factors d'escalat consistents, i una senyal consistent de la ràtio 3'/5' dels controls endògens  $\beta$ -actina i gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa. A més, es van examinar els arxius ".DAT" en busca de possibles artefactes. El control de qualitat i l'anàlisi preliminar de les dades es va realitzar utilitzant el *Microarray Analysis Suite 5.0* (Affymetrix).

### 3.7.2.- Processat i anàlisi estadístic

Els valors d'expressió crus es van obtenir directament dels arxius ".CEL" i es van preprocessar utilitzant el mètode *Robust Method Analysis (RMA)* (350), un procés de tres passos que integra la correcció del soroll de fons, la normalització i la sumarització dels valors de les sondes. Aquestes matrius normalitzades són la base de tots els anàlisis.



Previ a l'anàlisi, les dades es van sotmetre a un filtrat no específic basat en dos passos: primer, es van eliminar els gens amb senyals baixos (aquells gens el senyal mitjà dels quals a cada grup no superava un llindar mínim, el tercer quartil dels valors d'expressió normalitzats de tots els arrays); i segon, es van mantenir només els gens amb una mínima variabilitat (aquells gens la desviació estàndard dels quals era major al tercer quartil de totes les desviacions estàndard).

La selecció dels gens expressats de manera diferencial entre les condicions es va basar en un model d'anàlisi lineal amb una moderació empírica de Bayes de les estimacions de la variància, seguint la metodologia desenvolupada per Smyth (351). El mètode estén l'anàlisi del model lineal tradicional utilitzant mètodes de Bayes empírics per combinar la informació del total del xip i cada gen individual, per tal d'obtenir estimacions de l'error millorades que són molt útils en les anàlisis de xips en que la mida mostral és petita, cosa que pot conduir a estimacions errònies dels errors i, en conseqüència, a valors  $p$  falsos. L'anàlisi inclou tests estadístics estàndards com *fold changes*, moderat-t o valor  $p$  que es poden utilitzar per a classificar els gens en funció dels seus nivells d'expressió. Per tal de manejar els múltiples paràmetres de tests derivats del fet que es fan molt tests simultanis, els valors  $p$  es van ajustar per obtenir un fort control sobre la taxa de fals descobriment (*False Discovery Rate, FDR*), que es defineix com la proporció esperada de tipus 1 o falsos positius entre la hipòtesi nul·la, utilitzant la correcció de múltiples tests de Benjamini & Hochberg (352). Si el mètode esdevé massa restrictiu, llavors la llista classificada de gens i els valors  $p$  no ajustats s'utilitzen com a base per a la selecció dels candidats.

Els xips es van analitzar en dues tandes separades en el temps, primer es van analitzar xips de mostres de múscul de 3 pacients amb HI i 3 pacients sense HI i després es van realitzar els 14 xips restants. Per això, el fet d'haver-los realitzat en diferents temps pot influir en l'anàlisi final dels resultats. Aquest efecte, denominat *batch effect* (353) va ser considerat a l'hora d'ajustar les dades.

Totes les anàlisis estadístiques es van realitzar amb el llenguatge estadístic lliure *R* i les llibreries desenvolupades per a les anàlisis de dades de xips del *Bioconductor Project* ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)). Els principals mètodes i eines utilitzades estan descrits a la monografia de Gentleman i col·laboradors (354).

### 3.7.3.- Significat biològic

El llistat de gens diferencialment expressats que s'obté després de l'anàlisi estadístic dóna informació respecte a gens importants, però no dóna una idea sobre grups de gens o processos alterats. Per això, els gens van ser agrupats per trobar patrons d'expressió comú.

El llistat de gens diferencialment expressats es va comparar amb una base de dades de grups de gens denominada *Gene Ontology* (GO), que classifica els gens en 3 ontologies diferents: processos biològics, components cel·lulars i funció molecular ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org); (355)). Es va realitzar un test estadístic per determinar si un grup de gens concret, és a dir, una categoria del GO, estava sobre o infra-expressat en la llista de gens seleccionats (la mostra) respecte a una llista de referència (la població) des d'on ha sigut seleccionat. Aquest set de referència és tots els gens del xip.

També es va utilitzar la base de dades de rutes *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG; [www.genome.jp/kegg/pathway.html](http://www.genome.jp/kegg/pathway.html); (356)). De manera similar al GO, es van comparar les dades amb la base de dades *Pathway* i es va analitzar els resultats utilitzant un test hipergeomètric sobre el set de rutes associades amb els gens seleccionats i el total de gens des de on es van seleccionar.

Finalment, es va analitzar els gens diferencialment expressats mitjançant el programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA; (357)). Aquest programa no només permet analitzar les rutes alterades en els resultats del xip, com els dos anteriors, sinó que a més permet veure en figures com són les rutes alterades. És a dir, es pot visualitzar la ruta alterada amb totes les interaccions entre els gens que la componen, directes o indirectes, i s'hi representen els gens sobre-expressats en color vermell i els infra-expressats en color verd, amb diferències en la tonalitat en funció de la dimensió del valor.

## 4.- Mètodes Bioquímics

En els següents apartats es detallen totes les tècniques relatives a l'obtenció i quantificació de proteïnes.

#### 4.1.- Extracció de proteïna

Com que el mètode varia en funció de la font de on s'extreu la proteïna, s'ha dividit aquest apartat en dos blocs per facilitar-ne la comprensió. A més, el mètode d'extracció de la proteïna és diferent en funció de si es compara amb els resultats de l'expressió gènica. Així, la proteïna es pot obtenir a partir de la separació amb fenol:cloroform (només en teixit, quan es compara amb els resultats de la RT-PCR semiquantitativa), a partir de la purificació de RNA en columnes de Qiagen (només en cèl·lules, quan es compara amb la PCR en temps real) o per lisis directa amb tampó RIPA (en els dos casos, quan no és cap dels dos anteriors).

##### 4.1.1.- Teixit

Després de la separació de l'RNA en fenol:cloroform, detallat en l'apartat 3.1.1, es va precipitar la proteïna seguint el protocol del reactiu TRIzol (Invitrogen). En primer lloc, es va precipitar el DNA afegint etanol absolut a una relació 1:3 respecte al TRIzol inicial. Després d'invertir el tub varies vegades i incubar durant 2-3 minuts a temperatura ambient, es va centrifugar a 2.000 x g durant 5 minuts i a 4°C. Es va transferir el sobrenedant a un nou tub on es va afegir isopropanol a una relació 3:2 respecte al TRIzol inicial. Es va incubar la mostra 10 minuts a temperatura ambient i després es va centrifugar a 12.000 x g durant 10 minuts i a 4°C per precipitar la proteïna. Es va eliminar el sobrenedant i es va rentar el precipitat proteic 3 vegades amb una solució 0.3 M de clorhidrat de guanidina en 95% d'etanol. Es va afegir la solució a una relació 2:1 respecte al TRIzol inicial, es va incubar 20 minuts a temperatura ambient i es va centrifugar a 7.500 x g durant 5 minuts i a 4°C. Finalment, es va fer un últim rentat amb etanol absolut per eliminar les restes de guanidina. Es va afegir 2 ml d'etanol, es va incubar durant 20 minuts a temperatura ambient i es va centrifugar a 7.500 x g durant 5 minuts i a 4°C. Es va eliminar el sobrenedant i es va deixar assecar el precipitat durant 5-10 minuts. Es va ressuspendre el precipitat en tampó RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.25% Sodium deoxycholate, 2% SDS, 1 mM EDTA, amb 1:100 d'inhibidors de proteases de Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) i es va centrifugar a 12.000 x g durant 10 minuts i a 4°C per eliminar el material insoluble. Finalment, es va conservar la proteïna a -20°C fins a la seva quantificació i ús.

La lisi directa amb el tampó RIPA es va realitzar utilitzant un homogeneïtzador Polytron (Kinematica AG), a partir de 100 mg de teixit immersos en 1 ml de tampó RIPA. Després de l'homogeneïtzació, es va centrifugar la mostra a 12.000 x g durant

10 minuts i a 4°C per eliminar el material insoluble. L'extracte proteic es va mantenir a -20°C fins al seu ús.

### 4.1.2.- Cèl·lules

Depenent de la localització de la proteïna es van utilitzar tècniques diferents. La proteïna secretada i soluble es va recollir del medi, mentre que la proteïna de MEC, de membrana o intracel·lular es va recollir afegint tampó de lisi directament sobre les cèl·lules.

#### 4.1.2.1.- Extracte cel·lular

Després d'afegir el tampó de lisi RLT, com es descriu en l'apartat 3.1.2, es va carregar la mostra a la columna de Qiagen per purificar RNA. Mentre la columna reté l'RNA, en el primer eluït és on s'hi troba la proteïna. Aquesta proteïna es va precipitar seguint el protocol de purificació de proteïna detallat en les instruccions. Es va afegir 4 volums d'acetona a l'eluït, i es va incubar 30 minuts en gel. Es va centrifugar durant 10 minuts a 14.000 x g i a 4°C i es va eliminar el sobrenedant. El precipitat, que contenia la proteïna, es va rentar en etanol absolut i es va tornar a centrifugar. Es va ressuspèndre el precipitat en tampó RIPA i es va mantenir a -20°C fins al seu ús. D'aquesta manera, es podia comparar els resultats de l'expressió gènica amb els proteics. Però té l'inconvenient que si la molècula és de MEC no la trobarem (es tripsinitzen les cèl·lules) i si és de membrana pot haver sofert una fragmentació (si és una diana de la tripsina).

Per això, l'extracció en aquests casos es va fer directament utilitzant tampó RIPA. En un flascó de 75 cm<sup>2</sup>, quan les cèl·lules van arribar gairebé a confluència, es van rentar dos cops amb PBS i s'hi va afegir 0.5 ml de tampó RIPA. Es va repartir homogèniament per tota la placa de cultiu, i es van raspar les cèl·lules amb l'ajut d'un *scraper*. Es va recollir l'extracte proteic i es va passar per una xeringa de 21G (0.8 mm de diàmetre; repetint 10 vegades) per homogeneïtzar el DNA. Finalment, es va centrifugar l'extracte a 12.000 x g durant 10 minuts i a 4°C per eliminar el material insoluble, i es va guardar la mostra a -20°C fins al seu ús.

#### 4.1.2.2.- Medi cel·lular

Quan les cèl·lules d'un flascó de 75 cm<sup>2</sup> van arribar gairebé a confluència, se'ls hi va canviar el medi per un medi amb tots els components menys el FBS, per evitar

interferències amb la proteïna sèrica. Es van deixar les cèl·lules durant tota la nit en aquest medi a l'incubador, i al dia següent es va recollir els 12 ml de medi total, que es van congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins al seu ús.

#### **4.2.- Concentració de proteïna**

En alguns casos, degut a la naturalesa de la mostra, la proteïna va quedar diluïda a concentracions massa baixes per al seu ús en les posteriors aplicacions, o fins i tot per a la seva quantificació. És per això que s'han utilitzat dues tècniques per a concentrar la mostra, en funció del seu volum de partida. A més, aquestes tècniques permeten eliminar interferents com ions, el vermell de fenol, o altres substàncies que puguin donar errors en la quantificació i/o posterior ús.

Per a volums petits, es van utilitzar els tubs eppendorf concentradors d'Amicon (Millipore; Billerica, MA, USA). Aquests tubs eppendorf porten una membrana al centre que deixa passar molècules molt petites i líquid, mentre que reté la proteïna. Hi ha diferents membranes que permeten el pas de proteïnes de major o menor pes molecular. Es va carregar la mostra a sobre una membrana de 10 kDa de tall i es va centrifugar a  $14.000 \times g$  durant 40 minuts i a  $4^{\circ}\text{C}$ . Es va recuperar la part retinguda, que es va passar a un nou eppendorf i es va mantenir a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins al seu ús.

Per a volums grans, es va utilitzar l'àcid tricloracètic (TCA) com a agent que afavoreix la precipitació proteica. Es va col·locar la mostra en un vas de precipitats petit en agitació. Es va afegir el mateix volum de TCA al 20% en aigua que de mostra, de manera molt lenta per a què la barreja sigui homogènia i complerta. Aquest pas és enormement crític, i cal fer-lo amb molta cura. El TCA al 20% es va afegir amb l'ajut d'una pipeta d'1 ml, i es va afegir gota a gota, assegurant que entre gota i gota el líquid queda totalment barrejat. Es pot fer un seguiment de l'èxit del procés al visualitzar petits precipitats en forma de filaments que donen voltes a l'interior del vas de precipitats. Un cop afegit tot el TCA al 20%, es va passar tot el volum a un tub *Falcon* de 50 ml i es va centrifugar a  $12.000 \times g$  durant 20 minuts i a  $4^{\circ}\text{C}$ . Es va eliminar el sobrenedant i es va resuspendre el precipitat en TCA al 10% en aigua (la meitat del volum de TCA al 20%). Es va centrifugar a  $12.000 \times g$  durant 20 minuts i a  $4^{\circ}\text{C}$  i es va eliminar el sobrenedant. Es va fer un darrer rentat en dietilèter per eliminar el TCA i es va tornar a centrifugar, 10 minuts en les mateixes condicions. Finalment, es va resuspendre el precipitat en tampó RIPA amb el volum desitjat, i es va congelar la mostra a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins al seu ús.

### 4.3.- Quantificació de proteïna

La proteïna es va quantificar mitjançant l'ús del kit comercial *BCA Protein Assay kit* (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). La tècnica es basa en combinar la reducció del coure (de  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$ ) per part de les proteïnes en medi alcalí (reacció de Biuret) amb la detecció colorimètrica selectiva i altament sensible del  $\text{Cu}^{+1}$  utilitzant un únic reactiu que conté àcid bicinconínic (BCA). La quelació de dues molècules d'aquest reactiu per cadascuna del catió  $\text{Cu}^{+1}$  dona un producte de reacció de color porpra que es pot mesurar per espectrofotometria a 562 nm, densitat òptica en la qual l'absorbància de la mostra és proporcional a la quantitat de proteïna (dins un rang comprès entre 20-2000  $\mu\text{g/ml}$ ). Els responsables de la formació del color són l'estructura macromolecular de la proteïna, el nombre d'enllaços peptídics i la presència de 4 aminoàcids concrets (cisteïna, cistina, triptòfan i tirosina).

Per tal de conèixer la quantitat de proteïna d'una mostra, cal extrapolar la seva absorbància amb una recta patró de concentracions conegudes. Es va partir d'albumina sèrica bovina (BSA) a 2 mg/ml, proporcionada pel kit, i es va fer un banc de dilucions de la següent manera:

- Afegir 375  $\mu\text{l}$  de BSA a 375  $\mu\text{l}$  de tampó de quantificació (1000  $\mu\text{g/ml}$ )
- Afegir 375  $\mu\text{l}$  de l'anterior a 125  $\mu\text{l}$  de tampó (750  $\mu\text{g/ml}$ )
- Afegir 335  $\mu\text{l}$  de l'anterior a 165  $\mu\text{l}$  de tampó (500  $\mu\text{g/ml}$ )
- Afegir 250  $\mu\text{l}$  de l'anterior a 250  $\mu\text{l}$  de tampó (250  $\mu\text{g/ml}$ )
- Afegir 250  $\mu\text{l}$  de l'anterior a 250  $\mu\text{l}$  de tampó (125  $\mu\text{g/ml}$ )
- Deixar un tub amb tampó sol (0  $\mu\text{g/ml}$ )

El tampó de quantificació és el tampó en el que es troba la mostra. Cal diluir-lo tantes vegades com s'acabi diluint la mostra en aigua.

Es va col·locar 90  $\mu\text{l}$  de les dilucions anteriors en diferents tubs i 90  $\mu\text{l}$  (a la dilució que calgui) de cada mostra i se'ls va afegir 720  $\mu\text{l}$  de reactiu de mostra (és una barreja dels reactius A i B de la casa comercial a una relació 50:1). Es va homogeneïtzar amb un vòrtex i es van incubar tots els tubs a 37°C durant 30 minuts. La reacció s'atura en posar els tubs en gel. Es va passar 225  $\mu\text{l}$  de cada tub a 3 pous diferents (triplicats) d'una placa de 96 pous i es va llegir l'absorbància a 562 nm. Els resultats es van representar gràficament i, a partir de l'equació de la recta patró, es van extrapolar les absorbàncies per tal d'obtenir la quantitat de proteïna de cada mostra.

#### 4.4.- Electroforesi

Per tal d'identificar i quantificar específicament una proteïna, cal separar-la de la resta de proteïnes. Aquesta separació es realitza en un gel de poliacrilamida, que s'obté per la polimerització de l'acrilamida en presència de bis-acrilamida (forma ponts entre els polímers d'acrilamida) i el sofre. El percentatge d'acrilamida determina la mida dels porus que queden entre les cadenes de poliacrilamida. A major percentatge de poliacrilamida, més petit és el porus (358-360).

Les proteïnes són molècules amb càrregues diverses que migren en funció del pH. Per a què migrin en un camp elèctric, s'han de carregar negativament mitjançant SDS, un detergent aniònic que les envolta i els proporciona una càrrega negativa en funció del seu pes molecular. D'aquesta manera, migren del pol negatiu cap al positiu en un camp elèctric (SDS-PAGE). La seva separació en un gel de poliacrilamida es dona en funció del seu pes molecular: com més petita és una proteïna més ràpid arribarà al pol positiu. Així, modificant el percentatge de poliacrilamida del gel, es pot aconseguir separar les proteïnes d'alt pes molecular (en percentatges petits, quan els porus són grans, les molècules petites passen igual de ràpid i se separen les grans) o separar les de baix pes molecular (en percentatges alts, quan els porus són petits, les molècules grans queden igual de retingudes al gel i se separen les petites).

Concentració d'acrilamida (%)	Rang lineal de separació (kDa)
15	10-43
12	12-60
10	20-80
8	36-94
6	57-212

**Taula M7.** Rang efectiu de separació de les proteïnes.

Per tant, en funció de la proteïna que es volia detectar, es va utilitzar un percentatge d'acrilamida o un altre. Primer es va preparar un gel separador (*resolving*), que és el gel en el qual se separen les proteïnes en funció del pes molecular de la proteïna que volem detectar. El gel es va col·locar en el muntatge d'electroforesi, entre els dos vidres per on es van separar les proteïnes i deixant la part superior buida. Es va afegir iso-butanol (Sigma-Aldrich) a la part alta del gel per a què quedés recte. Després de 45 minuts de polimerització a temperatura ambient, es va rentar la part alta dels vidres i s'hi va carregar el gel concentrador (*stacking*). Aquest gel es va

preparar al 5% d'acrilamida. La baixa concentració en acrilamida fa que totes les mostres corrin igual de ràpid pel gel concentrador, de manera que arriben totes a la mateixa vegada al gel separador. Així es minimitzen les diferències en els volums entre mostres. Un cop carregat el gel concentrador, es va col·locar la pinta per marcar els pous on es van carregar les mostres i es va deixar polimeritzar durant 30 minuts a temperatura ambient. Un cop polimeritzat, es van desmuntar els vidres del suport i es van muntar a la cubeta d'electroforesi. Es va omplir la cubeta d'electroforesi fins a cobrir els gels amb tampó d'electroforesi (25 mM Tris base, 192 mM Glicina, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.3).

Els gels es van preparar seguint les taules de volums següents(Figura M4 i Figura M5;(361)):



Components	Gel Volume =>	Volume (ml) of Components Required to Cast Gels of Indicated Volumes and Concentrations							
		5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
<b>6% gel</b>									
H <sub>2</sub> O		2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30% acrylamide mix		1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
Tris-Cl (1.5 M, pH 8.8)		1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS (10%)		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED		0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
<b>8% gel</b>									
H <sub>2</sub> O		2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30% acrylamide mix		1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
Tris-Cl (1.5 M, pH 8.8)		1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS (10%)		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED		0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
<b>10% gel</b>									
H <sub>2</sub> O		1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30% acrylamide mix		1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
Tris-Cl (1.5 M, pH 8.8)		1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS (10%)		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED		0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
<b>12% gel</b>									
H <sub>2</sub> O		1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% acrylamide mix		2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
Tris-Cl (1.5 M, pH 8.8)		1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS (10%)		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED		0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
<b>15% gel</b>									
H <sub>2</sub> O		1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30% acrylamide mix		2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
Tris-Cl (1.5 M, pH 8.8)		1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS (10%)		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED		0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

**Figura M4.** Volums per preparar el gel separador.

Components	Gel Volume ⇒	Volume (ml) of Components Required to Cast Gels of Indicated Volumes							
		1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
H <sub>2</sub> O		0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% acrylamide mix		0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
Tris-Cl (1.0 M, pH 6.8)		0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
SDS (10%)		0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
ammonium persulfate (10%)		0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED		0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

**Figura M5.** Volums per preparar el gel concentrador.

La mostra es va preparar de la següent manera:

- Volum de mostra a carregar: Aquest volum depèn de l'abundància de la proteïna que es vol detectar i de la concentració de la mostra.
- Tampó de càrrega (*loading buffer*): Aquest tampó (63 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 0.025% (w/v) blau de Bromofenol, 10% glicerol) condiona la mostra abans de ser carregada per a què se separi en el gel. A aquest tampó se li afegeix 100 mM DTT (dithiothreitol) com a agent reductor en cas que es vulgui trencar els ponts disulfur.

Els tubs es van escalfar a 95°C durant 5 minuts, excepte per a les mostres utilitzades en zimografia (apartat 4.6). Aquest procés permet desnaturalitzar la proteïna i fa accessibles a la reducció amb DTT els enllaços disulfur interns. D'aquesta manera, les proteïnes queden totalment desnaturalitzades, i l'SDS les envolta conferint la càrrega en funció del seu pes molecular.

Es van carregar les mostres i es van separar les proteïnes a 120 V durant 1-2 hores a temperatura ambient, mitjançant una font elèctrica. El temps depèn del percentatge del gel i de la proteïna a separar, de manera que sempre s'intenta que la proteïna quedi al centre del gel (part de separació lineal) i el front de separació (determinat pel color blau, que corre aproximadament com una proteïna de 4 kDa) surti del gel.

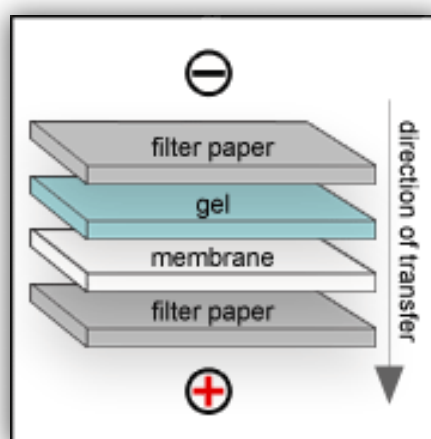
Finalment, es va desmuntar els gels en una cubeta amb aigua i es va seguir com es defineix als apartats 4.5 o 4.6.

Com a control de càrrega, cada cop que es va preparar un gel se'n va preparar un altre paral·lelament. Aquest segon gel, en acabar l'electroforesi, es va tenyir amb tampó de tinció (0.025% de blau de bromofenol en 40% metanol i 7% d'àcid acètic glacial) durant 1 hora i es va destenyir en diferents rentats d'àcid acètic glacial al 7% en aigua fins a obtenir un bon contrast. D'aquesta manera, queda tenyit de color blau tot el perfil proteic de cada mostra i quantificant les bandes per densitometria (amb l'aparell GelDoc de Bio-Rad) es pot veure si la quantitat total de proteïna carregada és igual entre les mostres.

#### **4.5.- Immunotransferència.**

Es tracta d'una tècnica que permet detectar i quantificar una proteïna específica mitjançant l'ús d'anticossos. En un primer pas, se separen les proteïnes de l'homogenat de la mostra mitjançant l'electroforesi en SDS-PAGE i posteriorment es transfereixen a un suport membranós on es realitzarà la detecció (362). Aquest segon pas és també una electroforesi, però en aquest cas és horitzontal. D'aquesta manera, les proteïnes surten del gel i queden adherides a una membrana amb alta afinitat per proteïnes, quedant accessibles per a la unió amb anticossos. Posteriorment, cal bloquejar la membrana mitjançant una proteïna inerta (com el BSA, o la llet descremada) per evitar la unió inespecífica dels anticossos a la membrana (doncs els anticossos són també proteïnes). Després, s'incuba la membrana amb un anticòs primari contra la proteïna d'interès, que es detecta amb un anticòs secundari contra la fracció constant de l'anticòs primari (determinada per l'espècie on s'ha obtingut l'anticòs primari). Aquest anticòs secundari sol anar conjugat a un sistema de detecció lumínic (radiogràfic, fluorescència, peroxidasa, etc) que en permet la detecció i quantificació posterior de la intensitat de la banda.

Després de l'electroforesi, es va desmuntar el gel i es va equilibrar en tampó de transferència (48 mM Tris Base, 42.5 mM Glicina, 20% metanol, 0.04% SDS, pH 8.3) durant 30 minuts. També es va equilibrar una membrana de nitrocel·lulosa (*Nitrocellulose membrane* 0.45  $\mu\text{m}$ , Bio-Rad) de 9 x 6 cm. Es va fer el muntatge en *sandwich* de la següent manera (de positiu a negatiu): esponja absorbent, paper de filtre tipus Whatman® (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), gel amb proteïnes, membrana de nitrocel·lulosa, paper de filtre tipus Whatman® i esponja absorbent (Figura M6). Durant el procés es va tenir molta cura en eliminar totes les bombolles.



**Figura M6.** Esquema del muntatge de transferència. Extret de The Cardio Research Web Project (Jan 2011). *Lab Protocols – Western blot.* De <http://www.cardio-research.com/protocols/western-blot>

El muntatge es va col·locar en una cubeta de transferència i es va realitzar la transferència a 4°C. Primer, es va fer un pols de 100 V durant 30 minuts i posteriorment es va deixar durant tota la nit a 60 V. Un cop acabada la transferència, es van desmuntar les membranes i es van rentar en tampó T-TBS (40 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween-20) durant 5 minuts. Posteriorment, es van incubar les membranes amb una solució vermell *Ponceau* (0.5% Ponceau S, de Sigma-Aldrich, i 1% àcid acètic glacial, en aigua). Aquest procés permet controlar si hi ha hagut una correcta transferència de les proteïnes i, a més, serveix com a control de càrrega. Després de la tinció, es van rentar les membranes amb T-TBS durant 5 minuts. A més, per assegurar una bona transferència, es van tenyir els gels amb Blau de Bromofenol durant 30 minuts i es van destenyir en àcid acètic glacial al 7%.

El bloqueig de les membranes es va realitzar incubant-les durant almenys 30 minuts en una solució de llet descremada al 10% en T-TBS o en una solució de BSA al 5% en T-TBS, en funció de l'anticòs primari, doncs alguns anticòssos tenen afinitat per les proteïnes de la llet.

Es van incubar les membranes amb l'anticòs primari concret diluït en una solució de llet descremada al 10% o de BSA al 5% en T-TBS. En funció de l'anticòs, aquesta incubació es va realitzar durant dues hores a temperatura ambient o durant tota la

nit a 4°C. Els anticossos utilitzats i les seves respectives dilucions venen recollits en la Taula M8.

Immunogen	Nom complet	Dilució	Casa comercial i número catàleg	Hoste
AGC1	Aggrecan (regió G1-IGD-G2)	1/500	R&D Systems; AF-1220	Cabra
AGC1	Aggrecan (molècula sencera)	1/100	Santa Cruz Biotech; sc-33695	Ratolí
CHI3L1	quitinasa 3 L1	1/500	R&D Systems; AF-2599	Cabra
COL1A1	Col·lagen tipus I, alfa-1	1/40	Calbiochem; #CP17	Ratolí
COL3A1	Col·lagen tipus III, alfa-1	1/100	Calbiochem; #CP19	Ratolí
DES	desmin	1/100	Calbiochem; #F02	Ratolí
IL-6	Interleuquina 6	1/666	R&D Systems; AB-206-NA	Cabra
MMP1	Metal·loproteasa de matriu 1	1/50	Calbiochem; #IM35	Ratolí
RELN	reelin	1/100	Calbiochem; #553730	Ratolí
SEC63	homòleg de Sec63 de <i>S. Cerevisiae</i>	1/100	Santa Cruz Biotech; sc-12330	Cabra
TACE/ADAM17	Enzim convertidor de TNF	1/1000	Chemicon; #AB19027	Conill
TIMP3	Inhibidor tissular de metal·loproteasa	1/20	Calbiochem; #IM43	Ratolí
TIMP4	Inhibidor tissular de metal·loproteasa	1/200	Chemicon; #AB19168	Conill
TNF-A	Factor de necrosis tumoral alfa	1/10	HyCult; #HM2026	Ratolí
TNFRSF1A	Membre 1A de la superfamília de receptors del TNF	1/10	HyCult; #HM2020	Ratolí
TNFRSF1B	Membre 1B de la superfamília de receptors del TNF	1/10	HyCult; #HM2022	Ratolí

**Taula M8.** Anticossos primaris utilitzats per detectar les proteïnes específiques en els les immunotransferències.

Després de la incubació, es van rentar les membranes 3 cops en T-TBS, 10 minuts cada rentat a temperatura ambient. Es van incubar les membranes amb anticòs secundari diluït en T-TBS durant 1 hora a temperatura ambient. Tots els anticossos secundaris utilitzats (Taula M9) estaven units a *horseradish peroxidase* (HRP).

Immunogen	Dilució	Casa comercial i número de catàleg	Hoste
immunoglobulines de cabra	1/2000	Dako; #P0449	Conill
immunoglobulines de conill	1/2000	Dako; #P0448	Cabra
immunoglobulines de rata	1/2000	Dako; #P0450	Conill
immunoglobulines de ratolí	1/2000	Dako; #P0447	Cabra

**Taula M9.** Anticossos secundaris utilitzats en les immunotransferències.

Després de la incubació, es van fer 3 rentats de 10 minuts en T-TBS a temperatura ambient. Finalment, es va fer el revelat de la membrana, a través de l'ús de kits de revelat que contenen dos reactius: el substrat de l'enzim HRP (luminol, producte del qual emet llum) i un augmentador del senyal. Es van utilitzar dos sistemes diferents en funció de les característiques de l'anticòs o la proteïna a detectar:

- ECL™ Western Blotting Detection Reagent (Amersham, GE Healthcare).
- Supersignal® West Dura Extended Detection Substrate (Pierce, Thermo Scientific).

Es van barrejar les dues solucions del kit en proporcions 1:1 i es va incubar la membrana durant 3 minuts amb la barreja. Es va col·locar la membrana en un casset d'exposició Hypercassette (Amersham) i es va portar a la cambra fosca (amb llum infraroja). Es va col·locar un film d'exposició Hyperfilm ECL (Amersham) a sobre durant un temps entre 10 segons i 30 minuts en funció del reactiu de revelat i l'anticòs utilitzat i la proteïna analitzada. El film es va revelar en un aparell revelador automàtic FujiFilm FPM-100A (Fuji Medical Systems, Stamford, CT, USA).

Els films es van escanejar mitjançant l'ús de l'aparell GelDoc i es van processar mitjançant el software *Quantity One Quantitation* (Bio-Rad). Les intensitats dels senyals es van dividir respecte a les intensitats dels senyals dels controls endògens i es van comparar els grups de pacients amb HI respecte al grup de pacients control sense HI.

#### 4.6.- Zimografia i zimografia reversa

Aquesta tècnica permet la separació i detecció de l'activitat enzimàtica en un homogenat proteic. La tècnica es basa en separar les proteïnes mitjançant electroforesi, amb la particularitat que en el mateix gel d'electroforesi s'hi barreja el substrat de l'enzim que es vol detectar. Un cop s'han separat les proteïnes, s'activa l'activitat enzimàtica. Finalment, es tenyeix el gel, de manera que quedarà tot tenyit (el substrat és una proteïna) excepte on ha quedat l'enzim específic, doncs haurà degradat el substrat i quedarà un buit (no es tenyirà). Per a aquesta tècnica no es desnaturalitzen les proteïnes (no s'afegeix DTT ni s'escalfen les mostres a 95°C) per tal d'evitar la pèrdua de l'activitat enzimàtica.

La zimografia reversa té fonaments similars a la zimografia, però en aquest cas es co-polimeritza el substrat de l'enzim amb l'enzim. D'aquesta manera, el que es detecta és l'inhibidor de l'enzim, en la zona on no s'ha degradat el substrat. En tenyir, quedarà tot el gel blanc per la degradació del substrat, excepte on hi ha l'inhibidor, que quedarà marcat en blau.

Es van utilitzar dos tipus de substrat diferent:

- Gelatina (Sigma-Aldrich): És el substrat de les MMP-2 (Gelatinasa A) i MMP-9 (Gelatinasa B).
- $\beta$ -caseïna (Sigma-Aldrich): És el substrat de les MMP-3 (Stromelysin-1, progelatinasa) i MMP-7 (Matrilysin).

Es van preparar gels al 7.5% (gelatina) o al 10% ( $\beta$ -caseïna) de poliacrilamida, seguint les instruccions per a la preparació de gels descrites en l'apartat 4.5. Es va afegir 1 ml menys d'aigua, que va ser substituït per 1 ml de gelatina a 1.5 mg/ml o 1 ml de  $\beta$ -caseïna a 1.5 mg/ml. En el cas de la zimografia reversa, es va afegir 1 ml de gelatina a 2.5 mg/ml i 1 ml de Gelatinasa A (1.2  $\mu$ g/10 ml de gel; Oncogene, Barcelona, Espanya).

Després de l'electroforesi a 4°C (per evitar la degradació dels gels) es van desmuntar els gels i es van fer rentats de 15 minuts utilitzant els següents tampons:

- 2 rentats amb tritó X-100 al 2.5% en aigua destil·lada.
- 2 rentats amb tritó X-100 al 2.5% en 50 mM Tris-HCl pH 7.5.

- 2 rentats amb 50 mM Tris-HCl pH 7.5.

Els rentats amb tritó X-100 permeten l'eliminació de l'SDS de la mostra, detergent que envolta les proteïnes fent que perdin l'activitat (es restaura l'activitat). Finalment, es van incubar els gels amb tampó d'incubació (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>) durant 22 hores (zimografies) o 15 hores (zimografia reversa) a 37°C. Posteriorment, es van tenyir amb Blau de Comassie i es van destenyir amb àcid acètic al 7%. Les bandes van ser detectades amb l'aparell GelDoc i quantificades per densitometria amb el software Quantity One (Bio-Rad). En la zimografia, es van invertir les imatges per a la quantificació.

## 5.- Mètodes de Biologia Cel·lular

En aquest apartat es detallen els experiments realitzats directament sobre el cultiu cel·lular, ja sigui per a la detecció i visualització de proteïnes (mitjançant immunofluorescència) o per a l'anàlisi de funcions cel·lulars (proliferació i apoptosi, mitjançant variacions de la immunofluorescència o tècniques fluorescentes).

### 5.1.- Immunofluorescència

La immunofluorescència és una variació de la immunocitoquímica o immunohistoquímica en la qual es detecta, igual que en la immunotransferència, una proteïna determinada mitjançant l'ús d'anticossos específics. En aquest cas, els anticossos secundaris van units a un fluorocrom. L'ús de la fluorescència permet amplificar molt el senyal, de manera que es poden veure les proteïnes sense necessitat de fer una extracció. A la vegada, permet veure la localització subcel·lular de les proteïnes i els canvis de compartiments en determinades situacions. A més, amb un disseny adequat i una bona posada a punt, es poden identificar fins a 3 proteïnes diferents, observant les seves co-localitzacions.

#### 5.1.1.- Mètode

Es van col·locar els cobreobjectes circulars de vidre de 12 mm de diàmetre (Menzel-Glaser Deckgläser, Menzel GmbH & Co., Braunschweig, Alemanya) a l'interior dels pous d'una placa de 24 pous i es van incubar tota la nit amb FBS. Al dia següent, es van sembrar 10.000 cèl·lules a cada pou i es van deixar adherir fins al dia següent. Un cop adherides, es van rentar les cèl·lules dos cops amb PBS i es van fixar amb paraformaldehid (PFA) al 4% en PBS durant 20 minuts a temperatura ambient. La



fixació és un pas que mata les cèl·lules preservant les seves estructures. A partir de la fixació, tots els rentats es van realitzar amb solució de rentat (20 mM Glicina en PBS). La glicina que conté aquest tampó permet eliminar l'autofluorescència de compostos com els grups aldehids (com el PFA), un procés denominat *quenching*, de manera que es redueix molt el soroll de fons.

Després de la fixació, es van fer 3 rentats de 5 minuts amb solució de rentat i es van permeabilitzar les cèl·lules amb 0.05% de tritó X-100 en PBS durant 15 minuts. El tritó és un detergent que produeix grans porus en la membrana cel·lular, permetent la difusió de fluids i molècules d'alt pes molecular (com els anticossos).

Es van rentar les cèl·lules 3 cops durant 5 minuts en solució de rentat i es van bloquejar amb BSA a l'1% en PBS durant almenys 30 minuts. El procés de bloqueig evita la unió inespecífica de l'anticòs primari. Durant el bloqueig, es va preparar una cambra fosca i humida utilitzant una placa de cultius de 100 mm de diàmetre, que es va embolicar amb paper d'alumini. Al fons s'hi va col·locar paper de filtre humitejat per mantenir un ambient humit, i a sobre s'hi va col·locar un paper de *parafilm*<sup>®</sup>.

Es va diluir l'anticòs primari a la concentració idònia (Taula M10) en BSA a l'1% en PBS i es va col·locar una gota de 50 µl a sobre del *parafilm*<sup>®</sup>. Es va col·locar el cobreobjectes boca avall, amb la cara on hi havia les cèl·lules en contacte amb la gota i es va incubar durant 1 hora a temperatura ambient. En alguns casos, es va incubar durant 45 minuts en una estufa de 37°C.

Immunogen	Nom complet	Dilució	Casa comercial i número de catàleg	Hoste
$\alpha$ -SMA	actina alfa de múscul llis	1/100	Sigma-Aldrich; #A2547	Ratolí
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine	1/100	Calbiochem; #NA61	Ratolí
CHI3L1	quitinasa 3 L1	1/20	R&D Systems; #MAB-2599	Rata
pFAK	Quinasa d'adhesions focals, fosforilada a Tyr 577	1/50	Calbiochem; #ST1011	Conill
RELN	reelin	1/20	Calbiochem; #553730	Ratolí
Tensin	tensin	1/50	Santa Cruz Biotech; #sc-28542	Conill
Vimentin	vimentin	1/40	Neomarkers; #MS129P	Ratolí

**Taula M10.** Anticossos primaris utilitzats en la immunofluorescència.

Després de la incubació, es van retornar els cobreobjectes a la placa de 24 pous i es van efectuar 3 rentats en solució de rentat, de 10 minuts cadascun. Es va preparar la dilució d'anticòs secundari idònia (Taula M11) i es va dipositar una gota de 50  $\mu$ l en una nova base de *parafilm*<sup>®</sup>. Es van col·locar els cobreobjectes cara avall i es va incubar durant 1 hora a temperatura ambient. A partir d'aquest pas, és totalment indispensable que es realitzi tot amb el mínim contacte amb la llum, ja que els anticossos secundaris van marcats amb fluorocrom.

Immunogen	Dilució	Alexa Fluor	Casa comercial i número de catàleg	Hoste
immunoglobulines de conill	1/200	568 (vermell llunyà)	Invitrogen; #A11011	Cabra
immunoglobulines de rata	1/200	594 (vermell llunyà)	Invitrogen; #A21209	Ase
immunoglobulines de ratolí	1/200	488 (verd)	Invitrogen; #A11029	Cabra

**Taula M11.** Anticossos secundaris emprats en la immunofluorescència.

Es van retornar els cobreobjectes a la placa de 24 pous, recoberta amb paper d'alumini. Es van realitzar 3 rentats de 10 minuts amb solució de rentat i es van treure els cobreobjectes de la placa de 24 pous, deixant-los assecar a temperatura ambient. Es va col·locar 5 ml de medi de muntatge VectaShield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) a sobre un portaobjectes i s'hi va col·locar el cobreobjectes boca avall, amb les cèl·lules en contacte amb la gota. Aquest medi de muntatge, a més de ser un preservant que manté les immunofluorescències, porta incorporat 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), una molècula fluorescent amb elevada afinitat per regions riques en A-T en el DNA. D'aquesta manera, el nucli quedarà tenyit de color blau, ja que aquesta molècula absorbeix llum ultraviolada.

Els portaobjectes amb les preparacions es van mantenir en fosc i a la nevera fins al seu ús. En tots els casos, es va realitzar un control negatiu consistent en la presència d'anticòs secundari i l'absència d'anticòs primari. Les immunofluorescències es van visualitzar mitjançant l'ús d'un microscopi de fluorescència BX-61 d'Olympus (Olympus Corporation, Tokyo, Japó). La captació de les imatges es va realitzar a la Unitat Científico-Tècnica de Suport (UCTS) de l'Institut de Recerca de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron (VHIR), i mitjançant l'ús del microscopi d'epifluorescència confocal espectral FV-1000 (Olympus). El tractament i obtenció de les imatges es va realitzar mitjançant el software FV-ASW (Olympus).

Es va utilitzar també el kit comercial *Actin Cytoskeleton and Focal Adhesion Staining kit* (FAK100, Millipore), que tenyeix els filaments d'actina i la vinculina (proteïna d'adhesions focals). El kit conté faloidina (una molècula amb alta afinitat per l'actina) marcada amb rodamina (dóna fluorescència vermella) i un anticòs de ratolí contra vinculina, que es detecta amb un anticòs secundari contra ratolí (Taula M11). El protocol que es va seguir és molt similar al descrit en aquest apartat, posant una dilució de l'anticòs primari anti-vinculina a 1:200 i una dilució de fal·loïdina (que es barreja amb l'anticòs secundari) a 1:300.

### **5.1.2.- Proliferació**

La quantificació de les cèl·lules en fase proliferativa, és a dir, aquelles que s'estan dividint, es va realitzar utilitzant una modificació del protocol bàsic de la immunofluorescència. En primer lloc, després de sembrar les cèl·lules en els cobreobjectes, es van incubar durant 12 hores amb una solució 10  $\mu$ M de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; Calbiochem) en medi DMEM complet. El BrdU és una

molècula anàloga a la Timidina, que les cèl·lules en replicació l'incorporen al DNA quan la troben en el medi.

El BrdU es va detectar mitjançant un anticòs específic (Taula M10). Prèviament, i després de fixar i permeabilitzar, es van tractar les cèl·lules amb 1 Unitat/ $\mu$ l de DNasa I (Promega, Fitchburg, WI, USA). Aquest tractament produeix la fragmentació del DNA, de manera que deixa més accessible el BrdU a l'anticòs.

La resta del procés es va seguir com en la immunofluorescència. Després d'adquirir les imatges, es va quantificar el nombre de nuclis positius respecte als totals (marcats amb DAPI) mitjançant l'ús del software gratuït *ImageJ* (desenvolupat pel National Institutes of Health, NIH; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

### 5.2.- Apoptosi

La mesura i quantificació de la mort cel·lular (apoptosi) es va realitzar mitjançant l'ús del kit comercial *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (Roche Applied Sciences). Aquest reactiu es basa en marcar fluorescentment els oligonucleòtids generats durant el trencament del DNA, un procés habitual i característic de l'apoptosi. Durant la fragmentació del DNA es generen fragments 3'-OH que són reconeguts per l'enzim *Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)*, que catalitza l'addició de dUTPs marcats fluorescentment amb fluoresceïna (color verd). Aquest procés es denomina *Tdt-mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL)* o *In Situ End Labeling (ISEL)*.

Un cop sembrades les cèl·lules, es van procedir a fixar amb PFA al 4% i es van permeabilitzar amb 0.05% de tritó X-100, com en la immunofluorescència. Es van col·locar els cobreobjectes a sobre una gota de 50  $\mu$ l de la barreja de reacció de TUNEL (5  $\mu$ l de solució d'enzim per cada 45  $\mu$ l de solució de marcatge) en una cambra humida i fosca, igual que la preparada en la immunofluorescència (apartat 5.1.1). Es van incubar les mostres durant 60 minuts a 37°C i es van realitzar 3 rentats amb PBS de 5 minuts cadascun. Finalment, es van muntar els cobreobjectes en portaobjectes amb medi de muntatge VectaShield (Vector Laboratories, Inc.). Es van adquirir les imatges mitjançant un microscopi de fluorescència, com en la immunofluorescència. El percentatge de cèl·lules apoptòtiques es va quantificar com a nombre de cèl·lules positives respecte al total de cèl·lules (marcades amb DAPI) mitjançant el software *ImageJ*.

Es van realitzar dos controls del procés:

- Control negatiu: És una mostra amb cèl·lules però on només s'afegeix 50 µl de la solució de marcatge, sense afegir la solució d'enzim.
- Control positiu: És una mostra amb cèl·lules on s'afegeix DNasa I de Promega (1 Unitat/µl de DNasa) abans de l'addició de la barreja de reacció de TUNEL.

## **6.- Biomaterials**

En aquest apartat es descriuen totes les tècniques utilitzades per a la caracterització física de les malles quirúrgiques utilitzades i l'anàlisi del comportament cel·lular dels fibroblasts sembrats en contacte amb aquestes malles. Es va utilitzar una de les malles més utilitzades en cirurgia abdominal de reparació de la HI, la malla de polipropilè (PP). Els resultats es van comparar amb les malles sembrades en una placa de poliestirè utilitzada habitualment per al cultiu cel·lular (PS).

### **6.1.- Malla de polipropilè**

Es va utilitzar una malla Prolene (Ethicon) de polipropilè monofilament d'alta densitat. El gruix dels filaments d'aquesta malla és de 0.68 mm i els porus són de 164 x 96 µm.

Les malles venien esterilitzades pel fabricant. Es van tallar en fragments de 1 cm<sup>2</sup> en un ambient estèril.

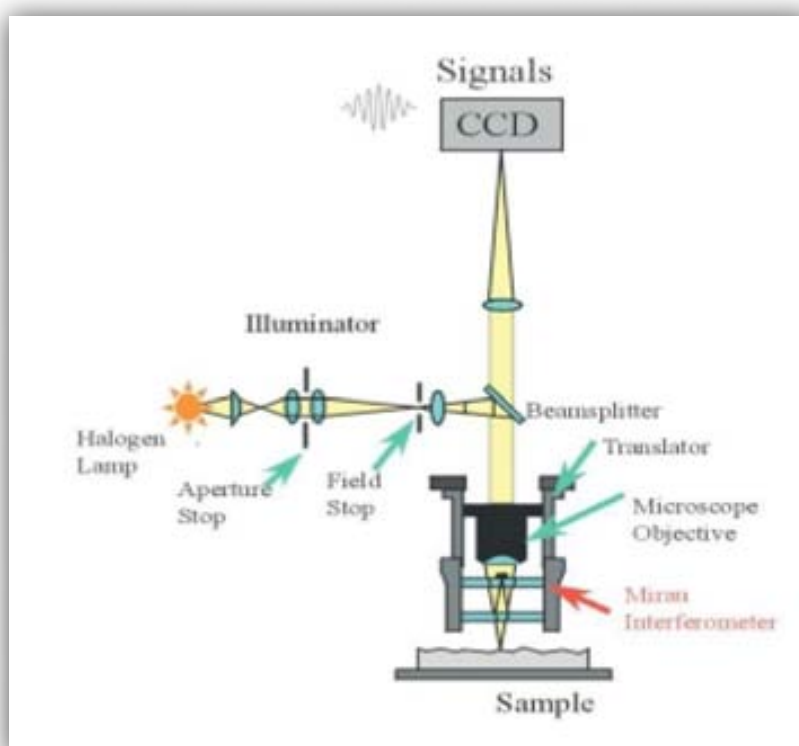
### **6.2.- Mètodes de caracterització física**

La caracterització física de les malles de PP es va realitzar utilitzant els aparells de la Plataforma de Nanotecnologia del Parc Científic de Barcelona (PCB; [www.pcb.ub.es/plataforma/nanotecnologia](http://www.pcb.ub.es/plataforma/nanotecnologia)), sota la supervisió d'un tècnic especialitzat.

#### **6.2.1.- Topografia**

La topografia es va analitzar mitjançant l'ús d'un microscopi interferomètric Wyko NT1100 (Veeco Instruments, Inc., Woodbury, NY, USA). L'interferometre és un microscopi òptic que analitza la rugositat sense contactar amb la mostra.

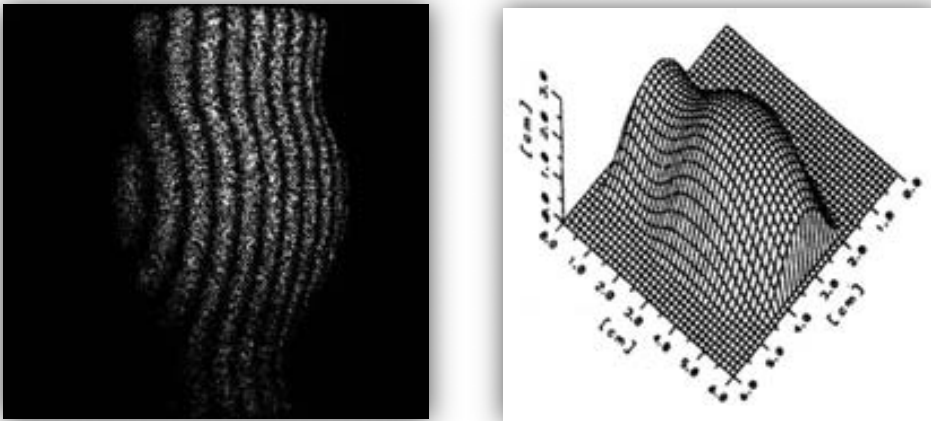
Es basa en llençar un feix de llum contra un mirall anomenat *beam-splitter* (Figura M7). Aquest és un mirall amb una fina capa de plata, que deixa passar la meitat del feix i reflecteix l'altra meitat. El feix de referència travessa aquest mirall i es reflecteix en un altre mirall intern i arriba a la càmera. L'altre feix es reflecteix en el mirall i després es reflecteix sobre la mostra a analitzar, arribant després a la càmera. Quan els dos feixos arriben a la càmera, se solapen i interfereixen, generant un patró d'àrees blanques i negres (anomenat franges d'interferència; Figura M8). Les àrees blanques corresponen a l'addició dels dos feixos (interferència constructiva) i les àrees negres són zones on un feix és contrarestat per l'altre (interferència destructiva). El patró exacte d'interferència depèn del camí o la distància extra que hagi recorregut un dels feixos (363).



**Figura M7.** Esquema del funcionament d'un interferòmetre. Adaptat de Woods S (Dec 2009). *Understanding scanning white light interferometry*. De

<http://www.micromanufacturing.com/content/understanding-scanning-white-light-interferometry>

El patró és registrat digitalment i permet registrar petites variacions en l'altura de la superfície, donant lloc a un perfil de rugositat de la mostra (Figura M8).

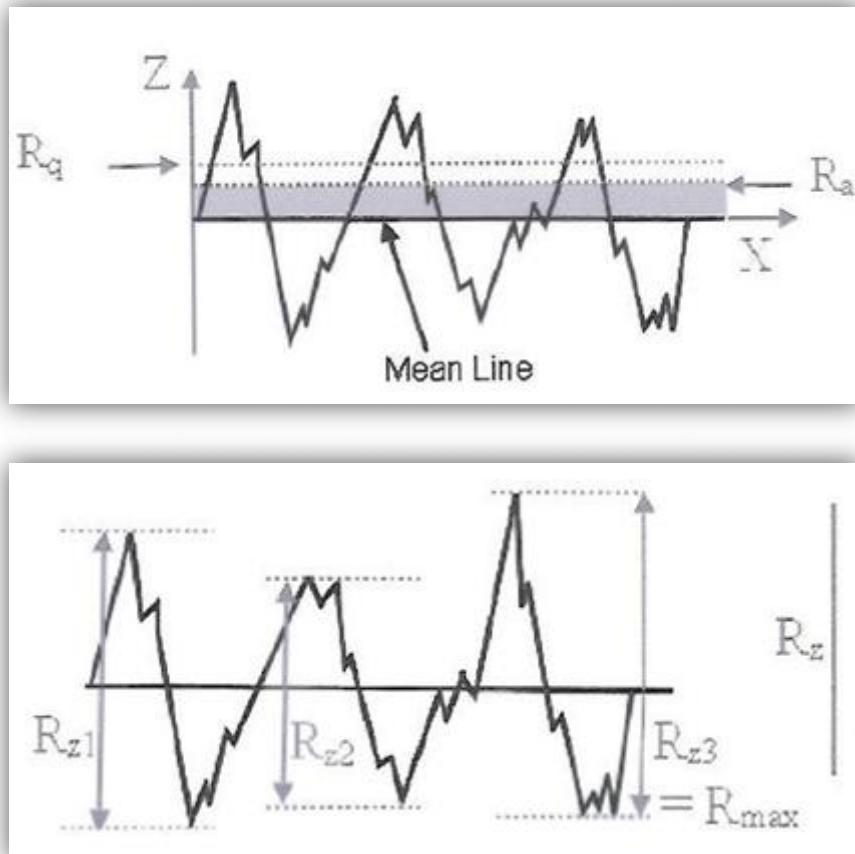


**Figura M8.** Representació tridimensional de les franges d'interferència.

Es van analitzar àrees de  $736 \times 480 \text{ mm}^2$ . L'anàlisi de les dades es va realitzar mitjançant l'ús del software Wyko Vision 32™ (Veeco), després de passar un filtre de Gaussian per corregir la ondulació de la mostra i només analitzar la rugositat.

Es van analitzar els següents paràmetres topogràfics (Figura M9):

- Ra (promig de la rugositat): és la desviació aritmètica promig de la altura de la superfície des de la línia central a través del perfil.
- Rq o RMS (rugositat): és la desviació quadràtica mitja a partir de la línia central.
- Rz (mitja del valor més alt): és el valor promig dels diferents pics analitzats.
- Rt (distància pic-vall): és la màxima distància entre tots els valors més positius (pics) i tots els valors més negatius (valls) analitzats.



**Figura M9.** Representació gràfica dels paràmetres de rugositat analitzats. Extret de FineTubes. *Surface Finishes*. De <http://www.finetubes.co.uk/products/technical-reference-library/tube-surface-finishes>

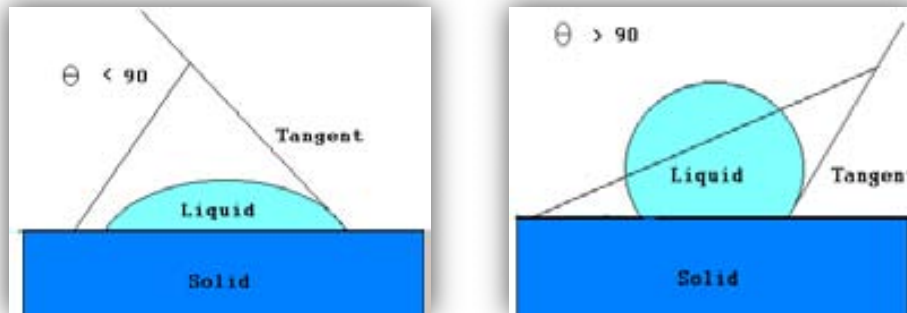
Es van realitzar un total de 15 mesures per cada superfície (PP i PS).

### 6.2.2.- Absorbibilitat

L'absorbibilitat és el procés pel qual un líquid s'espargeix o mulla un sòlid. Quan un líquid entra en contacte amb un sòlid, el mullarà més o menys en funció de les propietats d'adsorció del sòlid i de la tensió superficial del líquid. Prop de la interfase entre líquid i sòlid, just on entren en contacte, es generen unes forces de cohesió (líquid/líquid) i d'adhesió (sòlid/líquid) que es tradueixen en un increment en la superfície per unitat d'àrea (364). Aquest canvi conformacional produeix una alliberació d'energia anomenada energia lliure (365). L'excés d'aquesta energia es denomina energia lliure de superfície. L'energia lliure de superfície està, doncs, estretament relacionada amb la tensió superficial del líquid.



En el punt d'interacció entre el sòlid i el líquid es genera un angle, denominat angle de contacte, que pot ser mesurat (364). Aquest angle depèn de l'absorbibilitat del sòlid, de manera que quan l'angle de contacte és menor a  $90^\circ$  (les forces d'adhesió són superiors a les forces de cohesió), el sòlid és hidrofílic. En canvi, quan l'angle de contacte és major de  $90^\circ$  (les forces d'adhesió són inferiors a les forces de cohesió), el sòlid és hidrofòbic (Figura M10).

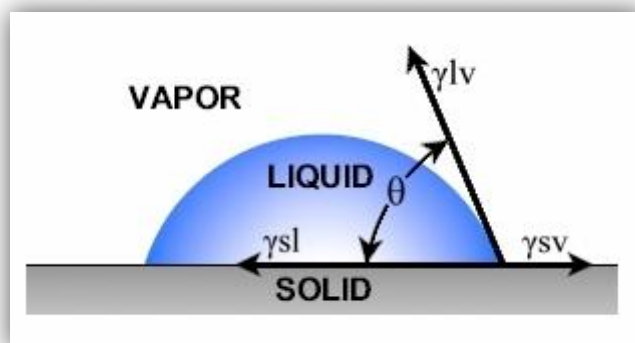


**Figura M10.** Esquema d'un sòlid hidrofílic (esquerra) i d'un sòlid hidrofòbic (dreta).

L'energia lliure de superfície es pot obtenir a partir d'aquest angle de contacte, a través de l'equació de Young (366). Thomas Young va proposar l'angle de contacte d'un líquid com un equilibri de la gota a sobre una superfície sòlida en l'entorn de les 3 fases que hi participen (Figura M11):

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cdot \cos \theta$$

On  $\theta$  és l'angle de contacte,  $\gamma_{SV}$  és l'energia lliure de superfície del sòlid,  $\gamma_{SL}$  és l'energia lliure interfacial entre el líquid i el sòlid i  $\gamma_{LV}$  és la tensió superficial del líquid.



**Figura M11.** Angle de contacte i energies lliures que participen en la interacció entre una gota i una superfície sòlida. Adaptat de Ramé-hart Instrument Inc. *Information on contact angle.* De <http://www.ramehart.com/contactangle.htm>

D'aquesta equació, només se'n poden calcular directament dos paràmetres: la tensió superficial del líquid,  $\gamma_{LV}$  (obtinguda a través de molts mètodes diferents, (364), i l'angle de contacte,  $\theta$ . Per això, per a obtenir l'energia lliure de superfície cal una altra equació que lligui l'energia lliure interfacial,  $\gamma_{SL}$ , amb les altres variables.

De les diferents aproximacions a la termodinàmica interfacial, es va elegir la fórmula descrita per Good-van Oss (367,368):

$$\gamma_S = \gamma_S^{LW} + \gamma_S^{AB}$$

On  $\gamma_S^{LW}$  és la component no polar (Lifshitz-van der Waals, LW; (369) i és la component polar, que depèn de les interaccions àcid/base. Aquesta component polar es pot dividir en dues components: la component àcida (acceptor d'electrons,  $\gamma^+$ ) i la component bàsica (donant d'electrons,  $\gamma^-$ )(370).

$$\gamma_S^{AB} = 2 \sqrt{(\gamma_S^+ \gamma_S^-)}$$

Aplicant aquesta aproximació a la fórmula de Young, la fórmula final és:

$$\gamma_L (1 + \cos \theta) = 2 \cdot (\gamma_L^{LW} \gamma_S^{LW})^{1/2} + 2 \cdot (\gamma_L^+ \gamma_S^-)^{1/2} + 2 \cdot (\gamma_L^- \gamma_S^+)^{1/2}$$

Així, la component no polar (LW), i les components àcides i bàsiques d'un sòlid es poden calcular a través de les mesures dels angles de contacte de diferents líquids de tensions superficials conegudes, amb un sistema de tres equacions amb tres incògnites. Per tant, cal l'ús de les mesures de l'angle de contacte de com a mínim tres líquids.

Les mesures es van realitzar a la Plataforma de Nanotecnologia del Parc Científic de Barcelona mitjançant l'ús del goniòmetre OCA15+ plus (DataPhysics, San Jose, CA, USA). Aquest aparell diposita una gota a sobre del material i té una càmera adaptada que capta la imatge de la gota. Mitjançant el software SCA20 (DataPhysics) es van calcular els angles de contacte de 4 líquids diferents i de tensions superficials conegudes (Taula M12; (371)): aigua milliQ, formamida, etilen glicol (són líquids polars) i diiodometà (líquid no polar).

Líquid	$\gamma_L$	$\gamma_L^{LW}$	$\gamma_L^+$	$\gamma_L^-$
Aigua milliQ	72,80	21,80	25,50	25,50
Etilen glicol	48,00	29,00	1,92	47,00
Formamida	58,00	33,00	3,25	48,08
Diiodometà	50,80	50,80	~ 0,00	~ 0,00

**Taula M12.** Tensions superficials i les seves components (en mN/m) dels 4 líquids utilitzats en l'anàlisi de l'angle de contacte. Extret de van Oss CJ *et al.* *Estimation of the polar parameters of the surface tension of liquids by contact angle measurements.* J Colloid Interface Sci. 1989; 128(2): 313-9.; i de Erbil HY. *Handbook of Surface and Colloid Chemistry.* CRC Press (1997): 292.

Es van dipositar 3 gotes de 3  $\mu$ l en 5 malles diferents (total de 15 mesures) per cada líquid. Mitjançant el software, es van introduir les mitges dels angles de contacte per cada líquid i es van obtenir les components polar i no polar de la malla de PP.

### 6.3.- Mètodes Biològics

#### 6.3.1.- Adsorció de proteïna

Abans de sembrar les cèl·lules, es va analitzar la capacitat d'adsorció proteica de les malles. Es van incubar la malla de PP i el PS amb FBS durant 24 hores a 37°C. Es va retirar l'FBS (es va quantificar mitjançant el kit de BCA) i es va fer dos rentats amb PBS. Després es va extreure la proteïna unida fortament a la malla mitjançant SDS a l'1%. Finalment es va quantificar la quantitat de proteïna de l'FBS extret després de la incubació, el PBS dels dos rentats i el SDS de l'extracció final, relacionant cada fracció amb el FBS inicial, de manera que es va obtenir el percentatge de proteïna que es quedava adsorbida a la malla, tant per adhesions febles com fortes.

#### 6.3.2.- Tractament previ

Les malles es van copolimeritzar amb agarosa al 2% per evitar que suessin en el medi de cultiu i, a més, evitar que les cèl·lules s'adherissin al fons de la placa de cultius. Es va escalfar en un microones 2 grams d'agarosa per cada 100 ml de PBS i es va dipositar al fons dels pous d'una placa de cultius. Immediatament, es van col·locar els fragments de malla, de manera que quan l'agarosa solidifiqués la malla hi quedés enganxada. La combinació obtinguda es va esterilitzar mitjançant llum ultraviolada a l'interior d'una campana de cultius durant tota la nit.

Al dia següent, es va afegir FBS amb antibiòtic als pous i es va incubar durant tota la nit en un incubador de 37°C.

#### 6.3.3.- Test de citotoxicitat

Es va col·locar agarosa al 2% en una placa de cultius de 100 mm de diàmetre i es va deixar solidificar. Es va deixar durant tota la nit sota llum ultraviolada en una campana de cultius. Al dia següent, es va afegir medi RPMI-1640 (Invitrogen) complet (10% FBS, 1% antibiòtic, 20 mM HEPES) i es van cultivar  $5 \times 10^5$  Monòcits THP-1 (Sigma-Aldrich). Es va quantificar el número de cèl·lules vives i mortes mitjançant Trypan blue. Aquesta molècula tenyeix de blau els nuclis de les cèl·lules mortes. Es va agafar 10 µl cada 2-3 dies i es va quantificar el nombre de cèl·lules vives i mortes, donant un percentatge de viabilitat.

El medi es va canviar cada 2-3 dies. Tenint en compte que son cèl·lules que creixen en suspensió, cada 2-3 dies es va agafar el medi i es va centrifugar a 300 x g durant 5 minuts. Es va aspirar el medi i es van ressuspèndre les cèl·lules en medi RPMI-1640 complementat amb antibiòtic, diluint-les sempre a la meitat.

Es va realitzar l'assaig durant 20 dies i es van realitzar triplicats. Els resultats es van comparar amb monòcits THP-1 cultivats en una placa de cultiu de 100 mm de diàmetre sense agarosa.

#### **6.3.4.- Sembra i creixement de cèl·lules**

Es van utilitzar fibroblasts procedents d'aponeurosi de 5 pacients amb HI i 5 pacients sense HI, obtinguts com s'explica en l'apartat 2.

Un cop en passí 5, es van tripsinitzar els fibroblasts i es van ressuspèndre en 3 ml de medi complet. Es va contar el nombre de cèl·lules amb un contador de partícules *Z1 Coulter Particle Counter* (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Es van sembrar 50.000 cèl·lules en 1 ml de medi, per cada fragment d'1 cm<sup>2</sup> dipositat sobre agarosa al 2% en un pou d'una placa de 24 pous. Es van deixar les cèl·lules durant tota la nit a l'incubador de la sala de cultius. Al dia següent es va canviar el medi i a partir de llavors es va canviar cada 2-3 dies. Tots els experiments es van realitzar en triplicats independents.

El creixement de les cèl·lules al llarg del temps es va analitzar mitjançant el kit de proliferació *CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, WI, USA). Aquest assaig colorimètric es basa en mesurar la reducció de les sals de tetrazolium (un derivat del tetrazolium, denominat MTS) a sals de formazán. Aquesta reducció es produeix per l'acció de les deshidrogenases mitocondrials de les cèl·lules vives. Les sals de formazán generades són solubles i es pot mesurar la quantitat generada per espectrofotometria. La quantitat de sals de formazán generades són directament proporcionals al nombre de cèl·lules vives. El creixement cel·lular va ser analitzat cada 3-4 dies, durant 35 dies, al canviar el medi de cultiu per medi sense sèrum i complementat amb un 20% del reactiu MTS. Es va incubar durant 4 hores amb el reactiu a 37°C i en fosc. Es va agafar una alíquota de 300 µl i es va passar a una nova placa de 96 pous. Es va mesurar la densitat òptica a 490 nm mitjançant l'ús d'un lector de plaques *ELx800 Universal Microplate Reader* (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). El soroll de fons es va eliminar en incubar les mostres sense cèl·lules amb 20% de MTS en medi sense sèrum.

### 6.3.5.- Assaig de viabilitat

Es va comprovar la citotoxicitat de la malla analitzant el nombre de cèl·lules vives i mortes. L'assaig es va realitzant mitjançant una tècnica fluorescent que utilitza dues sondes marcades, el kit comercial *Live/dead Viability/Cytotoxicity kit for mammalian cells* (Molecular Probes, Invitrogen). Una de les sondes és la *Calcein AM*, que és permeable a la membrana cel·lular i, per tant, entra en totes les cèl·lules. A l'interior cel·lular, l'activitat esterasa intrínseca de les cèl·lules vives converteix la *Calcein AM* en *Calcein*, una molècula verd fluorescent que queda retinguda al citoplasma. La segona sonda és el *Ethidium homodimer-1* (EthD-1), que és impermeable a la membrana cel·lular. Per tant, només entra en les membranes danyades, de les cèl·lules mortes, on pot entrar fins al nucli. S'intercala en el DNA augmentant la seva fluorescència, de color vermell, fins a 40 vegades. Per tant, el resultat final és l'observació de les cèl·lules vives en color verd al citoplasma i les cèl·lules mortes en color vermell al nucli.

Es va posar a punt la tècnica amb diferents concentracions de *Calcein AM* i EthD-1, arribant al compromís d'utilitzar 1  $\mu\text{M}$  i 3  $\mu\text{M}$ , respectivament. Es va afegir una dilució d'aquests dos components en D-PBS estèril durant 30 minuts, a temperatura ambient i en fosc. Després es van rentar les cèl·lules en D-PBS dos cops i es van fixar amb PFA al 4% durant 20 minuts a temperatura ambient i en fosc. Posteriorment, es van muntar les mostres en VectaShield amb DAPI (Vector Laboratories, Inc.) per tenyir el nucli de totes les cèl·lules. Les malles es van col·locar en una placa amb el fons foradat i substituït per vidre per a poder col·locar la malla (MatTek Corporation; Ashland, MA, USA). Es van adquirir cinc imatges a l'atzar per cada mostra mitjançant un microscopi confocal Leica-TCS-UV (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanya) a la UCTS. Les imatges de les malles es van adquirir en la seva totalitat, des de la part més baixa a la més alta en increments de 5  $\mu\text{m}$ . Les imatges planars digitals (en el pla X-Y) es van capturar a l'incrementar la profunditat (eix Z) de la mostra. La reconstrucció tridimensional i el tractament de les imatges es va realitzar mitjançant el software Fluoview FV-1000 (versió 1.7b; Olympus). El nombre de cèl·lules mortes (en vermell) es va comptar com a percentatge del nombre total de cèl·lules.

### 6.3.6.- Immunofluorescència

Per a les immunofluorescències sobre les malles es van seguir els passos indicats en l'apartat 5.1. Es van adaptar els passos a volums més grans, de manera que la malla

quedés recoberta (300 µl). En l'adquisició i el tractament de les imatges es van seguir els passos de l'apartat 6.3.5. Es van utilitzar els anticossos descrits en la taula M11.

L'assaig de proliferació en malles es va realitzar com es descriu en l'apartat 5.1, adaptant els volums (300 µl) i seguint els passos d'adquisició d'imatge de l'apartat 6.3.5.

### **6.3.7.- Apoptosi**

Es va adaptar a les malles el protocol descrit en l'apartat 5.2 amb un volum de 300 µl. L'adquisició de les imatges es va realitzar seguint els passos descrits en l'apartat 6.3.5.

## **7.- Mètodes estadístics**

En aquest apartat es detallen els mètodes utilitzats per avaluar si les diferències entre els pacients amb HI i els pacients sense HI són estadísticament significatives, per les diferents variables analitzades. Els mètodes utilitzats en el xip de DNA es troben detallats en l'apartat 3.7.2.

### **7.1.- Anàlisi estadístic general**

Els resultats pel grup pacients amb HI i pel grup pacients sense HI van ser quantificats com a mitjanes aritmètiques  $\pm$  l'error estàndard de la mitjana (SEM). Es va utilitzar la SEM enlloc de la desviació estàndard (s) perquè corregeix l'error en mostres petites ( $SEM = s / \sqrt{n}$ ).

Es va comprovar que existia homogeneïtat de les variàncies de totes les dades analitzades mitjançant el test de Levene. Les diferències entre les mitges dels grups es van analitzar mitjançant el test *t* de Student quan es complia la normalitat o un test no paramètric *U* de Mann-Whitney en cas que no es complís la normalitat.

Les dades categòriques dels pacients (dades no numèriques) es van analitzar mitjançant el *exact test* de Fisher.

Es va considerar estadísticament significatiu quan el valor  $p$  obtingut era menor a 0.05. Quan el valor  $p$  es trobava entre 0.05 i 0.10 es va considerar que hi havia una tendència a l'associació.

### 7.2.- Anàlisi de dades multivariants

Les dades obtingudes en la RT – PCR semiquantitativa es van analitzar mitjançant tests de comparacions múltiples, que permeten comparar a la vegada múltiples variants analitzades i agrupar les molècules en conjunts.

#### 7.2.1.- Anàlisi de components principals

L'anàlisi de components principals (PCA) és un mètode simple, no paramètric, utilitzat per reduir la dimensionalitat de les dades, amb la finalitat de poder-les representar gràficament en dues o tres dimensions (372,373). D'aquesta manera, permet agrupar les variables en factors, o components, compostos per l'agrupació de varies variables. Així doncs, la tècnica permet determinar el nombre de factors explicatius d'un conjunt de dades que determinen en major grau la variabilitat d'aquestes dades. És a dir, agafant totes les dades de tots els pacients, permet agrupar les variables responsables d'una malaltia en diferents grups relacionats (on les variables estan molt relacionades) en funció de com incideixen en la variabilitat total.

Per a obtenir el PCA, cal aplicar una transformació lineal de les dades en un nou sistema de coordenades en el qual la variància de major mida és capturada en el primer eix, anomenat primera component principal. La segona variància més gran cau en el segon eix, i així successivament. Per a poder fer aquesta transformació cal construir primer una matriu de covariància o matriu de coeficients de correlació a partir de la qual s'obté una segona matriu denominada matriu factorial. Aquesta matriu està formada per un factor que es correspon amb cadascuna de les variables analitzades. Aquest factor, anomenat càrrega o pes factorial (*factor loading*), és el coeficient de regressió estandarditzat de cadascuna de les regressions múltiples aplicada a cada variable. Aquests factors són els que expliquen quin percentatge de la variabilitat total aporta cada variable, i determinen en quin punt del gràfic de components principals se situa la variable en concret.



Es va realitzar un anàlisi per les dades en múscul i pacients amb HI, un anàlisi en múscul i pacients sense HI, un anàlisi en aponeurosi i pacients amb HI i un anàlisi en aponeurosi per pacients sense HI.

### **7.2.2.- Anàlisi de regressions múltiples**

Aquest anàlisi permet veure les relacions entre una variable i la resta de les variables, és a dir, com influeixen el conjunt de variables en una variable. Es va utilitzar el mètode de regressió per eliminació progressiva (*Backward Stepwise Regression*), que fixa una variable respecte a tota la resta de variables i construeix un model predictiu. En cada pas, s'elimina la variable menys influent, segons el criteri d'exclusió o inclusió aplicat. Es va utilitzar el contrast individual de la *F*-ratio amb una probabilitat menor a 0.10, és a dir, quan una de les variables superava un valor *p* de 0.10 s'excloïa de l'anàlisi i es re-analitzava fins que totes les molècules tenien un valor *p* menor a 0.10.

Es van analitzar les dades de múscul i les dades d'aponeurosi per separat, però en els dos casos fixant la variable grup (pacients amb HI = 0; pacients sense HI = 1).



# RESULTATS



**CAPÍTOL I: DESREGULACIÓ DE LA SENYALITZACIÓ  
INFLAMATÒRIA I LA RELACIÓ MMPs/TIMPs EN ELS  
TEIXITS DE L'HÈRNIA INCISIONAL HUMANA**



Recentment, s'ha relacionat la HI amb processos patològics associats a defectes en la síntesi del col·lagen de la MEC de l'aponeurosi. Encara que alguns treballs apunten també cap a una alteració en algunes de les molècules que regulen aquesta remodelació, les MMPs, manca el lligam entre aquestes alteracions i els mecanismes que desencadenen la formació d'una HI.

En aquest capítol s'analitzen les biòpsies d'aponeurosi i de múscul esquelètic per observar quins mecanismes poden causar aquesta desestructuració tissular en els pacients amb HI. S'analitza la síntesi de col·làgens, de MMPs i dels seus inhibidors, TIMPs, així com els nivells de molècules inflamatòries com a possibles reguladors d'aquestes alteracions.

### **1.- Pacients.**

En aquest capítol es van comparar 10 pacients amb HI i 10 pacients sense HI, dels quals es va extreure mostra de teixit aponeuròtic i de múscul esquelètic. Les mostres de pacients sense HI es van obtenir de donants voluntaris provinents de cirurgia abdominal digestiva, de tumors de colon i recte (n = 8) o de colecistectomia (n = 2). Les mostres d'hèrnia van ser extretes totes de la línia mitja.

En la Taula R1 s'observen les característiques dels pacients seleccionats per aquest estudi i a partir dels quals es va obtenir les biòpsies. Tant l'edat com el sexe i les comorbiditats no són estadísticament diferents entre els pacients amb i sense HI i, per tant, es pot considerar que aquests factors no influeixen en els resultats de l'estudi.

Variable	Pacients amb HI	Pacients sense HI	Valor p
Edat ± SEM (rang)	61 ± 4 (42-72)	55 ± 3 (43-69)	0.19
Sexe masculí	7	7	1.00
Fumadors	3	2	1.00
Alcohòlics	0	2	0.47
Obesitat (índex de massa corporal ≥ 29)	2	5	0.35
Diabetis	0	0	1.00
Hiperlipidèmia	1	1	1.00

**Taula R1.** Característiques dels pacients inclosos en l'estudi.

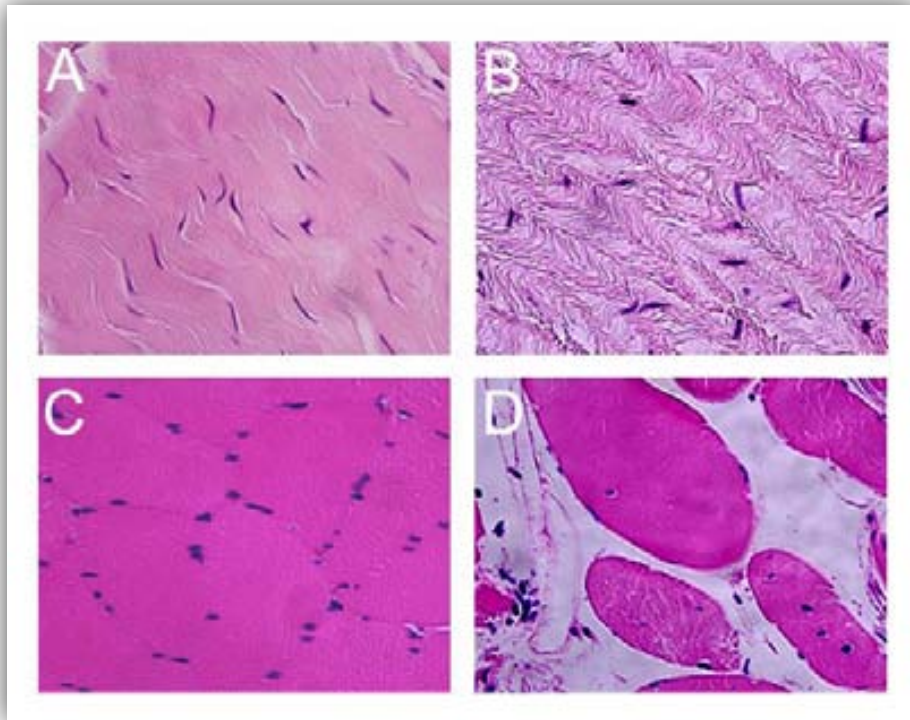
Tots els pacients amb HI la van desenvolupar com a conseqüència d'una operació prèvia i, per tant, cap va ser espontània. A més, les mostres es van recollir quan els pacients van ser tractats en la seva primera HI i, per tant, no hi havia presència de malla quirúrgica.

## 2.- Desestructuració i pèrdua de la matriu extracel·lular.

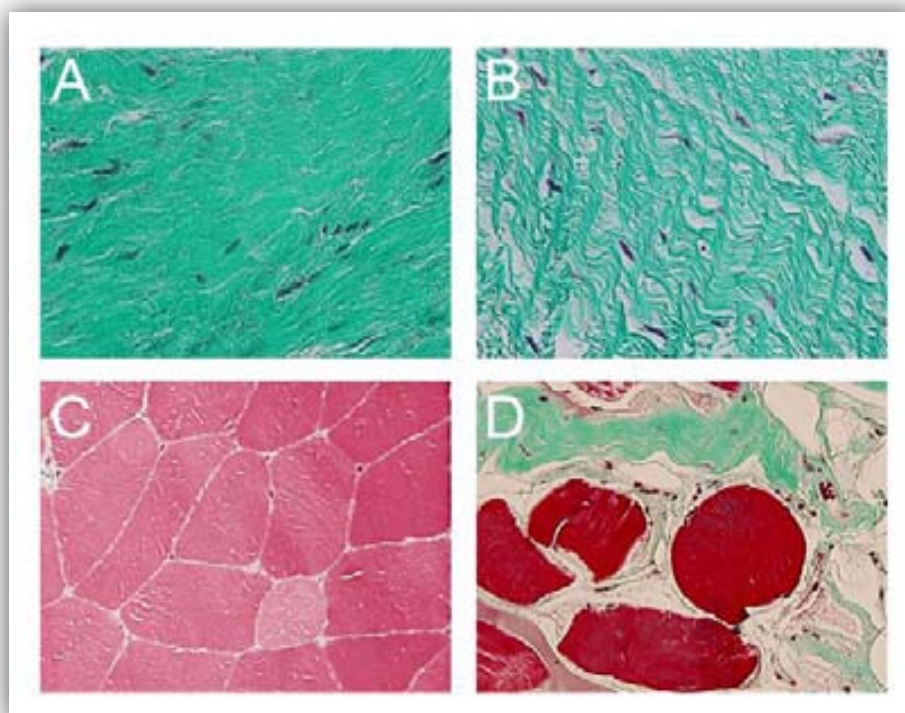
Les imatges histològiques mostren una desestructuració de l'aponeurosi i del múscul esquelètic dels pacients amb HI en comparació amb els pacients sense HI.

Les imatges de hematoxilina/eosina (Figura R1) i de tricròmic de Masson (Figura R2) mostren una desestructuració i pèrdua de la MEC de l'aponeurosi dels pacients amb HI, amb la presència d'uns fibroblasts generalment més arrodonits i amb una pèrdua del contacte cèl·lula-matriu. En el múscul esquelètic, s'observa també una desestructuració de les fibres de teixit muscular, amb un major percentatge de cèl·lules localitzades al centre de les fibres, i amb una major acumulació de teixit connectiu (verd en el tricròmic de Masson, Figura R2D) en l'endomisi.



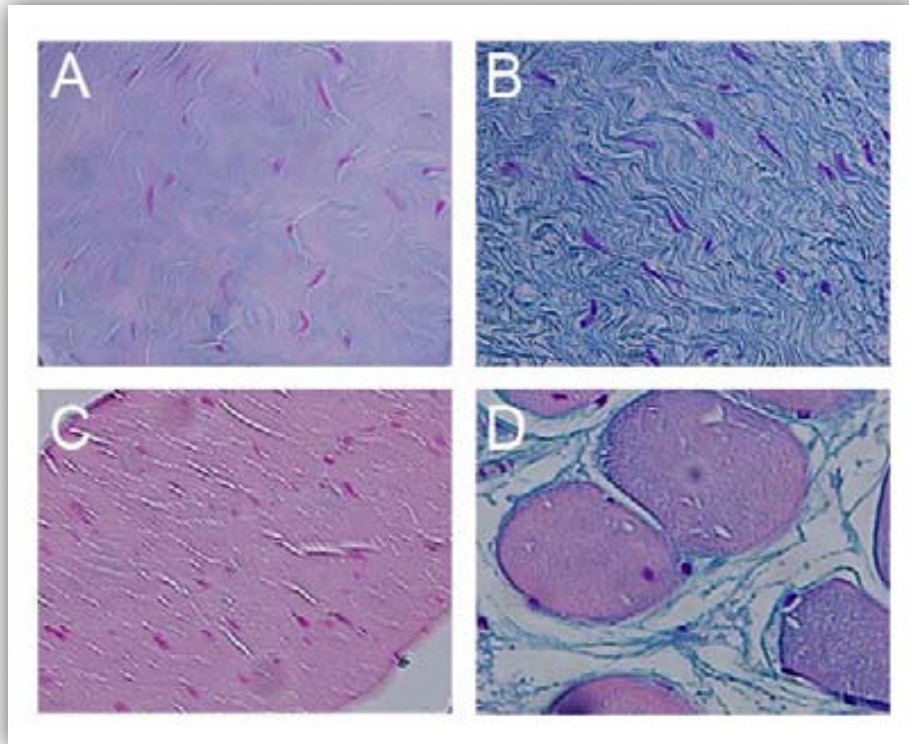


**Figura R1.** Imatges representatives de les seccions tenyides amb hematoxilina/eosina. Les aponeurosis dels pacients amb HI (B) es caracteritzen per tenir una pèrdua de l'organització de la MEC, de la integritat tissular i un major nombre de fibroblasts arrodonits en comparació amb les aponeurosis dels pacients sense HI (A). Els músculs esquelètics dels pacients amb HI (D) presenten una major deposició de teixit connectiu en l'endomisi i un major nombre de nuclis centralitzats en les fibres en comparació amb els músculs esquelètics de pacients sense HI (C).



**Figura R2.** Imatges representatives de les seccions tenyides amb tricròmic de Masson. Les aponeurosis dels pacients amb HI (B) es caracteritzen per tenir una pèrdua de l'organització de la MEC, de la integritat tissular i un major nombre de fibroblasts arrodonits en comparació amb les aponeurosis dels pacients sense HI (A). Els músculs esquelètics dels pacients amb HI (D) presenten una major deposició de teixit connectiu en l'endomisi i un major nombre de nuclis centralitzats en les fibres en comparació amb els músculs esquelètics de pacients sense HI (C).

Les imatges tenyides amb blau d'Alcian (Figura R3) mostren una major acumulació de glicosaminoglicans (GAGs) en l'aponeurosi i el múscul esquelètic dels pacients amb HI.



**Figura R3.** Imatges representatives de les seccions tenyides amb blau d'Alcian. S'observa una major quantitat de glicosaminoglicans (en blau) en les aponeurosis (B) i els músculs esquelètics (D) dels pacients amb HI en comparació amb les aponeurosis (A) i els músculs esquelètics (C) dels pacients sense HI.

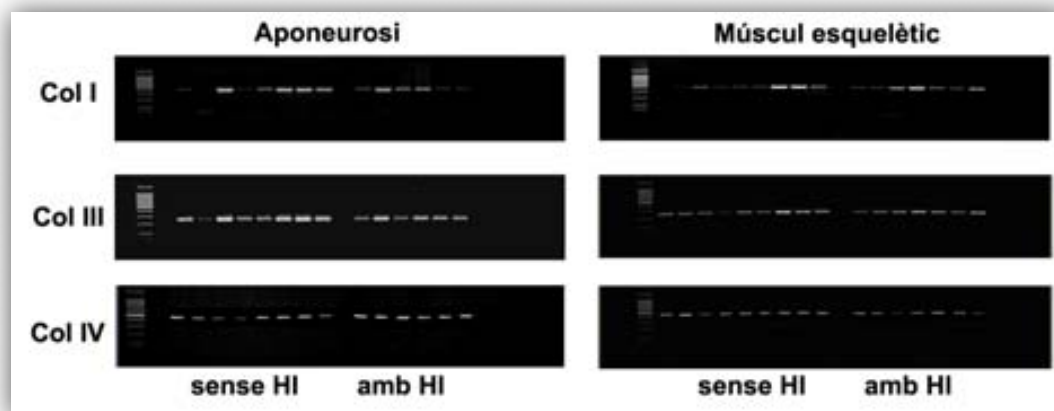
Finalment, no es van observar signes evidents d'infecció ni de infiltrats inflamatoris o teixit granulós en cap de les observacions.

### **3.- Metabolisme de la matriu extracel·lular.**

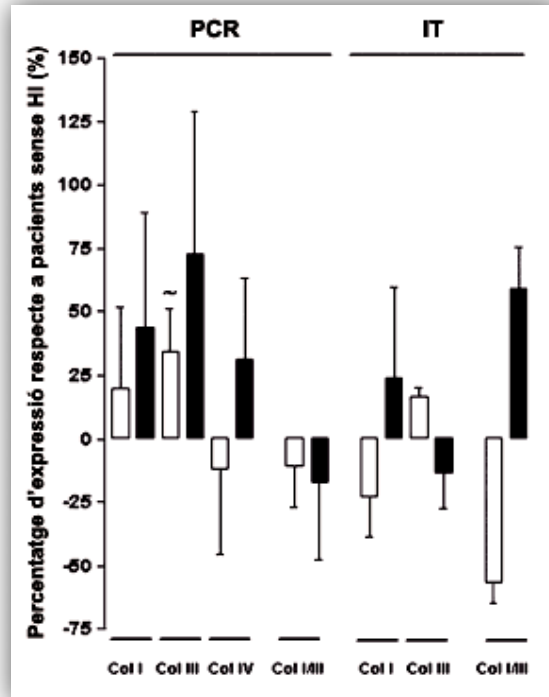
#### **3.1.- Nivells de col·lagen.**

Es van analitzar els col·làgens intersticials (Col·làgens  $\alpha$ -1 tipus I, tipus III i tipus IV) més abundants en el teixit connectiu de la zona de l'abdomen. El col·lagen és la molècula més abundant de la MEC dels teixits connectius, conferint-los-hi resistència a les tensions que han de suportar. Alteracions en la síntesi de col·lagen poden comportar greus alteracions tissulars.

En general es va observar un cert grau de sobre expressió dels col·làgens intersticials al nivell del mRNA dels pacients amb HI però, a nivell estadístic, només hi ha una tendència a veure's incrementat el col·lagen tipus III  $\alpha$ -1 de múscul esquelètic (COL III; 34.34% més;  $p = 0.093$ ; Figura R4 i Figura R5). A més, es va observar una ràtio col·lagen tipus I/tipus III disminuïda, en favor d'una major expressió de col·lagen tipus III sense arribar a ser estadísticament significativa en ambdós teixits.

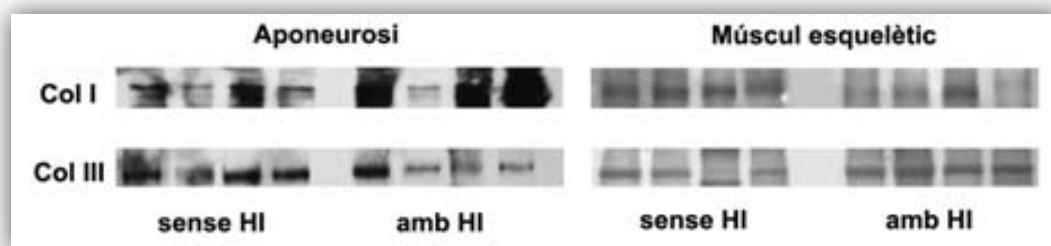


**Figura R4.** Imatges representatives dels gels d'agarosa dels productes de les PCRs semiquantitatives de col·làgens.



**Figura R5.** Anàlisi gràfica de les PCR semiquantitatives i les immunotransferències (IT) dels col·làgens. Els resultats es presenten, per a cada molècula, com a percentatge de canvi entre pacients amb HI i pacients sense HI. ~ indica un valor  $p$  entre 0.05 i 0.10. En barres negres es mostren els resultats per aponeurosi i en barres blanques es mostren els resultats per múscul esquelètic.

Respecte al nivell proteic, es va observar que els nivells de col·làgens no concordaven amb els d'expressió gènica (Figura R5 i Figura R6). Concretament, es va veure que els nivells proteics de col·lagen  $\alpha$ -1 tipus I en múscul esquelètic i de col·lagen  $\alpha$ -1 tipus III en aponeurosi eren menors en els pacients amb HI (22.75% i 11.62% menys, respectivament). A més, com a conseqüència, es va observar una ràtio col·lagen  $\alpha$ -1 tipus I/tipus III augmentada en l'aponeurosi dels pacients amb HI (67.65% més). Tot i això, les diferències no eren estadísticament significatives.

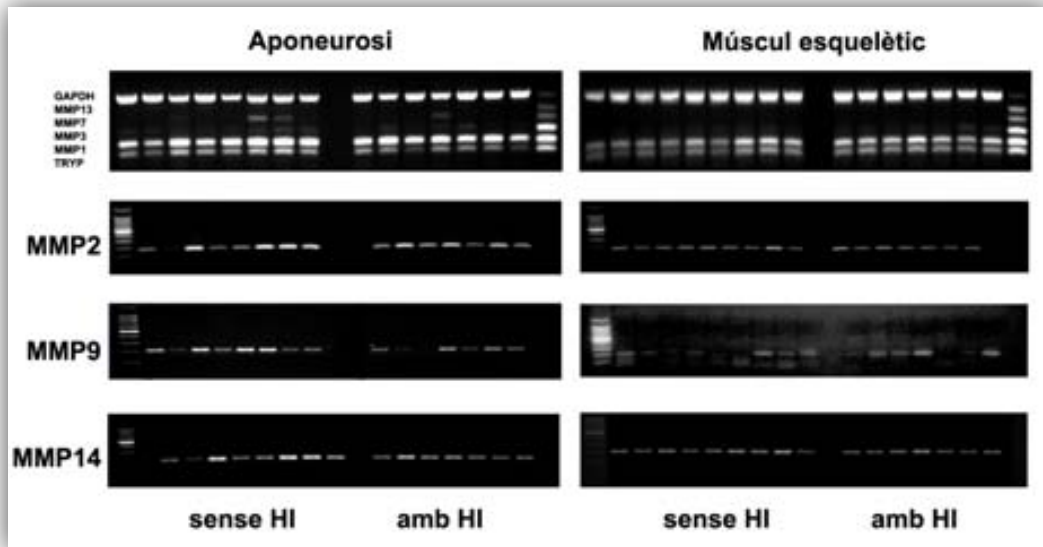


**Figura R6.** Imatges representatives de les immunotransferències dels col·làgens.

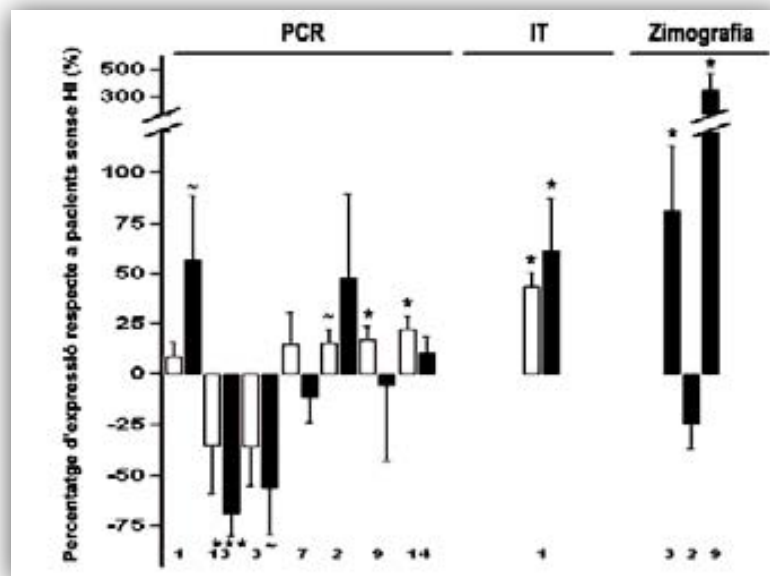
### 3.2.- Augment dels nivells de les metal·loproteases de matriu.

Entre les 24 MMPs descrites, es van analitzar aquelles que podien tenir una implicació més directa en la degradació/remodelació del teixit connectiu abdominal. Concretament, es van analitzar la MMP1 (col·lagenasa 1), MMP2 (gelatinasa A), MMP3 (proteoglicanasa), MMP7 (matrilisina), MMP9 (gelatinasa B), MMP13 (col·lagenasa 3) i MMP14 (col·lagenasa de membrana) (Taula I3). Les MMPs regulen la homeòstasi del microambient extracel·lular mitjançant la remodelació de les molècules de la MEC. L'alteració en els nivells i/o en l'activitat de les MMPs s'ha relacionat amb diversos desordres patològics, incloent-hi l'artrosi reumàtica, malalties cardiovasculars o el càncer.

Es van observar canvis tant a nivell transcripcional com post-transcripcional en els nivells d'expressió de les diferents MMPs analitzades. Concretament, els pacients amb HI presentaven un increment en els transcrits d'mRNA de MMP1 (57.07% més;  $p = 0.055$ ) en aponeurosi i de MMP2 (15.45% més;  $p = 0.074$ ), de MMP9 (16.99% més;  $p = 0.045$ ) i de MMP14 (22.10% més;  $p = 0.016$ ) en múscul esquelètic. A més, es va observar una disminució en l'expressió dels transcrits de MMP13 (68.86% menys;  $p < 0.001$ ) i de MMP3 (56.53% menys;  $p = 0.060$ ) en l'aponeurosi de pacients amb HI (Figura R7 i Figura R8).

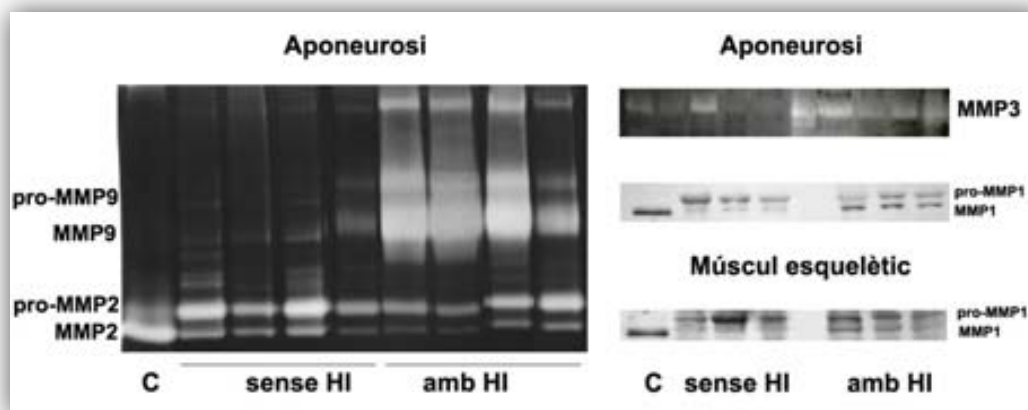


**Figura R7.** Imatges representatives dels gels d'agarosa dels productes de les PCRs semiquantitatives de les MMPs. En la primera fila es poden observar les imatges representatives dels gels d'agarosa dels productes de la PCR semiquantitativa múltiple.



**Figura R8.** Anàlisi gràfica de les PCR semiquantitatives, les immunotransferències (IT) i les zimografies de les MMPs. Els resultats es presenten, per a cada molècula, com a percentatge de canvi entre pacients amb HI i pacients sense HI. ~ indica un valor  $p$  entre 0.05 i 0.10, \* indica un valor  $p$  entre 0.05 i 0.01 i \*\*\* indica un valor  $p$  menor a 0.001. En barres negres es mostren els resultats per aponeurosi i en barres blanques es mostren els resultats per múscul esquelètic.

Els gens que presentaven diferències significatives van ser analitzats per immunotransferència o zimografia al nivell proteic per valorar-ne la quantitat o l'activitat enzimàtica. Concretament, es va analitzar la MMP1 per immunotransferència i la MMP2, MMP3 i MMP9 per zimografia. En quan a la MMP1 destaca la major presència de banda activa de 43 kDa (43.37% més,  $p = 0.014$  en múscul esquelètic; i 61.52% més,  $p = 0.031$  en aponeurosi) en pacients amb HI (Figura R8 i Figura R9).



**Figura R9.** Imatges representatives de les zimografies de gelatina (MMP2 i MMP9) i caseïna (MMP3) i de les immunotransferències (MMP1) per detectar les MMPs C en un medi lliure de FBS i concentrat de fibroblasts de pell (Sigma-Aldrich).

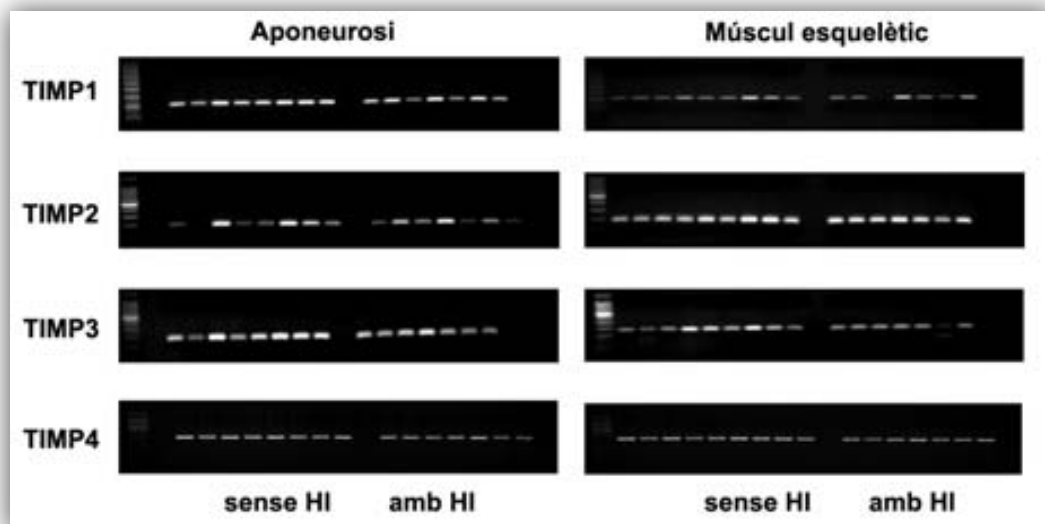
Per zimografia de gelatina es va observar una forta inducció de l'activitat de MMP9 (92 kDa i 86 kDa; 444.04% més;  $p = 0.026$ ) i per zimografia de caseïna una inducció de MMP3 (81.16% més;  $p = 0.040$ ) en l'aponeurosi dels pacients amb HI (Figura R8 i Figura R9). En aquestes condicions no es van poder detectar les activitats de les MMPs en el múscul esquelètic, probablement degut al fet que la proteïna de MEC, en múscul esquelètic, és una proporció molt petita de la proteïna total. Per tant, els nivells de MMPs al múscul esquelètic són molt baixos.



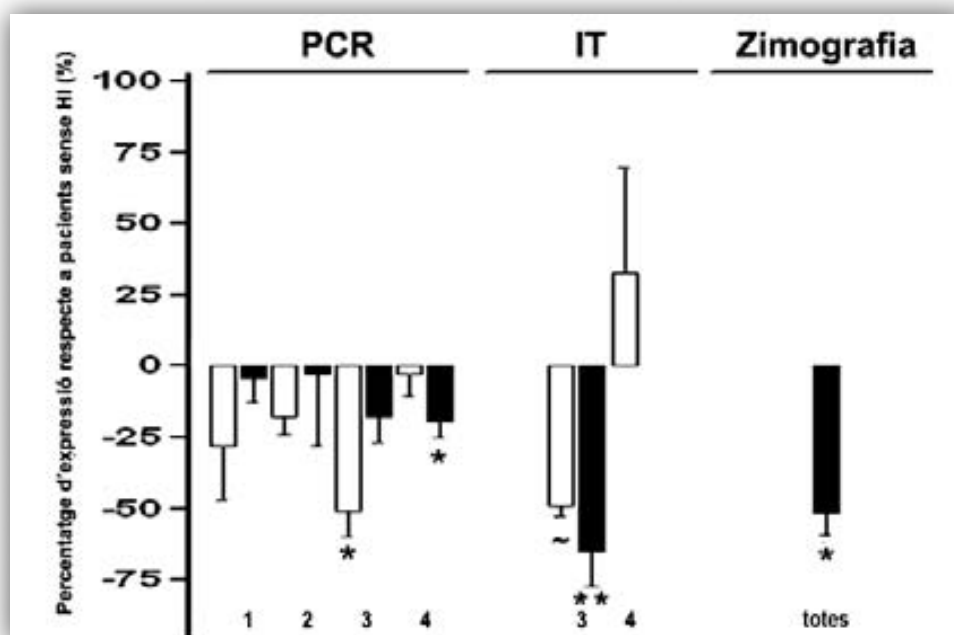
### 3.3.- Disminució en els nivells dels inhibidors tissulars de les metal·loproteases de matriu.

També es van analitzar els canvis en els TIMPs, analitzant els 4 TIMPs descrits (TIMP1, TIMP2, TIMP3 i TIMP4) tant a nivell transcripcional com post-transcripcional, observant en tots una disminució dels seus nivells. Els TIMPs són molècules secretades per les cèl·lules per regular l'activitat de les MMPs. Una alteració en la síntesi i/o activitat podria desembocar en una destrucció de la MEC.

Al nivell gènic, tots els TIMPs analitzats presentaven menors nivells d'expressió en ambdós teixits de pacients amb HI. Destaca, sobretot, els menors nivells de TIMP3 (50.71% menys;  $p = 0.012$ ) en el múscul esquelètic i TIMP4 (19.40% menys;  $p = 0.036$ ) en l'aponeurosi dels pacients amb HI en relació amb els pacients sense HI (Figura R10 i Figura R11).

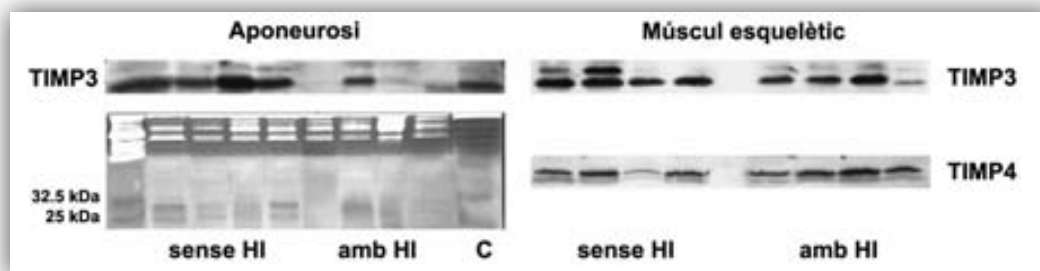


**Figura R10.** Imatges representatives dels gels d'agarosa dels productes de les PCRs semiquantitatives dels TIMPs.



**Figura R11.** Anàlisi gràfica de les PCR semiquantitatives, les immunotransferències (IT) i la zimografia reversa dels TIMPs. Els resultats es presenten, per a cada molècula, com a percentatge de canvi entre pacients amb HI i pacients sense HI. ~ indica un valor  $p$  entre 0.05 i 0.10, \* indica un valor  $p$  entre 0.05 i 0.01 i \*\* indica un valor  $p$  entre 0.01 i 0.001. En barres negres es mostren els resultats per aponeurosi i en barres blanques es mostren els resultats per múscul esquelètic.

Aquests gens diferencialment expressats es van analitzar també per immunotransferència, observant que els nivells proteics de TIMP3 eren també inferiors en els dos teixits analitzats dels pacients amb HI (aponeurosi: 64.82% menys,  $p = 0.008$ ; múscul esquelètic: 49.20% menys,  $p = 0.080$ ). En canvi, es va observar major quantitat de TIMP4 en múscul esquelètic (32.92% més), tot i no ser significatiu (Figura R11 i Figura R12).



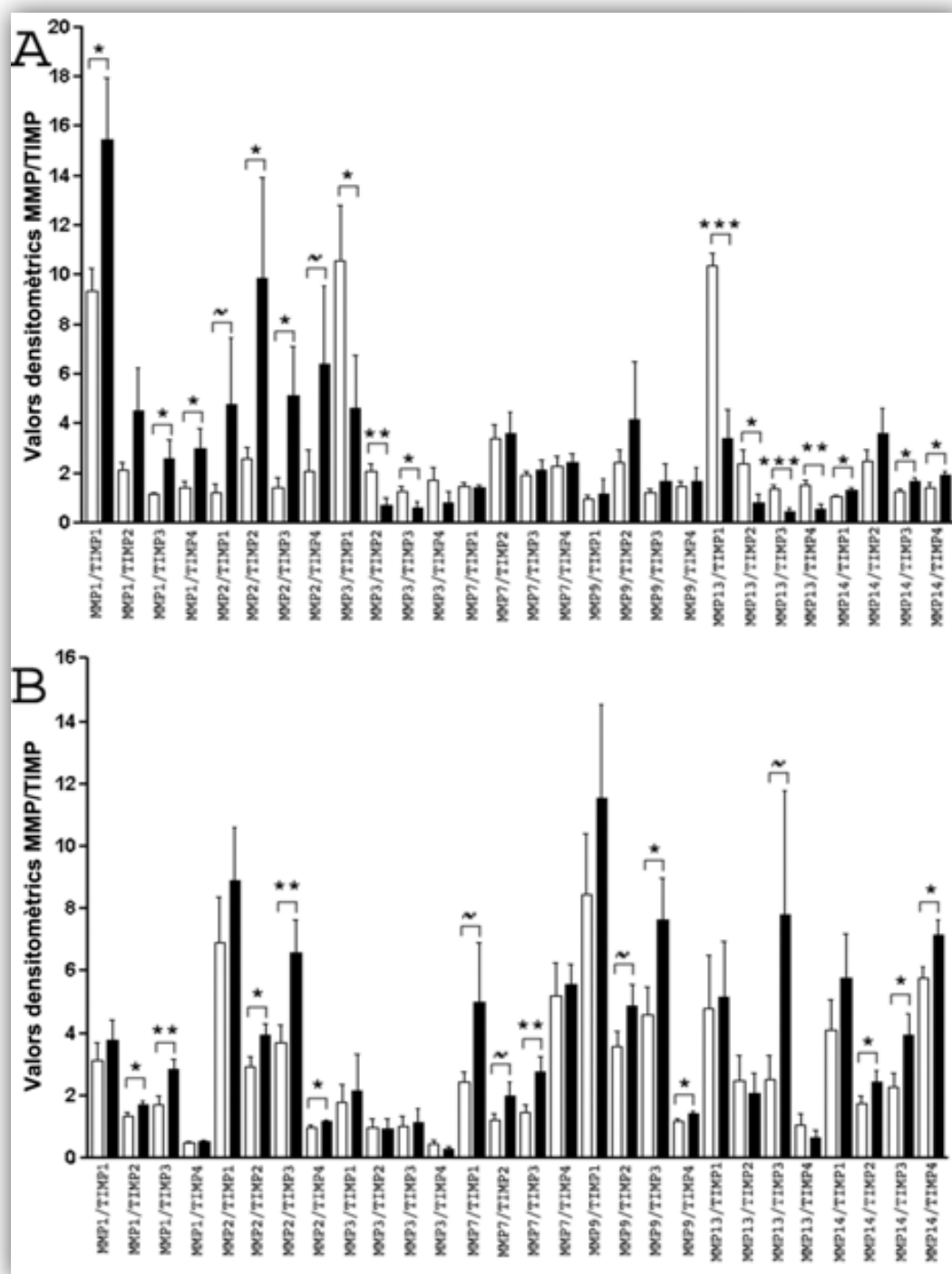
**Figura R12.** Imatges representatives de les immunotransferències (TIMP3 i TIMP4) i la zimografia reversa (tots els TIMPs; en aponeurosi, a baix a l'esquerra) per detectar els TIMPs.

Mitjançant la zimografia reversa, es va observar una disminució de gairebé el 50% en l'activitat total dels TIMPs (51.37% menys;  $p = 0.015$ ) en l'aponeurosi dels pacients amb HI en comparació amb els pacients sense HI (Figura R11 i Figura R12). En aquestes condicions, i probablement per la mateixa raó que les MMPs, no es van poder detectar les activitats dels TIMPs en el múscul esquelètic.

### 3.4.- Desregulació en la relació MMPs/TIMPs.

Al nivell transcripcional, es van comparar les relacions entre totes les ràtios de les MMPs i els TIMPs analitzats per a cada teixit entre els pacients amb HI i els pacients sense HI (Figura R13). Aquesta comparació es va realitzar en dividir els valors de densitometria de cadascuna de les MMPs respecte a cadascun dels TIMPs. Aquesta ràtio és important per identificar si hi ha alguna alteració en les MMPs o en els TIMPs, i una ràtio alterada és característica de patologies relacionades amb alteracions en el metabolisme de la MEC.

Es va observar, en general, una ràtio MMPs/TIMPs augmentada en els pacients amb HI, cosa que repercuteix en la major activitat MMP i menor activitat TIMP abans esmentada.

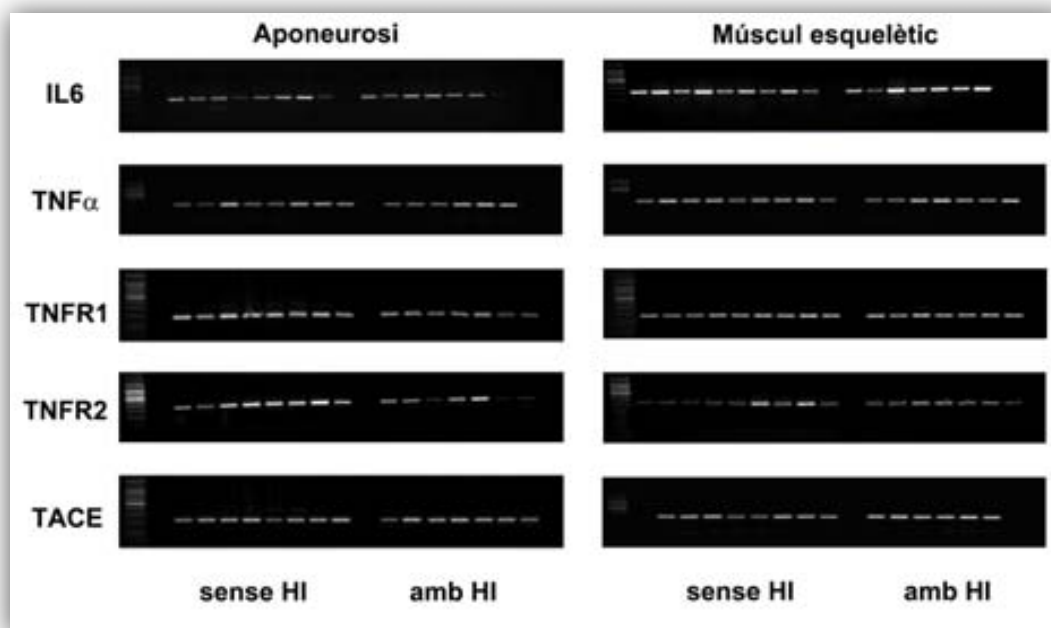


**Figura R13.** Relacions entre MMPs/TIMPs en els transcrits de aponeurosi (A) i múscul esquelètic (B). ~ indica un valor  $p$  entre 0.05 i 0.10, \* indica un valor  $p$  entre 0.05 i 0.01, \*\* indica un valor  $p$  entre 0.01 i 0.001 i \*\*\* indica un valor  $p$  menor a 0.001 (valors de pacients amb HI respecte a valors de pacients sense HI). En barres negres es mostren els resultats per pacients amb HI i en barres blanques es mostren els resultats per pacients sense HI.

#### 4.- Senyalització pro-inflamatòria.

Els nivells de MMPs i TIMPs es regulen mitjançant un conjunt de molècules, entre les que es troben certs factors de creixement, hormones i molècules inflammatòries (Taula I4). En aquest estudi es van seleccionar algunes molècules relacionades amb la inflamació perquè s'ha observat que és un factor de risc important en el desenvolupament d'una HI, ja sigui de manera directa (infeccions post-operatòries, reaccions a la ferida) o indirecta (diabetis, tabaquisme). Concretament, es va analitzar el TNF- $\alpha$ , l'enzim convertidor de TNF- $\alpha$  (TACE/ADAM17), els dos receptors del TNF- $\alpha$  (TNFRSF1A i TNFRSF1B) i la IL6.

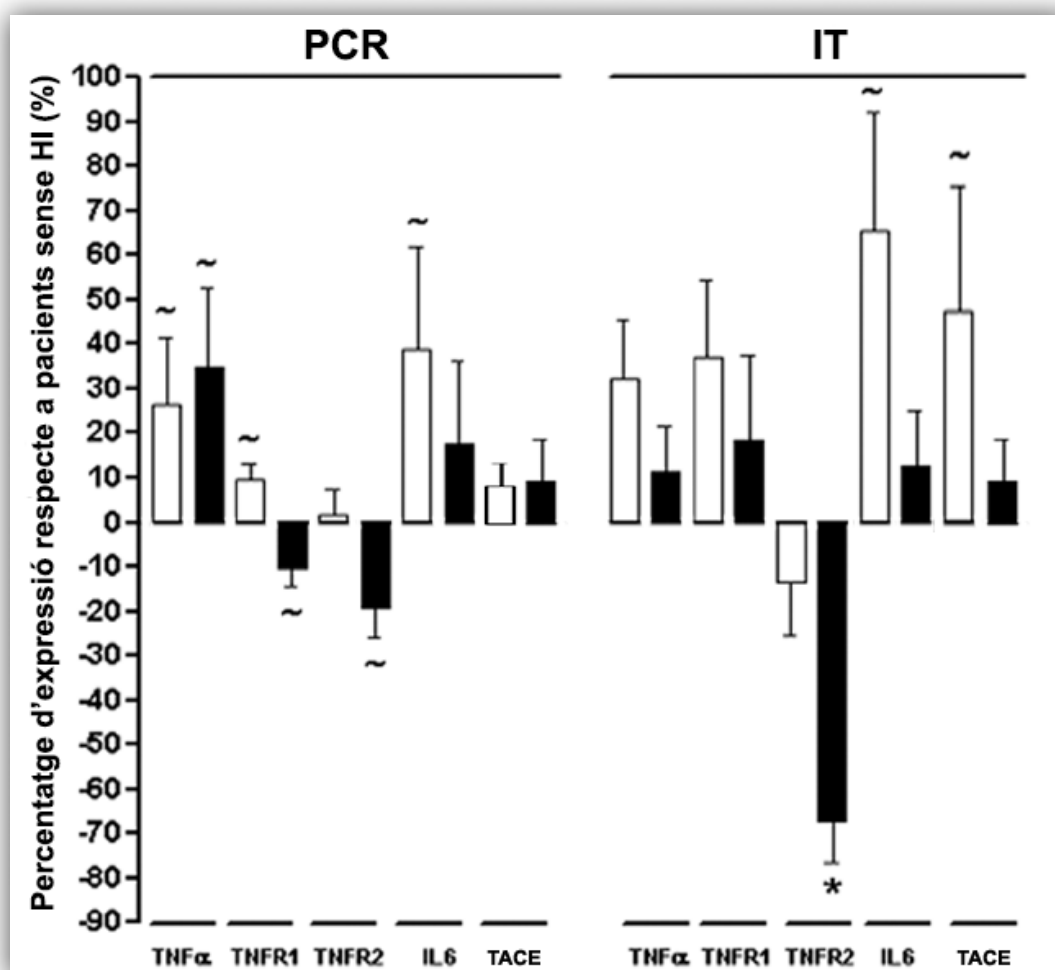
Al nivell transcripcional, es va observar una tendència a expressar majors nivells de TNF- $\alpha$  i de IL6 en els pacients amb HI (TNF- $\alpha$  en aponeurosi: 34.70% més,  $p = 0.064$ ; TNF- $\alpha$  en múscul esquelètic: 26.22% més,  $p = 0.077$ ; IL6 en múscul esquelètic: 38.68% més,  $p = 0.097$ ; Figura R14 i Figura R15).



**Figura R14.** Imatges representatives dels gels d'agarosa dels productes de les PCRs semiquantitatives de les molècules pro-inflamatòries analitzades.

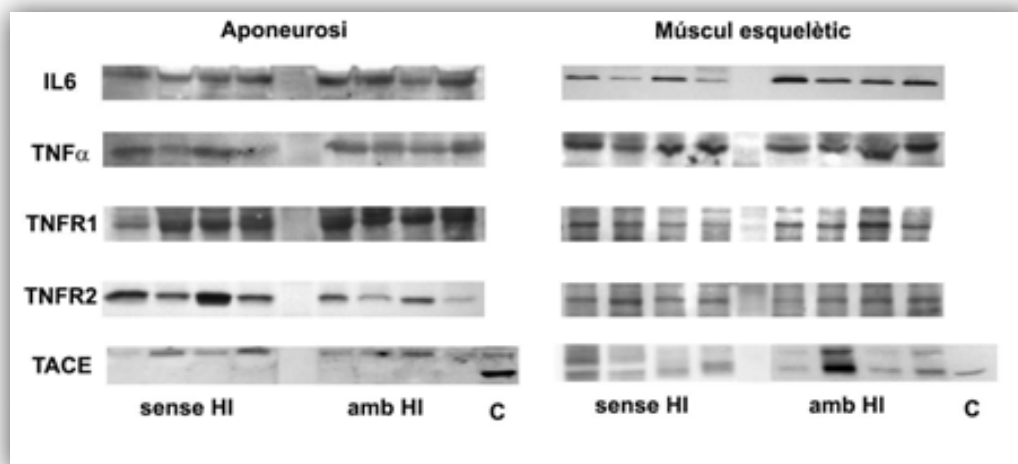
L'expressió del mRNA dels dos receptors del TNF- $\alpha$  es va observar que tendia a disminuir en l'aponeurosi dels pacients amb HI (TNFRSF1A: 10.58% menys,  $p = 0.071$ ; TNFRSF1B: 19.39% menys,  $p = 0.063$ ), mentre que l'expressió del receptor TNFRSF1A tendia a augmentar en el múscul esquelètic dels pacients amb HI (9.58%

més,  $p = 0.089$ ). No es va observar diferències estadístiques en l'expressió del TACE en cap dels dos teixits.



**Figura R15.** Anàlisi gràfica de les PCR semiquantitatives i les immunotransferències (IT) del les molècules pro-inflamatòries. Els resultats es presenten, per a cada molècula, com a percentatge de canvi entre pacients amb HI i pacients sense HI. ~ indica un valor  $p$  entre 0.05 i 0.10 i \* indica un valor  $p$  entre 0.05 i 0.01. En barres negres es mostren els resultats per aponeurosi i en barres blanques es mostren els resultats per múscul esquelètic.

Es van analitzar totes les molècules pro-inflamatòries també al nivell proteic. Es va observar que IL6 ( $p = 0.056$ ) i TNF- $\alpha$  ( $p = 0.099$ ) tendien a trobar-se en majors quantitats en el múscul esquelètic dels pacients amb HI (65.36% i 32.07% més, respectivament; Figura R15 i Figura R16).



**Figura R16.** Imatges representatives de les immunotransferències de les molècules pro-inflamatòries. C = extracte cel·lular de cèl·lules HeLa.

Es va observar una sorprenent davallada en els nivells de TNFRSF1B soluble (TNFR2, Figura R16) en l'aponeurosi de pacients amb HI (66.63% menys;  $p = 0.022$ ). En canvi, els nivells de TNFRSF1A eren majors en els dos teixits de pacients amb HI (18.27% més en aponeurosi i 36.94% en múscul esquelètic), però sense diferències estadístiques. També va ser d'especial interès que en el múscul esquelètic només es va detectar la fracció soluble del TNF- $\alpha$  (sTNF- $\alpha$ , 17 kDa), mentre que en l'aponeurosi només es van detectar baixos nivells de TNF- $\alpha$  de membrana (mTNF- $\alpha$ , 26 kDa). A més, es va observar una tendència a presentar majors nivells de TACE actiu (80 kDa) en el múscul esquelètic dels pacients amb HI (un 50% més;  $p = 0.075$ ).

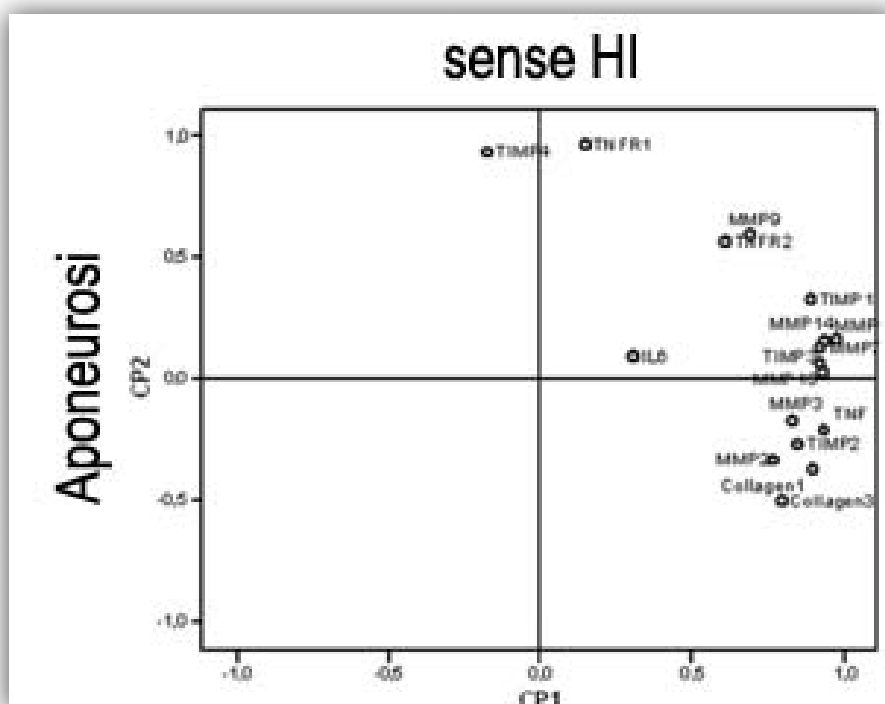
Finalment, també és important destacar que la proteïna IL6 es trobava fortament unida a la MEC i es va necessitar un procés d'extracció molt més potent (utilitzant un tampó RIPA amb 2% d' SDS, 20 vegades més detergent de l'habitual) per aconseguir obtenir-ne nivells avaluable per immunotransferència.

### 5.- Conjunt de molècules que controlen el procés.

Degut a la dificultat de comparar a la vegada els patrons d'expressió de les 17 molècules analitzades al nivell transcripcional, es van analitzar mitjançant una eina estadística anomenada anàlisi de components principals (PCA). Aquesta eina permet reduir un nombre de variables elevat en un nombre de variables més fàcil de

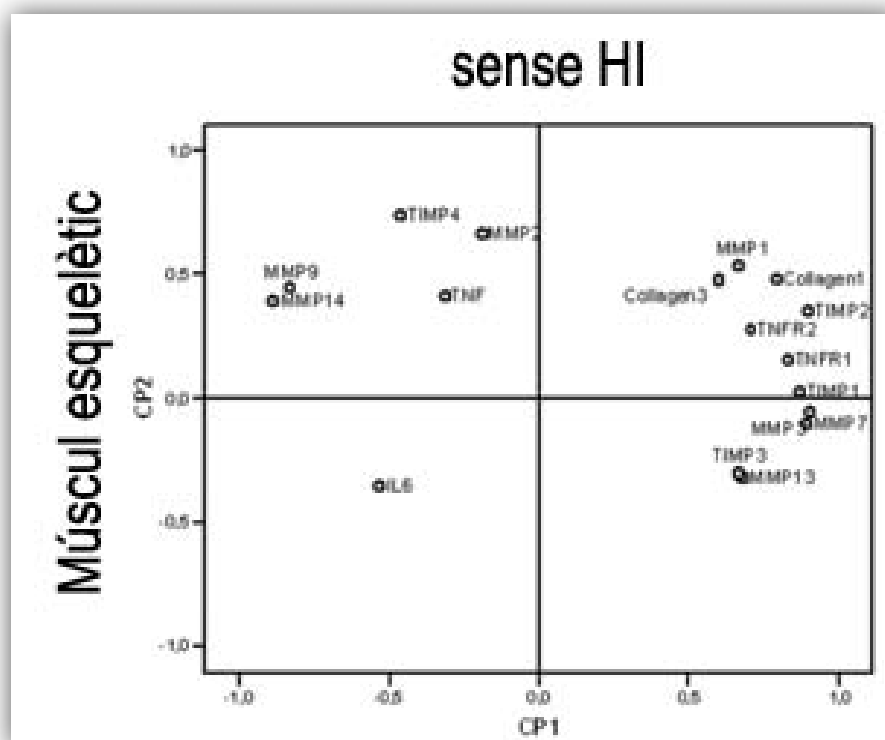
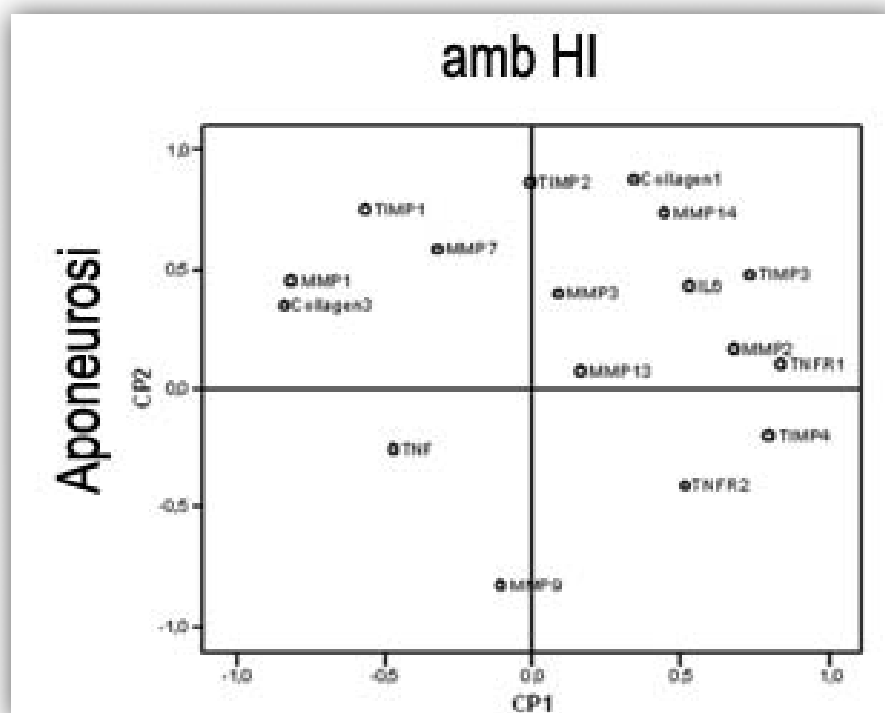
comprendre, de manera que es poden identificar quina o quines de les variables tenen més incidència en la variabilitat global.

Es va reduir tota la dimensionalitat de les dades a dues dimensions, que defineixen els dos eixos d'un gràfic, la component principal 1 (CP1) i la component principal 2 (CP2). Després de tots els tractaments estadístics, s'obté un *factor de càrrega* per a cada molècula que es correspon a cadascuna de les CP, i que fa que es puguin representar gràficament les molècules i tenir una visió més intuïtiva dels resultats (Figura R17 i Taula R2).

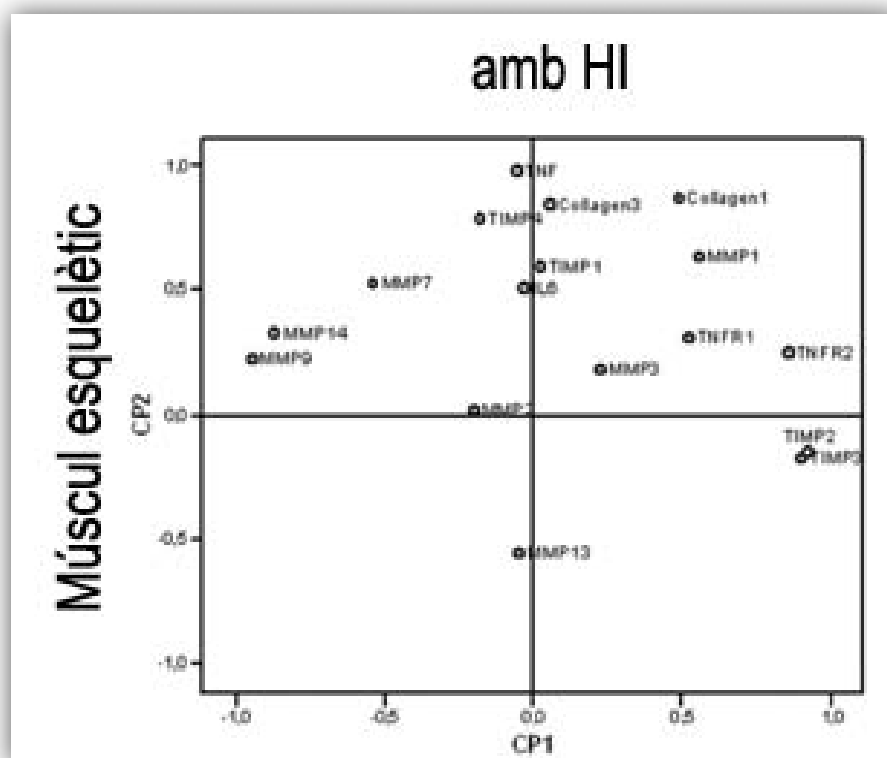


**Figura R17.** Gràfica de la posició de cada molècula en cadascun dels components principals (CP) per a cada teixit en els pacients amb i sense HI.





**Figura R17 (segueix).** Gràfica de la posició de cada molècula en cadascun dels components principals (CP) per a cada teixit en els pacients amb i sense HI.



**Figura R17 (segueix).** Gràfica de la posició de cada molècula en cadascun dels components principals (CP) per a cada teixit en els pacients amb i sense HI.

Així, es va observar com en els pacients sense HI pràcticament totes les molècules explicaven la variabilitat de les dades, i es trobaven amb un *factor de càrrega* alt per a la primera component. En canvi, en els pacients amb HI les molècules es repartien entre la primera i la segona component. A més, cal destacar que existeixen una associació entre els diferents col·làgens intersticials, les MMPs, els TIMPs i les molècules inflamatòries que difereix en funció del teixit afectat que es mira.

Pacients sense HI				Pacients amb HI			
Aponeurosi				Aponeurosi			
PC1	PC2			PC1	PC2		
MMP14	0,973	TNFRSF1A	0,966	COL3A1	-0,842	COL1A1	0,880
MMP1	0,934	TIMP4	0,933	TNFRSF1A	0,835	TIMP2	0,867
TNF	0,933			MMP1	-0,814	MMP9	-0,827
TIMP3	0,926			TIMP4	0,797	TIMP1	0,754
MMP7	0,920			TIMP3	0,730	MMP14	0,740
MMP13	0,920			MMP2	0,677		
COL1A1	0,898						
TIMP1	0,889						
TIMP2	0,848						
MMP3	0,829						
COL3A1	0,796						
MMP2	0,764						
MMP9	0,691						
TNFRSF1B	0,608						
Múscul esquelètic				Múscul esquelètic			
PC1	PC2			PC1	PC2		
MMP3	0,900	TIMP4	0,740	MMP9	-0,948	TNF	0,979
TIMP2	0,896	MMP2	0,666	TIMP2	0,921	COL1A1	0,871
MMP7	0,893			TIMP3	0,901	COL3A1	0,846
MMP14	-0,886			MMP14	-0,871	TIMP4	0,786
TIMP1	0,869			TNFRSF1B	0,855	MMP1	0,635
MMP9	-0,832						
TNFRSF1A	0,830						
COL1A1	0,790						
TNFRSF1B	0,706						
MMP13	0,678						
MMP1	0,666						
TIMP3	0,665						

**Taula R2.** Factors de càrrega ( $\geq 0.6$ ) de cadascuna de les molècules per a les dues components principals generades en ambdós teixits de pacients amb i sense HI.

Per veure les correlacions directes entre gens o grups de gens, es va utilitzar l'anàlisi de regressions múltiples en sentit invers *Backward Stepwise*. Mitjançant aquest mètode, es van obtenir una sèrie de models predictius que revelen correlacions interessants entre conjunts de gens de les MMPs i la família del TNF- $\alpha$  (Taula R3).

Aponeurosi				Múscul esquelètic			
Gens	Coefficient de Regressió	Significància	R <sup>2</sup> (%)	Gens	Coefficient de Regressió	Significància	R <sup>2</sup> (%)
<b>TNF-alfa</b>				<b>TNFR1</b>			
Intersecció	38,67	0,007		Intersecció	192,46	0,000	
MMP9	0,21	0,002	38	MMP9	-0,93	0,001	31
MMP1	0,19	0,018	17	MMP7	7,06	0,011	14
MMP3	2,27	0,026	15	MMP2	0,51	0,015	12
MMP13	-4,82	0,074	8	MMP3	-46,98	0,046	8
Grup	2,79 x G	0,810	0	Grup	-12,30 x G	0,089	5
R <sup>2</sup> ajustada = 0,78 ; p = 0,003				R <sup>2</sup> ajustada = 0,70 ; p = 0,003			
<b>TNFRSF1A</b>							
Intersecció	54,42	0,007					
MMP14	0,57	0,010	19				
MMP1	-0,12	0,080	7				
MMP3	-1,07	0,078	7				
Grup	15,94 x G	0,040	10				
R <sup>2</sup> ajustada = 0,43 ; p = 0,046							
<b>TNFRSF1B</b>							
Intersecció	34,07	0,000					
MMP13	3,44	0,028	26				
MMP9	0,12	0,031	24				
Grup	-8,13 x G	0,421	3				
R <sup>2</sup> ajustada = 0,53 ; p = 0,009							

**Taula R3.** Anàlisi de regressions múltiples en sentit invers amb una probabilitat F-ràtio de 0.10 com a criteri d'inclusió o exclusió. G = 0 quan es considera els pacients amb HI i G = 1 quan es considera els pacients sense HI.

Els coeficients de regressió obtinguts indiquen la força de correlació entre els gens, de manera que si es volgués obtenir el valor d'un gen en concret sortiria de multiplicar el valor del gen correlacionat pel valor del coeficient de regressió, tenint en compte que el valor del coeficient de regressió pel grup cal multiplicar-lo per 1 quan es tracta d'un pacient sense HI i per 0 quan es tracta d'un pacient amb HI. D'aquesta manera, el valor del TNF-α s'obtindria:

$$\text{TNF-}\alpha = 38.67 + 2.79 \times G + 0.21 \times \text{MMP9} + 0.19 \times \text{MMP1} + 2.27 \times \text{MMP3} - 4.82 \times \text{MMP13}$$

El resultat obtingut, seria vàlid per al 78% dels casos estudiats (R<sup>2</sup> ajustada).

**CAPÍTOL II: PERFILS D'EXPRESSION GÈNICA DELS  
FIBROBLASTS DE FÀSCIA I DE MÚSCUL ESQUELÈTIC EN  
L'HÈRNIA INCISIONAL HUMANA**



Els cultius primaris de cèl·lules són útils per a l'anàlisi i comprensió de molts desordres i malalties. Les cèl·lules, un cop extretes de l'organisme, són capaces de conservar el seu fenotip durant un llarg període de temps. L'anàlisi del fenotip, mitjançant els xips d'expressió gènica, posa al descobert una sèrie de gens implicats o alterats en una malaltia. L'ús d'eines bioinformàtiques per aprofundir en els resultats obtinguts permet obtenir un seguit de rutes alterades que poden millorar el coneixement de la malaltia i generar noves dianes des de on incidir terapèuticament.

En aquest capítol es van extreure els fibroblasts del múscul esquelètic i de l'aponeurosi de pacients amb i sense HI i es comparen mitjançant l'anàlisi de xips d'expressió gènica. Les rutes alterades s'analitzen, a partir de les dades obtingudes, mitjançant eines bioinformàtiques. Finalment, les dades obtingudes es corroboren analitzant diverses molècules mitjançant PCR en temps real i immunotransferències.

### **1.- Pacients.**

Per a aquest capítol es van utilitzar mostres d'aponeurosi i de múscul esquelètic de 5 pacients amb HI i 5 pacients sense HI, realitzant un total de 20 xips d'expressió gènica. Les mostres de pacients sense HI es van obtenir de donants voluntaris provinents de cirurgia abdominal digestiva, de tumors de colon i recte. Per motius de disponibilitat de mostra i realització dels xips en dos lots diferents, no tots els pacients utilitzats per als xips d'aponeurosi coincideixen amb els utilitzats per al múscul esquelètic. Com s'observa en la Taula R4, cap de les característiques dels pacients utilitzats en l'estudi presenta diferències estadístiques, ni comparant pacients amb i sense HI ni comparant els teixits.

Variable	Aponeurosi		valor p
	Sense HI (n = 5)	Amb HI (n = 5)	
Edat ± SEM (rang)	68 ± 5 (54-76)	63 ± 5 (55-77)	0,41
Sexe masculí	3	4	0,49
Fumadors	2	1	0,49
Alcohòlics	0	0	1,00
Obesitat (Índex de massa corporal >29)	1	2	0,49
Diabetis	1	0	0,29
Hiperlipidèmia	0	1	0,29

Variable	Múscul esquelètic		valor p
	Sense HI (n = 5)	Amb HI (n = 5)	
Edat ± SEM (rang)	65 ± 11 (50-76)	58 ± 18 (28-76)	0,46
Sexe masculí	3	4	0,49
Fumadors	1	2	0,49
Alcohòlics	1	1	1,00
Obesitat (Índex de massa corporal >29)	2	3	0,53
Diabetis	2	0	0,49
Hiperlipidèmia	2	1	0,11

Variable	Total		valor p
	Sense HI (n = 10)	Amb HI (n = 10)	
Edat ± SEM (rang)	67 ± 3 (50-76)	61 ± 5 (28-77)	0,26
Sexe masculí	6	8	0,49
Fumadors	3	3	1,00
Alcohòlics	1	1	1,00
Obesitat (Índex de massa corporal >29)	3	5	0,36
Diabetis	3	0	0,06
Hiperlipidèmia	2	2	1,00

**Taula R4.** Característiques dels pacients inclosos en l'estudi.

Tots els pacients amb HI la van desenvolupar com a conseqüència d'una operació prèvia i, per tant, cap va ser espontània. A més, les mostres es van recollir quan els pacients van ser tractats en la seva primera HI i, per tant, no hi havia presència de malla quirúrgica.

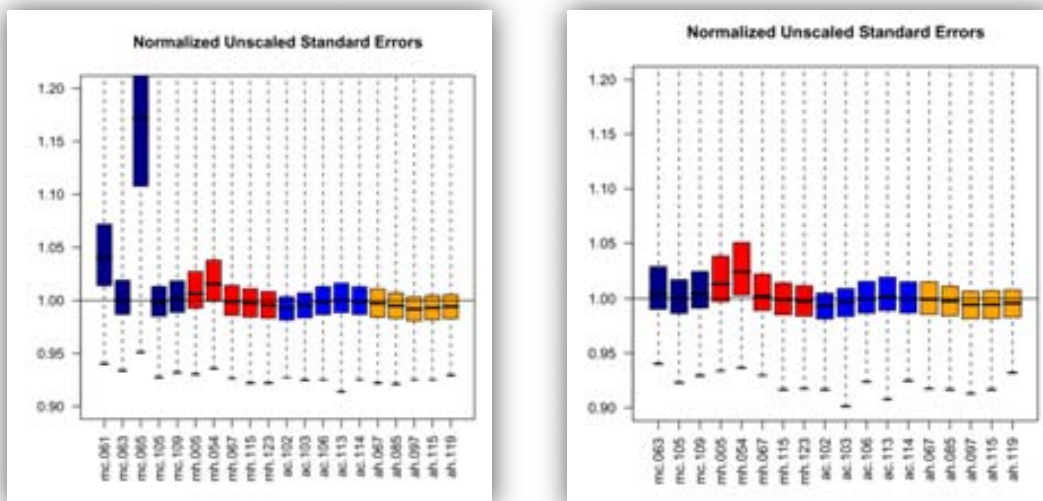


## 2.- Xips d'expressió gènica.

### 2.1.- Validació

En un estudi preliminar, es van realitzar els xips d'expressió gènica a partir de 3 mostres provinents de múscul esquelètic de pacients amb HI i de 3 mostres de múscul esquelètic de pacients sense HI. Com que en el primer capítol s'havia observat que hi havia diferències entre els teixits de pacients amb i sense HI, però aquestes eren subtils, es va voler fer un primer apropament per comprovar si aquestes diferències es mantienien en el cultiu primari. Davant del interès dels resultats obtinguts, es va decidir augmentar la mostra en 2 pacients amb HI i 2 pacients sense HI, i afegir-hi mostres d'aponeurosi de 5 pacients amb HI i 5 pacients sense HI. Així, en total es van obtenir els resultats de 20 xips. Degut a què es van realitzar primer 6 xips i després 14, en dos lots diferents, l'efecte lot es va considerar en el tractament estadístic.

Un cop eliminat l'efecte lot i realitzats els filtratges, es van analitzar els resultats. Es va concloure que dos dels xips (els dos de múscul esquelètic de pacients sense HI) no superaven el filtratge degut a tenir senyals d'intensitat febles i sorolls de fons elevats, en comparació amb la resta de xips. Per tant, els resultats finals es basen en l'anàlisi de 18 xips.



**Figura R18.** Gràfic dels errors estàndard dels xips abans i després d'eliminar els dos xips que no van superar el filtratge.

Es van obtenir un total de 3731 gens que van passar el filtratge, per als dos teixits (ja que es van agafar els 18 xips a la vegada). D'aquests gens es van seleccionar aquells que tenien un valor  $p < 0.05$  per a cadascun dels teixits. No es va utilitzar el valor  $p$  corregit perquè cap dels gens es va obtenir amb un valor  $p$  corregit  $< 0.05$ . El valor  $p$  corregit s'utilitza habitualment per a la correcció dels valors  $p$  obtinguts en tests estadístics múltiples, derivats de l'anàlisi d'un gran volum de dades, per tal de disminuir la taxa de falsos positius. Això significa que els resultats obtinguts probablement són més febles i poden aparèixer falsos positius, de manera que la comprovació de les dades esdevé més necessària. De tota manera, els resultats obtinguts van ser prou rellevants i relacionats amb la HI i es per això que es va comprovar un elevat nombre de gens per PCR en temps real per tal de corroborar les dades obtingudes.

### **2.2.- L'expressió gènica dels fibroblasts d'aponeurosi de pacients amb hèrnia incisional és diferent a la dels pacients control.**

De tots els gens que van passar el filtratge, es va obtenir un total de 234 gens diferencialment expressats en els fibroblasts procedents de l'aponeurosi dels pacients amb HI en comparació amb els fibroblasts procedents de l'aponeurosi dels pacients sense HI (amb un valor  $p < 0.05$ ). D'aquests gens, es van trobar:

- 176 gens sobre-expressats.
- 58 gens infra-expressats.

Número de sonda	Gen	log FC	p-valor
223316_at	CCDC3	-2,0082	0,0003
201079_at	SYNGR2	-1,3699	0,0004
229070_at	C6orf105	2,2301	0,0006
235004_at	RBM24	-1,0078	0,0009
1554930_a_at	FUT8	0,9580	0,0009
1555420_a_at	KLF7	0,8504	0,0013
210317_s_at	YWHAE	0,8245	0,0017
204035_at	SCG2	-1,7344	0,0022
224567_x_at	MALAT1	-0,7883	0,0023
1555830_s_at	ESYT2	0,8185	0,0029
222240_s_at	ISYNA1	-0,9915	0,0033
1007_s_at	DDR1	-0,8201	0,0034
226188_at	HSPC159	-0,8908	0,0035
204240_s_at	SMC2	1,3492	0,0040
202743_at	PIK3R3	-0,9583	0,0040
222843_at	FIGNL1	0,9153	0,0044
209629_s_at	NXT2	0,7428	0,0046
221011_s_at	LBH	-1,2050	0,0047
231907_at	ABL2	0,9544	0,0048
224856_at	FKBP5	1,2358	0,0048
200707_at	PRKCSH	0,5519	0,0049
238539_at	HPS3	0,5870	0,0050
227072_at	RTTN	0,9877	0,0056
209396_s_at	CHI3L1	3,4697	0,0056
204072_s_at	FRY	-0,9824	0,0057
202708_s_at	HIST2H2BE	-0,9627	0,0058

**Taula R5.** Gens diferencialment expressats en els fibroblasts d'aponeurosi de pacients amb HI. El *fold change* (FC) es troba expressat en logaritme en base 2. Els valors negatius de FC indiquen infra-expressió.

Número de sonda	Gen	log FC	p-valor
206385_s_at	ANK3	-1,8269	0,0063
202014_at	PPP1R15A	0,5999	0,0064
226587_at	SNRPN	-0,9176	0,0065
207334_s_at	TGFBR2	1,2461	0,0069
212621_at	TMEM194A	0,8421	0,0073
227088_at	PDE5A	-1,1736	0,0074
206298_at	ARHGAP22	0,7533	0,0074
217161_x_at	ACAN	-2,0297	0,0077
235272_at	SBSN	1,9147	0,0078
228708_at	RAB27B	2,2828	0,0079
212703_at	TLN2	0,7147	0,0087
1554097_a_at	LOC554202	0,9997	0,0094
203788_s_at	SEMA3C	1,4122	0,0095
203355_s_at	PSD3	0,7035	0,0099
235061_at	PPM1K	-1,0236	0,0101
218000_s_at	PHLDA1	1,0320	0,0104
87100_at	ABHD2	0,9494	0,0104
1569269_s_at	SRGAP1	0,7323	0,0105
216915_s_at	PTPN12	0,8213	0,0107
211561_x_at	MAPK14	0,6107	0,0108
202555_s_at	MYLK	-0,8613	0,0109
230630_at	AK3L1	-0,8120	0,0110
52940_at	SIGIRR	1,2525	0,0113
203209_at	RFC5	0,8676	0,0116
201695_s_at	NP	0,8821	0,0117
216252_x_at	FAS	0,5874	0,0118
210150_s_at	LAMA5	-0,7460	0,0118
214438_at	HLX1	-0,8425	0,0120
212543_at	AIM1	1,6411	0,0121
224410_s_at	LMBR1	0,6813	0,0124
203642_s_at	COBLL1	-0,7784	0,0128
204205_at	APOBEC3G	-0,7618	0,0129
227224_at	RALGPS2	0,9201	0,0132
209626_s_at	OSBPL3	0,6985	0,0133
222719_s_at	PDGFC	0,7452	0,0133
231720_s_at	JAM3	0,7871	0,0135
204825_at	MELK	1,0821	0,0136
232994_s_at	RGNEF	0,7709	0,0142
232035_at	HIST1H4B	-0,9924	0,0142
234975_at	GSPT1	0,6033	0,0142

**Taula R5 (segueix).** Gens diferencialment expressats en els fibroblasts d'aponeurosi de pacients amb HI. El *fold change* (FC) es troba expressat en logaritme en base 2. Els valors negatius de FC indiquen infra-expressió.

Número de sonda	Gen	log FC	p-valor
227334_at	USP54	0,7316	0,0145
205429_s_at	MPP6	0,8713	0,0145
201251_at	PKM2	0,5205	0,0147
223687_s_at	LY6K	1,5402	0,0148
201663_s_at	SMC4	0,9235	0,0148
209894_at	LEPR	-1,1697	0,0153
238199_x_at	LOC440552	-0,5605	0,0156
204162_at	NDC80	1,4868	0,0156
216952_s_at	LMNB2	0,6540	0,0160
219872_at	C4orf18	1,2186	0,0161
219441_s_at	LRRK1	0,7155	0,0161
209030_s_at	CADM1	1,6705	0,0163
206788_s_at	CBFB	0,7039	0,0164
225541_at	RPL22L1	0,5567	0,0167
224325_at	FZD8	0,9278	0,0168
238332_at	ANKRD29	1,2467	0,0168
226789_at	EMB	0,9859	0,0169
210186_s_at	FKBP1A	0,6363	0,0172
202605_at	GUSB	0,6222	0,0179
202444_s_at	ERLIN1	0,7002	0,0181
223044_at	SLC40A1	-1,7525	0,0182
234863_x_at	FBXO5	0,9106	0,0182
1555997_s_at	IGFBP5	-1,1124	0,0185
201621_at	NBL1	0,9368	0,0191
209421_at	MSH2	0,6838	0,0193
204768_s_at	FEN1	0,8750	0,0196
207002_s_at	PLAGL1	-0,6817	0,0196
228754_at	SLC6A6	-0,9138	0,0200
213937_s_at	FTSJ1	0,6599	0,0208
230611_at	SYPL2	-0,9920	0,0208
221677_s_at	DONSON	0,7428	0,0209
236656_s_at	LOC1001305C	-0,6677	0,0210
1560916_a_at	DPY19L1	0,6397	0,0212
230071_at	SEPT11	-0,7998	0,0215
203254_s_at	TLN1	0,4791	0,0216
224944_at	TMPO	0,7615	0,0218
230831_at	FRMD5	1,1336	0,0218
205240_at	GPSM2	0,8972	0,0219
225246_at	STIM2	0,5990	0,0221
222424_s_at	NUCKS1	0,8484	0,0221

**Taula R5 (segueix).** Gens diferencialment expressats en els fibroblasts d'aponeurosi de pacients amb HI. El *fold change* (FC) es troba expressat en logaritme en base 2. Els valors negatius de FC indiquen infra-expressió.

Número de sonda	Gen	log FC	p-valor
228885_at	MAMDC2	-2,0029	0,0221
218747_s_at	TAPBPL	0,6806	0,0228
1555730_a_at	CFL1	0,4636	0,0229
218782_s_at	ATAD2	0,9294	0,0230
230723_at	SPATA18	0,6895	0,0235
220253_s_at	LRP12	-0,6905	0,0240
203214_x_at	CDC2	1,4454	0,0243
204612_at	PKIA	1,3177	0,0249
215913_s_at	GULP1	1,0807	0,0249
227240_at	NGEF	1,3168	0,0251
1555326_a_at	ADAM9	0,5218	0,0251
218625_at	NRN1	2,4900	0,0251
240528_s_at	EXOC4	0,7225	0,0252
225662_at	ZAK	-0,5362	0,0253
209714_s_at	CDKN3	1,3145	0,0253
206540_at	GLB1L	1,0889	0,0257
215136_s_at	EXOSC8	0,6891	0,0262
235281_x_at	AHNAK	1,0566	0,0263
209398_at	HIST1H1C	-0,8491	0,0263
1552508_at	KCNE4	-1,3348	0,0266
223260_s_at	POLK	0,5181	0,0268
216230_x_at	SMPD1	0,7335	0,0268
218585_s_at	DTL	1,2684	0,0271
202391_at	BASP1	0,6797	0,0273
203755_at	BUB1B	1,3146	0,0275
203771_s_at	BLVRA	0,6529	0,0278
217309_s_at	DSCR3	0,5122	0,0279
1053_at	RFC2	0,7180	0,0279
201476_s_at	RRM1	0,6748	0,0280
204932_at	TNFRSF11B	-0,9547	0,0281
214866_at	PLAUR	0,8589	0,0282
203022_at	RNASEH2A	0,9844	0,0285
211742_s_at	EVI2B	1,4892	0,0286
225655_at	UHRF1	1,1607	0,0290
201110_s_at	THBS1	-0,7129	0,0292
201292_at	TOP2A	1,5026	0,0293
225895_at	SYNPO2	-0,9524	0,0294
211343_s_at	COL13A1	1,2487	0,0297
214266_s_at	PDLIM7	0,5637	0,0298
219288_at	C3orf14	0,5620	0,0298

**Taula R5 (segueix).** Gens diferencialment expressats en els fibroblasts d'aponeurosi de pacients amb HI. El *fold change* (FC) es troba expressat en logaritme en base 2. Els valors negatius de FC indiquen infra-expressió.

Número de sonda	Gen	log FC	p -valor
204023_at	RFC4	0,6901	0,0299
200646_s_at	NUCB1	0,4914	0,0301
1552658_a_at	NAV3	0,6733	0,0301
224964_s_at	GNG2	1,1642	0,0304
230214_at	MRV11	-1,2344	0,0309
229127_at	JAM2	-1,4379	0,0310
204026_s_at	ZWINT	1,0451	0,0320
223229_at	UBE2T	0,9787	0,0320
228531_at	SAMD9	2,1115	0,0321
200041_s_at	BAT1	0,4836	0,0321
228152_s_at	DDX60L	0,7218	0,0323
218039_at	NUSAP1	1,4535	0,0324
214933_at	CACNA1A	0,7207	0,0325
202440_s_at	ST5	-0,4508	0,0329
212437_at	CENPB	0,3918	0,0329
220615_s_at	FAR2	1,3418	0,0338
35666_at	SEMA3F	-0,9641	0,0343
203812_at	SLIT3	-0,7659	0,0343
210734_x_at	MAX	0,5597	0,0346
210983_s_at	MCM7	0,7790	0,0352
234989_at	NEAT1	-0,5791	0,0353
213135_at	TIAM1	1,5134	0,0355
201654_s_at	HSPG2	0,5136	0,0356
212141_at	MCM4	0,6257	0,0367
219555_s_at	CENPN	0,8957	0,0369
218252_at	CKAP2	0,8881	0,0369
219049_at	CSGALNACT1	1,2013	0,0369
1552619_a_at	ANLN	1,4196	0,0373
200962_at	RPL31	1,0395	0,0373
225283_at	ARRDC4	-0,9475	0,0374
217771_at	GOLM1	0,7825	0,0375
239909_at	ADAMTSL1	0,6746	0,0375
227954_at	ITPRIPL2	-0,4721	0,0376
204420_at	FOSL1	0,6058	0,0378
209055_s_at	CDC5L	0,4217	0,0382
203294_s_at	LMAN1	0,7137	0,0386
219148_at	PBK	1,5494	0,0386
222781_s_at	C9orf40	0,5881	0,0388
209781_s_at	KHDRBS3	0,6484	0,0389
218542_at	CEP55	1,4641	0,0394

**Taula R5 (segueix).** Gens diferencialment expressats en els fibroblasts d'aponeurosi de pacients amb HI. El *fold change* (FC) es troba expressat en logaritme en base 2. Els valors negatius de FC indiquen infra-expressió.

Número de sonda	Gen	log FC	p-valor
202278_s_at	SPTLC1	0,4349	0,0396
202161_at	PKN1	0,4772	0,0398
226179_at	SLC25A37	0,5655	0,0398
235486_at	C11orf41	0,8726	0,0399
1554768_a_at	MAD2L1	1,2105	0,0402
203270_at	DTYMK	0,6783	0,0405
219248_at	THUMPD2	0,7485	0,0407
204257_at	FADS3	-0,6171	0,0411
208875_s_at	PAK2	0,4989	0,0412
225310_at	RBMX	0,5341	0,0415
208611_s_at	SPTAN1	0,4182	0,0421
218802_at	CCDC109B	0,7395	0,0424
228293_at	DEPDC7	0,8550	0,0425
1554696_s_at	TYMS	0,9091	0,0426
203705_s_at	FZD7	-0,8579	0,0429
215813_s_at	PTGS1	1,4286	0,0433
205830_at	CLGN	1,8383	0,0435
218726_at	HJURP	1,1881	0,0436
212143_s_at	IGFBP3	1,0759	0,0437
213273_at	ODZ4	0,6897	0,0439
220093_at	ANTXR1	-0,8790	0,0441
1558680_s_at	PDE1A	1,3956	0,0442
201430_s_at	DPYSL3	0,9243	0,0445
227059_at	GPC6	0,8176	0,0450
210692_s_at	SLC43A3	1,0210	0,0456
217757_at	A2M	-1,8049	0,0460
202087_s_at	CTSL1	0,6909	0,0464
218340_s_at	UBA6	0,6921	0,0465
1568618_a_at	GALNT1	-0,8013	0,0465
243357_at	NEGR1	0,5493	0,0473
212325_at	LIMCH1	-0,9726	0,0475
227272_at	C15orf52	-1,0043	0,0476
209054_s_at	WHSC1	0,6502	0,0479
203233_at	IL4R	0,5782	0,0479
220658_s_at	ARNTL2	0,8586	0,0484
1555594_a_at	MBNL1	0,6192	0,0485
205967_at	HIST1H4C	0,6310	0,0490
237215_s_at	TFRC	0,7759	0,0492
205130_at	RAGE	1,0732	0,0494
210571_s_at	CMAH	1,3294	0,0494

**Taula R5 (segueix).** Gens diferencialment expressats en els fibroblasts d'aponeurosi de pacients amb HI. El *fold change* (FC) es troba expressat en logaritme en base 2. Els valors negatius de FC indiquen infra-expressió.



Número de sonda	Gen	log FC	p-valor
218009_s_at	PRC1	1,2626	0,0496
202219_at	SLC6A8	-0,5376	0,0497
207828_s_at	CENPF	1,2050	0,0499
203554_x_at	PTTG1	1,0407	0,0499
226722_at	FAM20C	0,5690	0,0500

**Taula R5 (segueix).** Gens diferencialment expressats en els fibroblasts d'aponeurosi de pacients amb HI. El *fold change* (FC) es troba expressat en logaritme en base 2. Els valors negatius de FC indiquen infra-expressió.

### 2.3.- L'expressió gènica dels fibroblasts de múscul esquelètic de pacients amb hèrnia incisional és diferent a la dels pacients control.

De tots els gens que van passar el filtratge, es va obtenir un total de 127 gens diferencialment expressats en els fibroblasts procedents del múscul esquelètic dels pacients amb HI en comparació amb els fibroblasts procedents del múscul esquelètic dels pacients sense HI (amb un valor  $p < 0.05$ ). D'aquests gens, es van trobar:

- 81 gens sobre-expressats.
- 44 gens infra-expressats.

Número de sonda	Gen	log FC	p-valor
205798_at	IL7R	-2,1075	0,0017
201295_s_at	WSB1	1,3158	0,0026
228312_at	PI16	-2,4157	0,0032
215305_at	PDGFRA	-0,9793	0,0041
224368_s_at	NDRG3	0,9464	0,0046
212641_at	HIVEP2	1,0009	0,0048
213661_at	PAMR1	-2,1964	0,0052
219929_s_at	ZFYVE21	1,0683	0,0058
233540_s_at	CDK5RAP2	0,9609	0,0063
213845_at	GRIK2	-1,8978	0,0066

**Taula R6.** Gens diferencialment expressats en els fibroblasts de múscul esquelètic de pacients amb HI. El *fold change* (FC) es troba expressat en logaritme en base 2. Els valors negatius de FC indiquen infra-expressió.

Número de sonda	Gen	log FC	p-valor
210145_at	PLA2G4A	-1,9324	0,0067
201487_at	CTSC	-1,8560	0,0072
225160_x_at	MDM2	1,5817	0,0075
222846_at	RAB8B	1,1158	0,0075
212257_s_at	SMARCA2	1,0873	0,0078
203868_s_at	VCAM1	2,5004	0,0085
205923_at	RELN	-4,2021	0,0086
203491_s_at	CEP57	0,8235	0,0088
213548_s_at	CDV3	1,0987	0,0090
226098_at	IFT80	0,7643	0,0090
210635_s_at	KLHL20	0,7084	0,0096
212787_at	YLPM1	1,0169	0,0098
219209_at	IFIH1	1,3553	0,0107
230214_at	MRVI1	1,7968	0,0108
219118_at	FKBP11	-1,1799	0,0109
1555229_a_at	C1S	1,3022	0,0111
211965_at	ZFP36L1	1,0884	0,0114
1559954_s_at	DDX42	1,0437	0,0119
1555594_a_at	MBNL1	0,9809	0,0120
217161_x_at	ACAN	-2,2525	0,0121
204476_s_at	PC	0,7744	0,0124
213844_at	HOXA5	-1,2608	0,0124
201667_at	GJA1	1,1396	0,0125
205170_at	STAT2	0,9828	0,0126
212067_s_at	C1R	1,2825	0,0133
1557970_s_at	RPS6KA2	0,9117	0,0144
200646_s_at	NUCB1	0,6687	0,0154
227260_at	ANKRD10	1,0609	0,0154
206197_at	NME5	-1,1140	0,0155
218959_at	HOXC10	0,8858	0,0156
222803_at	PRTFDC1	-1,5785	0,0156
205321_at	EIF2S3	1,2511	0,0161
203060_s_at	PAPSS2	-0,8788	0,0164
201212_at	LG MN	-1,1840	0,0166
235256_s_at	GALM	1,0379	0,0166
209131_s_at	SNAP23	0,6380	0,0189
205542_at	STEAP1	1,2173	0,0189
209395_at	CHI3L1	3,5369	0,0190
1558214_s_at	CTNNA1	0,7020	0,0199
231769_at	FBXO6	0,8461	0,0212

**Taula R6 (segueix).** Gens diferencialment expressats en els fibroblasts de múscul esquelètic de pacients amb HI. El *fold change* (FC) es troba expressat en logaritme en base 2. Els valors negatius de FC indiquen infra-expressió.

Número de sonda	Gen	log FC	p-valor
233827_s_at	SUPT16H	1,0831	0,0218
238320_at	NEAT1	1,1890	0,0219
226972_s_at	CCDC136	-1,0280	0,0219
209905_at	HOXA9	-1,1564	0,0231
238539_at	HPS3	0,5416	0,0234
201211_s_at	DDX3X	0,8315	0,0238
200917_s_at	SRPR	0,9852	0,0239
213059_at	CREB3L1	-0,8332	0,0240
209682_at	CBLB	-0,7046	0,0243
200998_s_at	CKAP4	-0,6847	0,0248
217173_s_at	LDLR	0,7856	0,0251
231721_at	JAM3	0,8133	0,0255
209782_s_at	DBP	0,7298	0,0256
228400_at	SHROOM3	-1,3554	0,0256
221875_x_at	HLA-F	0,7953	0,0261
209652_s_at	PGF	-1,5389	0,0262
222701_s_at	CHCHD7	-0,6228	0,0266
202323_s_at	ACBD3	0,8671	0,0270
206614_at	GDF5	0,9058	0,0277
201649_at	UBE2L6	0,5674	0,0280
204279_at	PSMB9	0,9180	0,0281
201801_s_at	SLC29A1	1,1722	0,0281
222880_at	AKT3	0,9352	0,0282
206953_s_at	LPHN2	-1,9463	0,0283
243999_at	SLFN5	0,8206	0,0298
1569106_s_at	SETD5	0,8126	0,0301
204472_at	GEM	0,7344	0,0301
210735_s_at	CA12	1,3555	0,0302
200879_s_at	EPAS1	1,3632	0,0303
228335_at	CLDN11	-1,2033	0,0307
207876_s_at	FLNC	-0,7449	0,0318
223618_at	FMN2	-1,0918	0,0322
208965_s_at	IFI16	0,7217	0,0336
221771_s_at	MPHOSPH8	0,7836	0,0338
226304_at	HSPB6	-1,6669	0,0342
221638_s_at	STX16	0,7987	0,0343
226244_at	CLEC14A	-1,7394	0,0348
205582_s_at	GGT5	0,8982	0,0350
203455_s_at	SAT1	0,7205	0,0352
208403_x_at	MAX	0,5210	0,0354

**Taula R6 (segueix).** Gens diferencialment expressats en els fibroblasts de múscul esquelètic de pacients amb HI. El *fold change* (FC) es troba expressat en logaritme en base 2. Els valors negatius de FC indiquen infra-expressió.

Número de sonda	Gen	log FC	p-valor
213273_at	ODZ4	0,86373	0,0358
228575_at	IL2ORB	-2,22417	0,0369
203217_s_at	ST3GAL5	1,28613	0,0372
1557910_at	HSP90AB1	0,6936	0,0377
230112_at	MARCH4	-0,80177	0,0386
235033_at	NPEPL1	-0,59689	0,0388
212107_s_at	DHX9	0,71743	0,0393
203886_s_at	FBLN2	-1,55772	0,0393
203676_at	GNS	0,62352	0,0396
213568_at	OSR2	-2,01329	0,0401
208442_s_at	ATM	0,59091	0,0404
205227_at	IL1RAP	0,58765	0,0406
232224_at	MASP1	-1,38281	0,0415
214336_s_at	COPA	0,90504	0,0419
219143_s_at	RPP25	-0,90124	0,0429
204070_at	RARRES3	1,08343	0,0429
209598_at	PNMA2	-1,21027	0,0433
202589_at	TYMS	-1,02873	0,0436
212570_at	ENDOD1	0,73083	0,0437
209645_s_at	ALDH1B1	0,87636	0,0438
217979_at	TSPAN13	-1,93394	0,0443
208459_s_at	XPO7	0,64354	0,0449
225155_at	SNHG5	-1,46174	0,0449
227655_at	SNORD123	-0,84358	0,0456
218223_s_at	PLEKHO1	0,72575	0,0461
224374_s_at	EMILIN2	-2,09787	0,0463
200706_s_at	LITAF	0,67848	0,0469
235016_at	REEP3	0,73895	0,0474
210367_s_at	PTGES	-1,70852	0,0476
218589_at	LPAR6	1,19139	0,0478
227812_at	TNFRSF19	1,03302	0,0479
213684_s_at	PDLIM5	0,50844	0,0487
210517_s_at	AKAP12	-0,69488	0,0489
208850_s_at	THY1	0,9964	0,0492
236356_at	NDUFS1	0,54643	0,0499

**Taula R6 (segueix).** Gens diferencialment expressats en els fibroblasts de múscul esquelètic de pacients amb HI. El *fold change* (FC) es troba expressat en logaritme en base 2. Els valors negatius de FC indiquen infra-expressió.

## **2.4.- Rutes alterades.**

Mitjançant eines bioinformàtiques es va estudiar com s'agrupaven els gens diferencialment expressats per tal de relacionar la HI amb rutes i funcions cel·lulars i facilitar la comprensió de les dades generades en els xips.

### **2.4.1.- Gene Ontology.**

El GO és una base de dades que permet agrupar els gens en tres principals categories, anomenades ontologies. Aquestes ontologies permeten agrupar els gens en funció dels processos biològics associats (BP; operacions o conjunts d'esdeveniments moleculars amb un inici i un final definits, necessaris per al funcionament dels organismes vius), dels components cel·lulars (CC; la part de la cèl·lula o el ambient extracel·lular on està localitzat el producte gènic) i les funcions moleculars (MF; les activitats elementals d'un producte gènic al nivell molecular, i.e. reaccions enzimàtiques). Cadascuna d'aquestes ontologies conté els gens associats en grups anomenats termes. El problema del GO és que ni els grups inclosos estan interrelacionats entre ells ni permet identificar interaccions entre els gens i/o els productes gènics.

De les categories obtingudes en els gens sobre-expressats, cal destacar que es podrien agrupar en alteracions relacionades amb el cicle cel·lular, la divisió cel·lular, la reparació del DNA, etc. (Taula R7).

Ontologia	Identificador	Valor p	Gens totals	Gens identificats	Terme
MF	GO:0005524	0,001	206	26	ATP binding
MF	GO:0030165	0,001	4	3	PDZ domain binding
MF	GO:0008144	0,004	2	2	drug binding
MF	GO:0008094	0,005	6	3	DNA-dependent ATPase activity
MF	GO:0008022	0,006	12	4	protein C-terminus binding
MF	GO:0017111	0,006	93	13	nucleoside-triphosphatase activity
MF	GO:0004553	0,008	13	4	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
MF	GO:0016818	0,009	97	13	hydrolase activity, acting on acid anhydrides, in phosphorus-9
MF	GO:0016787	0,01	302	30	hydrolase activity
MF	GO:0046872	0,009	548	24	metal ion binding
MF	GO:0005215	0,009	148	3	transporter activity
BP	GO:0007067	0	41	14	mitosis
BP	GO:0000278	0	57	16	mitotic cell cycle
BP	GO:0006260	0	35	12	DNA replication
BP	GO:0000279	0	48	14	M phase
BP	GO:0051301	0	50	14	cell division
BP	GO:0000819	0	7	5	sister chromatid segregation
BP	GO:0006281	0	30	9	DNA repair
BP	GO:0009719	0	54	12	response to endogenous stimulus
BP	GO:0007093	0	6	4	mitotic checkpoint
BP	GO:0048015	0,001	24	7	phosphoinositide-mediated signaling
BP	GO:0007059	0,001	4	3	chromosome segregation
BP	GO:0007076	0,001	4	3	mitotic chromosome condensation
BP	GO:0000226	0,002	20	6	microtubule cytoskeleton organization and biogenesis
BP	GO:0009221	0,005	2	2	pyrimidine deoxyribonucleotide biosynthetic process
BP	GO:0051276	0,006	58	10	chromosome organization and biogenesis
BP	GO:0032501	0	644	28	multicellular organismal process
BP	GO:0048856	0,002	431	17	anatomical structure development
BP	GO:0009887	0,005	98	1	organ morphogenesis
BP	GO:0007155	0,009	178	5	cell adhesion
CC	GO:0005694	0	63	15	chromosome
CC	GO:0005663	0,001	4	3	DNA replication factor C complex
CC	GO:0043228	0,001	282	32	non-membrane-bound organelle
CC	GO:0000775	0,002	9	4	chromosome, precentric region
CC	GO:0005634	0,002	521	50	nucleus
CC	GO:0000776	0,003	5	3	kinetochore
CC	GO:0044446	0,003	332	35	intracellular organelle part
CC	GO:0005819	0,003	10	4	spindle
CC	GO:0005622	0,003	1232	98	intracellular
CC	GO:0000779	0,005	2	2	condensed chromosome, pericentric region
CC	GO:0000940	0,005	2	2	outer kinetochore of condensed chromosome
CC	GO:0000922	0,009	7	3	spindle pole

**Taula R7.** Funcions moleculars (MF), processos biològics (BP) i components cel·lulars (CC) identificats entre els gens diferencialment sobre-expressats en els fibroblasts procedents de l'aponeurosi de pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI segons el *Gene Ontology*.

El nombre de processos identificats en el llistat de gens infra-expressats en els fibroblasts procedents de l'aponeurosi de pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI en canvi, va resultar ser molt menor. Tots aquests processos estaven majoritàriament relacionats amb el transport de ions (Taula R8).

Ontologia	Identificador	Valor p	Gens totals	Gens identificats	Terme
MF	GO:0005328	0	2	2	neurotransmitter:sodium symporter activity
MF	GO:0008324	0,01	63	5	cation transporter activity
BP	GO:0006334	0,004	17	3	nucleosome assembly
BP	GO:0006836	0,006	6	2	neurotransmitter transport
CC	GO:0008021	0,001	9	3	synaptic vesicle
CC	GO:0000786	0,002	13	3	nucleosome

**Taula R8.** Funcions moleculars (MF), processos biològics (BP) i components cel·lulars (CC) identificats entre els gens diferencialment infra-expressats en els fibroblasts procedents de l'aponeurosi de pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI segons el *Gene Ontology*.

En el múscul esquelètic, i a partir dels 127 gens diferencialment expressats en els fibroblasts dels pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI, també es van obtenir una sèrie de categories en funció dels gens sobre-expressats o infra-expressats.

Entre les categories identificades en els gens sobre-expressats destaquen categories relacionades amb la resposta immunològica (Taula R9).

Ontologia	Identificador	Valor p	Gens totals	Gens identificats	Terme
MF	GO:0004386	0	18	5	helicase activity
MF	GO:0005486	0,001	2	2	t-SNARE activity
MF	GO:0003816	0,001	2	2	complement component C1s activity
MF	GO:0004004	0,007	4	2	ATP-dependent RNA helicase activity
MF	GO:0008565	0,009	13	3	protein transporter activity
BP	GO:0006955	0,006	102	9	immune response
BP	GO:0006891	0,006	4	2	intra-Golgi vesicle-mediated transport
BP	GO:0022600	0,006	4	2	digestive process
BP	GO:0009615	0,01	14	3	response to virus

**Taula R9.** Funcions moleculars (MF) i processos biològics (BP) identificats entre els gens diferencialment sobre-expressats en els fibroblasts procedents del múscul esquelètic de pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI segons el *Gene Ontology*.

En canvi, en els gens infra-expressats destaquen categories relacionades amb rutes metabòliques de catabolisme de macromolècules (Taula R10).

Ontologia	Identificador	Valor p	Gens totals	Gens identificats	Terme
MF	GO:0005529	0,002	28	4	sugar binding
MF	GO:0008233	0,004	83	6	peptidase activity
MF	GO:0004252	0,004	18	3	serine-type endopeptidase activity
MF	GO:0005201	0,006	40	4	extracellular matrix structural constituent
BP	GO:0009116	0,002	4	2	nucleoside metabolic process
BP	GO:0006221	0,003	5	2	pyrimidine nucleotide biosynthetic process
BP	GO:0006508	0,005	96	6	proteolysis
BP	GO:0032501	0,008	644	18	multicellular organismal process
CC	GO:0045177	0,007	7	2	apical part of cell
CC	GO:0043234	0,005	247	0	protein complex
CC	GO:0044446	0,007	332	1	intracellular organelle part

**Taula R10.** Funcions moleculars (MF), processos biològics (BP) i components cel·lulars (CC) identificats entre els gens diferencialment infra-expressats en els fibroblasts procedents del múscul esquelètic de pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI segons el *Gene Ontology*.

#### 2.4.2.- KEGG.

El KEGG és una base de dades que té agrupats tots els gens en blocs moleculars de gens i proteïnes (informació gènica) i substàncies químiques (informació química). Aquests blocs, que descriuen detalladament les funcions i utilitats d'un sistema biològic (i.e. la cèl·lula) des de tots els mecanismes que el regulen, estan integrats en diagrames d'interaccions moleculars i reaccions connectats entre ells. És a dir, aquests blocs representen les xarxes moleculars (interaccions moleculars, reaccions moleculars i xarxes de relacions) que representen les funcions sistèmiques de la cèl·lula i de l'organisme. En aquesta base de dades sí que existeixen relacions entre els blocs o termes, però segueixen mancants les interaccions entre els gens i/o els productes gènics.

Les rutes identificades mitjançant aquesta base de dades van resultar ser molt similars als obtinguts amb el GO. Els gens diferencialment expressats en l'aponeurosi de pacients amb HI també s'agrupaven principalment en categories referents a cicle cel·lular, divisió cel·lular, etc. Els gens diferencialment expressats en el múscul esquelètic de pacients amb HI també estaven relacionats amb el catabolisme de macromolècules, però cal destacar que mitjançant aquesta eina es van identificar altres rutes alterades interessants, com l'apoptosi o l'adhesió cel·lular (Taula R11).



Identificador	Valor p	Gens totals	Gens identificats	Terme	Teixit
KEGG:4130	0.0121	4	2	SNARE interactions in vesicular transport	Múscul esquelètic
KEGG:790	0.0196	5	2	Folate biosynthesis	Múscul esquelètic
KEGG:4670	0.0221	24	4	Leukocyte transendothelial migration	Múscul esquelètic
KEGG:4210	0.0292	15	3	Apoptosis	Múscul esquelètic
KEGG:590	0.0281	11	2	Arachidonic acid metabolism	Múscul esquelètic
KEGG:240	0.0281	11	2	Pyrimidine metabolism	Múscul esquelètic
KEGG:4510	0.0373	79	5	Focal adhesion	Múscul esquelètic
KEGG:240	0.00063	11	5	Pyrimidine metabolism	Aponeurosi
KEGG:4110	0.00959	34	7	Cell cycle	Aponeurosi
KEGG:3030	0.0156	3	2	DNA polymerase	Aponeurosi
KEGG:230	0.0273	24	5	Purine metabolism	Aponeurosi
KEGG:4742	0.0297	4	2	Taste transduction	Aponeurosi
KEGG:860	0.0297	4	2	Porphyrin and chlorophyll metabolism	Aponeurosi
KEGG:4360	0.0322	25	5	Axon guidance	Aponeurosi
KEGG:791	0.0249	1	1	Atrazine degradation	Aponeurosi

**Taula R11.** Rutes alterades obtingudes mitjançant *KEGG* a partir dels gens diferencialment expressats en els fibroblasts procedents de l'aponeurosi o del múscul esquelètic de pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI.

### 2.4.3.- Ingenuity Pathways Analysis.

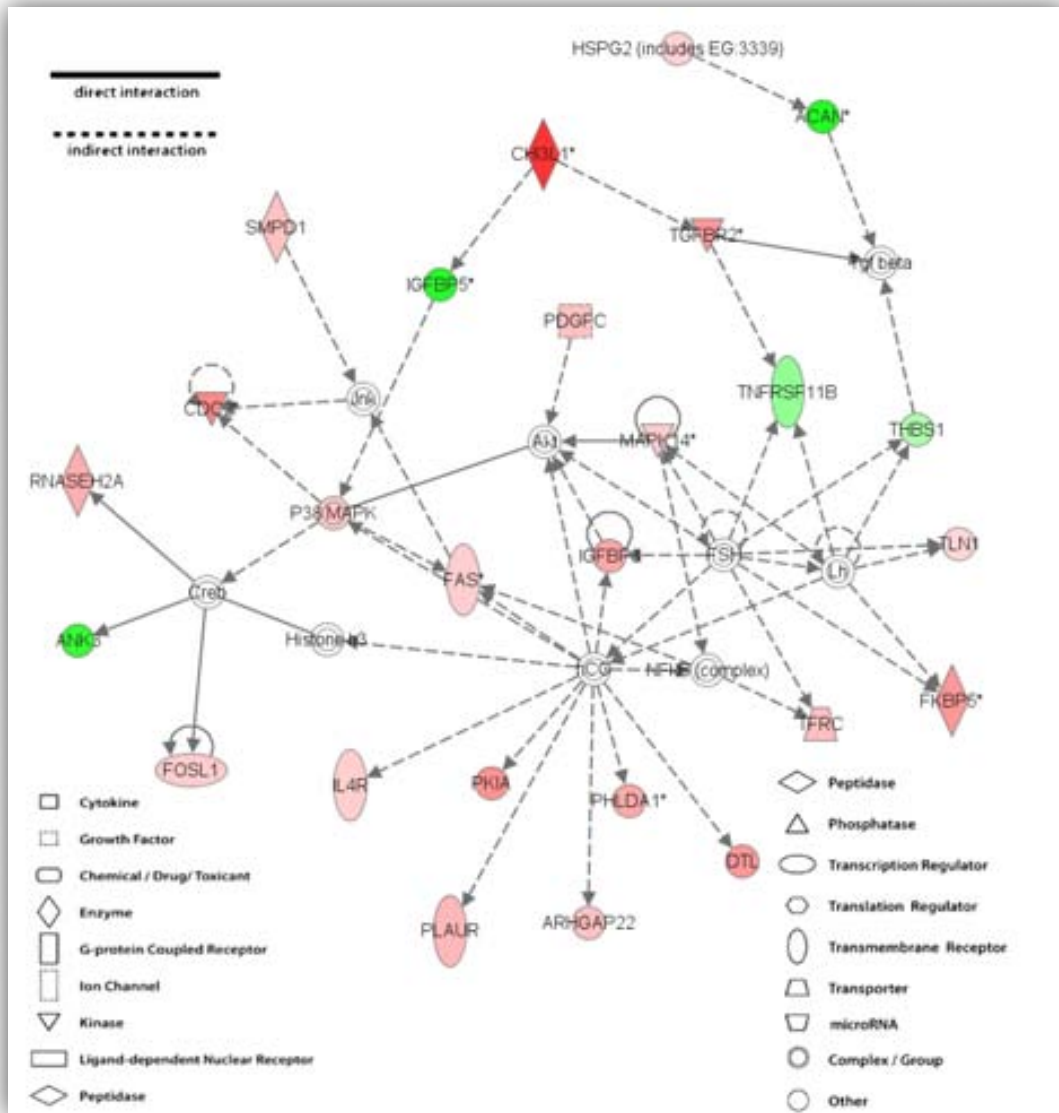
La base de dades IPA és un arxiu enorme d'interaccions biològiques i anotacions funcionals, generat a partir de milions de relacions individuals entre proteïnes, gens, complexes, cèl·lules, teixits, metabòlits, fàrmacs i malalties. Els grups gènics obtinguts no són tant específics com en les dues bases de dades anteriors, però aquesta base de dades és única en la informació que genera. Totes les rutes que identifica es poden analitzar al detall, amb accessos als articles que han descrit relacions entre molècules, associacions amb malalties o buscar informació referent a una sola molècula. A més, genera una presentació molt intuïtiva en forma de gràfics que facilita la comprensió de les rutes analitzades a través de la visualització de les molècules implicades i les seves interaccions.

En els fibroblasts procedents de l'aponeurosi de pacients amb HI cal destacar que les funcions alterades obtingudes amb la base de dades IPA també guarden relació amb el cicle cel·lular i la proliferació. A més, també és destacable que es trobi alterat el desenvolupament del teixit connectiu (Taula R12).

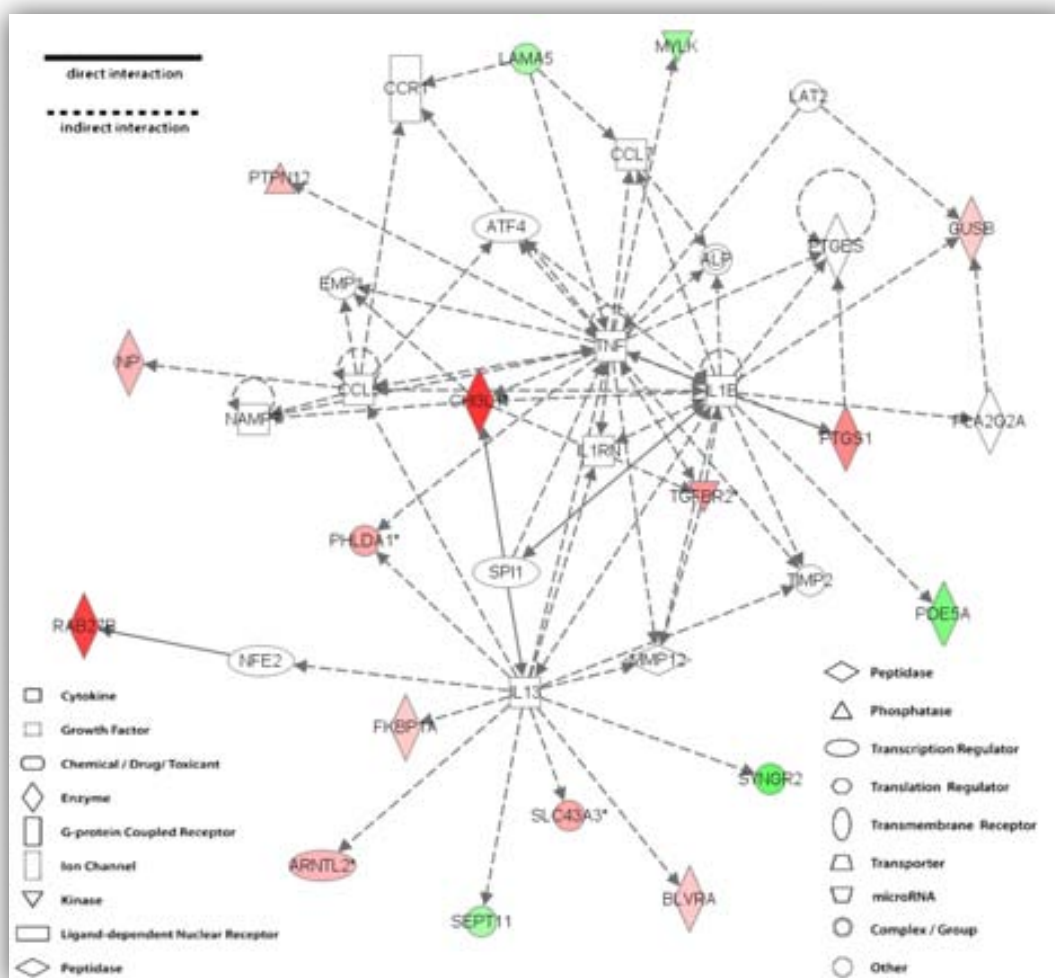
Funció biològica	Valor p	Gens identificats	Terme
Malalties i desordres	5,77E-11	98	Cancer
Malalties i desordres	5,77E-11	48	Malaltia Gastrointestinal
Malalties i desordres	2,83E-08	147	Desordre Genètic
Malalties i desordres	2,96E-05	59	Desordres del Sistema Endocrí
Malalties i desordres	2,96E-05	66	Malalties Metabòliques
Funcions cel·lulars i moleculars	3,13E-08	36	Cicle Cel·lular
Funcions cel·lulars i moleculars	3,53E-06	24	Replicació, Recombinació i Reparació del DNA
Funcions cel·lulars i moleculars	1,25E-05	45	Mort Cel·lular
Funcions cel·lulars i moleculars	8,87E-05	51	Creixement i Proliferació Cel·lular
Funcions cel·lulars i moleculars	9,60E-05	28	Assemblatge i Organització Cel·lular
Processos fisiològics	2,16E-04	10	Desenvolupament i Funció del Sistema Hematològic
Processos fisiològics	8,19E-04	8	Desenvolupament i Funció del Teixit Connectiu
Processos fisiològics	1,50E-03	9	Morfologia Tissular
Processos fisiològics	2,28E-03	7	Morfologia Tumoral
Processos fisiològics	2,98E-03	9	Desenvolupament Embriològic

**Taula R12.** Rutes alterades identificades mitjançant el software *Ingenuity Pathways Analysis* en els fibroblasts de l'aponeurosi dels pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI.

Amb el IPA, a més, es poden estudiar aquelles rutes en que s'han descrit interaccions entre molècules. A partir dels transcrits obtinguts, es van identificar una sèrie de xarxes en funció de les xarxes gèniques de la base de dades. Aquestes xarxes gèniques, a diferència dels grups de funcions biològiques, identifiquen interaccions directes o indirectes entre les molècules que les conformen. El software identifica quins gens apareixen a les seves bases de dades, i genera una puntuació en funció del nombre de gens de la xarxa i el nombre de gens identificats en el xip d'expressió gènica. Aquesta puntuació permet classificar les xarxes en funció de la importància que aquestes tenen en les dades inferides. Es van seleccionar les dues xarxes amb major puntuació, destacant alguns gens molt interessants relacionats amb inflamació, de la família del TGF- $\beta$  o del TNF- $\alpha$  (Figura R19 i Figura R20). Cal esmentar que en aquestes xarxes hi poden aparèixer molècules no identificades en els resultats del xip d'expressió gènica (sense color).



**Figura R19.** Xarxa de Morfologia de la Cèl·lula, Desenvolupament Cel·lular i Malaltia Cardiovascular de l'IPA a partir del llistat de gens diferencialment expressats en els fibroblasts procedents de l'aponeurosi de pacients amb HI. En vermell s'hi veuen els gens sobre-expressats i en verd els gens infra-expressats en comparació amb els fibroblasts de pacients sense HI. La intensitat del color correlaciona amb el grau d'expressió.



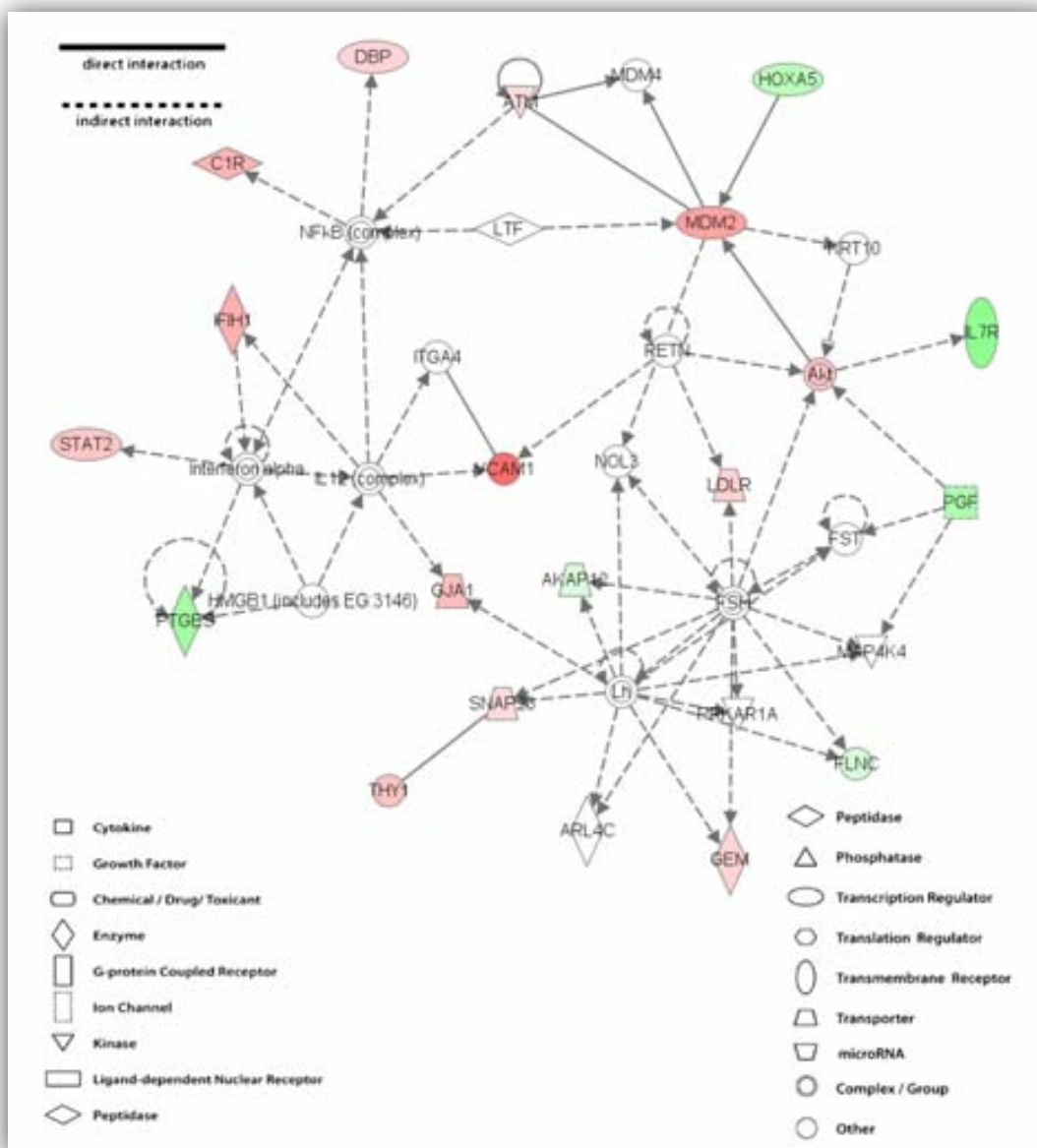
**Figura R20.** Xarxa de Cicle Cel·lular, Assemblatge i Organització Cel·lular, i Replicació, Recombinació i Reparació del DNA de l'IPA a partir del llistat de gens diferencialment expressats en els fibroblasts procedents de l'aponeurosi de pacients amb HI. En vermell s'hi veuen els gens sobre-expressats i en verd els gens infra-expressats en comparació amb els fibroblasts de pacients sense HI. La intensitat del color correlaciona amb el grau d'expressió.

En els fibroblasts procedents del múscul esquelètic de pacients amb HI es va observar que les rutes alterades estaven relacionades amb desenvolupament i manteniment cel·lulars, a més de la presència de rutes relacionades amb el sistema immunològic (Taula R13).

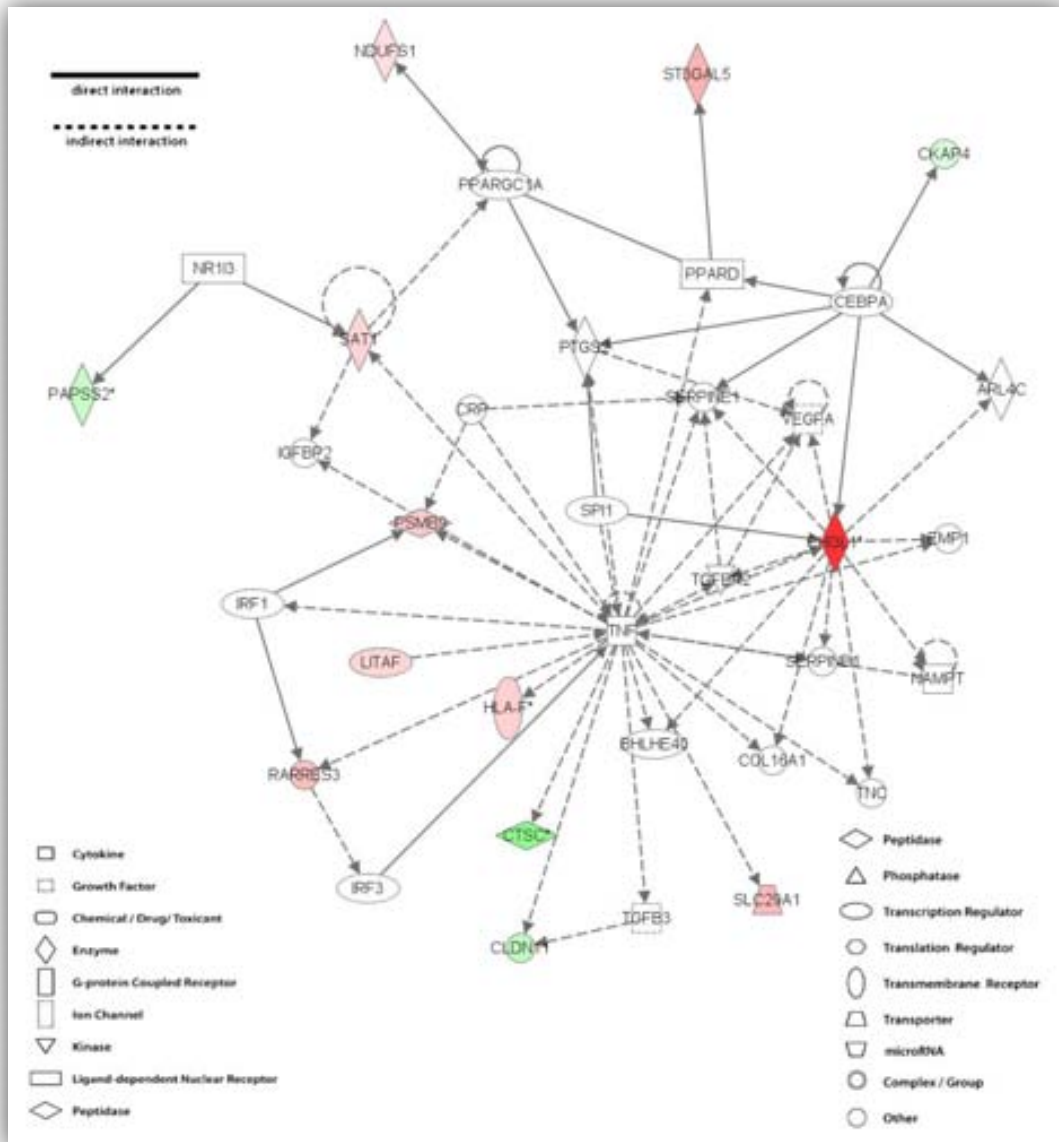
Funció biològica	Valor p	Gens identificats	Terme
Malalties i desordres	1,34E-06	57	Malaltia Neurològica
Malalties i desordres	4,61E-05	76	Desordre Genètic
Malalties i desordres	5,09E-05	11	Desordre del Teixit Connectiu
Malalties i desordres	5,09E-05	18	Malaltia Immunològica
Malalties i desordres	5,09E-05	33	Malaltia Inflamatòria
Funcions cel·lulars i moleculars	2,08E-04	16	Senyalització i Interacció Cèl·lula-Cèl·lula
Funcions cel·lulars i moleculars	2,08E-04	12	Assemblatge i Organització Cel·lular
Funcions cel·lulars i moleculars	2,08E-04	28	Desenvolupament Cel·lular
Funcions cel·lulars i moleculars	2,08E-04	11	Funció i Manteniment Cel·lular
Funcions cel·lulars i moleculars	2,08E-04	9	Replicació, Recombinació i Reparació del DNA
Processos fisiològics	6,96E-05	17	Morfologia Tissular
Processos fisiològics	6,84E-04	10	Desenvolupament Embriològic
Processos fisiològics	6,84E-04	9	Hematopoesi
Processos fisiològics	6,84E-04	7	Tràfic Cel·lular Immunològic
Processos fisiològics	9,13E-04	17	Desenvolupament Tissular

**Taula R13.** Rutes alterades identificades mitjançant el software *Ingenuity Pathways Analysis* en els fibroblasts del múscul esquelètic dels pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI.

A partir de les rutes funcionals que mostren les interaccions entre les diferents molècules s'ha pogut identificar algunes molècules d'interès que no apareixen en els llistat obtinguts a partir del xip, com la ruta del NF- $\kappa$ B o de molècules que interaccionen amb el TNF- $\alpha$  (Figura R21 i Figura R22).



**Figura R21.** Xarxa de Càncer, Creixement i Proliferació Cel·lular, i Desenvolupament de l'Organisme de l'IPA a partir del llistat de gens diferencialment expressats en els fibroblasts procedents del múscul esquelètic de pacients amb HI. En vermell s'hi veuen els gens sobre-expressats i en verd els gens infra-expressats en comparació amb els fibroblasts de pacients sense HI. La intensitat del color correlaciona amb el grau d'expressió.



**Figura R22.** Xarxa de Càncer, Desenvolupament Cel·lular, i Creixement i Proliferació Cel·lulars de l'IPA a partir del llistat de gens diferencialment expressats en els fibroblasts procedents del múscul esquelètic de pacients amb HI. En vermell s'hi veuen els gens sobre-expressats i en verd els gens infra-expressats en comparació amb els fibroblasts de pacients sense HI. La intensitat del color correlaciona amb el grau d'expressió.

**3.- Els gens comprovats per PCR en temps real correlacionen amb els resultats dels xips d'expressió gènica.**

Per tal de comprovar els resultats obtinguts en els xips d'expressió gènica, es van seleccionar una sèrie de gens per analitzar mitjançant PCR en temps real. Aquesta selecció es va realitzar en funció de criteris d'expressió i criteris estadístics (diferència d'expressió [FC]  $\geq \pm 2$ ; valor  $p < 0.01$ ). Es va comprovar un total de 13 gens per teixit i 2 controls endògens per teixit (gens que no presentaven diferències entre pacients amb i sense HI) (Taula R14). De tots aquests gens, un d'ells coincidia en els dos teixits: ACAN (agrecà). Tots els gens validats es van trobar alterats en el mateix sentit que en el xip d'expressió gènica i en FCs similars, exhibint nivells de correlació alts entre la PCR en temps real i les dades del xip d'expressió gènica. A més, els dos controls endògens utilitzats per cada teixit no van mostrar diferències entre els grups, de manera que van poder ser utilitzats per normalitzar els resultats per cada gen. Els gens comprovats per PCR en temps real van ser analitzats en fibroblasts procedents de pacients diferents als dels xips obtenint resultats molt similars (5 pacients amb HI i 5 pacients sense HI diferents per teixit).



Gen	Eficiència de qPCR	Fold change	Correlació amb el microxip ( <i>P</i> valor)
<b>Gens diferencialment expressats en aponeurosi</b>			
<i>Gens sobre-expressats en HI</i>			
CHI3L1	1,796	5,41	-0,966
RAB27B	1,997	4,41	-0,932
SBSN	1,845	4,00	-0,957
SMC2	1,821	2,15	-0,824
SEMA3C	1,798	1,64	-0,889
<i>Gens infra-expressats en HI</i>			
CCDC3	1,858	8,23	-0,793
AGC1	1,857	6,76	-0,961
SCG2	1,865	5,32	-0,871
ANK3	1,960	5,15	-0,846
SYNGR2	1,663	3,34	-0,882
IGFBP5	1,862	3,01	-0,878
PDE5A	1,867	1,71	-0,540
MALAT1	1,926	1,53	-0,325
<b>Gens diferencialment expressats en múscul esquelètic</b>			
<i>Gens sobre-expressats en HI</i>			
WSB1	1,797	1,51	-0,345
SMARCA2	1,887	1,44	0,346
RAB8B	1,810	1,41	0,558
VCAM1	1,792	0,90	0,384
CPM	1,824	0,85	0,332
<i>Gens infra-expressats en HI</i>			
RELN	2,064	40,00	-0,983
PI16	1,791	11,05	-0,835
AGC1	1,807	5,88	-0,795
IL7R	1,947	5,00	-0,714
RAMP	1,990	4,85	-0,536
PLA2G4A	1,889	3,21	-0,706
CTSC	1,797	2,29	-0,748
FKBP11	1,787	0,68	-0,014
<b>Controls endògens</b>			
<i>Aponeurosi</i>			
SEC63	2,001	1,008	-0,242
SLC39A8	2,056	1,031	-0,101
<i>Múscul esquelètic</i>			
DES	1,802	1,000	-0,015
SGMS2	1,783	1,004	0,487

**Taula R14.** Gens comprovats per PCR en temps real (qPCR). L'eficiència indica quantes vegades augmenta en cada cicle el cDNA, i és important a l'hora de calcular el *fold change*. El *fold change* indica quantes vegades més (gens sobre-expressats) o menys (gens infra-expressats) s'expressa un gen en els fibroblasts de pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI

Es van seleccionar dos gens per teixit per analitzar al nivell proteic. Aquestes molècules es van seleccionar per ser les que més diferències d'expressió presentaven, però també perquè les seves funcions podrien tenir relació amb els resultats.

Com s'ha descrit en el capítol I, la HI està estretament relacionada amb una alteració en el metabolisme de la MEC. L'agrecà, una de les molècules seleccionades, és un proteoglicà de la MEC. A més d'aquesta desestructuració de la MEC, s'ha observat que hi ha una pèrdua del contacte cèl·lula-matriu. La reelina, una altra de les molècules seleccionades, participa en processos d'adhesió cel·lular. Finalment, s'ha observat una associació entre l'alteració de molècules que regulen el metabolisme de la MEC i molècules pro-inflamatòries. La quitinasa 3 és una molècula implicada en processos inflamatoris.

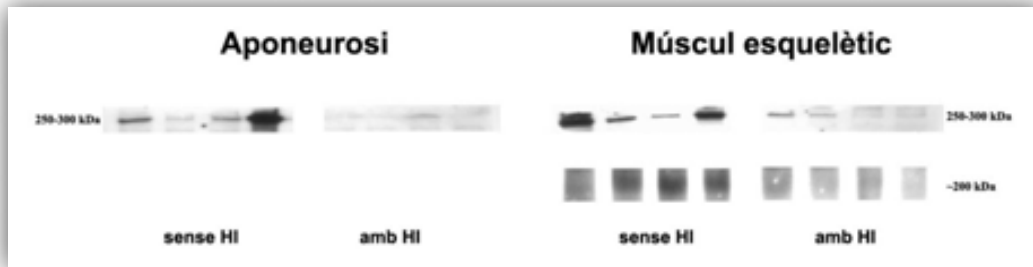
A més, per cada teixit, es va utilitzar un dels gens que no presentaven diferències entre els grups com a control endogen per normalitzar els resultats. Les proteïnes es van analitzar tant per immunotransferència com per immunofluorescència. Es van utilitzar 4 pacients amb HI i 4 pacients sense HI, per a cada teixit, per comprovar els nivells proteics.

#### **4.- Agrecà.**

Entre tots els gens del xip seleccionats per comprovar per PCR en temps real, hi havia una de les molècules que coincidia en els dos teixits, l'agrecà (AGC1 o ACAN), que es troba en menor quantitat en els fibroblasts de pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI. L'AGC1 és un proteoglicà que se secreta a la MEC i dóna força i flexibilitat a la MEC. Una disminució en els seus nivells i/o una degradació s'ha relacionat amb una pèrdua de consistència de la MEC en algunes malalties com l'artrosi reumàtica o l'artrosi òssia.

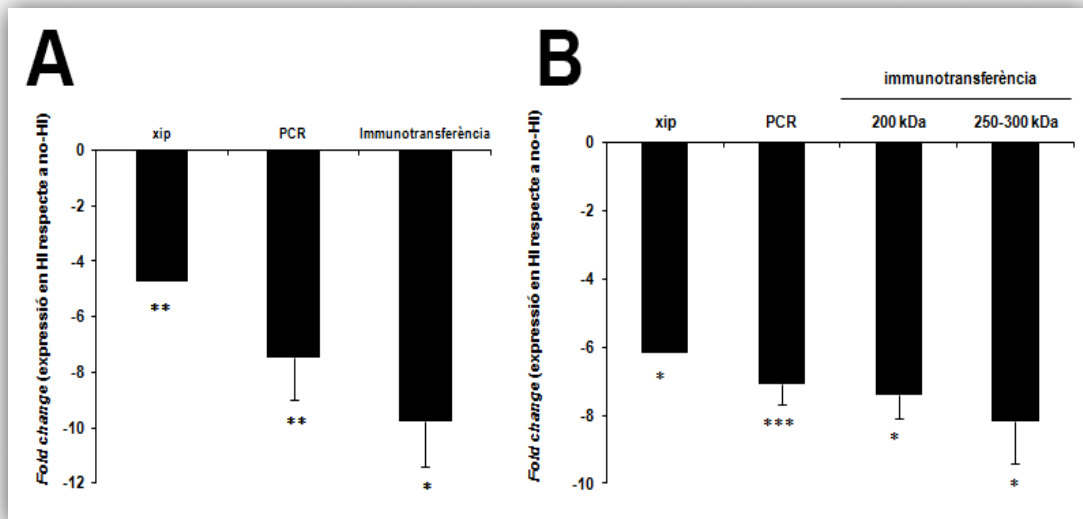
Com que l'agrecà és una molècula que se secreta i forma part de la MEC es va detectar en l'extracte cel·lular. Mitjançant un anticòs que detecta la regió G1-IGD-G2 es va detectar una molècula d'uns 250-300 kDa. Es va trobar 9.8 vegades menys ( $p = 0.05$ ) en els fibroblasts de l'aponeurosi i 7.4 vegades menys ( $p = 0.01$ ) en els fibroblasts del múscul esquelètic dels pacients amb HI en comparació amb els dels pacients sense HI (Figura R30, imatges superiors). A més, mitjançant un altre anticòs contra tota la molècula es va detectar una banda addicional a uns 200 kDa només en els fibroblasts de múscul esquelètic, on els de pacients amb HI tenien 6.3

vegades menys ( $p = 0.01$ ) que els de pacients sense HI (Figura R23, imatge inferior en múscul esquelètic).



**Figura R23.** Immunotransferències de AGC1 en l'extracte cel·lular dels fibroblasts procedents d'aponeurosi i de múscul esquelètic de pacients amb i sense HI. Les imatges superiors es van detectar mitjançant un anticòs contra la regió G1-IGD-G2, mentre que la imatge inferior es va detectar mitjançant un anticòs contra la molècula sencera.

Tots els resultats, tant d'expressió gènica (xip i PCR en temps real) com de nivells proteics (immunotransferència), demostren una menor quantitat de AGC1 en els fibroblasts procedents d'aponeurosi i de múscul esquelètic dels pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI (Figura R24).



**Figura R24.** Fold Change (FC) de AGC1 dels fibroblasts d'aponeurosi (A) i de múscul esquelètic (B) de pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI en les diferents tècniques utilitzades.

A partir de la base de dades IPA, a més dels anàlisis que s'han comentat abans, també es pot analitzar molècules en concret. En aquest cas, no s'introdueixen les dades obtingudes en l'experiment, sinó que a partir de la base de dades s'obté una sèrie de molècules que interaccionen directa o indirectament amb la molècula seleccionada. Aquest apropament, encara que no identifica les molècules obtingudes en el xip d'expressió gènica, mostra molècules relacionades amb la molècula seleccionada. Això pot posar al descobert molècules que poden estar alterades a causa de l'alteració de la molècula seleccionada, o que puguin ser l'origen de l'alteració d'aquesta molècula. La relació entre molècules es basa en estudis publicats.

L'anàlisi de l'AGC1 mitjançant l'IPA va posar de manifest que es tracta d'una molècula molt important en el metabolisme cel·lular. Es va observar que interacciona amb un elevat nombre de molècules (Figura R25), entre les que destaquen varies MMPs i TIMPs, així com molècules de la família del TGF- $\beta$  i el TNF- $\alpha$ . A més, també interacciona amb altres molècules de la MEC, com el Versican, l'àcid hialurònic i altres proteoglicans.

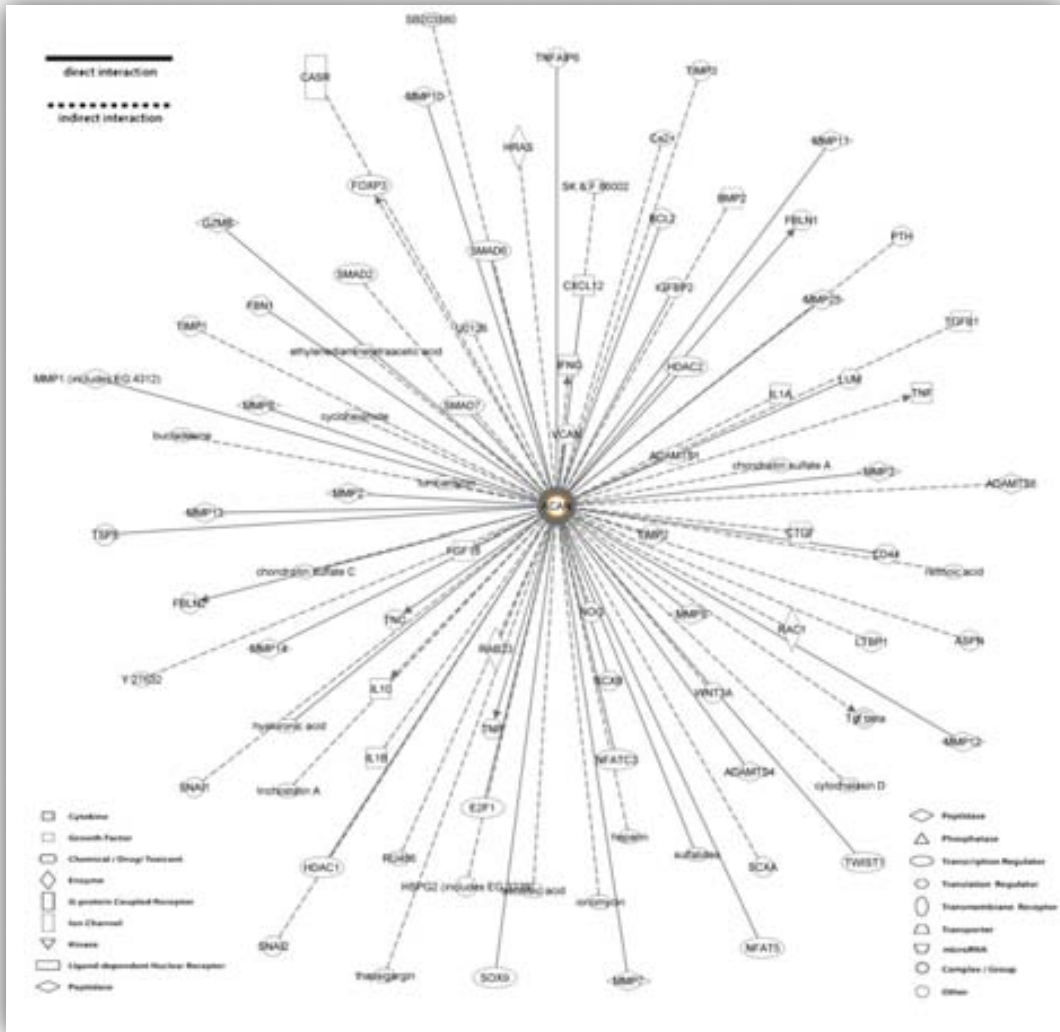
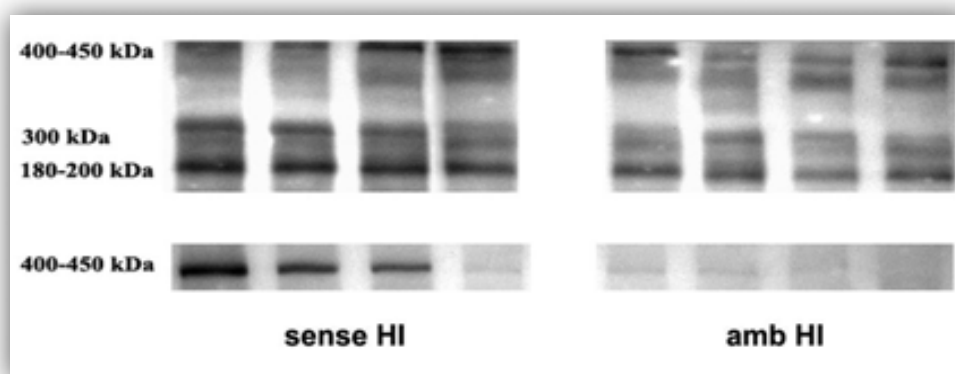


Figura R25. Molècules que interaccionen amb l'AGC1 (ACAN).

## 5.- Reelina.

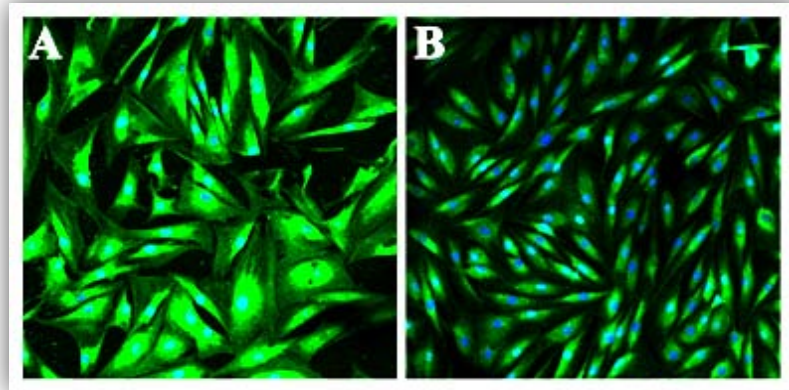
Es va seleccionar la reelina (RELN) com a molècula diferencialment expressada en els fibroblasts procedents de múscul esquelètic de pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI. Aquesta molècula s'ha observat que està estretament lligada amb l'adhesió cel·lular, formant part dels complexos focals. Es va seleccionar aquesta molècula perquè podria tenir alguna relació amb la pèrdua del contacte cèl·lula-matriu observada en el primer capítol. A més, en el grup s'ha observat que els fibroblasts de pacients amb HI presenten menor adhesió que els de pacients sense HI (341).

Aquesta molècula se secreta al medi cel·lular, però també es pot trobar a l'interior cel·lular. Per això, la RELN es va detectar tant en el medi cel·lular com en l'extracte proteic.. En el medi cel·lular (Figura R26, imatge superior) es van detectar 3 fraccions de RELN descrites: una a 180-200 kDa (FC = 1.4 vegades menys en HI;  $p = 0.006$ ), una a 300 kDa (FC = 1.6 vegades menys en HI;  $p = 0.049$ ) i una a 400-450 kDa (sense diferències estadístiques). En l'extracte cel·lular només es va detectar la fracció de 400-450 kDa, que es trobava 5.2 vegades menys quantitat ( $p = 0.01$ ) en fibroblasts de múscul esquelètic de pacients amb HI que en els de pacients sense HI (Figura R26, imatge inferior).



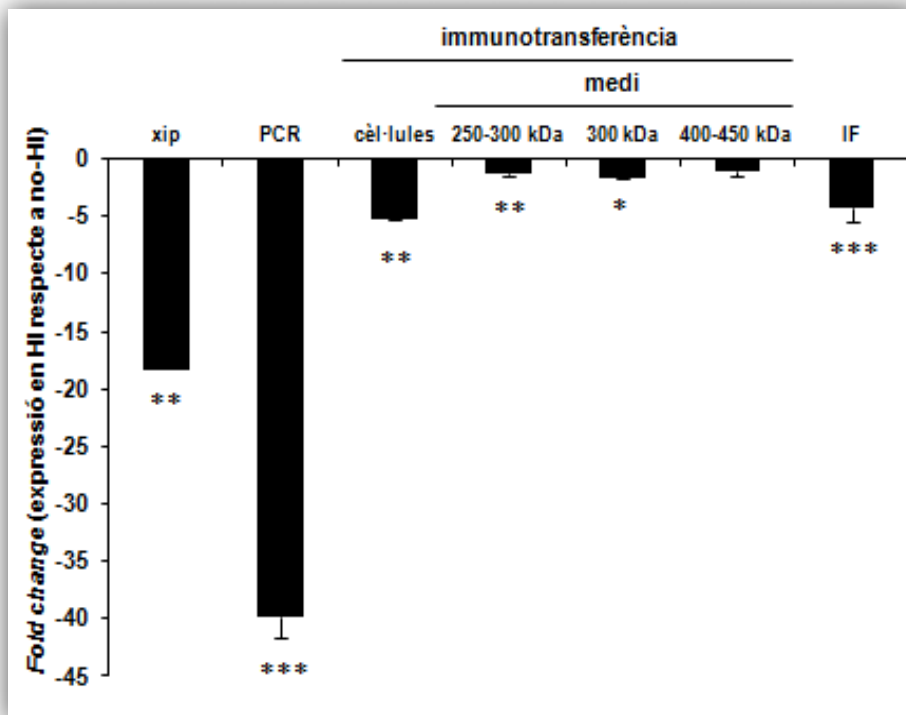
**Figura R26.** Immunotransferències de RELN en el medi cel·lular (imatge superior) i en l'extracte cel·lular (imatge inferior) dels fibroblasts procedents de múscul esquelètic de pacients amb i sense HI.

Per immunofluorescència es va detectar nivells molt similars als detectats per immunotransferència, amb 4.2 vegades menys quantitat ( $p < 0.001$ ) en els fibroblasts procedents de múscul esquelètic de pacients amb HI que en els de pacients sense HI (Figura R27).



**Figura R27.** Immunofluorescència de RELN en els fibroblasts procedents de múscul esquelètic de pacients sense (A) i amb (B) HI (20x).

Tots els resultats, tant d'expressió gènica (xip i PCR en temps real) com de nivells proteics (immunotransferència i immunofluorescència), demostren una menor quantitat de RELN en els fibroblasts procedents del múscul esquelètic dels pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI (Figura R28).

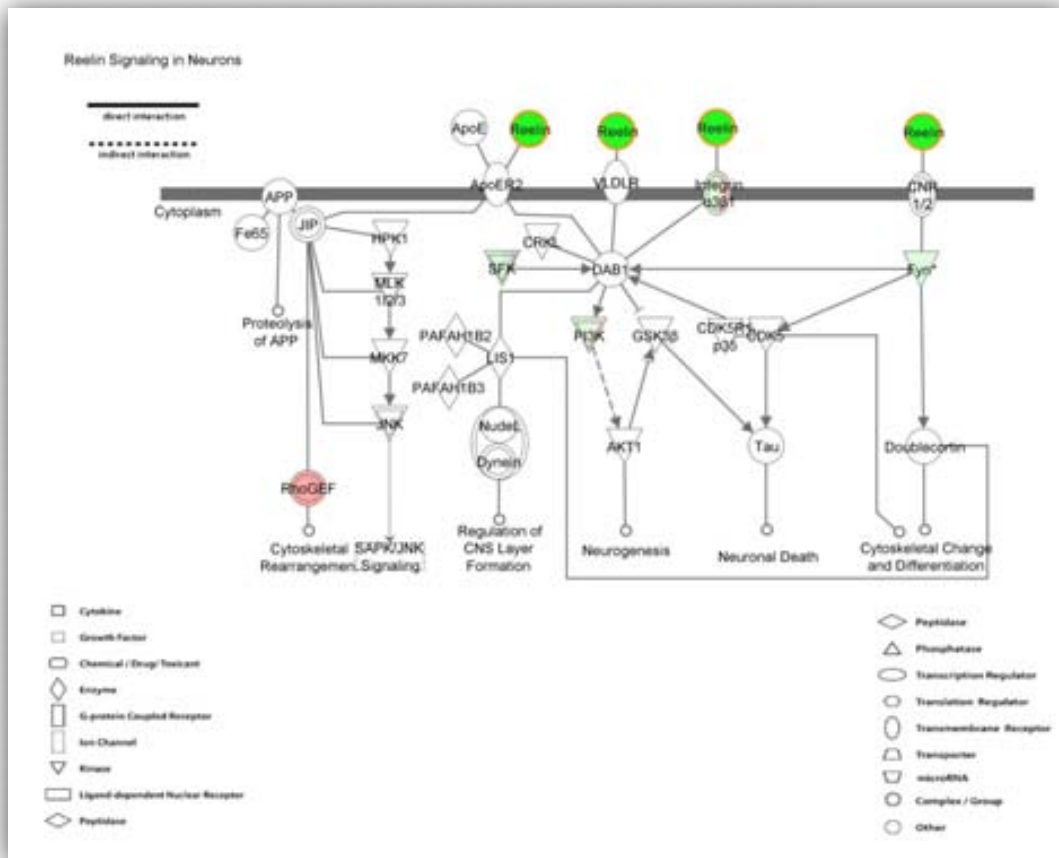


**Figura R28.** *Fold Change* (FC) de RELN dels fibroblasts del múscul esquelètic de pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI en les diferents tècniques utilitzades. IF = Immunofluorescència





nou, l'aparició d'aquestes rutes depenen d'una puntuació que s'atorga en funció del nombre de gens de la ruta i del nombre de gens identificats a partir del xip d'expressió gènica. En una de les rutes de la base de dades de l'IPA (Senyalització de Reelina en neurones) es va observar com alguns dels components d'aquesta ruta es trobaven alterats. (Figura R30).



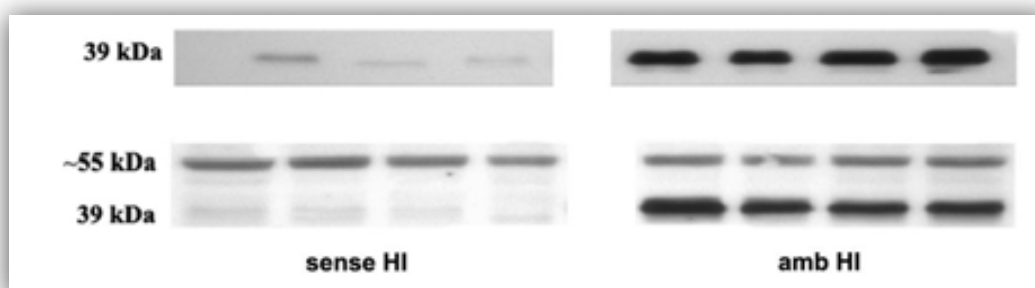
**Figura R30.** Ruta de senyalització de RELN en neurones, que regula alguns processos cel·lulars importants, com l'assemblatge i la diferenciació del citoesquelet. En vermell s'hi veuen els gens sobre-expressats i en verd els gens infra-expressats en comparació amb els fibroblasts de pacients sense HI. La intensitat del color correlaciona amb el grau d'expressió.

## 6.- Chitinase 3-like 1.

La chitinase 3-like 1 (CHI3L1) es va seleccionar com a molècula diferencialment expressada en els fibroblasts de l'aponeurosi dels pacients amb HI. En aquest treball, s'ha trobat una associació entre una desregulació en el metabolisme de la MEC i els nivells de molècules pro-inflamatòries. La CHI3L1 es va seleccionar perquè, a més

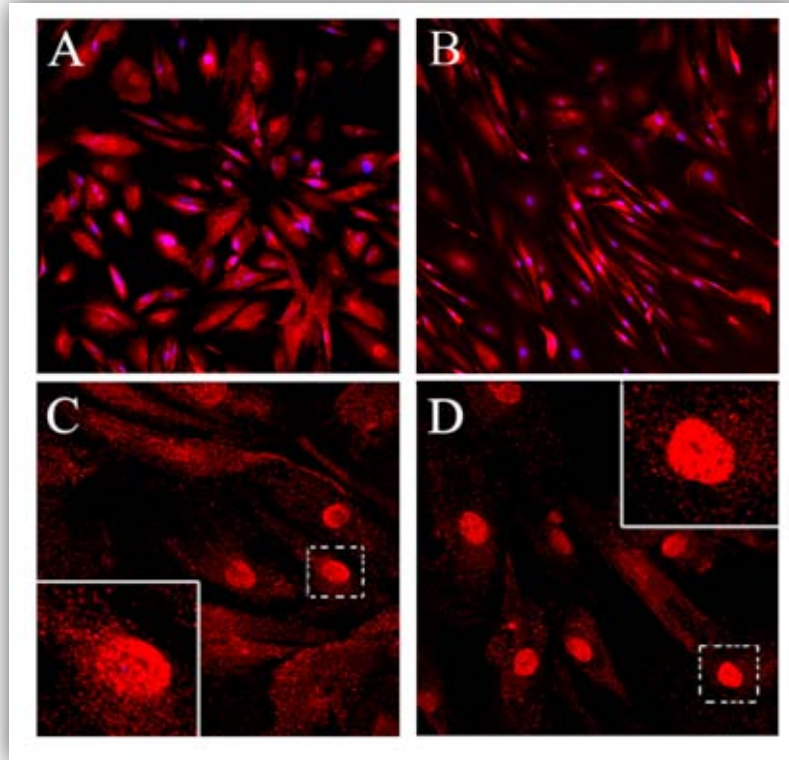
d'expressar-se en nivells alts en els fibroblasts de pacients amb HI, està estretament relacionada amb processos inflamatoris i està regulada per molècules inflammatòries.

La CHI3L1 és una proteïna de 39 kDa que se secreta i, per això, es va analitzar en recollir el medi cel·lular i en l'extracte proteic. En el medi cel·lular, es va detectar fins a 29.5 vegades ( $p < 0.001$ ) més en els fibroblasts procedents d'aponeurosi de pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI (Figura R31, imatge superior). De forma similar, en l'extracte cel·lular se'n va detectar fins a 22.4 vegades ( $p < 0.001$ ) més en els fibroblasts procedents d'aponeurosi de pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI. A més, en l'extracte cel·lular es va detectar una proteïna immunoreactiva a uns 55 kDa, sense presentar diferències entre els fibroblasts de pacients amb HI respecte als de pacients sense HI (Figura R31, imatge inferior).



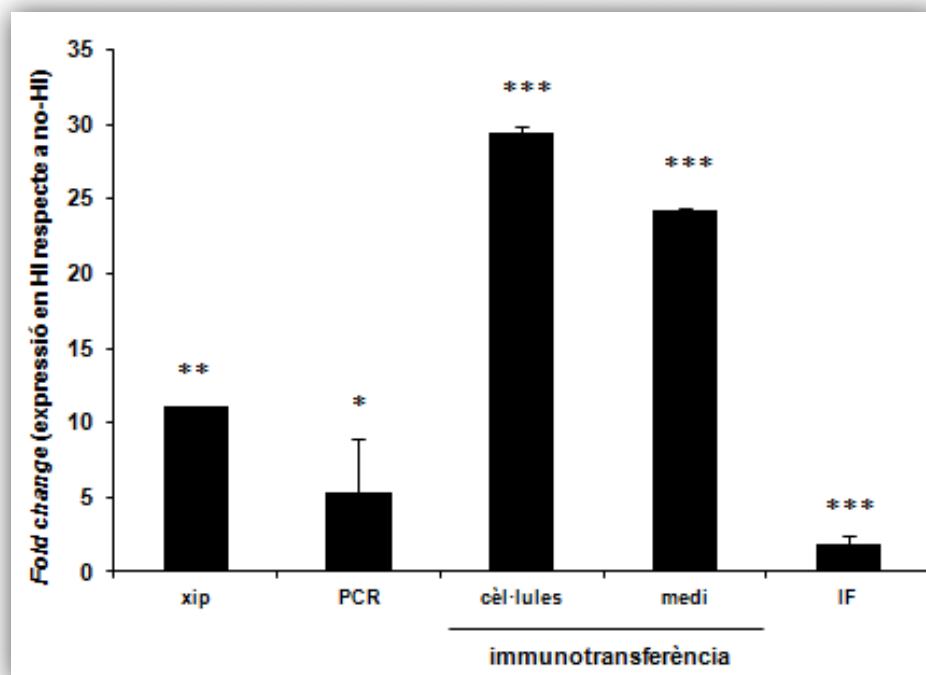
**Figura R31.** Immunotransferències de CHI3L1 en el medi cel·lular (imatge superior) i en l'extracte cel·lular (imatge inferior) dels fibroblasts procedents d'aponeurosi de pacients amb i sense HI.

L'anticòs emprat per immunotransferència no va ser útil per immunofluorescència i se'n va utilitzar un altre. Aquest va resultar no donar tantes diferències en immunofluorescència ( $FC = 1.89$ ,  $p < 0.001$ ), però va revelar la presència de CHI3L1 en els nuclis dels fibroblasts primaris procedents d'aponeurosi, tant de pacients amb HI com de pacients sense HI (Figura R32).



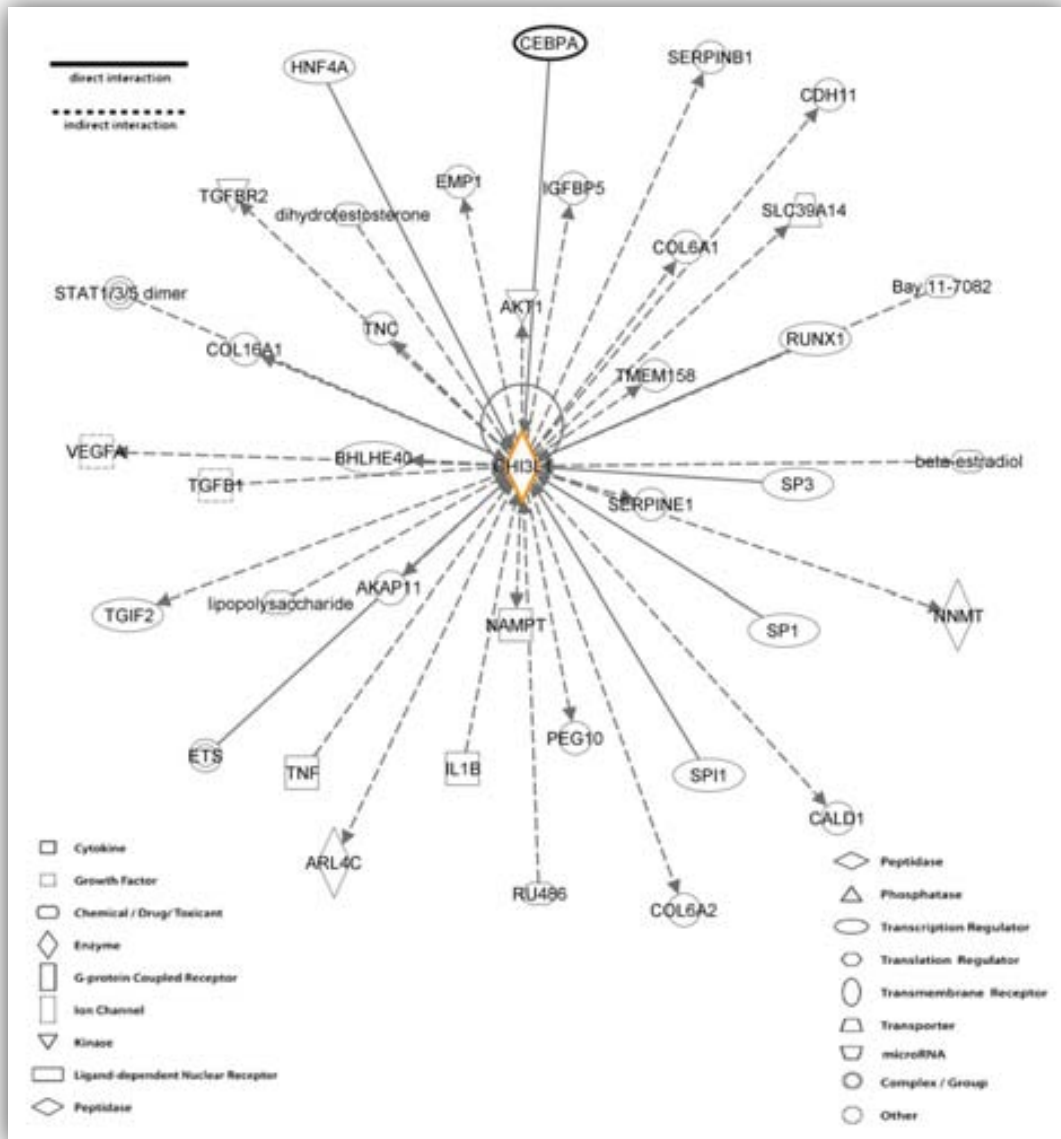
**Figura R32.** Immunofluorescència de CHI3L1 en els fibroblasts de pacients sense (A) i amb (B) HI (20x). Les imatges magnificades (60x) mostren senyal de CHI3L1 en el nucli dels pacients sense (C) i amb (D) HI. Es va realitzar una ampliació de la imatge, en els requadres, per facilitar-ne la visió.

Tots els resultats, tant d'expressió gènica (xip i PCR en temps real) com de nivells proteics (immunotransferència i immunofluorescència), demostren una major quantitat de CHI3L1 en els fibroblasts procedents de l'aponeurosi dels pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI (Figura R33).



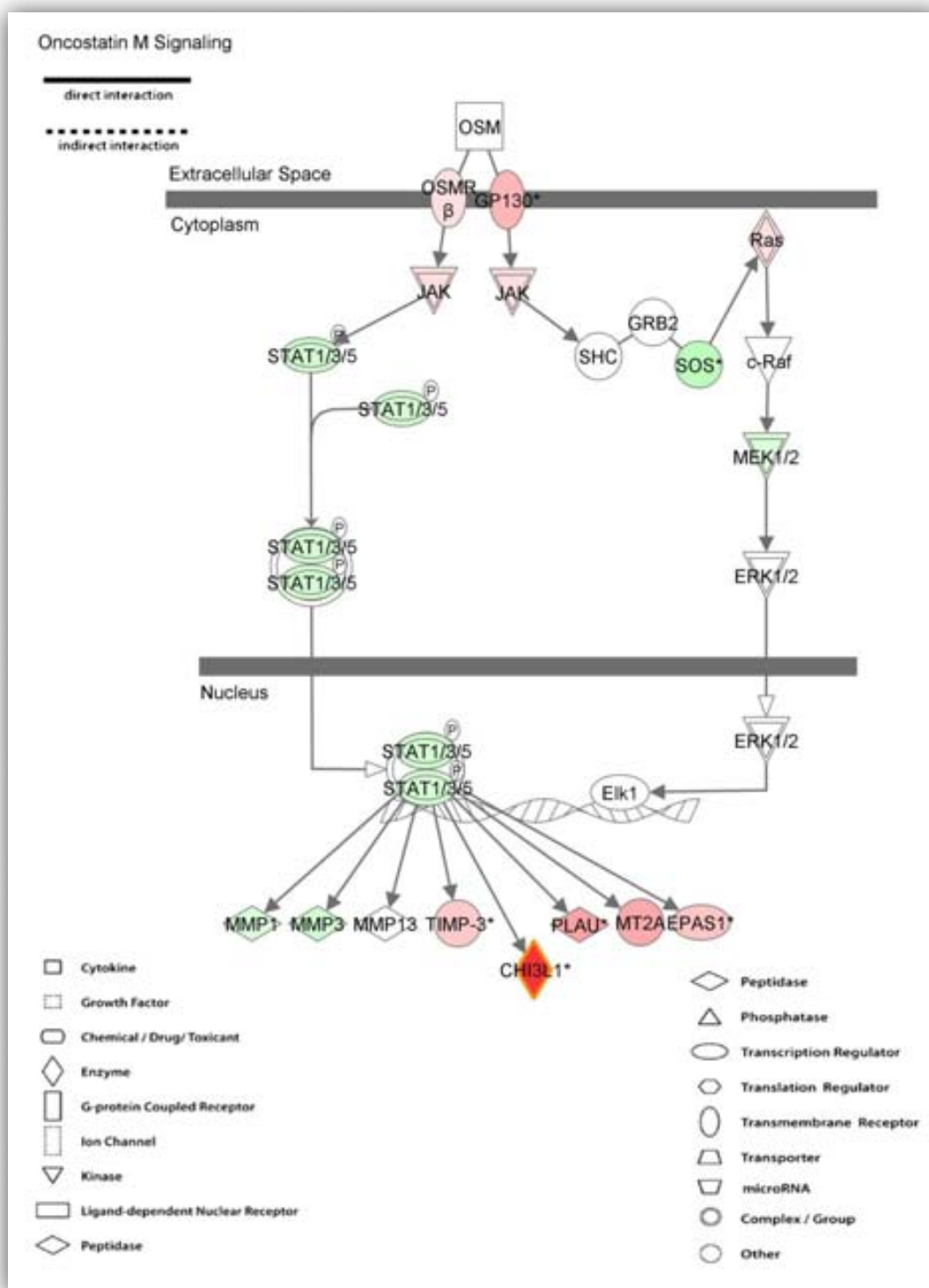
**Figura R33.** *Fold Change* (FC) de CHI3L1 dels fibroblasts de l'aponeurosi de pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI en les diferents tècniques utilitzades. IF = Immunofluorescència.

L'anàlisi d'aquesta molècula mitjançant l'eina bioinformàtica IPA va revelar un conjunt de molècules que interaccionen directa o indirectament amb la CHI3L1. Entre totes aquestes molècules, és d'especial interès la presència de TNF- $\alpha$ , el TGF- $\beta$  o alguns col·làgens, així com alguns factors de transcripció com SP1, SP3 o Runx1 (Figura R34).



**Figura R34.** Molècules que interaccionen amb la CHI3L1.

A més, en una de les rutes de la base de dades de l'IPA (Senyalització de Oncostatin M) es va observar com alguns dels components de la ruta de regulació de l'expressió de la CHI3L1 es trobaven alterats. A més, mitjançant aquesta ruta, es va observar també que la regulació de l'expressió de CHI3L1 és paral·lela a la regulació de l'expressió de MMPs com la MMP1, MMP3 i MMP13, a més de la TIMP3 (Figura R35).



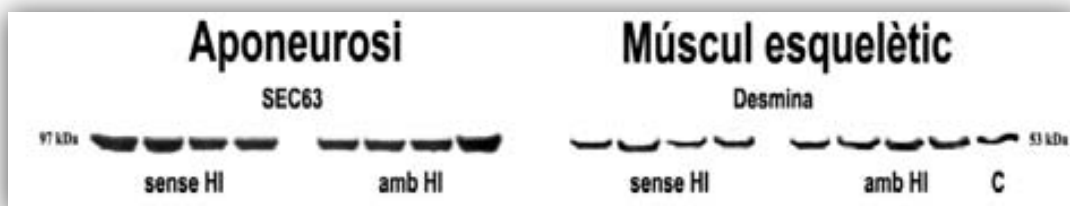
**Figura R35.** Ruta de senyalització de Oncostatin M que regula l'expressió de CHI3L1 i altres molècules d'interès com les MMP1, MMP3, MMP13 i TIMP3. En vermell s'hi veuen els gens sobre-expressats i en verd els gens infra-expressats en comparació amb els fibroblasts de pacients sense HI. La intensitat del color correlaciona amb el grau d'expressió.

## 7.- Nous controls endògens per als fibroblasts procedents d'aponeurosi i múscul esquelètic.

Mitjançant els resultats obtinguts en el xip, es van trobar un seguit de gens que no presentaven diferències entre els pacients amb i sense HI i que, per tant, podien ser utilitzats com a controls endògens en altres tècniques.

Entre els gens obtinguts, es van seleccionar dos gens per aponeurosi (SEC63 i SLC39A8) i dos gens per múscul esquelètic (DES i SGMS2) que es van comprovar per PCR en temps real (Taula R14). Es van obtenir els mateixos resultats que en el xip, sense trobar diferències en l'expressió entre els pacients amb i sense HI. D'aquesta manera, es va considerar que aquests gens es podien utilitzar com a controls endògens, i es van utilitzar per relativitzar els resultats dels altres gens comprovats per PCR en temps real.

A més, al nivell proteic es va comprovar si hi havia diferències en una d'aquestes molècules per aponeurosi (SEC63) i una per múscul esquelètic (DES). La proteïna SEC63 (homòleg de la mateixa proteïna en llevat), és una proteïna transportadora de la membrana del reticle endoplasmàtic que es va detectar en l'extracte proteic dels fibroblasts procedents d'aponeurosi (Figura R36, imatge esquerra) sense obtenir diferències entre els de pacients amb i sense HI. La proteïna DES (Desmina) és un filament intermedi específic del múscul que es va detectar en l'extracte proteic dels fibroblasts procedents de múscul esquelètic (Figura 36, imatge dreta) sense obtenir diferències entre els de pacients amb i sense HI.



**Figura R36.** Immunotransferències de SEC63 i de Desmina en l'extracte cel·lular dels fibroblasts procedents d'aponeurosi (esquerra) i de múscul esquelètic (dreta), respectivament, de pacients amb i sense HI.

Tots els resultats, tant d'expressió gènica (xip i PCR en temps real) com de nivells proteics (immunotransferències), demostren que els gens SEC63 en els fibroblasts

procedents d'aponeurosi i DES en els fibroblasts procedents de múscul esquelètic no presenten diferències entre els pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI, de manera que poden ser considerats com a controls endògens. Els resultats de les diferents immunotransferències van ser relativitzats respecte a aquests controls endògens.



**CAPÍTOL III: INFLUÈNCIA DEL POLIPROPILÈ EN LES  
PROPIETATS CEL·LULARS DELS FIBROBLASTS DE  
FÀSCIA EN L'HÈRNIA INCISIONAL HUMANA**



El tractament més comú per a la HI és l'ús de malles quirúrgiques que fan de reforç per al teixit operat, de manera que es pot tancar la sutura sense tensió i es millora la cicatrització. De tota manera, l'ús de malles sembla que només retarda l'aparició de la HI i les taxes de recidiva segueixen essent elevades. Per això, s'està estudiant en millorar l'estructura o la composició de les malles per millorar la seva integració en l'hoste. L'estudi mitjançant animals d'experimentació permet l'anàlisi d'aquestes noves modificacions, però el model animal es induït i no reflecteix el curs natural de la HI. La interacció entre les cèl·lules i els biomaterials resulta una alternativa interessant que pot posar de manifest moltes rutes que identifiquin com es dona aquesta interacció i què es pot millorar per tal d'afavorir la integració tissular.

En aquest capítol es van obtenir fibroblasts de pacients amb i sense HI, provinents de múscul esquelètic i aponeurosi. Es va estudiar el comportament d'aquests fibroblasts, mitjançant l'anàlisi de l'adhesió, la morfologia, la proliferació i l'apoptosi; i es van relacionar amb les propietats físiques del biomaterial per tal d'establir un model *in vitro* per a l'estudi de noves malles quirúrgiques. A més, l'ús de fibroblasts de pacients amb HI podria donar indicis sobre quines rutes de modificació es podrien seguir.

### **1.- Pacients.**

Per a aquest capítol es van utilitzar fibroblasts primaris procedents de l'aponeurosi de 5 pacients amb HI i de 5 pacients sense HI. Les mostres de pacients sense HI es van obtenir de donants voluntaris provinents de cirurgia abdominal digestiva, de tumors de colon i recte.

En la Taula R15 s'observen les característiques dels pacients seleccionats per aquest estudi i a partir dels quals es van obtenir els fibroblasts primaris. Tant l'edat com el sexe i les comorbiditats no són estadísticament diferents entre els pacients amb i

sense HI i, per tant, es pot considerar que aquests factors no influeixen en els resultats de l'estudi.

Variable	Pacients amb HI	Pacients control sense HI	valor <i>p</i>
Edat ± SEM (rang)	65 ± 7 (39-79)	64 ± 9 (34-86)	0.47
Sexe masculí	2	3	1.00
Fumadors	1	0	1.00
Alcohòlics	1	1	1.00
Obesitat (índex de massa corporal ≥ 29)	1	0	1.00
Diabetis	0	0	1.00
Hiperlipidèmia	1	0	1.00

**Taula R15.** Característiques dels pacients inclosos en l'estudi.

Tots els pacients amb HI la van desenvolupar com a conseqüència d'una operació prèvia i, per tant, cap va ser espontània. A més, les mostres es van recollir quan els pacients van ser tractats en la seva primera HI i, per tant, no hi havia presència de malla quirúrgica.

## 2.- Propietats físiques del biomaterial.

Es van mesurar, com a propietats físiques que poden influir en el comportament cel·lular a sobre d'un material, la topografia (per interferometria) i l'energia lliure de superfície o absorbibilitat (per mesura de l'angle de contacte).

### 2.1.- Topografia.

Com a factors de rugositat superficial més importants, es va observar que el polipropilè tenia una rugositat mitja (Ra) d'unes 45 vegades més que el poliestirè ( $p < 0.001$ ; Taula R16), mentre que la distància entre els pics (Rt) era unes 25 vegades superior en el polipropilè ( $p < 0.001$ ). El valor promig dels pics analitzats va ser unes 44 vegades més gran en el polipropilè que en el poliestirè ( $p < 0.001$ ).

Material	$R_a$	$R_q$	$R_z$	$R_t$
Polipropilè	$1.096 \pm 0.050$	$1.393 \pm 0.050$	$14.979 \pm 0.794$	$23.251 \pm 1.929$
Poliestirè	$0.024 \pm 0.002$	$0.032 \pm 0.002$	$0.580 \pm 0.022$	$0.988 \pm 0.041$

**Taula R16.** Paràmetres de rugositat superficial ( $\mu\text{m}$ ) en termes de  $R_a$  (rugositat mitja),  $R_q$  (desviació quadràtica de la rugositat mitja),  $R_z$  (valor promig dels pics) i  $R_t$  (màxima distància entre els pics i les valls) de les malles de polipropilè i el poliestirè.

## 2.2.- Angle de contacte i energia lliure de superfície.

L'energia lliure de superfície de la malla de polipropilè es va obtenir a partir dels angles de contacte de 4 líquids: aigua, etilen glicol, formamida, (líquids polars amb diferents tensions superficials; Taula M14) i diiodometà (líquid no polar).

Es va observar que tots els angles de contacte eren majors en la malla de polipropilè que en el poliestirè (gairebé el doble; tots amb  $p < 0.001$ ; Taula R17), indicant que la malla és més hidrofòbica que el plàstic. Això es va observar en transformar les dades a energies lliures, veient que el valor de l'energia lliure superficial total de la malla de polipropilè era gairebé la meitat que el del poliestirè. A més, tota l'energia superficial era conseqüència de la component no polar (Lifshitz-van der Waals, LW) en les dues superfícies, tot i que es va observar una component bàsica (donadora d'electrons,  $\gamma^-$ ) només en el poliestirè.

Material	$\theta_{\text{aigua}}$	$\theta_{\text{formamida}}$	$\theta_{\text{diiodometà}}$	$\theta_{\text{etilen glicol}}$
Polipropilè	$116.11 \pm 1.58$	$103.93 \pm 2.22$	$72.49 \pm 1.37$	$77.05 \pm 3.53$
Poliestirè	$61.19 \pm 1.50$	$59.86 \pm 2.09$	$47.89 \pm 2.10$	$58.83 \pm 0.85$

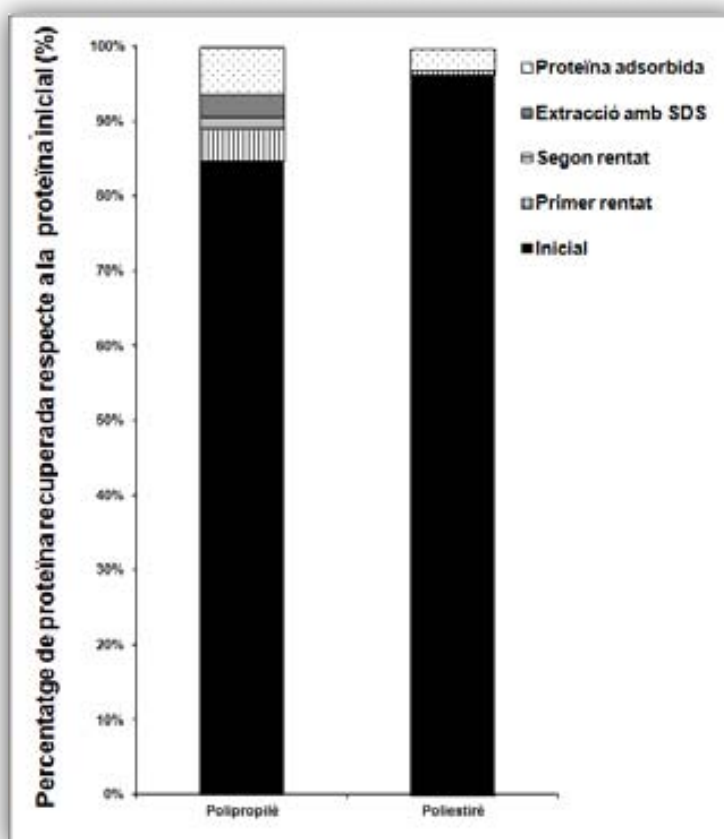
Material	$\gamma_s^{\text{LW}}$	$\gamma_s^{\text{AB}}$	$\gamma_s^+$	$\gamma_s^-$	$\gamma_s$
Polipropilè	19.86	0.00	0.00	0.00	19.86
Poliestirè	35.01	0.00	0.00	17.52	35.01

**Taula R17.** Angles de contacte (en graus) de l'aigua, la formamida, el diiodometà i l'etilen glicol i paràmetres calculats de tensió superficial (en  $\text{mJ/m}^2$ ) del polipropilè i el poliestirè.  $\gamma_s^{\text{LW}}$  = component no polar de Lifshitz-van der Waals;  $\gamma_s^+$  = component àcida (acceptor d'electrons);  $\gamma_s^-$  = component bàsica (donant d'electrons); de l'energia superficial total  $\gamma_s$ .

### 3.- Adsorció de proteïna.

Es va observar que en el poliestirè només es va adsorbir pràcticament un 1% de la proteïna total dipositada. A més, aquesta proteïna s'adsorbia amb interaccions febles, ja que en el primer rentat desapareixia (Figura R37).

En canvi, en el polipropilè es va adsorbir gairebé un 9% de la proteïna inicial incubada. D'aquesta proteïna adsorbida, gairebé un 6% es trobava adsorbida de forma feble (4.15% es va quantificar en el primer rentat amb PBS i 1.67% en el segon rentat) i un 3.03% es trobava adsorbida de forma forta (es va requerir d'extracció amb SDS).

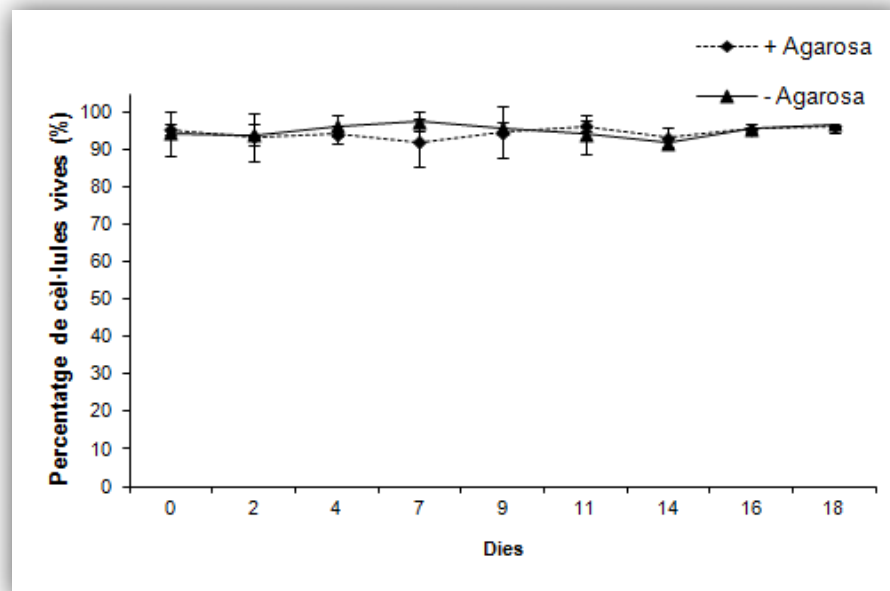


**Figura R37.** Percentatge de proteïna adsorbida de forma feble (primer i segon rentat, amb PBS) i de forma forta (extracció amb SDS) respecte a la proteïna inicial en el poliestirè i el polipropilè.

#### 4.- Toxicitat de l'agarosa.

Per tal que la malla no surés i les cèl·lules no s'adherissin al poliestirè del pou, es va copolimeritzar la malla de polipropilè amb agarosa al 2%. Per comprovar que aquestes condicions no eren tòxiques, es van posar en contacte amb cèl·lules que sobreviuen en suspensió, els monòcits THP-1 (una línia cel·lular procedent de leucèmia humana) durant 20 dies.

Es va observar que no hi havia diferències estadístiques entre la supervivència dels monòcits (per exclusió de *Trypan blue*) en contacte amb l'agarosa i els monòcits sense agarosa al llarg del temps (Figura R38). La supervivència en els dos casos va ser superior al 90% i sense diferències estadístiques entre els dos grups.

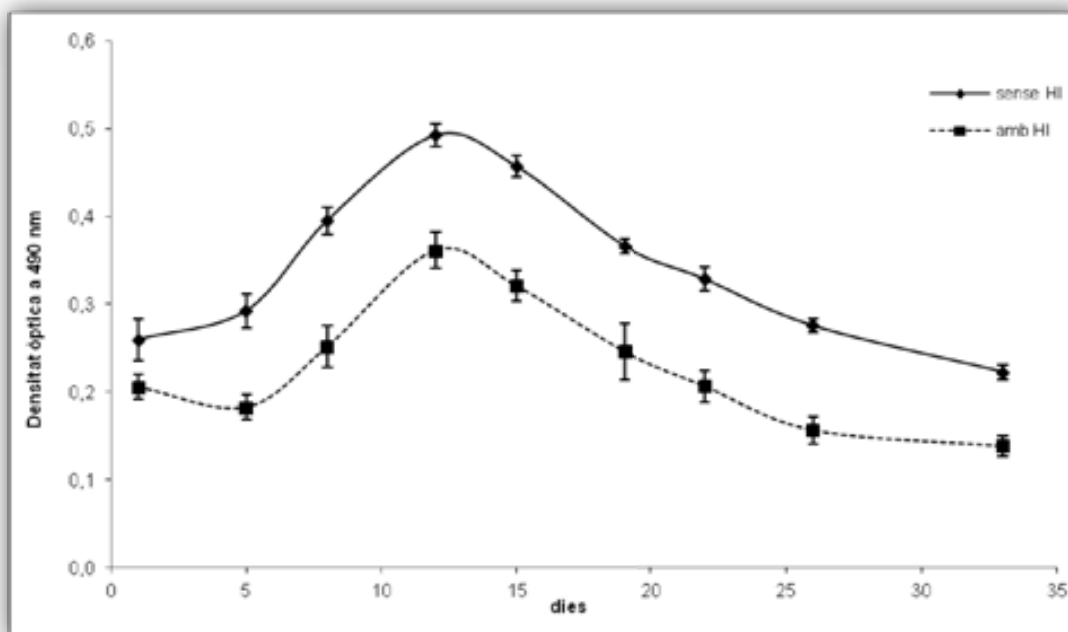


**Figura R38.** Percentatge de viabilitat dels monòcits THP-1 cultivats en presència o absència d'agarosa al 2%.

#### 5.- Disminució del nombre de fibroblasts d'hèrnia.

A l'analitzar el creixement dels fibroblasts d'aponeurosi en contacte amb la malla de polipropilè, es va observar que els fibroblasts procedents de l'aponeurosi de pacients amb HI s'adherien menys a la malla de polipropilè en comparació amb els de pacients sense HI (Figura R39). A més, al llarg del temps sempre hi havia menor nombre de fibroblasts de pacients amb HI que de fibroblasts de pacients sense HI.

Tot i això, es van observar perfils de creixement similars entre els fibroblasts procedents de pacients amb HI i els de pacients sense HI, amb una primera etapa d'adhesió i proliferació fins als 12-13 dies i una segona etapa de mort cel·lular.



**Figura R39.** Creixement dels fibroblasts procedents d'aponeurosi de pacients amb i sense HI en contacte amb la malla de polipropilè.

A partir d'aquesta corba de creixement, es van seleccionar els dies 10 i 30 de cultiu com a representatius per analitzar els diferents paràmetres del comportament cel·lular dels fibroblasts sobre la malla de polipropilè.

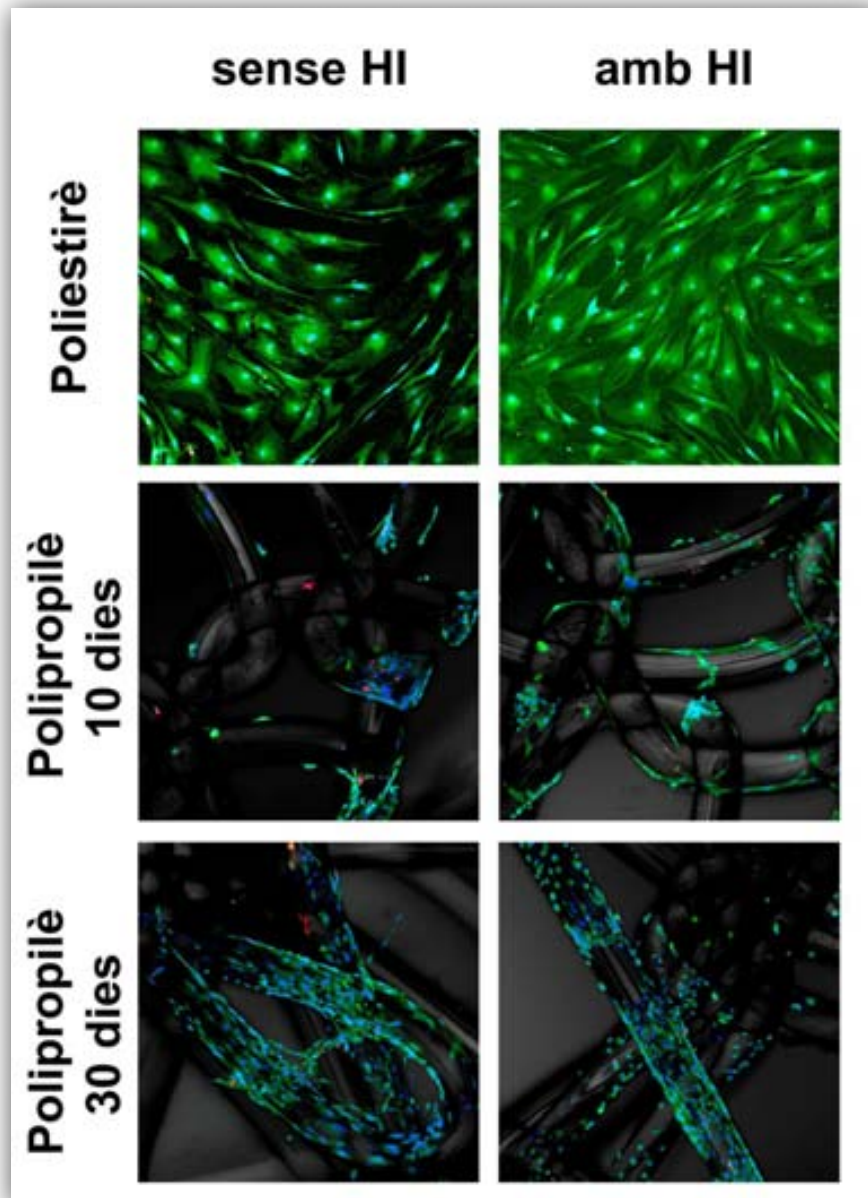
## 6.- Citotoxicitat.

La citotoxicitat es va mesurar mitjançant l'ús de dues molècules fluorescentes: la calceïna (tenyeix en verd el citoplasma de les cèl·lules vives) i el EthD-1 (tenyeix en vermell el nucli de les cèl·lules mortes). Es va calcular un percentatge de mortalitat en quantificar el nombre de cèl·lules mortes (vermelles) respecte al nombre de cèl·lules totals (verdes i vermelles).

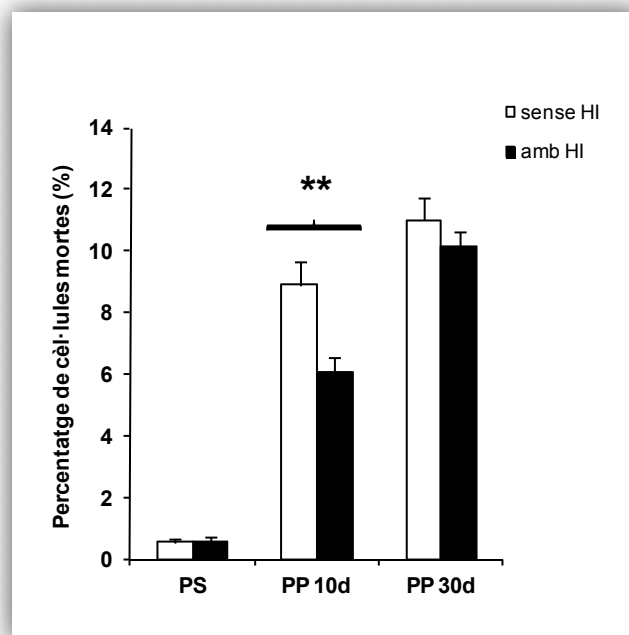
Es va observar que en el poliestirè hi havia un percentatge de mortalitat molt baix en els dos grups (0,6% en pacients amb HI i 0,5% en pacients sense HI; sense



diferències estadístiques; Figura R40 i Figura R41). En canvi, en contacte amb la malla de polipropilè el percentatge de mortalitat augmentava en els dos grups als 10 dies de cultiu (6.1% en pacients amb HI i 8.9% en pacients sense HI; valor  $p = 0.007$ ) i seguia augmentant als 30 dies de cultiu (10.1% en pacients amb HI i 11% en pacients sense HI; sense diferències estadístiques).



**Figura R40.** Imatges de les tincions amb calceïna (verd) i EthD-1 (vermell) als fibroblasts sembrats en poliestirè (10x) o polipropilè (4x). Es va utilitzar DAPI (blau) per tenyir els nuclis de totes les cèl·lules.



**Figura R41.** Percentatge de cèl·lules mortes en el poliestirè (PS) i en el polipropilè (PP). \*\* indica un valor  $p < 0.01$ .

## 7.- Canvis en els perfils de molècules d'adhesió.

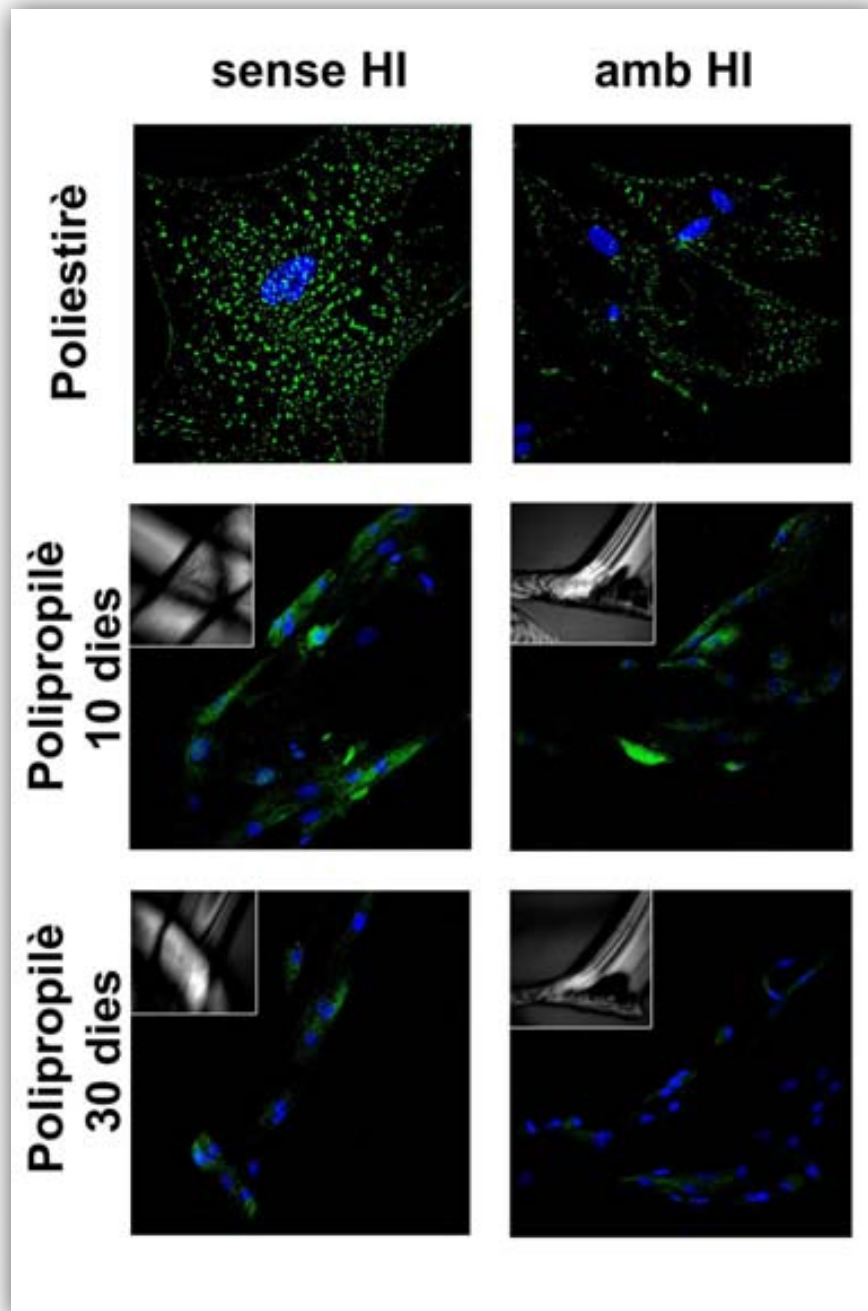
L'adhesió dels fibroblasts a la malla de polipropilè es va mesurar qualitativament mitjançant la immunofluorescència d'algunes de les molècules implicades en el procés.

### 7.1.- Redistribució de la vinculina.

Es va observar que la vinculina, una de les proteïnes més abundants dels punts focals, es localitzava més distribuïda per tot el citoplasma en els fibroblasts d'aponeurosi de pacients sense HI en el poliestirè (Figura R42). En canvi, en els fibroblasts procedents d'aponeurosi de pacients amb HI es localitzava a la perifèria del citoplasma.

En contacte amb la malla de polipropilè, es va observar que la vinculina es distribuïa de manera desorganitzada per tot el citoplasma dels fibroblasts d'aponeurosi, tant de pacients amb HI com de pacients sense HI. Com més temps en contacte amb la

maïlla de polipropilè més desorganitzats es trobaven els punts focals, en ambdós grups de pacients.



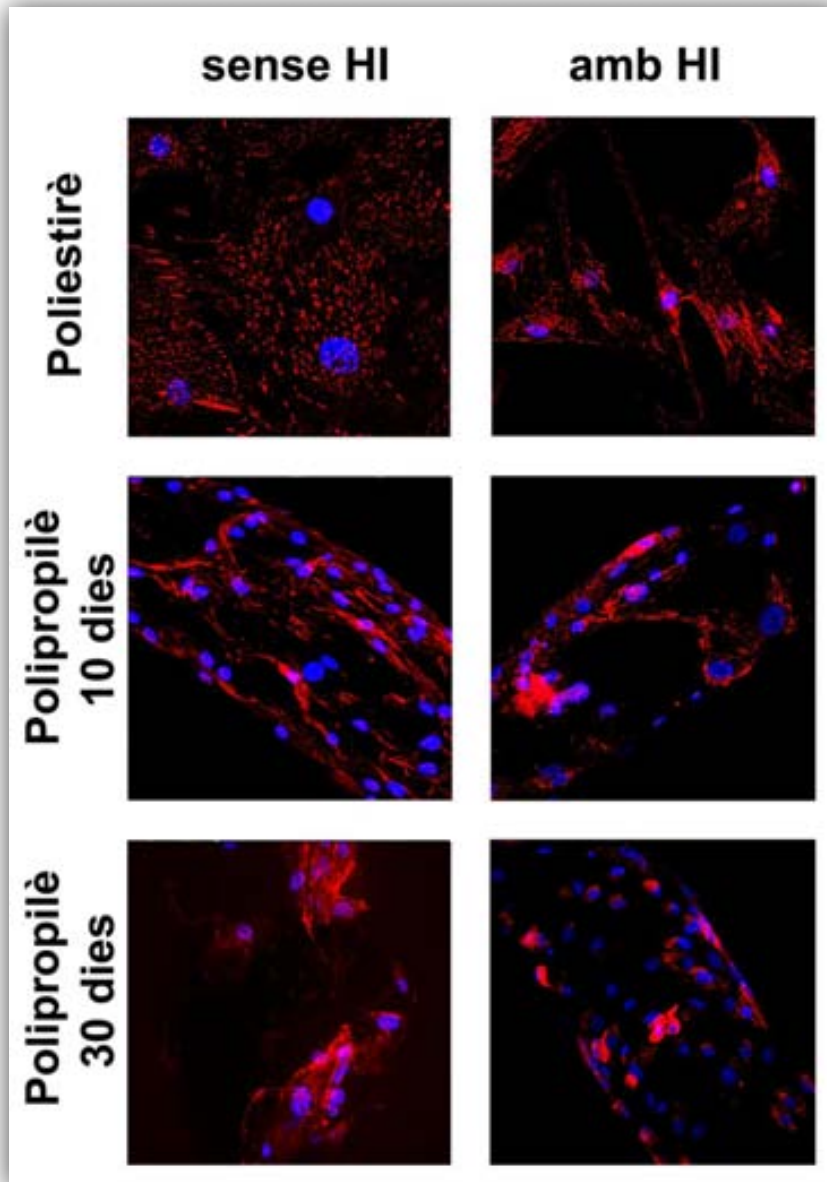
**Figura R42.** Imatges de les tincions per vinculina (verd) i DAPI (blau) als fibroblasts sembrats en poliestirè (60x) i polipropilè (10x). En els requadres es pot observar la imatge en llum transmesa.

## **7.2.- Desaparició de la tensina.**

També es va mesurar qualitativament la presència i distribució de la tensina, una molècula present en un altre tipus d'adhesions focals, anomenades adhesions fibril·lars i relacionades amb la formació de fibres de la MEC.

En el poliestirè, es va observar que hi havia una major distribució de tensina ocupant la major part del citoplasma dels fibroblasts procedents d'aponeurosi de pacients amb HI, de forma similar als resultats obtinguts per la vinculina (Figura R43).

En canvi, en contacte amb la malla de polipropilè es va veure que la tensina desapareixia al llarg del temps, i de manera molt similar entre els dos grups de pacients.



**Figura R43.** Imatges de les tincions per tensina (vermell) i DAPI (blau) als fibroblasts sembrats en poliestirè (40x) i polipropilè (10x).

### 8.- Canvis en molècules del citoesquelet.

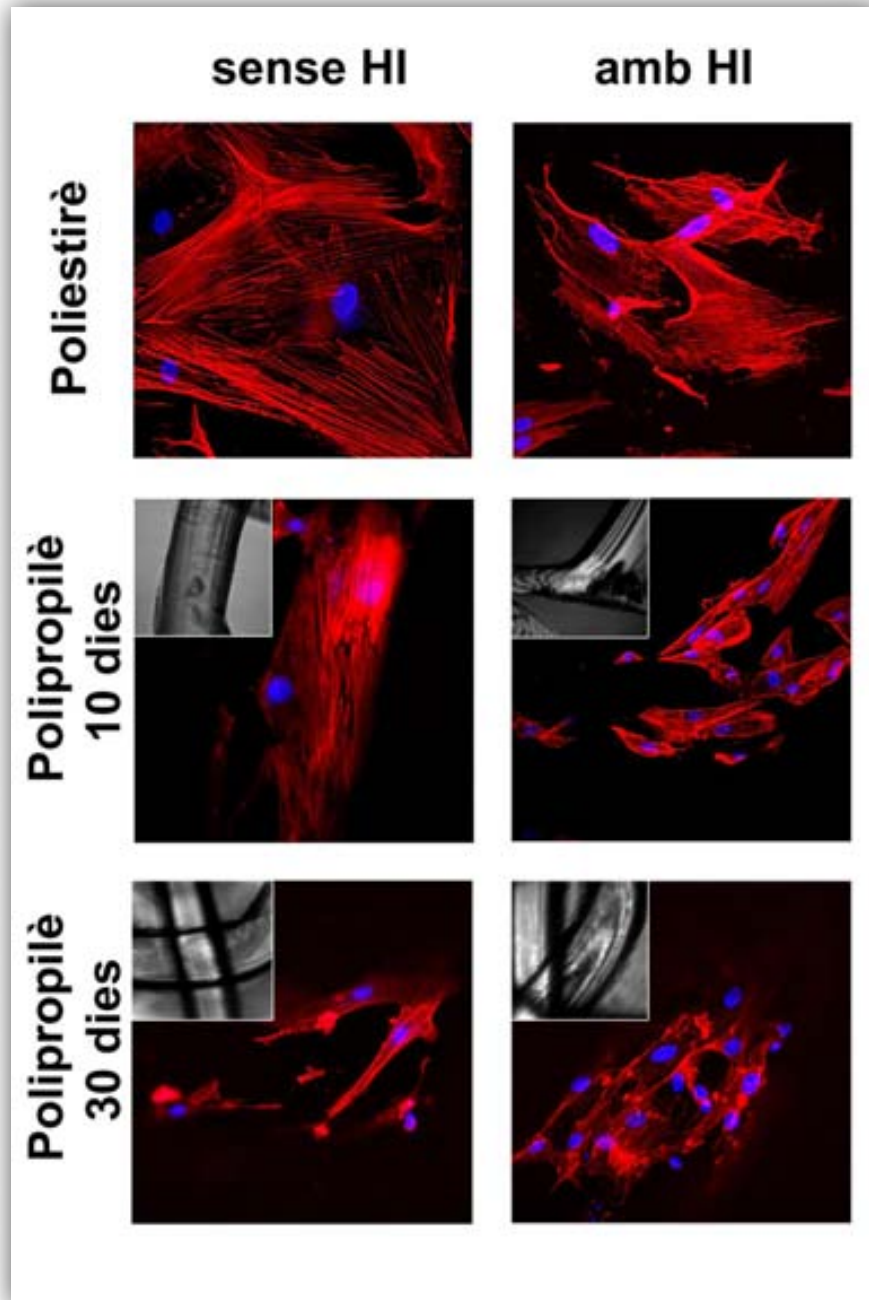
La morfologia cel·lular dels fibroblasts en contacte amb la malla de polipropilè es va determinar mitjançant la detecció per fluorescència de dues molècules molt abundants en el citoesquelet: l'actina i la vimentina. La organització dels filaments del citoesquelet pot donar indicis de la interacció entre la cèl·lula i el biomaterial i de com respon la cèl·lula.

### **8.1.- Reorganització de l'actina.**

Per detectar l'actina es va utilitzar la fal·loïdina, una molècula amb elevada afinitat pels filaments d'actina, marcada amb la molècula fluorescent rodamina (en vermell).

En el poliestirè, els fibroblasts procedents d'aponeurosi de pacients sense HI presentaven uns filaments d'actina molt més ben organitzats en comparació amb els de pacients amb HI, que presentaven una despolimerització dels filaments (Figura R44).

En contacte amb la malla, els filaments d'actina s'orientaven en una mateixa direcció als 10 dies de cultiu en els fibroblasts de pacients amb i sense HI. En canvi, als 30 dies els filaments tendien a la desestructuració en els fibroblasts d'ambdós grups de pacients.



**Figura R44.** Imatges de les tincions per actina (vermell) i DAPI (blau) als fibroblasts sembrats en poliestirè (60x) i polipropilè (10x). En els requadres es pot observar les imatges en llum transmesa.

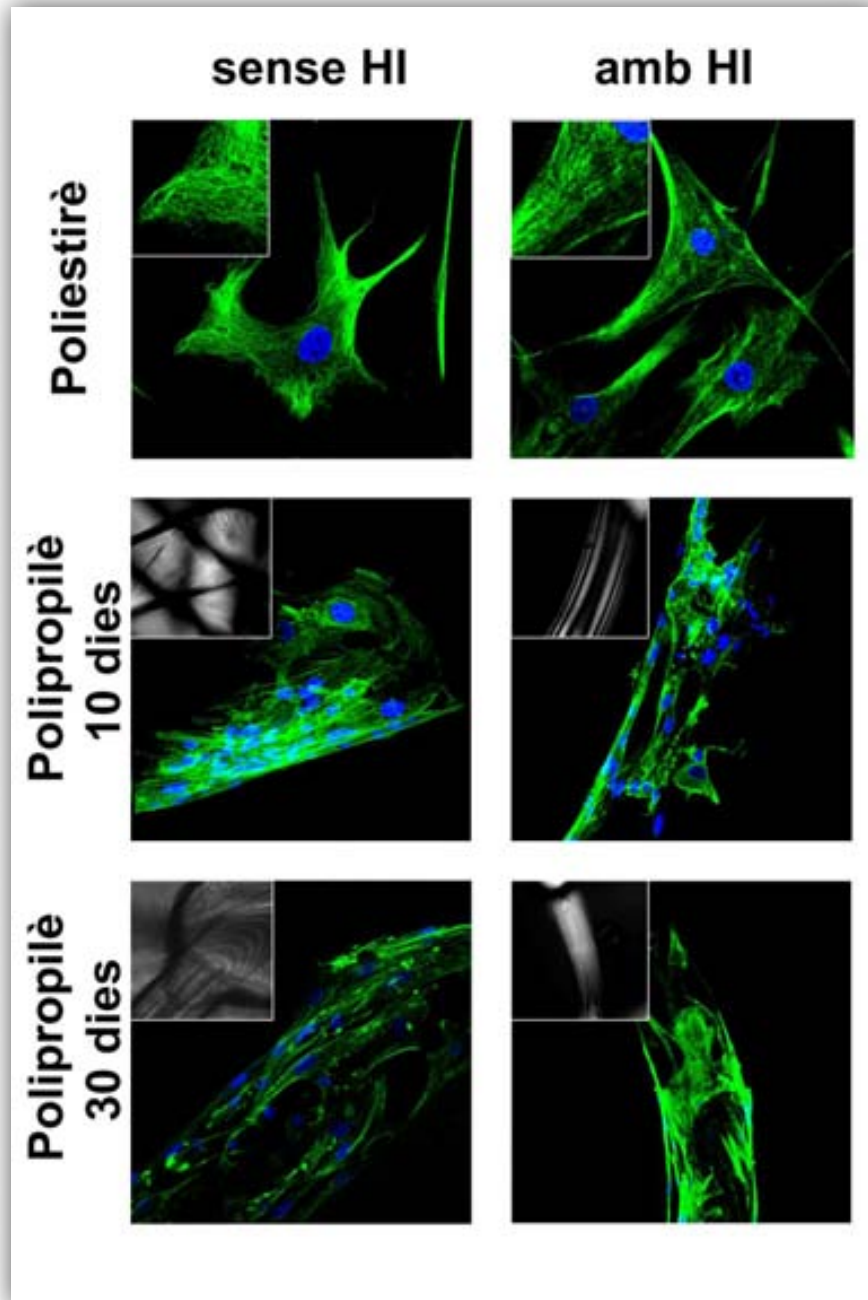
## **8.2.- Reorganització de la vimentina.**

La vimentina és un marcador específic de fibroblasts que forma part del citoesquelet. La seva distribució i organització al citoplasma es va observar mitjançant immunofluorescència.

En el poliestirè, es van observar resultats molt similars als de l'actina, amb una millor organització dels filaments de vimentina en els fibroblasts de pacients sense HI, en comparació amb la desestructuració en els fibroblasts de pacients amb HI (Figura R45, requadres amb ampliació).

En canvi, en contacte amb la malla de polipropilè es va observar una desorganització dels filaments de vimentina al llarg del temps tant en els fibroblasts de pacients amb i sense HI.



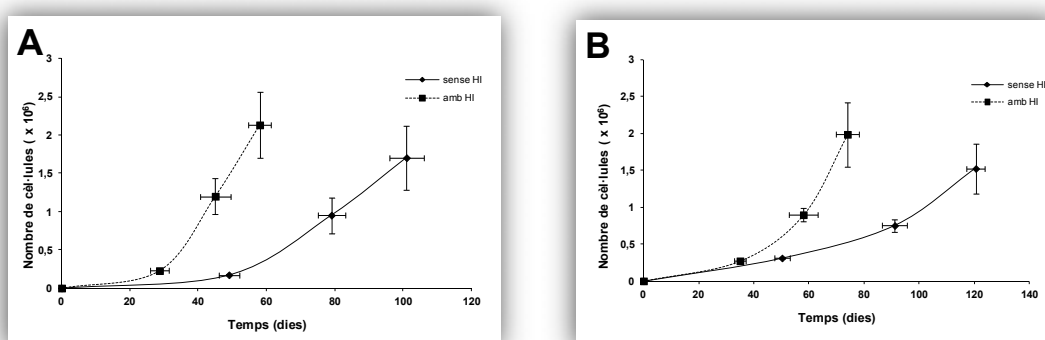


**Figura R45.** Imatges de les tincions per vimentina (verd) i DAPI (blau) als fibroblasts sembrats en poliestirè (40x) i polipropilè (10x). En els requadres de les imatges en poliestirè s'observa una ampliació per visualitzar l'organització dels filaments de vimentina en els pacients sense HI. En els requadres de les imatges amb poliestirè s'observa les imatges en llum transmesa.

## 9.- Disminució en la proliferació dels fibroblasts.

La proliferació es va mesurar mitjançant la incorporació de BrdU en el DNA de les cèl·lules en divisió. Es va calcular el percentatge de cèl·lules en divisió en quantificar el nombre de cèl·lules positives per BrdU (en verd, transformat a vermell per tenir millor contrast) respecte al nombre de cèl·lules totals tenyides amb DAPI (en blau, els nuclis).

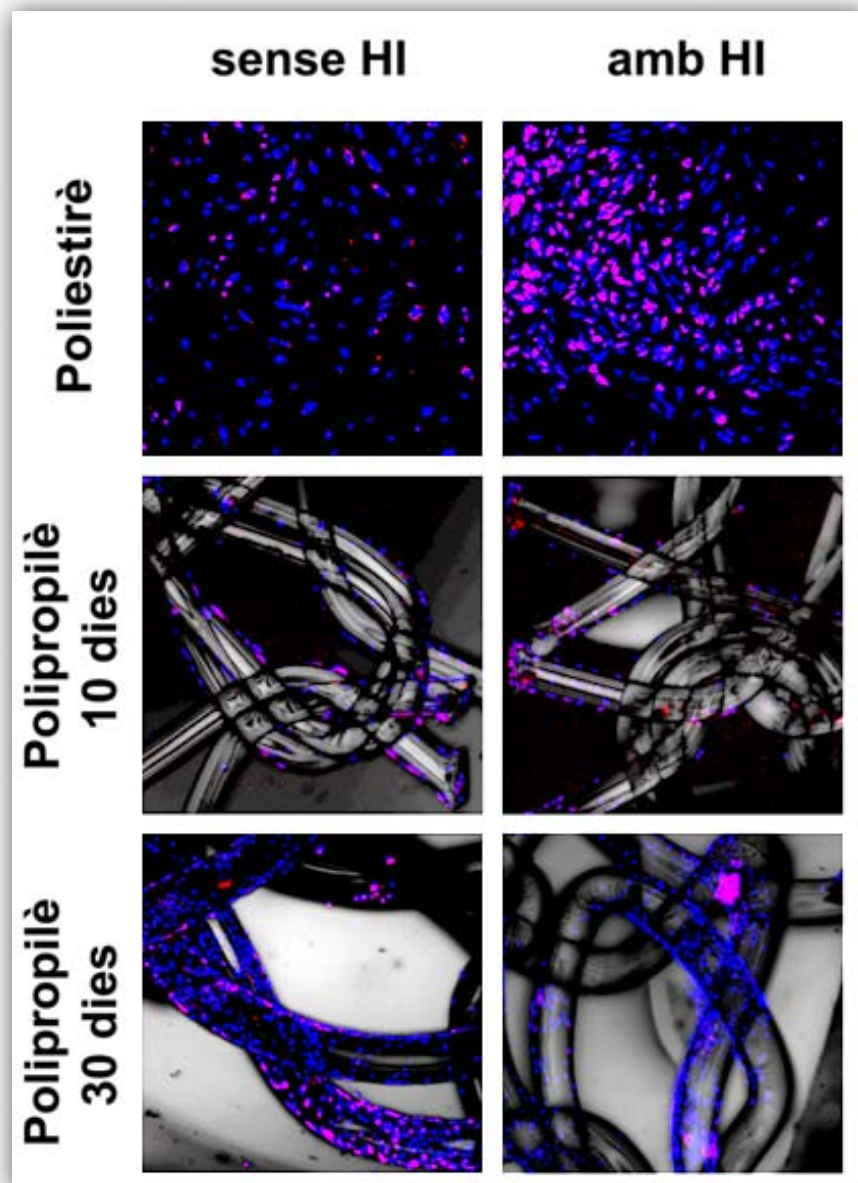
En el poliestirè, es va observar que els fibroblasts procedents de l'aponeurosi de pacients amb HI presenten un percentatge de proliferació 3 vegades superior al dels fibroblasts de pacients sense HI (28.4% i 9.5%, respectivament; valor  $p < 0.001$ ). Aquest resultat ja s'havia observat en veure que els fibroblasts de pacients amb HI (tant de múscul esquelètic com d'aponeurosi) apareixien abans en el cultiu cel·lular i els passis també es realitzaven abans. Per tant, el nombre de duplicacions era superior en els fibroblasts primaris de pacients amb HI (Figura R46).



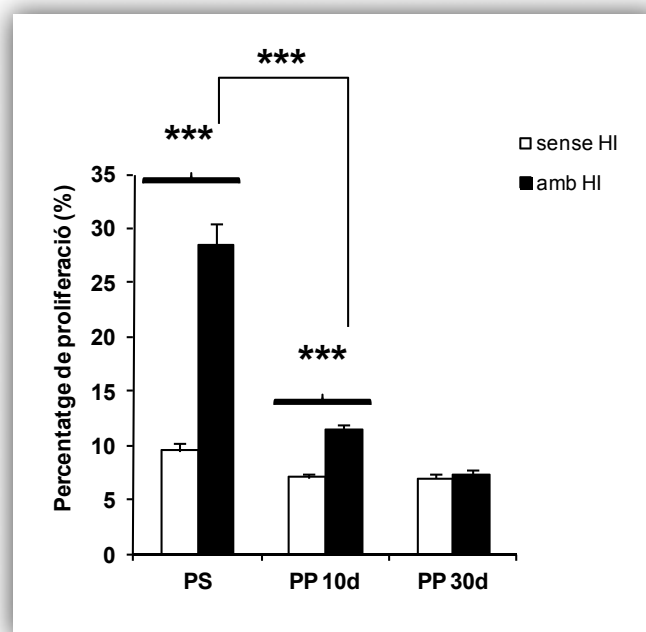
**Figura R46.** Perfil de creixement dels fibroblasts procedents d'aponeurosi (A) i de múscul esquelètic (B) durant els tres primers passis després de l'extracció a partir de la biòpsia.

Aquesta diferència desapareixia en contacte amb la malla al llarg del temps. Als 10 dies, la proliferació en els fibroblasts procedents d'aponeurosi de pacients amb HI va disminuir des del 28.4% fins a l'11.5% (valor  $p < 0.001$ ; Figura R47 i Figura R48), quedant una diferència de 1.6 vegades més proliferació respecte als fibroblasts d'aponeurosi de pacients sense HI (valor  $p < 0.001$ ). Als 30 dies, la proliferació en els fibroblasts procedents d'aponeurosi de pacients amb HI només va disminuir fins al 10.2%, sense diferències estadístiques amb els de pacients sense HI. Al llarg del temps, la proliferació pràcticament no va disminuir en els fibroblasts procedents

d'aponeurosi de pacients sense HI en contacte amb la malla (9.5% en PS, 7.1% en PP a 10 dies i 6.9% en PP 30 dies).



**Figura R47.** Imatges de les tincions per BrdU (transformat a vermell per contrastar) i DAPI (blau) als fibroblasts sembrats en poliestirè o polipropilè (4x).



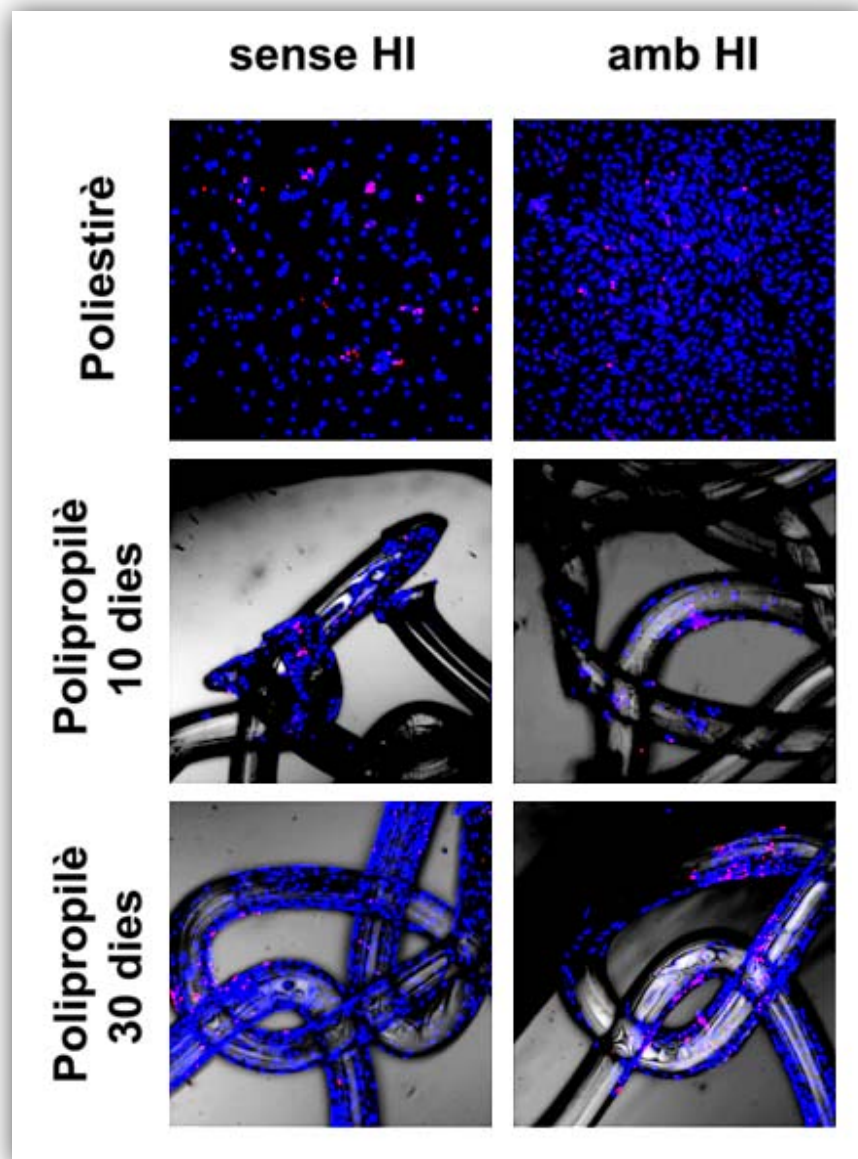
**Figura R48.** Percentatge de proliferació dels fibroblasts procedents d'aponeurosi de pacients amb i sense HI en el poliestirè (PS) i en el polipropilè (PP). \*\*\* indica un  $p$ -valor < 0.001.

## 10.- Augment de l'apoptosi en contacte amb la malla de polipropilè.

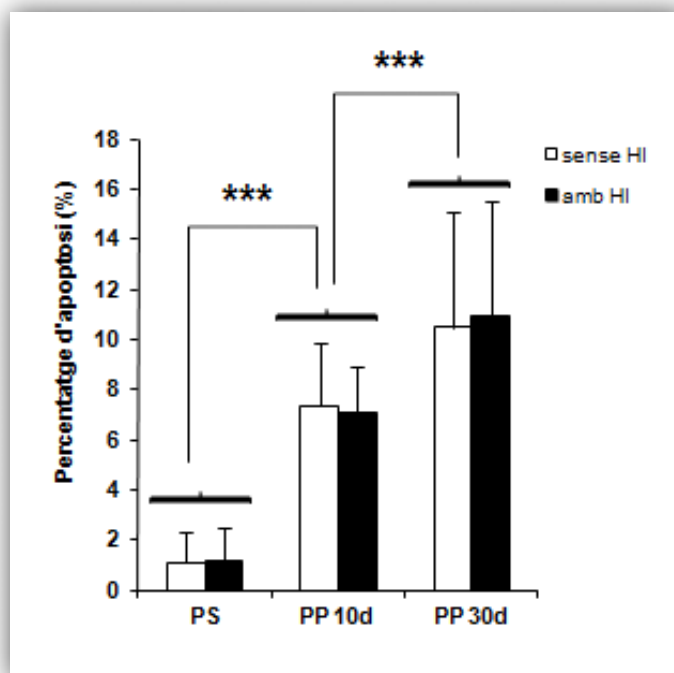
L'apoptosi es va mesurar mitjançant la tècnica de TUNEL, en la que s'addiciona dUTPs marcats fluorescentment (color verd) als extrems 3'-OH generats durant la fragmentació del DNA. Es va calcular el percentatge de cèl·lules en apoptosi en quantificar el nombre de cèl·lules positives per TUNEL (en verd, transformat a vermell per tenir millor contrast) respecte al nombre de cèl·lules totals tenyides amb DAPI (en blau, els nuclis).

En el poliestirè, es va observar que hi havia un percentatge de cèl·lules apoptòtiques molt baix i sense diferències estadístiques entre els dos grups (1.2% i 1.1% en els fibroblasts d'aponeurosi de pacients amb i sense HI, respectivament; Figura R49 i Figura R50). En contacte amb la malla de polipropilè, el percentatge de cèl·lules apoptòtiques augmentava en el temps, sense diferències estadístiques entre els dos grups. Als 10 dies l'augment va ser més considerable (7.1% i 7.4% en els fibroblasts d'aponeurosi de pacients amb i sense HI, respectivament), tot i que va seguir

augmentant als 30 dies (10.2% i 11% en els fibroblasts d'aponeurosi de pacients amb i sense HI, respectivament).



**Figura R49.** Imatges de les tincions per TUNEL (transformat a vermell per contrastar) i DAPI (blau) als fibroblasts sembrats en poliestirè o polipropilè (4x).



**Figura R50.** Percentatge d'apoptosi dels fibroblasts procedents d'aponeurosi de pacients amb i sense HI en el poliestirè (PS) i en el polipropilè (PP). \*\*\* indica un  $p$ -valor < 0.001.

## DISCUSSIÓ





## 1.- Capítol I

En aquest treball es pretén donar una visió exploratòria a nivell molecular per intentar millorar el coneixement del rol del microambient tissular local en els pacients amb una història clínica d'HI. En l'HI hem trobat principalment que:

- 1.- Les relacions MMPs/TIMPs són més elevades que les constitutives.
- 2.- Hi ha una tendència a la desregulació dels nivells de citocines pro-inflamatòries i a una alteració en la seva senyalització.
- 3.- Tant l'aponeurosi com el múscul esquelètic es veuen afectats i, a més, exhibeixen múltiples alteracions teixit-específiques.

Com les mostres s'han obtingut evitant la zona de l'anell de l'hèrnia (la zona activa de regeneració), els resultats apunten cap a esdeveniments subclínic que es reflecteixen a nivell sistèmic. La majoria d'estudis se centren en l'aponeurosi com a teixit diana del procés de la HI (28,374,375). En aquest estudi, s'han identificat alteracions en el múscul esquelètic que indiquen que la HI incideix més enllà que al nivell local.

Fins l'actualitat hi havia poca informació disponible respecte a l'expressió de MMPs i TIMPs en els teixits de la paret abdominal humana. En aquest treball es demostra que, en l'HI, el balanç entre MMPs/TIMPs es troba alterat en favor d'un augment en l'activitat proteolítica que podria alterar l'estabilitat de la MEC per mecanismes post-translacionals i contribuir a la formació de l'HI. La fallida aparent en la reposició de teixit connectiu amb material sintetitzat *de novo* es podria deure a deficiències en la síntesi de col·lagen (376,377). A més, tot i que no s'ha estudiat a nivell mecanicístic

en aquest treball, la fallida en la deposició de col·lagen podria atribuir-se a una maduració post-translacional deficient, secundària a l'acció de les citocines (378).

De totes les MMPs analitzades, destaca l'elevada expressió de MMP1, MMP3 i MMP9 en l'aponeurosi de l'HI, especialment en quan a activitat. Com que les biòpsies tissulars no presentaven cap tipus d'exudat inflamatori, es podria especular que aquestes MMPs podrien ser produïdes per cèl·lules mesenquimàtiques natives estimulades subtilment per un senyal inflamatori desregulat (379,380). La MMP1 juga un paper únic en l'eliminació del pro-col·lagen defectuós durant la neoformació de col·lagen (381) i la seva activitat anòmla s'ha associat amb múltiples malalties, incloent-hi les hèrnies diafragmàtiques pulmonars congènites (382,383). En HI, però, s'havia trobat certes discordances en la seva expressió (84,384). La MMP3 actua com a proteasa activadora de vàries MMPs, i pot estimular directament la transformació cel·lular (385). La MMP9 és important en la fase inflamatòria durant la reparació de ferides (386,387) i l'excessiva producció s'ha relacionat amb el dany tissular i la formació de matricriptines, especialment en malalties inflamatòries degeneratives i/o autoimmunes (128,388).

En estudis anteriors no s'havia descrit l'expressió de TIMPs en la paret abdominal dels pacients amb HI, amb l'excepció d'un estudi centrat en la disminució dels nivells de TIMP2 en la fàscia transversal de l'hèrnia inguinal (389). Cal destacar en el present estudi la disminució en l'expressió de TIMP3. De tots els TIMPs, TIMP3 és únic en la seva capacitat d'unir-se fortament a la MEC, on es localitza i influeix la remodelació de la MEC i la supervivència cel·lular i inhibeix les MMPs, agrecanases i l'enzim convertidor de TNF- $\alpha$  (TACE/ADAM17) (390,391). S'ha observat que els ratolins deficientes en TIMP3 tenen nivells elevats tant de TACE/ADAM17 com de TNF- $\alpha$  (392-394). Sembla que algunes molècules amb efecte anti-inflamatori, com la IL-10, estimulen l'expressió de TIMP-3 per a regular els nivells de TNF- $\alpha$  a través d'aquesta ruta (395). En el present estudi es va observar que l'expressió d'mRNA de TACE no presenta diferències entre els dos grups i en els dos teixits, però al nivell proteic es va observar una tendència a l'augment de TACE actiu (80 kDa) en el múscul esquelètic de l'HI, suggerint una activació post-transcripcional de TACE. Tot i que encara no està clar si aquesta disminució en els nivells de TIMP3 és un defecte primari o una conseqüència de la pèrdua del contingut i l'estructura de la MEC, es podria tenir en compte durant la transició cap a la ruptura tissular al proveir un nexa mecànic directe entre la inflamació i la degradació. Estudis propers que aprofundeixin en aquest camp podrien revelar aquestes qüestions.

Una altra dada interessant i destacable d'aquest treball és l'expressió desregulada de citocines pro-inflamatòries i dels seus receptors en els teixits de l'HI. La inflamació és un procés crucial en la resposta de l'hoste al dany tissular, però si innecessàriament es manté, pot acabar essent perjudicial (396). El TNF- $\alpha$  està involucrat en la patogènesi de la inflamació crònica *in vivo* (397,398) i és un dels inductors més importants de la producció proteica de MMPs (379). Els efectes específics del TNF- $\alpha$  es tradueixen via els seus receptors, TNFRSF1A i TNFRSF1B. El TNFRSF1B, que transmet els efectes del TNF- $\alpha$  d'una manera autocrina/paracrina, es detecta molt infraexpressat en l'aponeurosi de l'HI. La modulació selectiva de TNFRSF1B podria representar una protecció de l'hoste contra els efectes deleteris locals del TNF- $\alpha$  (399-401). Curiosament, el TNF- $\alpha$  té també un paper en la mediació de la degeneració muscular en pacients amb malaltia crònica debilitant, miopaties inflamatòries i resistència a la insulina (402-404). La tendència a expressar nivells més alts de TNF- $\alpha$  en pacients amb HI podria ser útil per explicar l'expressió elevada de IL6 en múscul esquelètic de pacients amb HI, a través de mecanismes estimuladors de la seva secreció (405) (els anàlisis de correlació simple confirmen que l'expressió de TNF- $\alpha$  i IL6 estan fortament inter-relacionats en el múscul esquelètic,  $r = 0.595$ ,  $P = 0.020$ ). A més, IL6 indueix les rutes de catepsina i ubiquitina durant la proteòlisi del múscul (406). Col·lectivament, aquests resultats plantegen la hipòtesi que la remodelació i destrucció tissular detectades en l'HI podrien deures, almenys en part, a l'excessiva producció de citocines, que afavoreixen un estat inflamatori crònic, fins i tot en absència d'exudat inflamatori (396). A més, enfatitzen el paper del múscul esquelètic com a diana potencial de l'HI.

Aquest estudi té dues limitacions principals: els anàlisis es van realitzar amb un disseny observacional i les deduccions respecte a les rutes causals no es poden concloure. La investigació de l'etiologia dels trets complexos representa un gran repte, i la recerca observacional és una eina investigadora útil, generant resultats ràpids i a baix cost. Un dels principals desavantatges és que els estudis descriptius no proporcionen cap indicació del risc absolut del factor en qüestió, però si la evidència trobada és prou convincent, els recursos es poden destinar a propers estudis més concrets. A més, encara que moltes hèrnies poden manifestar-se aviat, altres poden no ser detectades durant molt temps després de l'operació i tot i així ser-hi presents. Per això, no és fàcil elegir el grup control apropiat, on els seus pacients presentin característiques similars. Es podria haver inclòs un grup de pacients que no han desenvolupat HI després d'una operació abdominal prèvia però que van ser laparotomitzats per altres raons mèdiques, com a grup control

addicional. Però, fins i tot en aquest cas, podria haver-hi una hèrnia massa petita per ser detectada clínicament. Per tant, tampoc es pot descartar que el grup utilitzat en aquest estudi acabi desenvolupant un defecte incisional en un futur (proper). Finalment, tampoc es pot descartar que els canvis observats en l'expressió gènica siguin també deguts a una pèrdua de la mecano-transducció, secundària a una descàrrega mecànica del teixit connectiu (10) i/o a la pèrdua de l'ancoratge del fibroblast a la MEC (376,407).

En resum, els resultats d'aquest estudi són consistents amb la hipòtesi d'una biologia de formació de l'hèrnia (10,16). Encara que els estudis amb mostres adquirides directament de pacients humans no aconsegueixen els nivells de profunditat mecanicística i/o de determinar la causalitat que aquells que utilitzen animals tractables o sistemes in vitro, els resultats d'aquest estudi indiquen que, a més d'un desordre biològic fonamental, com és un metabolisme anormal del col·lagen, hi ha altres mecanismes moleculars implicats en la patogènesi de l'HI que podrien ser sensibles a modificacions terapèutiques (per exemple, únicament el control de la síntesi de col·lagen seria insuficient per al control de la progressiva formació de l'HI si persisteix, després del curt període de resposta inflamatòria, una desregulació de citocines). Així, sembla que els canvis en les relacions MMPs/TIMPs i la senyalització pro-inflamatòria observats en aquest estudi són processos compartimentalitzats que ocorren concomitants in vivo i probablement juguen un paper en la patogènesi de la malaltia conduint, conjuntament, cap a la disrupció local de les fibres de la MEC i a la ruptura mecànica. Des d'una perspectiva clínica, es pot concloure que el paper del microambient local en el desenvolupament i/o progressió del deteriorament de la paret abdominal requereix estudis addicionals i pot ajudar al desenvolupament de prevencions més efectives i de noves estratègies de tractament.

## **2.- Capítol II**

En els resultats del primer capítol d'aquesta tesi, s'ha observat que al nivell tissular hi ha una desregulació proteolítica i inflamatòria que podria desembocar en una desestabilització de la MEC i una ruptura del teixit connectiu, amb la conseqüent formació de la HI (408). De tota manera, en aquesta associació no s'ha demostrat què és causa i què és efecte en el procés. A més, aquesta desestructuració tissular sembla produir la pèrdua d'ancoratge entre la cèl·lula i la MEC, fet que podria tenir efectes fatals en la cèl·lula induint l'apoptosi (409,410). Totes aquestes alteracions repercuteixen en el fenotip del fibroblast del pacient amb HI, de manera que la

---

funcionalitat dels fibroblasts juga un paper molt important en el procés de formació de la HI i es podria considerar com a possible diana terapèutica.

El fibroblast és el component cel·lular majoritari dels teixits connectius. Respon ràpidament a estímuls, i és capaç de modificar el seu perfil fenotípic, no només en processos fisiopatològics (411), sinó també en funció dels requeriments biofísics de l'entorn en el què es troba. En resposta a un estrès, com la inflamació crònica, les cèl·lules responen activant una resposta adaptativa cel·lular, que integra una xarxa complexa de mòduls intracel·lulars (412). En funció de la intensitat de l'estrès, la resposta pot conduir a un dany en la reparació cel·lular que pot desembocar en la restitució completa de les funcions cel·lulars o en la mort cel·lular programada (413). De tota manera, quines rutes segueix aquesta senyalització i quines molècules hi estan implicades en la HI queda encara per resoldre.

Un cop extrets del teixit del qual provenen, s'ha observat que els fibroblasts són capaços de mantenir el seu fenotip en el cultiu perllongat *in vitro* (247,248). Per tant, les alteracions que sofreixen els fibroblasts del múscul esquelètic i l'aponeurosi dels pacients amb HI, en un entorn inflamatori, amb una pèrdua del contacte amb la MEC i de la mecano-transducció s'haurien de mantenir en el cultiu cel·lular. En un treball del grup (341) que no forma part d'aquesta tesi es va observar algunes d'aquestes alteracions en els fibroblasts provinents de l'aponeurosi. Es va observar una major mort cel·lular en trobar alterades rutes apoptòtiques (mitjançant la tècnica de TUNEL, la identificació dels nivells de caspasa-3 i de la fragmentació de vimentina,  $\alpha$ -fodrina i PARP) i autofàgiques (per microscòpia electrònica i detecció de LC3-II), tant al nivell tissular com cel·lular, probablement associades a la desregulada senyalització pro-inflamatòria i proteolítica descrites en el primer capítol d'aquesta tesi. A més, en el cultiu cel·lular també es va observar que els fibroblasts d'aponeurosi de pacients amb HI presentaven una mida menor, una major proliferació i migració, una menor adhesió, una desorganització del citoesquelet i menor formació de contactes focals. Finalment, encara que els fibroblasts extrets de pacients amb HI no presenten majors nivells apoptòtics, sí que es va observar que són més sensibles a estímuls pro-apoptòtics. Aquesta sensibilització suggeriria que els fibroblasts de HI ja presentaven nivells alts de dany en el DNA o que la reparació del DNA és més lenta que en els fibroblasts dels pacients sense HI (341). A més, es va observar que els fibroblasts de pacients amb HI eren més sensibles al TNF- $\alpha$ , molècula que s'havia trobat alterada en el primer capítol d'aquesta tesi.

En els resultats dels xips d'expressió gènica del present treball s'ha observat que els fibroblasts de pacients amb HI presenten alteracions en rutes de reparació de dany cel·lular i alteracions en el cicle cel·lular, tot i haver-los separat de l'estímul inflamatori que els afectava al teixit, a més del teixit desestructurat. Aquestes alteracions en les rutes de reparació de dany cel·lular podrien explicar aquesta major susceptibilitat dels fibroblasts de pacients amb HI a estímuls pro-apoptòtics (414,415), indicant que els fibroblasts són incapaços de reparar el dany cel·lular o ho fan més lent del que avança el procés de la HI. A més, les alteracions en el cicle cel·lular suggereixen que els fibroblasts dels pacients amb HI estan expressant factors de supervivència enfront les condicions adverses del teixit (416,417). Un cop alliberats d'aquestes condicions, i davant la manca de l'estímul pro-apoptòtic, la balança es decanta cap a una major proliferació (418,419). Aquests resultats indiquen, però, que la intensitat de les alteracions que sofreixen els fibroblasts de pacients amb HI és molt gran, i que aquests no es poden recuperar, ni en el teixit ni en el cultiu cel·lular.

Es van analitzar algun dels gens diferencialment expressats al nivell proteic, per intentar trobar possibles dianes terapèutiques o molècules que permetessin aprofundir en la comprensió del procés de la HI. Per tal de corroborar els resultats dels xips d'expressió gènica, es van seleccionar algunes de les molècules amb major diferència d'expressió entre els fibroblasts de pacients amb i sense HI. Es van seleccionar 3 molècules, una per teixit i una de comú en els dos, en funció de la possible implicació amb la HI. Es va seleccionar l'agrecà per ser un component de la MEC ja que s'havia observat una desestructuració de la MEC en el primer capítol. Es va seleccionar la reelina per la seva associació amb les adhesions focals, implicades en l'adhesió i el contacte cèl·lula-matriu, del qual s'havia observat una pèrdua en el primer capítol. Finalment, es va seleccionar la quitinasa 3 perquè és una molècula íntimament relacionada amb la inflamació i la supervivència cel·lular. En canvi, no es van seleccionar algunes molècules de les rutes més alterades (i.e. reparació del dany cel·lular o cicle cel·lular) perquè les diferències entre els pacients amb i sense HI eren molt petites, i es prioritzava la comprovació dels resultats dels xips d'expressió gènica. De tota manera, i després dels resultats observats, futurs estudis haurien d'anar enfocats a l'anàlisi d'aquestes molècules i rutes.

L'agrecà és el component de tipus no col·lagen més abundant en la MEC dels cartílags, però s'ha trobat també present en molts altres teixits connectius (420,421). El seu paper principal és el manteniment de la hidratació de la MEC, a més de generar, juntament amb els col·làgens, una xarxa complexa que dona flexibilitat i força a la MEC (422). L'agrecà és una molècula sintetitzada per varies cèl·lules, com

els condrocits, els osteoblasts o les cèl·lules mare del moll de l'ós. Fins ara s'havia considerat que els fibroblasts pràcticament no en secretaven, excepte en alguns casos concrets, com els fibroblasts de pell dels pacients amb el síndrome genètic Hutchinson-Gilford Progeria o síndrome d'envelliment prematur (423), tot i que en aquest cas hi ha una sobre-expressió. És el primer cop, doncs, que es troba que els fibroblasts procedents de múscul esquelètic i d'aponeurosi de la zona abdominal de pacients humans expressen i contenen aquesta proteïna i, a més, que els pacients amb HI en tenen menors nivells. La menor presència d'agrecà en els fibroblasts dels pacients amb HI podria ser un dels causants de la menor adhesió (424) d'aquests en el cultiu cel·lular. A més, s'ha observat que la degradació i pèrdua de l'agrecà genera fragments del domini G1 que estimulen l'apoptosi al desestabilitzar la interacció cèl·lula-matriu (425). Aquesta infra-expressió de l'agrecà es podria explicar a causa de la possible inflamació crònica que pateixen els pacients amb HI, de manera similar a la dels pacients amb artritis reumàtica o artrosi òssia (426). Per bé que en aquestes situacions patològiques es dona una degradació i alliberació de fragments de l'agrecà durant la destrucció progressiva del cartílag, essent un marcador diagnòstic de la malaltia (427,428), en altres situacions s'ha observat que molècules pro-inflamatòries com el TNF- $\alpha$  causen una davallada en l'expressió de l'agrecà (429) o en la fragmentació de la proteïna (346). És d'especial interès destacar que algunes molècules, com el BMP-7 (*Bone morphogenetic protein-7*; membre de la família del TGF- $\beta$  involucrat en proliferació, diferenciació, metabolisme i apoptosi en varis teixits (430)), semblen revertir o inhibir aquest efecte del TNF- $\alpha$  sobre l'agrecà, a més d'inhibir l'efecte apoptòtic del TNF- $\alpha$  (431). A més, s'ha observat que el BMP-7 té la capacitat *in vivo* d'estimular la síntesi de nova MEC (432,433) per compensar l'elevada degradació. Caldria analitzar també, al nivell tissular, la repercussió d'aquesta troballa, doncs sembla que l'agrecà juga un paper protector en la prevenció de la degradació de les fibres de col·lagen (434), i evitar la disminució en la síntesi d'agrecà podria repercutir en una MEC de major qualitat, evitant la formació de la HI. En un primer estudi preliminar, no s'ha observat diferències en l'expressió gènica mitjançant PCR en temps real en cap dels dos teixits. No es va aconseguir obtenir una bona immunotransferència. Aquests resultats s'haurien de repetir augmentant el grup d'estudi.

La reelina (RELN) és una proteïna de la MEC que juga un paper molt important durant el desenvolupament del sistema nerviós central (435). La reelina és una glicoproteïna secretada per les cèl·lules de Cajal-Retzius que actua a través de dos receptors: el receptor 2 d'apolipoproteïna E (ApoER2) i el receptor de lipoproteïnes

de molt baixa densitat (VLDLR). La unió a aquests receptors estimula la migració de les neurones corticals (436). S'ha observat que aquest mecanisme es realitza a través de processos d'assemblatge i desassemblatge del citoesquelet d'actina, que permet el moviment de l'extrem de la cèl·lula (437). Sembla que la reelina actuaria com a proteïna estabilitzadora del citoesquelet que protegiria la part de la cèl·lula que no està en moviment de la despolimerització dels fragments d'actina (438). A més, s'uneix a les integrines i promou la unió de proteïnes dels complexos d'adhesió focals, afavorint la inducció d'una cascada d'activació intracel·lular que estimula la transcripció de gens específics implicats en la sinapsi i en la remodelació del citoesquelet neuronal (439,440). El seu paper en teixits no nerviosos s'ha estudiat molt poc, en gran part perquè els animals *knockout*, anomenats *reeler* (441,442), no hi mostren patologies greus (443). En l'organisme adult, la seva expressió és baixa (444), però augmenta molt quan certs òrgans són danyats (445-447). La funció exacta d'aquest increment de reelina en els teixits danyats està sent encara investigada, però tot apunta a que la inflamació podria ser la causa d'aquest increment en la reelina, ja que algunes quimiocines augmenten la seva expressió (448). Tret de les cèl·lules nervioses, fins ara només se n'havia trobat expressió en odontoblasts (449). Per tant, és el primer cop que es descriu en els fibroblasts del múscul esquelètic de la zona abdominal de pacients humans. A més, és el primer cop que es descriu aquesta infra-expressió, tant en el mRNA com en la proteïna, de la reelina en els fibroblasts del múscul esquelètic de la zona abdominal dels pacients amb HI, en comparació amb els de pacients sense HI. La reelina sembla doncs una proteïna important en la formació de les adhesions focals i, aquesta infra-expressió en els fibroblasts procedents del múscul esquelètic en els pacients amb HI podria estar relacionada amb la menor adhesió d'aquests en el cultiu. L'alliberació del factor pro-inflamatori en les cèl·lules en cultiu podria explicar aquesta disminució de la reelina, però quedaria per estudiar com es dona aquesta regulació. A més, s'ha observat que la mecano-transducció indueix la seva expressió (450) i la pèrdua d'aquesta podria ser una causa de la disminució dels nivells de reelina. Finalment, s'ha observat que augmenta en determinades patologies on s'utilitza com a marcador (444,446,447). En cas que es corrobore la seva associació amb la HI, es podrien detectar els seus nivells en sang (445). En un estudi preliminar no s'ha observat diferències estadístiques en l'expressió de reelina en el teixit muscular, i tampoc s'han detectat nivells suficients per analitzar per immunotransferència.

La *chitinase 3-like 1 protein* (CHI3L1) s'ha descrit com la proteïna majoritària secretada pels condrocits del cartílag articular humà (451-453), tot i que també la



secreten les cèl·lules sinovials (454) i macròfags diferenciats (455,456). Actua com un factor de supervivència en resposta a un ambient advers, provocat per varis tipus d'estrès fisiològic com la inflamació, la hipòxia o la falta de nutrients, doncs s'ha observat que es capaç d'impedir l'entrada en apoptosi (457,458). S'ha observat que aquesta molècula estimula la proliferació de les cèl·lules del teixit connectiu (458,459) i que, a més, la seva expressió es troba induïda per factors inflamatoris com el TNF- $\alpha$  (460). Aquesta inducció podria donar-se com a resposta de supervivència contra els efectes deleteris de les molècules inflamatòries. Se sap que en malalties inflamatòries i autoimmunes es dona una pèrdua de la MEC, en gran part a causa de les citoquines pro-inflamatòries TNF- $\alpha$  i IL1, que condueixen a un augment en la producció de MMPs i ADAMTs, així com un nombre elevat de quimiocines (408,461). Les cascades d'activació utilitzades per el TNF- $\alpha$  i la IL1 per estimular la producció de les MMPs estan ben caracteritzades, i inclouen les MAPKs p38 MAPK i la SAPK/JNK, a més de la translocació del factor de transcripció NF- $\kappa$ B (462,463). S'ha observat que la CHI3L1 és capaç d'interferir en aquesta cascada a través de la inhibició de l'activitat de la ASK, que activa la JNK. Aquesta inhibició es realitza a través de l'activació de la AKT per la via de PI3Kinasa (459). Com a resultat d'aquesta inhibició, disminueix l'expressió d'alguns dels productes regulats per TNF- $\alpha$  i IL1, com MMP1 o MMP3, en fibroblasts de pell i condrocits (464). Així doncs, la sobre-expressió en els fibroblasts procedents de l'aponeurosi de pacients amb HI pot ser causada com a resposta de supervivència a l'estímul pro-inflamatori del teixit. En cultius, aquesta expressió, tant a nivell d'expressió gènica com proteica, segueix sent elevada i podria ser un dels causants de l'elevada proliferació d'aquests fibroblasts. De fet, en el teixit només s'ha observat una major proliferació en els pacients amb HI en analitzar-la mitjançant el marcador PCNA (antigen nuclear de proliferació nuclear; (341)). En canvi, mitjançant el marcador Ki-67 (marcador de cèl·lules en divisió cel·lular; (465)) no es va observar diferències (341). Això es pot deure a que els nivells de PCNA elevats també s'associen a processos de reparació del dany cel·lular en el DNA (466), i lligaria amb les alteracions en molècules implicades en aquesta reparació que s'han observat mitjançant els xips d'expressió gènica. De fet, en un estudi preliminar fins i tot s'ha observat que en el teixit aponeuròtic s'expressa menys CHI3L1 en els pacients amb HI (2.54 vegades menys,  $p = 0.05$ ). Però els nivells observats en el cultiu cel·lular poden indicar que l'alteració produïda en l'expressió gènica es manté després de alliberar-los de l'estímul tissular. De fet, algunes de les rutes de supervivència i apoptosi convergeixen en alguns factors de transcripció, com el AP-1 (467). Encara que se sap que aquest factor és clau en l'estimulació de l'apoptosi, en determinades situacions el mateix factor pot inhibir l'apoptosi i estimular la proliferació o la

diferenciació, a través de la cinasa JNK (468). Per tant, els fibroblasts de pacients amb HI, en cultiu cel·lular i davant la manca de l'estímul tissular, canvien la regulació a través de AP-1 minvant l'apoptosi i augmentant la proliferació. Caldria analitzar a fons aquesta ruta per veure si aquesta regulació és clau en el destí dels fibroblasts en l'entorn inflammat de la HI. A més, la presència de CHI3L1 no s'havia detectat encara en fibroblasts de múscul esquelètic ni de l'aponeurosi de la zona abdominal, ja que només s'havia analitzat en fibroblasts de pell, de fetge o sinovials (451), així com tampoc la seva presència en el nucli cel·lular i, per tant, estudis més exhaustius podrien ajudar millor a comprendre la seva funció en el procés de l'hèrnia incisional. També queda per identificar si la fracció de major pes molecular (aproximadament 55 kDa; Figura R20) guarda algun tipus de relació amb aquesta presència de CHI3L1 al nucli (Figura R21).

L'estudi ha permès també identificar dos gens per teixit que poden ser utilitzats com a controls endògens per a futurs experiments (SEC63 i SLC39A8 en aponeurosi i DES i SGMS2 en múscul esquelètic) i, almenys dos d'ells (SEC63 i DES), com a controls endògens al nivell proteic.

Finalment, la identificació de noves rutes implicades en el procés de formació i desenvolupament de la HI, mitjançant eines bioinformàtiques, han posat el descobert un seguit de noves molècules i noves rutes que cal estudiar en profunditat i que es podrien perfilar com a dianes terapèutiques potencials per a la prevenció de l'aparició de la HI o, fins i tot, en el tractament de la HI mitjançant biomaterials modificats convenientment. A més, algunes d'aquestes rutes han reafirmat la importància dels processos pro-inflamatoris descrits en el primer capítol, que sembla que jugarien un paper molt important en l'alteració d'aquestes noves molècules i rutes associades al procés de l'HI. Per bé que les molècules que s'han estudiat més a fons sembla que poden ser marcadors molt potents per a la HI, queda per estudiar moltes de les rutes i molècules amb menors variacions que han posat al descobert l'estudi amb xips en els fibroblasts de múscul esquelètic i aponeurosi de pacients amb i sense HI.

### Capítol III

La intervenció quirúrgica és el procediment més comú per al tractament de la HI. Durant anys ha estat un repte per als cirurgians, però des de la posada en pràctica del tancament de la sutura sense tensió i de l'ús de les malles quirúrgiques, la millora en la reparació de la HI abdominal ha fet un salt qualitatiu, fins i tot a llarg termini (469). Un gran nombre de materials s'ha estat utilitzant fins a l'actualitat: polipropilè

de multifilament (Surgipro), polipropilè de doble filament (Prolene), polipropilè monofilament (Marlex), PTFE (Gore-Tex), PTFE multifilament (Teflon) o polièster multifilament (Mersilene). Recentment, a més, moltes empreses estan investigant en l'ús de malles amb components d'origen biològic, com les malles de col·lagen de porc. De tota manera, l'ús de malles sembla ser que només retarda l'aparició de l'hèrnia (250), i en alguns casos apareixen complicacions post-operatòries com infeccions o adhesions als intestins (253). Per tant, les malles segueixen sent susceptibles de millora (470).

Per tal de comprendre millor la resposta originada per les malles en l'hoste, s'han realitzat nombrosos estudis en animals d'experimentació (313,471-473). El principal problema és que els estudis en animals grans, com corders o porcs, solen ser costosos i necessiten grans infraestructures, mentre que els estudis en animals petits, com rates o conills, no reflecteixen el curs que les hèrnies segueixen en el ser humà. Per tant, una alternativa interessant és l'ús de cèl·lules humanes en cultiu cel·lular *in vitro* en contacte amb les malles (157,332), que pot donar una informació directa de com pot modificar el comportament cel·lular i donar idea de com es poden modificar les malles per tal de millorar-les. De tota manera, queda encara per conèixer quin és el comportament de les cèl·lules sobre les malles quirúrgiques abans de decidir quina estratègia preventiva seguir.

El cultiu tridimensional de cèl·lules ha significat un gran avenç per a l'estudi dels biomaterials (474), però també per a l'estudi de diferents malalties (475,476). Aquest és un sistema molt més similar al teixit que el cultiu en monocapa, ja que les cèl·lules, en cultiu tridimensional, són capaces de mantenir el fenotip diferenciat (477,478). De tota manera, la posada a punt del cultiu cel·lular i de les diferents tècniques emprades per al seu anàlisi és sovint complicat (477). Per això, els objectius d'aquest capítol es van centrar en posar a punt totes aquestes tècniques i generar resultats només amb la malla de polipropilè monofilament, obrint una nova ruta d'estudi per a treballs futurs.

Per bé que la malla de polipropilè és una malla rugosa, la seva hidrofobicitat i la seva forma arrodonida ha dificultat considerablement el seu estudi. Les propietats físiques d'un biomaterial influeixen en la interacció entre aquest i el teixit on s'insereix, i poden ser determinants en l'èxit o el fracàs durant el seu ús. La topografia o rugositat sembla ser un factor que estimula l'adhesió d'alguns tipus cel·lulars, com els osteoblasts (479,480), però en canvi, sembla que els fibroblasts prefereixen les

superfícies llises (481). De tota manera, la rugositat d'un biomaterial és un factor clau per a l'adsorció proteica (482), que a la vegada és essencial per a l'adhesió cel·lular (483). En el cas del polipropilè, sembla que la rugositat afavoreix l'adsorció proteica i, aquesta, afavoreix l'adhesió cel·lular. Per tant, incubar la malla amb FBS és molt important per a l'adsorció de proteïnes que afavoreixen l'adhesió cel·lular i, molt probablement, la integració de la malla al teixit (483). A més, cal tenir en compte aquesta rugositat a l'hora de desenvolupar una malla que alliberi algun fàrmac o que retengui alguna molècula que influeixi en el comportament cel·lular (484). D'altra banda, la hidrofobicitat també és un factor important a tenir en compte, i també guarda estricta relació amb l'adsorció proteica i l'adhesió cel·lular (485). La hidrofobicitat del polipropilè també es podria tenir en compte a l'hora de desenvolupar molècules que puguin quedar-hi unides fortament i puguin influir en les funcions cel·lulars per tal de millorar la malla.

Molts pocs estudis s'han dut a terme amb fibroblasts en contacte amb les malles quirúrgiques (157,332,486) i, fins ara, cap estudi s'havia fet amb fibroblasts de pacients amb HI extrets dels teixits implicats (múscul i aponeurosi) en la seva formació i desenvolupament. En la present tesi s'ha observat que els fibroblasts provinents de pacients amb HI tenen una sèrie d'alteracions gèniques que els diferencien dels fibroblasts de pacients sense HI, a més d'un seguit d'alteracions morfològiques i funcionals (341). Aquestes alteracions, a pesar d'haver-los alliberat de l'estímul, molt probablement guarden una estricta relació amb l'entorn inflammat i desestructurat del qual provenen (408). La interacció entre aquests fibroblasts i les malles quirúrgiques pot aportar informació clau per a la millora del tractament de la HI, en comparar-los amb fibroblasts provinents de pacients sense HI.

En el present estudi s'observa que, tot i que els fibroblasts de pacients amb i sense HI en contacte amb la malla de polipropilè segueixen un perfil de creixement cel·lular similar, amb una primera fase de proliferació seguida d'una mort cel·lular, els fibroblasts procedents de pacients amb HI s'adhereixen en menor quantitat, i és per això que el nombre total de cèl·lules sempre es troba per sota del dels fibroblasts procedents de pacients sense HI. Aquest fet es podria atribuir, principalment, a la menor capacitat d'adhesió dels fibroblasts de pacients amb HI, descrita ja en resultats previs del grup (341). Aquesta menor adhesió *in vitro* pot estar associada a la pèrdua del contacte cèl·lula-matriu observada *in vivo*, a més de la elevada activitat de les MMPs (408). Encara que aquesta activitat no s'ha observat *in vitro*, s'ha observat que la desestructuració tissular ha produït un canvi en el fenotip dels

fibroblasts que es reflecteix en l'expressió gènica (capítol II) i en la morfologia i funcionalitat dels fibroblasts (341).

L'adhesió cel·lular és un procés clau per a la supervivència de les cèl·lules en els estadis inicials posteriors a la interacció amb un biomaterial (487,488). Aquesta adhesió, però, també juga un paper molt important en la proliferació, la migració cel·lular o la diferenciació (489). A més, si la cèl·lula no pot adherir-se correctament sobre una superfície, es pot produir la mort per apoptosi (490). Tot i que hi ha una primera fase en el contacte amb el polipropilè durant la qual els fibroblasts s'adhereixen i proliferen, al llarg del temps la mort cel·lular va en augment fins al punt de superar la proliferació, de manera que el nombre de cèl·lules va disminuint. Aquesta disminució en el nombre de cèl·lules no està associat a la menor adhesió dels fibroblasts de pacients amb HI, ja que afecta també de manera similar als de pacients sense HI. Probablement, aquest augment de la mort cel·lular vagi molt lligat a les dificultats de les cèl·lules per adherir-se al material (490). La interacció entre una cèl·lula i un biomaterial es dona principalment a través de les adhesions focals, formades per un gran nombre de proteïnes que transmeten la informació externa al nucli, a través del citoesquelet (207). Aquestes adhesions focals, situades a la membrana cel·lular, no interaccionen directament amb el material, sinó que ho fan a través de proteïnes mediadores de l'adhesió (i.e. vitronectina o fibronectina), que s'adsorbeixen primer al material. L'adsorció i disponibilitat de les regions d'adhesió d'aquestes proteïnes depèn en gran part de les propietats físiques del material. Tot i que la rugositat de les malles de polipropilè afavoreix la seva adhesió, la hidrofobicitat podria jugar un factor negatiu, doncs tot i que afavoreix una adsorció proteica més forta, pot produir la desnaturalització parcial o total de les proteïnes (320). Tot i que les malles s'han preincubat amb FBS i que s'ha observat que retenen un cert percentatge de proteïnes, la hidrofobicitat pot seguir influint fins i tot en les proteïnes que la pròpia cèl·lula secreta com a MEC per facilitar la seva adhesió i proliferació. Caldria analitzar com està afectant la malla a la secreció d'aquestes molècules (i.e. fibronectina, col·lagen).

Com que la mort cel·lular no depèn del fenotip de la HI, es va aprofundir en l'estudi de l'adhesió cel·lular per tal de comprendre com pot estar influent la superfície de la malla en l'apoptosi cel·lular. Els complexos d'adhesió (i.e. adhesions focals i complexos focals) són estructures formades per un elevat nombre de diferents tipus de proteïnes, capaces de captar i integrar senyals externs, indispensables per al control coordinat dels processos cel·lulars fonamentals, incloent-hi la diferenciació,

cicle cel·lular, apoptosi i motilitat (491,492). Aquesta informació és transmesa a través de les fibres de les molècules que conformen el citoesquelet (i.e. actina i vimentina) fins al nucli, des de on es regularan les funcions cel·lulars. La vinculina és una de les proteïnes més abundants dels complexos d'adhesió, i hi és present tot just quan es formen. En el poliestirè ja s'havia observat que els fibroblasts de pacients amb HI presentaven una localització distal de la vinculina, probablement associada a la menor adhesió cel·lular, mentre que els fibroblasts de pacients sense HI presentaven una distribució homogènia (341). En contacte amb el polipropilè, sembla que la distribució de la vinculina canvia, passant a trobar-se homogèniament distribuïda i fins i tot sembla minvar amb el temps (caldría analitzar-ne els nivells, mitjançant immunotransferència). Estudis recents han relacionat la disminució de vinculina amb un augment en l'apoptosi (493,494). A més, s'ha observat resultats similars per a la tensina, una molècula implicada en les adhesions fibril·lars (207). La tensina s'uneix a l'actina del citoesquelet i a la fibronectina, de la MEC, a través de integrines (495) i permet l'adhesió de les cèl·lules. Aquesta desaparició de tensina podria contribuir a la menor adhesió dels fibroblasts en la malla de polipropilè amb el temps. Podria ser que la influència que tenen les propietats físiques de la malla sobre l'adsorció proteica estigui produint aquesta pèrdua de tensina. S'ha observat que la manca de proteïnes d'adhesió de la MEC o de la despolimerització d'aquestes produeix una pèrdua de proteïnes de les adhesions fibril·lars, inclosa la tensina (496).

Aquesta pèrdua de contacte sembla que es podria transmetre a través del citoesquelet. La major part de molècules del citoesquelet són degradades durant l'apoptosi, incloent l'actina, la citoqueratina o els microtúbuls (497). En contacte amb el polipropilè, sembla que la distribució dels filaments d'actina canvia i, amb el temps, sembla tornar-se difusa. La molècula emprada per a detectar-la, la fal·loïdina, és una molècula amb afinitat pels filaments d'actina, i és per això que als 30 dies la detecció és més difusa, doncs els filaments es poden haver desestructurat. Resultats similars podrien atribuir-se a la vimentina, un altre filament del citoesquelet. La seva fragmentació i disrupció també s'ha relacionat amb l'apoptosi (341,498-500). Per tant, probablement l'apoptosi dels fibroblasts està dirigida per processos de manca o dificultat d'adhesió, ja que no depenen del fenotip alterat dels fibroblasts dels pacients amb HI, sinó que afecta de manera similar als fibroblasts de pacients sense HI.

A més, s'havia observat que els fibroblasts de pacients amb HI tenen una taxa de proliferació major que els de pacients sense HI (341), que molt probablement es deu

---

a l'alliberació de l'estímul pro-apoptòtic tissular. En canvi, en contacte amb el polipropilè aquestes diferències desapareixen en el temps. A més, aquesta reducció de la proliferació només afecta als fibroblasts de pacients amb HI, de manera que la malla de polipropilè està atenuant el fenotip dels fibroblasts procedents de pacients amb HI. Com s'ha descrit, aquesta major proliferació dels fibroblasts de pacients amb HI es podria deure a l'alliberació de l'estímul pro-apoptòtic, de manera que l'alteració gènica seguiria activa i s'estimulen els gens de proliferació. Podria ser que l'estructura o composició de la malla de polipropilè estigués influenciant en aquestes rutes alterades, de manera que revertís el fenotip de la HI. De tota manera, caldria aprofundir en aquestes rutes observades en els xips d'expressió gènica per veure com les afecta el contacte amb el polipropilè. A més, existeix la possibilitat que la manca d'adhesió reverteixi el fenotip proliferatiu altre cop cap a un fenotip apoptòtic. Encara que les rutes d'apoptosi induïda per manca d'adhesió i d'apoptosi induïda per estímuls pro-apoptòtics siguin diferents, convergeixen en alguns factors de transcripció que regulen la maquinària gènica (490).

Seria interessant també quantificar alguna de les molècules analitzades, per exemple per immunotransferència, ja que la immunofluorescència es qualitativa. Es va fer un intent de quantificar les molècules relacionades amb adhesió, però és necessària molta mostra (tant cèl·lules com malla de polipropilè) i no es va aconseguir amb èxit. De tota manera, la tècnica seria viable i caldrien més estudis en aquest sentit. A més, es va intentar analitzar també una altra molècula present en els complexos focals madurs, la FAK (Focal Adhesion Kinase) i la seva forma fosforilada (pFAK), encarregada de transmetre els senyals externs al citoesquelet. Durant el procés d'adhesió, es recluta un conjunt de molècules implicades en la formació de les adhesions focals, entre les que destaquen la vinculina, la paxil·lina, la talina o l' $\alpha$ -actinina. Aquestes adhesions maduren quan la tirosina kinasa FAK és reclutada i s'autofosforila (501). Aquesta autofosforilació acobla la FAK a una ruta de senyalització intracel·lular que regula la proliferació cel·lular, la supervivència, la motilitat i l'activació dels fibroblasts (502). Els baixos nivells de FAK i pFAK n'han dificultat la identificació, almenys per immunofluorescència, i caldria analitzar els seus nivells proteics.





## CONCLUSIONS



A partir del present estudi en pacients amb HI sobre la regulació del metabolisme de la MEC de l'aponeurosi i el múscul esquelètic, l'expressió gènica dels fibroblasts primaris procedents d'ambdós teixits i el seu comportament en la interacció amb malles de polipropilè utilitzades per al tractament de HI; i en comparació amb pacients sense HI es pot concloure que:

- 1.- S'ha identificat una alteració en el metabolisme de la MEC dels pacients amb HI associada a una desregulació en la senyalització inflamatòria. Concretament, s'ha observat:
  - 1.1.- Una relació MMPs/TIMPs alterada en favor d'una major activitat proteolítica.
  - 1.2.- Una tendència a la desregulació dels nivells d'algunes citocines pro-inflamatòries i en la seva senyalització.
  - 1.3.- Una alteració teixit-depenent que es manifesta diferent entre el múscul esquelètic i l'aponeurosi però amb conseqüències similars. S'observa una major alteració en MMPs/TIMPs en aponeurosi i una major alteració de la senyalització inflamatòria en múscul esquelètic (a més de menor expressió de TIMP3, que podria actuar de nexa mecanicístic a través de TACE), suggerint que el múscul esquelètic rep el impacte inflamatori i el transmet a l'aponeurosi. La presència de petits cúmuls inflamatoris només en el múscul esquelètic podrien contribuir a aquest procés.

- 2.- S'ha identificat un perfil d'expressió gènica diferencial mitjançant xips d'expressió gènica en els fibroblasts extrets del múscul esquelètic i de l'aponeurosi del pacients amb HI en comparació amb els de pacients sense HI probablement degut al condicionament continuat d'un entorn alterat. Concretament, s'ha observat:
  - 2.1.- Una alteració en gens de cicle cel·lular i reparació del dany en el DNA, probablement com a resposta de supervivència a l'entorn tissular advers.
  - 2.2.- Un conjunt de gens, que s'han comprovat per altres tècniques, amb funcions que ajuden a millorar el coneixement del procés de la HI. Aquests gens són l'agrecà (proteoglicà relacionat amb l'adhesió i la mort cel·lular i regulat per processos inflamatoris; en menor expressió en els dos teixits), la reelina (glicoproteïna relacionada amb l'adhesió i regulada per processos inflamatoris; en menor expressió en els fibroblasts de múscul esquelètic) i la CHI3L1 (glicoproteïna que actua com a factor de supervivència i regulada per processos inflamatoris; en major expressió en fibroblasts d'aponeurosi).
  - 2.3.- Una sèrie de gens que poden servir com a controls endògens per a la realització de futures PCR en temps real i/o immunotransferències. Aquests gens són el SEC63 i SLC39A8 (en fibroblasts d'aponeurosi) i DES i SGMS2 (en fibroblasts de múscul esquelètic).
  - 2.4.- Unes alteracions en l'expressió gènica que altre cop són teixit-específiques. Les rutes majoritàriament alterades en l'aponeurosi guarden relació amb el cicle cel·lular i la reparació del dany cel·lular, mentre que en el múscul esquelètic guarden relació amb la resposta immunològica.
- 3.- S'ha establert un model d'estudi *in vitro* de la interacció dels fibroblasts primaris procedents d'aponeurosi amb malles quirúrgiques de polipropilè. Concretament, s'ha observat:
  - 3.1.- Que el model *in vitro* mitjançant cèl·lules provinents de pacients amb HI és factible i que pot ser útil per posar de manifest com interaccionen les cèl·lules amb diferents malles quirúrgiques.

- 3.2.- Que l'adhesió dels fibroblasts primaris d'aponeurosi amb les malles de polipropilè és feble, degut a les propietats físiques de la malla. La modificació d'aquestes propietats en favor d'augmentar o millorar l'adhesió cel·lular podrien millorar la interacció amb els fibroblasts i la integració cel·lular.
- 3.3.- Que aquesta menor adhesió produeix canvis en l'organització de molècules del citoesquelet que podrien acabar desembocant en processos de mort cel·lular.
- 3.4.- Que la malla de polipropilè podria modificar el cicle cel·lular alterat dels fibroblasts de pacients amb HI disminuint la seva proliferació fins als nivells de la proliferació dels fibroblasts de pacients sense HI.



## **BIBLIOGRAFIA**





- (1) Kingsnorth A, LeBlanc K. Hernias: inguinal and incisional. *The Lancet* 2003;362(9395):1561-1571.
- (2) Flum DR, Horvath K, Koepsell T. Have outcomes of incisional hernia repair improved with time?: A population-based analysis. *Ann Surg* 2003;237(1):129-135.
- (3) Mudge M, Hughes L. Incisional hernia: a 10 year prospective study of incidence and attitudes. *Br J Surg* 1985;72(1):70-71.
- (4) Ellis H, Gajraj H, George C. Incisional hernias: when do they occur? *Br J Surg* 1983;70(5):290-291.
- (5) Stabile Ianora A, Midiri M, Vinci R, Rotoedo A, Angelelli G. Abdominal wall hernias: imaging with spiral CT. *Eur Radiol* 2000;10(6):914-919.
- (6) Akinci M, Ergul Z, Kaya O, Kulah B, Kulacoglu H. Predictors for duration of hospital stay after abdominal wall hernia repairs. *Chirurgia* 2012;107:47-51.
- (7) Yahchouchy-Chouillard E, Aura T, Picone O, Etienne JC, Fingerhut A. Incisional hernias. I. Related risk factors. *Dig Surg* 2003;20(1):3-9.
- (8) Dunne JR, Malone DL, Tracy JK, Napolitano LM. Abdominal wall hernias: risk factors for infection and resource utilization<sup>1</sup>. *J Surg Res* 2003;111(1):78-84.
- (9) O'Dwyer P, Courtney C. Factors involved in abdominal wall closure and subsequent incisional hernia. *The Surgeon* 2003;1(1):17-22.
- (10) Franz MG. The biology of hernia formation. *Surg Clin North Am* 2008;88(1):1-15.
- (11) DuBay DA, Wang X, Adamson B, Kuzon WM, Dennis RG, Franz MG. Progressive fascial wound failure impairs subsequent abdominal wall repairs: a new animal model of incisional hernia formation. *Surgery* 2005;137(4):463-471.
- (12) Franz MG. The biology of hernias and the abdominal wall. *Hernia* 2006;10(6):462-471.
- (13) Leong DJ, Hardin JA, Cobelli NJ, Sun HB. Mechanotransduction and cartilage integrity. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1240(1):32-37.
- (14) Wong VW, Akaishi S, Longaker MT, Gurtner GC. Pushing Back: Wound Mechanotransduction in Repair and Regeneration. *J Invest Dermatol* 2011;131(11):2186-2196.
- (15) Culbertson EJ, Xing L, Wen Y, Franz MG. Loss of mechanical strain impairs abdominal wall fibroblast proliferation, orientation, and collagen contraction function. *Surgery* 2011;150(3):410-417.
- (16) Jansen PL, Mertens P, Klinge U, Schumpelick V. The biology of hernia formation. *Surgery* 2004;136(1):1-4.
- (17) Klinge U, Si Z, Zheng H, Schumpelick V, Bhardwaj R, Klosterhalfen B. Abnormal collagen I to III distribution in the skin of patients with incisional hernia. *European surgical research* 2000;32(1):43-48.

- (18) Klinge U, Binnebösel M, Mertens P. Are collagens the culprits in the development of incisional and inguinal hernia disease? *Hernia* 2006;10(6):472-477.
- (19) White B, Osier C, Gletsu N, Jeansonne L, Baghai M, Sherman M, et al. Abnormal primary tissue collagen composition in the skin of recurrent incisional hernia patients. *Am Surg* 2007;73(12):1254-1258.
- (20) Antoniou SA, Antoniou GA, Granderath FA, Simopoulos C. The role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of abdominal wall hernias. *Eur J Clin Invest* 2009;39(11):953-959.
- (21) DuBay DA, Wang X, Adamson B, Kuzon WM, Dennis RG, Franz MG. Mesh incisional herniorrhaphy increases abdominal wall elastic properties: a mechanism for decreased hernia recurrences in comparison with suture repair. *Surgery* 2006;140(1):14-24.
- (22) Langer C, Neufang T, Kley C, Liersch T, Becker H. Central mesh recurrence after incisional hernia repair with Marlex—are the meshes strong enough? *Hernia* 2001;5(3):164-167.
- (23) Seker D, Kulacoglu H. Long-Term Complications of Mesh Repairs for Abdominal-Wall Hernias. *J Long Term Eff Med* 2011;21(3):205-218.
- (24) Song C, Alijani A, Frank T, Hanna G, Cuschieri A. Mechanical properties of the human abdominal wall measured in vivo during insufflation for laparoscopic surgery. *Surg Endosc* 2006;20(6):987-990.
- (25) Song C, Alijani A, Frank T, Hanna G, Cuschieri A. Elasticity of the living abdominal wall in laparoscopic surgery. *J Biomech* 2006;39(3):587-591.
- (26) Paoletti S. *The Fasciae: Anatomy, Dysfunction and Treatment*. 1<sup>st</sup> Ed. Seattle: Eastland Press; 2006.
- (27) Raghow R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *The FASEB journal* 1994;8(11):823-831.
- (28) Rath A, Chevrel J. The healing of laparotomies: review of the literature. *Hernia* 1998;2(3):145-149.
- (29) Baffoni L, Frisoni M, Maccaferri M, Ferri S. Systemic lupus erythematosus and eosinophilic fasciitis: an unusual association. *Clin Rheumatol* 1995;14(5):591-592.
- (30) Morales M, Dias J, Queiroz A, Santiago M. Fasciitis-panniculitis syndrome simulating deep venous thrombosis. *Eur J Intern Med* 2007;18(3):244-245.
- (31) Condon RE. Surgical anatomy of the transversus abdominis and transversalis fascia. *Ann Surg* 1971;173(1):1-5.
- (32) Gomes AV, Potter JD, Szczesna-Cordary D. The role of troponins in muscle contraction. *IUBMB Life* 2002;54(6):323-333.
- (33) DuBay DA, Choi W, Urbanchek MG, Wang X, Adamson B, Dennis RG, et al. Incisional herniation induces decreased abdominal wall compliance via oblique muscle atrophy and fibrosis. *Ann Surg* 2007 Jan;245(1):140-146.

- (34) Schaap LA, Pluijm SMF, Deeg DJH, Visser M. Inflammatory markers and loss of muscle mass (sarcopenia) and strength. *Am J Med* 2006;119(6):526. e9-526. e17.
- (35) Reid MB, Li YP. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir res* 2001;2(5):269-272.
- (36) Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001;11(9):372-377.
- (37) Nielsen S, Pedersen BK. Skeletal muscle as an immunogenic organ. *Curr Opin in Pharmacol* 2008;8(3):346-351.
- (38) Lightfoot A, McArdle A, Griffiths RD. Muscle in defense. *Crit Care Med* 2009;37(10):S384-S390.
- (39) Figarella-Branger D, Civatte M, Bartoli C, Pellissier JF. Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. *Muscle Nerve* 2003;28(6):659-682.
- (40) Bartoccioni E, Michaelis D, Hohlfeld R. Constitutive and cytokine-induced production of interleukin-6 by human myoblasts. *Immunol Lett* 1994;42(3):135-138.
- (41) De Rossi M, Bernasconi P, Baggi F, De Waal Malefyt R, Mantegazza R. Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation. *Int Immunol* 2000;12(9):1329-1335.
- (42) Langevin HM. Connective tissue: A body-wide signaling network? *Med Hypotheses* 2006;66(6):1074-1077.
- (43) Hay ED. *Cell biology of extracellular matrix*. 2<sup>nd</sup> Ed. New York: Springer; 1991.
- (44) Gemmiti CV, Guldborg RE. Shear stress magnitude and duration modulates matrix composition and tensile mechanical properties in engineered cartilaginous tissue. *Biotechnol Bioeng* 2009;104(4):809-820.
- (45) Martin I, Obradovic B, Treppo S, Grodzinsky A, Langer R, Freed L, et al. Modulation of the mechanical properties of tissue engineered cartilage. *Biorheology* 2000;37(1/2):141-148.
- (46) Lin H, Yang G, Tan J, Tuan RS. Influence of decellularized matrix derived from human mesenchymal stem cells on their proliferation, migration and multi-lineage differentiation potential. *Biomaterials* 2012; 33(18):4480-4489.
- (47) Guilak F, Cohen DM, Estes BT, Gimble JM, Liedtke W, Chen CS. Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell* 2009;5(1):17-26.
- (48) Stern MM, Myers RL, Hammam N, Stern KA, Eberli D, Kritchevsky SB, et al. The influence of extracellular matrix derived from skeletal muscle tissue on the proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells ex vivo. *Biomaterials* 2009;30(12):2393-2399.

- (49) Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 2009;324(5935):1673-1677.
- (50) Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10(1):21-33.
- (51) Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 2009;326(5957):1216-1219.
- (52) Sorokin L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010;10(10):712-723.
- (53) Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14(5):608-616.
- (54) Kragstrup TW, Kjaer M, Mackey AL. Structural, biochemical, cellular, and functional changes in skeletal muscle extracellular matrix with aging. *Scand J Med Sci Sports* 2011;21(6):749-757.
- (55) Hukins DWL, Aspden RM. Composition and properties of connective tissues. *Trends Biochem Sci* 1985;10(7):260-264.
- (56) Ushiki T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol* 2002;65(2):109-126.
- (57) Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen* 2009;17(2):153-162.
- (58) Mizuguchi T, Matsumoto N. Recent progress in genetics of Marfan syndrome and Marfan-associated disorders. *J Hum Genet* 2007;52(1):1-12.
- (59) Van Dijk FS, Nesbitt IM, Nikkels PGJ, Dalton A, Bongers EMHF, Van De Kamp JM, et al. CRTAP mutations in lethal and severe osteogenesis imperfecta: the importance of combining biochemical and molecular genetic analysis. *Eur J Hum Genet* 2009;17(12):1560-1569.
- (60) De Paepe A, Malfait F. The Ehlers-Danlos Syndrome, a disorder with many faces. *Clin Genet* 2012; 82(1): 1-11.
- (61) Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *The Lancet* 2001 9/15;358(9285):903-911.
- (62) Bei R, Masuelli L, Palumbo C, Tresoldi I, Scardino A, Modesti A. Long-lasting tissue inflammatory processes trigger autoimmune responses to extracellular matrix molecules. *Int Rev Immunol* 2008;27(3):137-175.
- (63) Geyer M, Müller-Ladner U. The pathogenesis of systemic sclerosis revisited. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011;40(2):92-103.
- (64) Guillemette MD, Cui B, Roy E, Gauvin R, Giasson CJ, Esch MB, et al. Surface topography induces 3D self-orientation of cells and extracellular matrix resulting in improved tissue function. *Integr.Biol.* 2009;1(2):196-204.

- (65) Engler AJ, Humbert PO, Wehrle-Haller B, Weaver VM. Multiscale modeling of form and function. *Science* 2009;324(5924):208.
- (66) Fratzl P, Weinkamer R. Nature's hierarchical materials. *Prog Mater Sci* 2007;52(8):1263-1334.
- (67) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>th</sup> Ed. New York: Garland Science 2002;34(1463):86.
- (68) Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatr Res* 2008;63(5):492-496.
- (69) Sasaki N, Odajima S. Elongation mechanism of collagen fibrils and force-strain relations of tendon at each level of structural hierarchy. *J Biomech* 1996;29(9):1131-1136.
- (70) Buehler MJ. Nature designs tough collagen: explaining the nanostructure of collagen fibrils. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103(33):12285-12290.
- (71) Wang JHC. Mechanobiology of tendon. *J Biomech* 2006;39(9):1563-1582.
- (72) Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg* 2001;38(2):72.
- (73) Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14(5):538-546.
- (74) Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(5):349-363.
- (75) Kessler D, Dethlefsen S, Haase I, Plomann M, Hirche F, Krieg T, et al. Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a "synthetic" phenotype. *J Biol Chem* 2001;276(39):36575-36585.
- (76) Chiquet M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix biology* 1999;18(5):417-426.
- (77) Pizzo AM, Kokini K, Vaughn LC, Waisner BZ, Voytik-Harbin SL. Extracellular matrix (ECM) microstructural composition regulates local cell-ECM biomechanics and fundamental fibroblast behavior: a multidimensional perspective. *J Appl Physiol* 2005;98(5):1909-1921.
- (78) Grammer JB, Böhm J, Dufour A, Benz M, Lange R, Bauernschmitt R. Atrial fibrosis in heart surgery patients. *Basic Res Cardiol* 2005;100(3):288-294.
- (79) Read RC. Metabolic factors contributing to herniation A review. *Hernia* 1998;2(2):51-55.
- (80) Finkbohner R, Johnston D, Crawford ES, Coselli J, Milewicz DM. Marfan syndrome: long-term survival and complications after aortic aneurysm repair. *Circulation* 1995;91(3):728-733.

- (81) Girotto JA, Malaisrie SC, Bulkely G, Manson PN. Recurrent ventral herniation in Ehlers-Danlos syndrome. *Plast Reconstr Surg* 2000;106(7):1520-1526.
- (82) Adye B, Luna G. Incidence of abdominal wall hernia in aortic surgery. *Am J Surg* 1998;175(5):400-402.
- (83) Friedman DW, Boyd CD, Norton P, Greco RS, Boyarsky AH, Mackenzie JW, et al. Increases in type III collagen gene expression and protein synthesis in patients with inguinal hernias. *Ann Surg* 1993;218(6):754-760.
- (84) Klinge U, Si Z, Zheng H, Schumpelick V, Bhardwaj R, Klosterhalfen B. Collagen I/III and matrix metalloproteinases (MMP) 1 and 13 in the fascia of patients with incisional hernias. *J Invest Surg* 2001;14(1):47-54.
- (85) Si Z, Bhardwaj R, Rosch R, Merten PR, Klosterhalfen B, Klinge U. Impaired balance of type I and type III procollagen mRNA in cultured fibroblasts of patients with incisional hernia. *Surgery* 2002;131(3):324-331.
- (86) Junge K, Klinge U, Rosch R, Mertens PR, Kirch J, Klosterhalfen B, et al. Decreased collagen type I/III ratio in patients with recurring hernia after implantation of alloplastic prostheses. *Langenbecks Arch Surg* 2004;389(1):17-22.
- (87) Rosch R, Junge K, Knops M, Lynen P, Klinge U, Schumpelick V. Analysis of collagen-interacting proteins in patients with incisional hernias. *Langenbecks Arch Surg* 2003;387(11):427-432.
- (88) Schroeder JA, Jackson LF, Lee DC, Camenisch TD. Form and function of developing heart valves: coordination by extracellular matrix and growth factor signaling. *J Mol Med (Berl)* 2003;81(7):392-403.
- (89) Gomes J, Amankwah R, Powell-Richards A, Dua H. Sodium hyaluronate (hyaluronic acid) promotes migration of human corneal epithelial cells in vitro. *Br J Ophthalmol* 2004;88(6):821-825.
- (90) Rühland C, Schönherr E, Robenek H, Hansen U, Iozzo RV, Bruckner P, et al. The glycosaminoglycan chain of decorin plays an important role in collagen fibril formation at the early stages of fibrillogenesis. *FEBS J* 2007;274(16):4246-4255.
- (91) Hu M, Sabelman EE, Cao Y, Chang J, Hentz VR. Three-dimensional hyaluronic acid grafts promote healing and reduce scar formation in skin incision wounds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2003;67(1):586-592.
- (92) Weindl G, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting H. Hyaluronic acid in the treatment and prevention of skin diseases: molecular biological, pharmaceutical and clinical aspects. *Skin Pharmacol Physiol* 2004;17(5):207-213.
- (93) Uppal R, Ramaswamy GN, Arnold C, Goodband R, Wang Y. Hyaluronic acid nanofiber wound dressing—production, characterization, and in vivo behavior. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011;97(1):20-29.
- (94) Kirker KR, Luo Y, Nielson JH, Shelby J, Prestwich GD. Glycosaminoglycan hydrogel films as bio-interactive dressings for wound healing. *Biomaterials* 2002;23(17):3661-3671.

- (95) Cook JL, Fox DB, Kuroki K, Jayo M, De Deyne PG. In vitro and in vivo comparison of five biomaterials used for orthopedic soft tissue augmentation. *Am J Vet Res* 2008;69(1):148-156.
- (96) Pieper J, Van Wachem P, Van Luyn M, Brouwer L, Hafmans T, Veerkamp J, et al. Attachment of glycosaminoglycans to collagenous matrices modulates the tissue response in rats. *Biomaterials* 2000;21(16):1689-1699.
- (97) Faleris J, Hernandez RMC, Wetzel D, Dodds R, Greenspan D. In-vivo and in-vitro histological evaluation of two commercially available acellular dermal matrices. *Hernia* 2011;15(2):147-156.
- (98) Linhardt RJ, Toida T. Role of glycosaminoglycans in cellular communication. *Acc Chem Res* 2004;37(7):431-438.
- (99) Taylor KR, Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J* 2006;20(1):9-22.
- (100) Butler CE, Navarro FA, Orgill DP. Reduction of abdominal adhesions using composite collagen-GAG implants for ventral hernia repair. *J Biomed Mater Res* 2001;58(1):75-80.
- (101) Schaefer L, Schaefer RM. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res* 2010;339(1):237-246.
- (102) Heinegård D. Proteoglycans and more—from molecules to biology. *Int J Exp Pathol* 2009;90(6):575-586.
- (103) Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen L, Heinegård D, Twardzik D, Border W, et al. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J* 1994;302(Pt 2):527-534.
- (104) Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 2007;446(7139):1030-1037.
- (105) Saksela O, Moscatelli D, Sommer A, Rifkin DB. Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol* 1988;107(2):743-751.
- (106) Massague J, Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 1993;62(1):515-541.
- (107) Wang L, Fuster M, Sriramarao P, Esko JD. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat Immunol* 2005;6(9):902-910.
- (108) Yanagishita M, Hascall V, Sandberg K, Ji H, Clark A, Shapira H, et al. Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 1992; 267(14):9451-9454.
- (109) Elenius K, Jalkanen M. Function of the syndecans—a family of cell surface proteoglycans. *J Cell Sci* 1994;107(11):2975-2982.

- (110) Ferdous Z, Peterson S, Tseng H, Anderson D, Iozzo R, Grande-Allen K. A role for decorin in controlling proliferation, adhesion, and migration of murine embryonic fibroblasts. *J Biomed Mater Res A* 2010;93(2):419-428.
- (111) Mythreye K, Blobel GC. Proteoglycan signaling co-receptors: roles in cell adhesion, migration and invasion. *Cell Signal* 2009;21(11):1548-1558.
- (112) Wight TN, Kinsella MG, Qwarnström EE. The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 1992;4(5):793-801.
- (113) Dutt S, Cassoly E, Dours-Zimmermann MT, Matasci M, Stoeckli ET, Zimmermann DR. Versican V0 and V1 direct the growth of peripheral axons in the developing chick hindlimb. *J Neurosci* 2011;31(14):5262-5270.
- (114) Giamanco K, Morawski M, Matthews R. Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. *Neuroscience* 2010;170(4):1314-1327.
- (115) Hienola A, Tumova S, Kuleskiy E, Rauvala H. N-syndecan deficiency impairs neural migration in brain. *J Cell Biol* 2006;174(4):569-580.
- (116) Young MF, Bi Y, Ameye L, Chen XD. Biglycan knockout mice: new models for musculoskeletal diseases. *Glycoconj J* 2002;19(4):257-262.
- (117) Rodrigues LMR, Theodoro TR, Matos LL, Mader AM, Milani C, Pinhal MAS. Heparanase isoform expression and extracellular matrix remodeling in intervertebral disc degenerative disease. *Clinics* 2011;66(5):903-909.
- (118) Pockert AJ, Richardson SM, Le Maitre CL, Lyon M, Deakin JA, Buttle DJ, et al. Modified expression of the ADAMTS enzymes and tissue inhibitor of metalloproteinases 3 during human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Rheum* 2009 Feb;60(2):482-491.
- (119) Huang M, Wang HQ, Zhang Q, Yan XD, Hao M, Luo ZJ. Alterations of ADAMTSs and TIMP-3 in human nucleus pulposus cells subjected to compressive load: Implications in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. *J Orthop Res* 2012; 30(2): 267-273.
- (120) Séguin CA, Bojarski M, Pilliar RM, Roughley PJ, Kandel RA. Differential regulation of matrix degrading enzymes in a TNF $\alpha$ -induced model of nucleus pulposus tissue degeneration. *Matrix Biology* 2006 9;25(7):409-418.
- (121) Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* 2005;7(4):R732-745.
- (122) Cong L, Pang H, Xuan D, Tu GJ. Association between the expression of aggrecan and the distribution of aggrecan gene variable number of tandem repeats with symptomatic lumbar disc herniation in Chinese Han of Northern China. *Spine* 2010;35(14):1371-1376.
- (123) Rutges JPHJ, Nikkels PGJ, Oner F, Ottink K, Verbout A, Castelein RJM, et al. The presence of extracellular matrix degrading metalloproteinases during fetal development of the intervertebral disc. *Eur Spine J* 2010;19(8):1340-1346.



- (124) Wolf K, Friedl P. Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends Cell Biol* 2011;21(12):736-744.
- (125) Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* 2012;196(4):395-406.
- (126) Friedl P, Wolf K. Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28(1):129-135.
- (127) Ricard-Blum S, Ballut L. Matricryptins derived from collagens and proteoglycans. *Front Biosci* 2011 Jan 1;16:674-697.
- (128) Tran KT, Lamb P, Deng JS. Matrikines and matricryptins: Implications for cutaneous cancers and skin repair. *J Dermatol Sci* 2005;40(1):11-20.
- (129) Davis GE, Bayless KJ, Davis MJ, Meininger GA. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am J Pathol* 2000;156(5):1489-1498.
- (130) Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* 2010;20(3):161-168.
- (131) Thomas C, Fuller C, Whittles C, Sharif M. Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15(1):27-34.
- (132) Dreier R, Wallace S, Fuchs S, Bruckner P, Grassel S. Paracrine interactions of chondrocytes and macrophages in cartilage degradation: articular chondrocytes provide factors that activate macrophage-derived pro-gelatinase B (pro-MMP-9). *J Cell Sci* 2001 Nov;114(Pt 21):3813-3822.
- (133) Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL. TNF- $\alpha$  stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF- $\kappa$ B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 1):131.
- (134) Abdollahi A, Maddah G, Mehrabi B, Jangjoo A, Forghani M, Sharbaf N. Prosthetic incisional hernioplasty: clinical experience with 354 cases. *Hernia* 2010;14(6):569-573.
- (135) Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L, Winberg JO. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J* 2011;278(1):28-45.
- (136) Nagase H, Woessner Jr JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274(31):21491-21494.
- (137) Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000;14(17):2123-2133.
- (138) Altincicek B, Vilcinskas A. Identification of a lepidopteran matrix metalloproteinase with dual roles in metamorphosis and innate immunity. *Dev Comp Immunol* 2008;32(4):400-409.
- (139) Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 2001;11(11):S37-S43.

- (140) Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005;9(2):267-285.
- (141) Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(6-7):1334-1347.
- (142) Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res* 2000;2(1):10-19.
- (143) Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4(8):617-629.
- (144) Elkington P, O'Kane C, Friedland J. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol* 2005;142(1):12-20.
- (145) Swindle CS, Tran KT, Johnson TD, Banerjee P, Mayes AM, Griffith L, et al. Epidermal growth factor (EGF)-like repeats of human tenascin-C as ligands for EGF receptor. *J Cell Biol* 2001;154(2):459-468.
- (146) Schenk S, Quaranta V. Tales from the crypt [ic] sites of the extracellular matrix. *Trends Cell Biol* 2003;13(7):366-375.
- (147) Tran KT, Griffith L, Wells A. Extracellular matrix signaling through growth factor receptors during wound healing. *Wound Repair Regen* 2004 May-Jun;12(3):262-268.
- (148) Chang YH, Lin I, Tsay GJ, Yang SC, Yang TP, Ho KT, et al. Elevated circulatory MMP-2 and MMP-9 levels and activities in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Biochem* 2008;41(12):955-959.
- (149) Blom AB, van Lent PL, Libregts S, Holthuysen AE, van der Kraan PM, van Rooijen N, et al. Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis Rheum* 2007;56(1):147-157.
- (150) Dollery CM, Libby P. Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res* 2006;69(3):625-635.
- (151) Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2002;110(5):625-632.
- (152) Hua H, Li M, Luo T, Yin Y, Jiang Y. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cell Mol Life Sci* 2011;68(23):3853-3868.
- (153) Lee KS, Min KH, Kim SR, Park SJ, Park HS, Jin GY, et al. Vascular endothelial growth factor modulates matrix metalloproteinase-9 expression in asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 2006;174(2):161-170.
- (154) Lechapt-Zalcman E, Prulière-Escabasse V, Advenier D, Galiacy S, Charrière-Bertrand C, Coste A, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 increases airway wound repair via MMP-2 upregulation: a new pathway for epithelial wound repair? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290(6):L1277-L1282.

- (155) Abraham M, Shapiro S, Lahat N, Miller A. The role of IL-18 and IL-12 in the modulation of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in monocytic cells. *Int Immunol* 2002;14(12):1449-1457.
- (156) Lee MH, Murphy G. Matrix metalloproteinases at a glance. *J Cell Sci* 2004;117(18):4015-4016.
- (157) Rosch R, Lynen-Jansen P, Junge K, Knops M, Klosterhalfen B, Klinge U, et al. Biomaterial-dependent MMP-2 expression in fibroblasts from patients with recurrent incisional hernias. *Hernia* 2006;10(2):125-130.
- (158) Salameh J, Talbott LDM, May W, Gosheh B, Vig PJS, McDaniel DO. Role of biomarkers in incisional hernias. *Am Surg* 2007;73(6):561-568.
- (159) The "a disintegrin and metalloprotease"(ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol* 2009;20(2):126-137.
- (160) Gomez D, Alonso D, Yoshiji H, Thorgeirsson U. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74(2):111-122.
- (161) Apte SS, Olsen BR, Murphy G. The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem* 1995;270(24):14313-14318.
- (162) Howard E, Banda M. Binding of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 to two distinct sites on human 72-kDa gelatinase. Identification of a stabilization site. *J Biol Chem* 1991;266(27):17972-17977.
- (163) Butler GS, Apte SS, Willenbrock F, Murphy G. Human tissue inhibitor of metalloproteinases 3 interacts with both the N-and C-terminal domains of gelatinases A and B. *J Biol Chem* 1999;274(16):10846-10851.
- (164) Bigg HF, Shi YE, Liu YE, Steffensen B, Overall CM. Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. *J Biol Chem* 1997;272(24):15496-15500.
- (165) Tandara AA, Mustoe TA. MMP-and TIMP-secretion by human cutaneous keratinocytes and fibroblasts—impact of coculture and hydration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2011;64(1):108-116.
- (166) Oum'Hamed Z, Garnotel R, Josset Y, Trenteseaux C, Laurent-Maquin D. Matrix metalloproteinases MMP-2,-9 and tissue inhibitors TIMP-1,-2 expression and secretion by primary human osteoblast cells in response to titanium, zirconia, and alumina ceramics. *J Biomed Mater Res A* 2004;68(1):114-122.
- (167) Goessler UR, Bieback K, Bugert P, Naim R, Schafer C, Sadick H, et al. Human chondrocytes differentially express matrix modulators during in vitro expansion for tissue engineering. *Int J Mol Med* 2005 Oct;16(4):509-515.
- (168) Kousidou OC, Roussidis A, Theocharis A, Karamanos N. Expression of MMPs and TIMPs genes in human breast cancer epithelial cells depends on cell culture conditions and is associated with their invasive potential. *Anticancer Res* 2004;24(6):4025-4030.

- (169) Sato T, Koike L, Miyata Y, Hirata M, Mimaki Y, Sashida Y, et al. Inhibition of activator protein-1 binding activity and phosphatidylinositol 3-kinase pathway by nobiletin, a polymethoxy flavonoid, results in augmentation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 production and suppression of production of matrix metalloproteinases-1 and-9 in human fibrosarcoma HT-1080 cells. *Cancer Res* 2002;62(4):1025-1029.
- (170) Sohara N, Trojanowska M, Reuben A. Oncostatin M stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 via a MEK-sensitive mechanism in human myofibroblasts. *J Hepatol* 2002;36(2):191-199.
- (171) Overall CM. Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression. *Ann N Y Acad Sci* 1994 Sep 6;732:51-64.
- (172) Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 1992 Feb 17;298(1):29-32.
- (173) Bertaux B, Hornebeck W, Eisen AZ, Dubertret L. Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Invest Dermatol* 1991 Oct;97(4):679-685.
- (174) Wang T, Yamashita K, Iwata K, Hayakawa T. Both tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and TIMP-2 activate Ras but through different pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296(1):201-205.
- (175) Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, Wang J, Fukushima P, Mansoor A, et al. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest* 1998;102(11):2002-2010.
- (176) Li G, Fridman R, Kim HRC. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Res* 1999;59(24):6267-6275.
- (177) Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L, Cilli M, Vacca A, et al. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer* 1998;75(2):246-253.
- (178) Bloomston M, Shafii A, Zervos EE, Rosemurgy AS. TIMP-1 overexpression in pancreatic cancer attenuates tumor growth, decreases implantation and metastasis, and inhibits angiogenesis. *J Surg Res* 2002;102(1):39-44.
- (179) Johnson MD, Kim HRC, Chesler L, Tsao-Wu G, Polverini PJ, Bouck N. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J Cell Physiol* 1994;160(1):194-202.
- (180) Jaworski DM, Soloway P, Caterina J, Falls WA. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2)-deficient mice display motor deficits. *J Neurobiol* 2006;66(1):82-94.
- (181) Mi M, Shi S, Li T, Holz J, Lee YJ, Sheu T, et al. TIMP2 deficient mice develop accelerated osteoarthritis via promotion of angiogenesis upon destabilization of the medial meniscus. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;423(2):366-372.

- (182) Yoon ST. Molecular therapy of the intervertebral disc. *Spine J* 2005 Nov-Dec;5(6 Suppl):280S-286S.
- (183) Creemers EEJM, Cleutjens JPM, Smits JFM, Daemen MJAP. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001;89(3):201-210.
- (184) Trengove NJ, Stacey MC, Macauley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, et al. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen* 1999;7(6):442-452.
- (185) Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002;90(5):520-530.
- (186) Wilson EM, Gunasinghe HR, Coker ML, Sprunger P, Lee-Jackson D, Bozkurt B, et al. Plasma matrix metalloproteinase and inhibitor profiles in patients with heart failure. *J Card Fail* 2002;8(6):390-398.
- (187) Medina C, Radomski MW. Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;318(3):933-938.
- (188) Tchetverikov I, Ronday H, Van El B, Kiers G, Verzijl N, TeKoppele J, et al. MMP profile in paired serum and synovial fluid samples of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004;63(7):881-883.
- (189) Leroy V, Monier F, Bottari S, Trocme C, Sturm N, Hilleret MN, et al. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* 2004 Feb;99(2):271-279.
- (190) Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000;113(6):443-453.
- (191) Le Bousse-Kerdilès MC, Martyré MC, Samson M. Cellular and molecular mechanisms underlying bone marrow and liver fibrosis: a review. *Eur Cytokine Netw* 2008;19(2):69-80.
- (192) Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G, Laurent GJ. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29(1):5-17.
- (193) Schiltz J, Mayne R, Holtzer H. The Synthesis of Collagen and Glycosaminoglycans by Dedifferentiated Chondroblasts in Culture. *Differentiation* 1973;1(2):97-108.
- (194) Ross FP, Christiano AM. Nothing but skin and bone. *J Clin Invest* 2006;116(5):1140-1149.
- (195) Huang E, Bi Y, Jiang W, Luo X, Yang K, Gao JL, et al. Conditionally Immortalized Mouse Embryonic Fibroblasts Retain Proliferative Activity without Compromising Multipotent Differentiation Potential. *PloS one* 2012;7(2):e32428.
- (196) Eyden B. The myofibroblast: a study of normal, reactive and neoplastic tissues, with an emphasis on ultrastructure. Part 1--normal and reactive cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2005;37(2):109-204.

- (197) McAnulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(4):666-671.
- (198) Zavadil J, Böttinger EP. TGF- $\beta$  and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005;24(37):5764-5774.
- (199) Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103(35):13180-13185.
- (200) Quan TE, Cowper S, Wu SP, Bockenstedt LK, Bucala R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol* 2004 Apr;36(4):598-606.
- (201) Hashimoto N, Jin H, Liu T, Chensue SW, Phan SH. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2004;113(2):243-252.
- (202) Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica* 2009;94(2):258-263.
- (203) da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006;119(11):2204-2213.
- (204) Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276(5309):71-74.
- (205) Wiig H, Rubin K, Reed R. New and active role of the interstitium in control of interstitial fluid pressure: potential therapeutic consequences. *Acta Anaesthesiol Scand* 2003;47(2):111-121.
- (206) Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 2006;119(19):3901-3903.
- (207) Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Nov;2(11):793-805.
- (208) Ruest PJ, Roy S, Shi E, Mernaugh RL, Hanks SK. Phosphospecific antibodies reveal focal adhesion kinase activation loop phosphorylation in nascent and mature focal adhesions and requirement for the autophosphorylation site. *Cell Growth Differ* 2000;11(1):41-48.
- (209) Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995;268(5208):233-239.
- (210) Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12(1):463-519.
- (211) Mammoto A, Ingber DE. Cytoskeletal control of growth and cell fate switching. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21(6):864-870.
- (212) Reddig PJ, Juliano RL. Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24(3):425-439.

- (213) Assoian RK, Zhu X. Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9(1):93-98.
- (214) Hirst SJ, Twort CHC, Lee TH. Differential effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation and phenotype. *Am J Resp Cell Mol Biol* 2000;23(3):335-344.
- (215) Freyer AM, Johnson SR, Hall IP. Effects of growth factors and extracellular matrix on survival of human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001 Nov;25(5):569-576.
- (216) Ulrich TA, de Juan Pardo EM, Kumar S. The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer Res* 2009;69(10):4167-4174.
- (217) Klein EA, Yin L, Kothapalli D, Castagnino P, Byfield FJ, Xu T, et al. Cell-cycle control by physiological matrix elasticity and in vivo tissue stiffening. *Curr Biol* 2009;19(18):1511-1518.
- (218) Maquart FX, Pasco S, Ramont L, Hornebeck W, Monboisse JC. An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity: implication in tumor invasion. *Crit Rev Oncol* 2004;49(3):199-202.
- (219) Duca L, Floquet N, Alix AJP, Haye B, Debelle L. Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol* 2004;49(3):235-244.
- (220) Trump BE, Berezesky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol* 1997;25(1):82-88.
- (221) Ghosh A, Joo NE, Chen TC, Kapila YL. Proapoptotic fibronectin fragment induces the degradation of ubiquitinated p53 via proteasomes in periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 2010;45(4):481-487.
- (222) Zahir N, Weaver VM. Death in the third dimension: apoptosis regulation and tissue architecture. *Curr Opin Genet Dev* 2004;14(1):71-80.
- (223) von Wnuck Lipinski K, Keul P, Lucke S, Heusch G, Wohlschlaeger J, Baba HA, et al. Degraded collagen induces calpain-mediated apoptosis and destruction of the X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis (xIAP) in human vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2006;69(3):697-705.
- (224) Gilmore AP, Owens TW, Foster FM, Lindsay J. How adhesion signals reach a mitochondrial conclusion--ECM regulation of apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2009 Oct;21(5):654-661.
- (225) Wu Y, Rizzo V, Liu Y, Sainz IM, Schmuckler NG, Colman RW. Kininostatin associates with membrane rafts and inhibits  $\alpha\beta 3$  integrin activation in human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(9):1968-1975.
- (226) Scott A, Khan K, Heer J, Cook J, Lian O, Duronio V. High strain mechanical loading rapidly induces tendon apoptosis: an ex vivo rat tibialis anterior model. *Br J Sports Med* 2005;39(5):e25-e25.

- (227) D'lima D, Hashimoto S, Chen P, Colwell C, Lotz M. Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9(8):712-719.
- (228) Allen P, Newland A, Bustin S. The role of apoptosis (programmed cell death) in haemopoiesis and the immune system. *Blood Rev* 1993;7(1):63-73.
- (229) Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30(9):1019-1030.
- (230) Eastman A. Assays for DNA fragmentation, endonucleases, and intracellular pH and Ca<sup>2+</sup> associated with apoptosis. *Methods Cell Biol* 1995;46:41-55.
- (231) Weinmann M, Jendrossek V, Handrick R, Güner D, Goecke B, Belka C. Molecular ordering of hypoxia-induced apoptosis: critical involvement of the mitochondrial death pathway in a FADD/caspase-8 independent manner. *Oncogene* 2004;23(21):3757-3769.
- (232) Anderson AJ, Ruehl WW, Fleischmann LK, Stenstrom K, Entriken TL, Cummings BJ. DNA damage and apoptosis in the aged canine brain: Relationship to A $\beta$  deposition in the absence of neuritic pathology. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2000;24(5):787-799.
- (233) Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007;127(3):514-525.
- (234) Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol* 2004 Jun;36(6):1031-1037.
- (235) Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008;16(5):585-601.
- (236) Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 2007;25(1):9-18.
- (237) Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000;407(6805):784-788.
- (238) Werner F, Jain MK, Feinberg MW, Sibinga NES, Pellacani A, Wiesel P, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem* 2000;275(47):36653-36658.
- (239) Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2010 Apr;6(4):232-241.
- (240) Faustman D, Davis M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9(6):482-493.
- (241) Makrygiannakis D, Catrina AI. Apoptosis as a mechanism of action of tumor necrosis factor antagonists in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2012;39(4):679-685.
- (242) Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell* 2010;140(6):871-882.



- (243) Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol* 1997;151(2):317-322.
- (244) Zhang Y, Cao HJ, Graf B, Meekins H, Smith TJ, Phipps RP. Cutting edge: CD40 engagement up-regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts. *J Immunol* 1998;160(3):1053-1057.
- (245) Shanley TP, Wong HR. Signal transduction pathways in acute lung injury: NF- $\kappa$ B and AP-1. *Mol Biol of Acute Lung Injury* 2001:1-16.
- (246) Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol* 2001;22(4):199-204.
- (247) Brouty-Boyé D, Pottin-Clémenceau C, Doucet C, Jasmin C, Azzarone B. Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts. *Eur J Immunol* 2000;30(3):914-919.
- (248) Hogaboam CM, Steinhauser ML, Chensue SW, Kunkel SL. Novel roles for chemokines and fibroblasts in interstitial fibrosis. *Kidney Int* 1998;54(6):2152-2159.
- (249) Pap T, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Fibroblast biology: role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000;2(5):361-367.
- (250) Burger JWA, Luijendijk RW, Hop WCJ, Halm JA, Verdaasdonk EGG, Jeekel J. Long-term follow-up of a randomized controlled trial of suture versus mesh repair of incisional hernia. *Ann Surg* 2004;240(4):578-583.
- (251) Luijendijk RW, Hop WCJ, van den Tol MP, de Lange DCD, Braaksma MMJ, IJzermans JNM, et al. A comparison of suture repair with mesh repair for incisional hernia. *N Engl J Med* 2000;343(6):392-398.
- (252) Anthony T, Bergen PC, Kim LT, Henderson M, Fahey T, Rege RV, et al. Factors affecting recurrence following incisional herniorrhaphy. *World J Surg* 2000;24(1):95-101.
- (253) Robinson T, Clarke J, Schoen J, Walsh M. Major mesh-related complications following hernia repair. *Surg Endosc* 2005;19(12):1556-1560.
- (254) Dorairajan N. Inguinal hernia-yesterday, today and tomorrow. *Indian J Surg* 2004;66(3):137-139.
- (255) Rowling JT. Pathological changes in mummies. *Proc R Soc Med* 1961;54(5):409-415.
- (256) Bull W. Notes on cases of hernia which have relapsed after various operations for radical cure. *NY Med J* 1891;53:615-617.
- (257) Bassini E. On the Treatment of Inguinal Hernia. *Arch.f.klin.Chir* 1890;40(429):I890.

- (258) Ponka JL. The relaxing incision in hernia repair. *Am J Surg* 1968;115(4):552-557.
- (259) Farr CE. A modified technique for difficult inguinal hernias. *Surg., Gynec.& Obst* 1927;44:261.
- (260) McArthur L. AUTOPLASTIC SUTURE IN HERNIA, AND OTHER DIASTASES.—PRELIMINARY REPORT. *J Am Med Assoc* 1901;37(18):1162.
- (261) Gallie WE, LeMesurier A. The use of living sutures in operative surgery. *Can Med Assoc J* 1921;11(7):504.
- (262) Mair GB. Preliminary report on the use of whole skin-grafts as a substitute for fascial sutures in the treatment of herniæ. *Br J Surg* 1945;32(127):381-385.
- (263) Laurencin CT, Freeman JW. Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach. *Biomaterials* 2005;26(36):7530-7536.
- (264) Witzel O. Ueber die verschliessung von bauchwunden und brustpforten durch versenkte silberdrahtnetze. *Zentralbl Chir* 1900;27:257-272.
- (265) Burke GL. The corrosion of metals in tissues; and an introduction to tantalum. *Can Med Assoc J* 1940;43(2):125-128.
- (266) Jones TE, Newell E, Brubaker R. The use of alloy steel wire in the closure of abdominal wounds. *Surg Gynecol Obstet* 1941;72:1056-1059.
- (267) MELICK DW. Nylon suture. *Ann Surg* 1942;115(3):475.
- (268) George C, Ellis H. The results of incisional hernia repair: a twelve year review. *Ann R Coll Surg Engl* 1986;68(4):185-187.
- (269) Cumberland V. A preliminary report on the use of prefabricated nylon weave in the repair of ventral hernia. *Med J Aust* 1952;1(5):143-144.
- (270) Scales JT. Tissue reactions to synthetic materials. *Proc R Soc Med* 1953;46(8):647-652.
- (271) Hamer-Hodges DW, Scott NB. Surgeon's workshop. Replacement of an abdominal wall defect using expanded PTFE sheet (Gore-tex). *J R Coll Surg Edinb* 1985 Feb;30(1):65-67.
- (272) Lichtenstein IL, Shulman AG, Amid PK, Montllor MM. The tension-free hernioplasty. *Am J Surg* 1989;157(2):188-193.
- (273) Ferrando JM, Vidal J, Armengol M, Huguet P, Gil J, Manero JM, et al. Early imaging of integration response to polypropylene mesh in abdominal wall by environmental scanning electron microscopy: comparison of two placement techniques and correlation with tensiometric studies. *World J Surg* 2001;25(7):840-847.
- (274) Stoppa RE. The treatment of complicated groin and incisional hernias. *World J Surg* 1989;13(5):545-554.

- (275) Rives J, Pire JC, Flament JB, Palot JP, Body C. Treatment of large eventrations. New therapeutic indications apropos of 322 cases. *Chirurgie* 1985;111(3):215-225.
- (276) Wantz GE. Incisional hernioplasty with Mersilene. *Surg Gynecol Obstet* 1991 Feb;172(2):129-137.
- (277) Park A, Birch DW, Lovrics P. Laparoscopic and open incisional hernia repair: a comparison study. *Surgery* 1998;124(4):816-822.
- (278) Holzman M, Purut C, Reintgen K, Eubanks S, Pappas T. Laparoscopic ventral and incisional hernioplasty. *Surg Endosc* 1997;11(1):32-35.
- (279) Heniford BT, Park A, Ramshaw BJ, Voeller G. Laparoscopic ventral and incisional hernia repair in 407 patients1. *J Am Coll Surg* 2000;190(6):645-650.
- (280) Doran F, Gibbins R, Whitehead R. A report on 313 inguinal herniae repaired with nylon nets. *Br J Surg* 1961;48(210):430-434.
- (281) Johnson-Nurse C, Jenkins D. The use of flexible carbon fibre in the repair of experimental large abdominal incisional hernias. *Br J Surg* 1980;67(2):135-137.
- (282) LeVeen HH, Barberio JR. Tissue reaction to plastics used in surgery with special reference to Teflon. *Ann Surg* 1949;129(1):74-84.
- (283) LUDINGTON LG, WOODWARD ER. Use of teflon mesh in the repair of musculofascial defects. *Surgery* 1959 Aug;46(2):364-373.
- (284) ABRAHAMS JI, JONASSEN OT. The use of polyvinyl sponge in the repair of abdominal wall hernias. *Surgery* 1957 Aug;42(2):336-341.
- (285) ADLER RH, DARBY C. Use of a porous synthetic sponge (Ivalon) in surgery. I. Tissue responses after implantation. *U S Armed Forces Med J* 1960 Nov;11:1349-1364.
- (286) Mehrabi M, Jangjoo A, Tavoosi H, Kahrom M, Kahrom H. Long-term outcome of Rives–Stoppa technique in complex ventral incisional hernia repair. *World J Surg* 2010;34(7):1696-1701.
- (287) Yaghoobi Notash A, Yaghoobi Notash A, Seied Farshi J, Ahmadi Amoli H, Salimi J, Mamarabadi M. Outcomes of the Rives–Stoppa technique in incisional hernia repair: ten years of experience. *Hernia* 2007;11(1):25-29.
- (288) DeBord JR. The historical development of prosthetics in hernia surgery. *Surg Clin North Am* 1998;78(6):973-1006.
- (289) USHER FC, GANNON JP. Marlex mesh, a new plastic mesh for replacing tissue defects: I. experimental studies. *AMA Arch Surg* 1959;78(1):131-137.
- (290) USHER FC, ALLEN JE,Jr, CROSTHWAIT RW, COGAN JE. Polypropylene monofilament. A new, biologically inert suture for closing contaminated wounds. *JAMA* 1962 Mar 10;179:780-782.
- (291) USHER FC. Hernia Repair with Knitted Polypropylene Mesh. *Surg Gynecol Obstet* 1963 Aug;117:239-240.

- (292) Ladurner R, Chiapponi C, Linhuber Q, Mussack T. Long term outcome and quality of life after open incisional hernia repair-light versus heavy weight meshes. *BMC Surg* 2011;11(1):25.
- (293) Qadri SJF, Khan M, Wani SN, Nazir SS, Rather A. Laparoscopic and open incisional hernia repair using polypropylene mesh-A comparative single centre study. *Int J Surg* 2010;8(6):479-483.
- (294) Yildirim M, Engin O, Karademir M, Hoser A, Calik B. Is Repair of Incisional Hernias by Polypropylene Mesh a Safe Procedure? *Med Princ Pract* 2010;19(2):129-132.
- (295) Di Vita G, D'Agostino P, Patti R, Arcara M, Caruso G, Davì V, et al. Acute inflammatory response after inguinal and incisional hernia repair with implantation of polypropylene mesh of different size. *Langenbecks Arch Surg* 2005;390(4):306-311.
- (296) Van't Riet M, Burger J, Bonthuis F, Jeekel J, Bonjer H. Prevention of adhesion formation to polypropylene mesh by collagen coating: a randomized controlled study in a rat model of ventral hernia repair. *Surg Endosc* 2004;18(4):681-685.
- (297) Borrazzo E, Belmont M, Boffa D, Fowler D. Effect of prosthetic material on adhesion formation after laparoscopic ventral hernia repair in a porcine model. *Hernia* 2004;8(2):108-112.
- (298) Brun J, Bordenave L, Lefebvre F, Bareille R, Barbie C, Rouais F, et al. Physical and biological characteristics of the main biomaterials used in pelvic surgery. *Biomed Mater Eng* 1992;2(4):203-225.
- (299) Carter PR, LeBlanc K, Hausmann M, Whitaker J, Rhynes VK, Kleinpeter K, et al. Does expanded polytetrafluoroethylene mesh really shrink after laparoscopic ventral hernia repair? *Hernia* 2011:1-5.
- (300) Gananadha S, Samra JS, Smith GS, Smith RC, Leibman S, Hugh TJ. Laparoscopic ePTFE mesh repair of incisional and ventral hernias. *ANZ J Surg* 2008;78(10):907-913.
- (301) Zografos GN, Mitropapas G, Vasiliadis G, Farfaras A, Ageli C, Margaritis E, et al. Open and laparoscopic approach in incisional hernia repair with ePTFE prosthesis. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2007 Jun;17(3):277-281.
- (302) Burger JWA, Halm J, Wijsmuller A, Raa S, Jeekel J. Evaluation of new prosthetic meshes for ventral hernia repair. *Surg Endosc* 2006;20(8):1320-1325.
- (303) Johnson EK, Hoyt CH, Dinsmore RC. Abdominal wall hernia repair: a long-term comparison of Sepramesh and Dualmesh in a rabbit hernia model. *Am Surg* 2004;70(8):657-661.
- (304) Heybeli T, Kulacoglu H, Genc V, Ergul Z, Ensari C, Kiziltay A, et al. Basic fibroblast growth factor loaded polypropylene meshes in repair of abdominal wall defects in rats. *Chirurgia (Bucur)* 2010;105:809-816.
- (305) Junge K, Rosch R, Anurov M, Titkova S, Öttinger A, Klinge U, et al. Modification of collagen formation using supplemented mesh materials. *Hernia* 2006;10(6):492-497.

- (306) López-Cano M, Armengol M, Quiles MT, Biel A, Velasco J, Huguet P, et al. Preventive midline laparotomy closure with a new bioabsorbable mesh: An experimental study. *J Surg Res* 2012. In Press. DOI 10.1016/j.jss.2012.05.041.
- (307) Ngo MD, Aberman HM, Hawes ML, Choi B, Gertzman AA. Evaluation of human acellular dermis versus porcine acellular dermis in an in vivo model for incisional hernia repair. *Cell Tissue Bank* 2011;12(2):135-145.
- (308) Adedeji OA, Bailey CA, Varma JS. Porcine dermal collagen graft in abdominal-wall reconstruction. *Br J Plast Surg* 2002 Jan;55(1):85-86.
- (309) Parker DM, Armstrong PJ, Frizzi JD, North JH, Jr. Porcine dermal collagen (Permacol) for abdominal wall reconstruction. *Curr Surg* 2006 Jul-Aug;63(4):255-258.
- (310) Catena F, Ansaloni L, Gazzotti F, Gagliardi S, Di Saverio S, D'Alessandro L, et al. Use of porcine dermal collagen graft (Permacol) for hernia repair in contaminated fields. *Hernia* 2007;11(1):57-60.
- (311) Orenstein S, Qiao Y, Klueh U, Kreutzer D, Novitsky Y. Activation of human mononuclear cells by porcine biologic meshes in vitro. *Hernia* 2010;14(4):401-407.
- (312) Petter-Puchner AH, Fortelny RH, Walder N, Mittermayr R, Öhlinger W, van Griensven M, et al. Adverse effects associated with the use of porcine cross-linked collagen implants in an experimental model of incisional hernia repair. *J Surg Res* 2008;145(1):105-110.
- (313) Arbos M, Ferrando J, Quiles M, Vidal J, López-Cano M, Gil J, et al. Improved surgical mesh integration into the rat abdominal wall with arginine administration. *Biomaterials* 2006;27(5):758-768.
- (314) Fabrizio-Homan DJ, Cooper SL. A comparison of the adsorption of three adhesive proteins to biomaterial surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed* 1991;3(1):27-47.
- (315) Roach P, Farrar D, Perry CC. Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes. *J Am Chem Soc* 2005 Jun 8;127(22):8168-8173.
- (316) Nishimoto SK, Nishimoto M, Park SW, Lee KM, Kim HS, Koh JT, et al. The effect of titanium surface roughening on protein absorption, cell attachment, and cell spreading. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008 Jul-Aug;23(4):675-680.
- (317) Ranella A, Barberoglou M, Bakogianni S, Fotakis C, Stratakis E. Tuning cell adhesion by controlling the roughness and wettability of 3D micro/nano silicon structures. *Acta Biomater* 2010;6(7):2711-2720.
- (318) Lamers E, van Horssen R, te Riet J, van Delft F, Luttge R, Walboomers X, et al. The influence of nanoscale topographical cues on initial osteoblast morphology and migration. *Eur Cell Mater* 2010;20:329-343.
- (319) Lee SW, Kim SY, Lee MH, Lee KW, Leesungbok R, Oh N. Influence of etched microgrooves of uniform dimension on in vitro responses of human gingival fibroblasts. *Clin Oral Implants Res* 2009;20(5):458-466.

- (320) Bacakova L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorcik V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol Adv* 2011;29(6):739-767.
- (321) Bächle M, Kohal RJ. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(6):683-692.
- (322) Rockwell GP, Lohstreter LB, Dahn J. Fibrinogen and albumin adsorption on titanium nanoroughness gradients. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011;91:90-96.
- (323) Oates CJ, Wen W, Hamilton DW. Role of Titanium Surface Topography and Surface Wettability on Focal Adhesion Kinase Mediated Signaling in Fibroblasts. *Materials* 2011;4(5):893-907.
- (324) Biggs MJP, Richards RG, Dalby MJ. Nanotopographical modification: a regulator of cellular function through focal adhesions. *Nanomedicine* 2010;6(5):619-633.
- (325) Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 2007;23(7):844-854.
- (326) Stadlinger B, Bierbaum S, Grimmer S, Schulz MC, Kuhlisch E, Scharnweber D, et al. Increased bone formation around coated implants. *J Clin Periodontol* 2009;36(8):698-704.
- (327) Nygren H. Initial reactions of whole blood with hydrophilic and hydrophobic titanium surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces* 1996;6(4-5):329-333.
- (328) Maciel J, Oliveira M, Gonçalves R, Barbosa M. The effect of adsorbed fibronectin and osteopontin on macrophage adhesion and morphology on hydrophilic and hydrophobic model surfaces. *Acta Biomater* 2012;8(10):3669-3677.
- (329) MacDonald D, Deo N, Markovic B, Stranick M, Somasundaran P. Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles. *Biomaterials* 2002;23(4):1269-1279.
- (330) Duchrow M, Windhovel U, Bethge T, Schwandner O, Markert U, Bruch HP, et al. Polypropylene synthetic mesh modifies growth of human cells in vitro. An experimental study. *Chirurg* 2002 Feb;73(2):154-8.
- (331) Langer C, Schwartz P, Krause P, Mohammadi H, Kulle B, Schaper A, et al. In-vitro study of the cellular response of human fibroblasts cultured on alloplastic hernia meshes. Influence of mesh material and structure. *Chirurg* 2005 Sep;76(9):876-885.
- (332) Weyhe D, Belyaev O, Buettner G, Mros K, Mueller C, Meurer K, et al. In vitro comparison of three different mesh constructions. *ANZ J Surg* 2008;78(1-2):55-60.
- (333) Kapischke M, Prinz K, Tepel J, Tensfeldt J, Schulz T. Precoating of alloplastic materials with living human fibroblasts—a feasibility study. *Surg Endosc* 2005;19(6):791-797.

- (334) Rosch R, Junge K, Schachtrupp A, Klinge U, Klosterhalfen B, Schumpelick V. Mesh implants in hernia repair. Inflammatory cell response in a rat model. *Eur Surg Res* 2003 May-Jun;35(3):161-166.
- (335) Raptis DA, Vichova B, Breza J, Skipworth J, Barker S. A Comparison of Woven Versus Nonwoven Polypropylene (PP) and Expanded Versus Condensed Polytetrafluoroethylene (PTFE) on Their Intraperitoneal Incorporation and Adhesion Formation. *J Surg Res* 2011;169(1):1-6.
- (336) Voskerician G, Jin J, White MF, Williams CP, Rosen MJ. Effect of biomaterial design criteria on the performance of surgical meshes for abdominal hernia repair: a pre-clinical evaluation in a chronic rat model. *J Mater Sci Mater Med* 2010;21(6):1989-1995.
- (337) Silva W, Fagundes DJ, Seidel AC, Taha MO. Animal model of chronic abdominal hernia in rabbit. *Acta Cir Bras* 2009;24(4):256-261.
- (338) Smietanski M, Lukasiewicz J, Bigda J, Lukianski M, Witkowski P, Sledzinski Z. Factors influencing surgeons' choice of method for hernia repair technique. *Hernia* 2005 Mar;9(1):42-45.
- (339) Korenkov M, Paul A, Sauerland S, Neugebauer E, Arndt M, Chevrel J, et al. Classification and surgical treatment of incisional hernia. *Langenbecks Arch Surg* 2001;386(1):65-73.
- (340) Rolf CG, Fu BS, Pau A, Wang W, Chan B. Increased cell proliferation and associated expression of PDGFRbeta causing hypercellularity in patellar tendinosis. *Rheumatology (Oxford)* 2001 Mar;40(3):256-261.
- (341) Diaz R, Quiles MT, Guillem-Marti J, Lopez-Cano M, Huguet P, Ramon-y-Cajal S, et al. Apoptosis-Like Cell Death Induction and Aberrant Fibroblast Properties in Human Incisional Hernia Fascia. *Am J Pathol* 2011;178(6):2641-2653.
- (342) HAYFLICK L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 1965 Mar;37:614-636.
- (343) Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993;15(3):532-534, 536-537.
- (344) Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 2006;27(2-3):126-139.
- (345) Davies B, Fried M. The L19 ribosomal protein gene (RPL19): gene organization, chromosomal mapping, and novel promoter region. *Genomics* 1995;25(2):372-380.
- (346) Wang J, Venegas V, Li F, Wong LJ. Analysis of mitochondrial DNA point mutation heteroplasmy by ARMS quantitative PCR. *Curr Protoc Hum Genet* 2011 Jan;Chapter 19:Unit 19.6.
- (347) Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29(9):e45-e45.

- (348) Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. *Rapid Cycle RealTime PCR Methods and Applications* 2001;1:21-34.
- (349) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 2001;25(4):402-408.
- (350) Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003;4(2):249-264.
- (351) Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004;3(1):3.
- (352) Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B* 1995;57(1):289-300.
- (353) Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* 2007;8(1):118-127.
- (354) Gentleman R. *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor*. 1<sup>st</sup> Ed. New York: Springer Verlag; 2005.
- (355) Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* 2000;25(1):25-29.
- (356) Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 1999;27(1):29-34.
- (357) Jiménez-Marín A, Collado-Romero M, Ramirez-Boo M, Arce C, Garrido JJ. Biological pathway analysis by ArrayUnlock and Ingenuity Pathway Analysis. *BMC Proc* 2009;3(Suppl 4):S6.
- (358) Righetti PG, Brost BC, Snyder RS. On the limiting pore size of hydrophilic gels for electrophoresis and isoelectric focusing. *J Biochem Biophys Methods* 1981 Jun;4(5-6):347-363.
- (359) Chrambach A, Rodbard D. Polyacrylamide gel electrophoresis. *Science* 1971;172(3982):440.
- (360) Corthals GL, Margolis J, Williams KL, Gooley AA. The role of pH and membrane porosity in preparative electrophoresis. *Electrophoresis* 1996 Apr;17(4):771-775.
- (361) Sambrook J, Russell DW. Preparation of denaturing polyacrylamide gels. *Cold Spring Harbor Protocols* 2006;2006(1):pdb. prot3793.
- (362) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 1979;76(9):4350-4354.
- (363) Hariharan P. *Basics of interferometry*. 2<sup>nd</sup> Ed. Burlington: Academic Press; 2007.



- (364) Adamson A, Gast A. The solid-liquid interface-contact angle. *Physical chemistry of surfaces*, 5<sup>th</sup> Ed. Wiley and Sons, New York, NY 1990:379-420.
- (365) Owens DK, Wendt R. Estimation of the surface free energy of polymers. *J Appl Polym Sci* 1969;13(8):1741-1747.
- (366) Young T. An essay on the cohesion of fluids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 1805;95:65-87.
- (367) GOOD RJ. Contact angle, wetting, and adhesion: a critical review. *J Adhesion Sci Technol* 1993;6(12):1269-1302.
- (368) Van Oss C, Ju L, Chaudhury M, Good R. Estimation of the polar parameters of the surface tension of liquids by contact angle measurements on gels. *J Colloid Interface Sci* 1989;128(2):313-319.
- (369) Sharma P, Hanumantha Rao K. Analysis of different approaches for evaluation of surface energy of microbial cells by contact angle goniometry. *Adv Colloid Interface Sci* 2002;98(3):341-463.
- (370) Van Oss CJ, Chaudhury MK, Good RJ. Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chem Rev* 1988;88(6):927-941.
- (371) Erbil HY. Surface tension of polymers. *Handbook of surface and colloid chemistry* 1997:265-312.
- (372) Morrison DF. *Multivariate statistical methods*. 3<sup>rd</sup> Ed. New York: Brooks/Cole; 2005.
- (373) Celli BR, Calverley P, Rennard SI, Wouters EFM, Agusti A, Anthonisen N, et al. Proposal for a multidimensional staging system for chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2005;99(12):1546-1554.
- (374) Korenkov M, Beckers A, Koebeke J, Lefering R, Tiling T, Troidl H. Biomechanical and morphological types of the linea alba and its possible role in the pathogenesis of midline incisional hernia. *Eur J Surg* 2001;167(12):909-914.
- (375) Fachinelli A, Maciel Trindade MR. Qualitative and quantitative evaluation of total and types I and III collagens in patients with ventral hernias. *Langenbecks Arch Surg* 2007 Jul;392(4):459-464.
- (376) Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligiel SEG, Kang S, Fisher GJ, et al. Decreased Collagen Production in Chronologically Aged Skin: Roles of Age-Dependent Alteration in Fibroblast Function and Defective Mechanical Stimulation. *Am J Pathol* 2006;168(6):1861-1868.
- (377) Fligiel SEG, Varani J, Datta SC, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Collagen degradation in aged/photodamaged skin in vivo and after exposure to matrix metalloproteinase-1 in vitro. *J Invest Dermatol* 2003;120(5):842-848.
- (378) Pischon N, Darbois LM, Palamakumbura AH, Kessler E, Trackman PC. Regulation of collagen deposition and lysyl oxidase by tumor necrosis factor- $\alpha$  in osteoblasts. *J Biol Chem* 2004;279(29):30060-30065.

- (379) Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 2003;200(4):448-464.
- (380) Han YP, Nien YD, Garner WL. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced proteolytic activation of pro-matrix metalloproteinase-9 by human skin is controlled by down-regulating tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and mediated by tissue-associated chymotrypsin-like proteinase. *J Biol Chem* 2002;277(30):27319-27327.
- (381) Sørensen LT. Effect of lifestyle, gender and age on collagen formation and degradation. *Hernia* 2006;10(6):456-461.
- (382) Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(3):207-214.
- (383) Masumoto K, De Rooij J, Suita S, Rottier R, Tibboel D, De Krijger R. The distribution of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the lungs of congenital diaphragmatic hernia patients and age-matched controls. *Histopathology* 2006;48(5):588-595.
- (384) Salameh JR, Talbott LM, May W, Gosheh B, Vig PJ, McDaniel DO. Role of biomarkers in incisional hernias. *Am Surg* 2007 Jun;73(6):561-567.
- (385) Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, Liu H, Nelson CM, Fata JE, et al. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 2005;436(7047):123-127.
- (386) Mirastschijski U, Impola U, Jahkola T, Karlsmark T, Saarialho-Kere U. Ectopic localization of matrix metalloproteinase-9 in chronic cutaneous wounds. *Hum Pathol* 2002;33(3):355-364.
- (387) St-Pierre Y, Themsche CV, Esteve PO. Emerging features in the regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets and therapeutic strategies. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003;2(3):206-215.
- (388) Opdenakker G, Dillen C, Fiten P, Martens E, Van Aelst I, Van den Steen PE, et al. Remnant epitopes, autoimmunity and glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 2006;1760(4):610-615.
- (389) Abci I, Bilgi S, Altan A. Role of TIMP-2 in fascia transversalis on development of inguinal hernias. *J Invest Surg* 2005;18(3):123-128.
- (390) Wisniewska M, Goettig P, Maskos K, Belouski E, Winters D, Hecht R, et al. Structural determinants of the ADAM inhibition by TIMP-3: crystal structure of the TACE-N-TIMP-3 complex. *J Mol Biol* 2008;381(5):1307-1319.
- (391) Amour A, Slocombe PM, Webster A, Butler M, Knight CG, Smith BJ, et al. TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett* 1998;435(1):39-44.
- (392) Black RA. TIMP3 checks inflammation. *Nat Genet* 2004;36(9):934-934.
- (393) Leco KJ, Waterhouse P, Sanchez OH, Gowing KLM, Poole AR, Wakeham A, et al. Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest* 2001;108(6):817-830.

- (394) Fedak PWM, Smookler DS, Kassiri Z, Ohno N, Leco KJ, Verma S, et al. TIMP-3 deficiency leads to dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2004;110(16):2401-2409.
- (395) Brennan FM, Green P, Amjadi P, Robertshaw HJ, Alvarez-Iglesias M, Takata M. Interleukin-10 regulates TNF- $\alpha$ - converting enzyme (TACE/ADAM-17) involving a TIMP-3 dependent and independent mechanism. *Eur J Immunol* 2008;38(4):1106-1117.
- (396) Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006 Dec 14;444(7121):860-867.
- (397) de Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett* 2008;582(1):97-105.
- (398) Dong J, Jimi E, Zeiss C, Hayden MS, Ghosh S. Constitutively active NF- $\kappa$ B triggers systemic TNF $\alpha$ -dependent inflammation and localized TNF $\alpha$ -independent inflammatory disease. *Genes Dev* 2010;24(16):1709-1717.
- (399) Theiss AL, Simmons JG, Jobin C, Lund PK. Tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *J Biol Chem* 2005;280(43):36099-36109.
- (400) Porteu F, Hieblot C. Tumor necrosis factor induces a selective shedding of its p75 receptor from human neutrophils. *J Biol Chem* 1994;269(4):2834-2840.
- (401) Higuchi Y, McTiernan CF, Frye CB, McGowan BS, Chan TO, Feldman AM. Tumor necrosis factor receptors 1 and 2 differentially regulate survival, cardiac dysfunction, and remodeling in transgenic mice with tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced cardiomyopathy. *Circulation* 2004;109(15):1892-1897.
- (402) Demoule A, Divangahi M, Yahiaoui L, Danialou G, Gvozdic D, Labbe K, et al. Endotoxin triggers nuclear factor- $\kappa$ B-dependent up-regulation of multiple proinflammatory genes in the diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174(6):646-653.
- (403) Zhan M, Jin B, Chen SE, Reecy JM, Li YP. TACE release of TNF- $\alpha$  mediates mechanotransduction-induced activation of p38 MAPK and myogenesis. *J Cell Sci* 2007;120(4):692-701.
- (404) Chen SE, Jin B, Li YP. TNF- $\alpha$  regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292(5):C1660-C1671.
- (405) Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280(5):E745-E751.
- (406) Tsujinaka T, Fujita J, Ebisui C, Yano M, Kominami E, Suzuki K, et al. Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice. *J Clin Invest* 1996;97(1):244-249.
- (407) Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Arch Dermatol* 2008;144(5):666-672.

- (408) Guillen-Marti J, Diaz R, Quiles MT, Lopez-Cano M, Vilallonga R, Huguet P, et al. MMPs/TIMPs and inflammatory signalling de-regulation in human incisional hernia tissues. *J Cell Mol Med* 2009;13(11-12):4432-4443.
- (409) Chiarugi P, Giannoni E. Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol* 2008;76(11):1352-1364.
- (410) Smets FN, Chen Y, Wang LJ, Soriano HE. Loss of cell anchorage triggers apoptosis (anoikis) in primary mouse hepatocytes. *Mol Genet Metab* 2002;75(4):344-352.
- (411) McAnulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(4):666-671.
- (412) Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- $\kappa$ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* 2011;13(1):11-22.
- (413) Jean C, Gravelle P, Fournie J, Laurent G. Influence of stress on extracellular matrix and integrin biology. *Oncogene* 2011;30(24):2697-2706.
- (414) Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 2006;12(9):440-450.
- (415) Hakem R. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J* 2008;27(4):589-605.
- (416) Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:89-116.
- (417) Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M. IKK $\beta$  couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* 2005;121(7):977-990.
- (418) Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 2003;66(8):1403-1408.
- (419) Schutte B, Ramaekers FC. Molecular switches that govern the balance between proliferation and apoptosis. *Prog Cell Cycle Res* 2000;4:207-217.
- (420) Watanabe H, Yamada Y, Kimata K. Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J Biochem* 1998;124(4):687-693.
- (421) Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12(2):69-78.
- (422) Kiani C, Liwen C, Yao Jiong W, YEE AJ, Burton BY. Structure and function of aggrecan. *Cell Res* 2002;12(1):19-32.
- (423) Lemire JM, Patis C, Gordon LB, Sandy JD, Toole BP, Weiss AS. Aggrecan expression is substantially and abnormally upregulated in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome dermal fibroblasts. *Mech Ageing Dev* 2006;127(8):660-669.

- (424) Yang BB, Zhang Y, Cao L, Yang BL. Aggrecan and link protein affect cell adhesion to culture plates and to type II collagen. *Matrix Biology* 1998 3;16(9):541-561.
- (425) Cao L, Yang BB. Chondrocyte apoptosis induced by aggrecan G1 domain as a result of decreased cell adhesion. *Exp Cell Res* 1999;246(2):527-537.
- (426) Stevens AL, Wishnok JS, White FM, Grodzinsky AJ, Tannenbaum SR. Mechanical injury and cytokines cause loss of cartilage integrity and upregulate proteins associated with catabolism, immunity, inflammation, and repair. *Mol Cell Proteomics* 2009;8(7):1475-1489.
- (427) Struglics A, Larsson S, Hansson M, Lohmander L. Western blot quantification of aggrecan fragments in human synovial fluid indicates differences in fragment patterns between joint diseases. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17(4):497-506.
- (428) Poole A, Ionescu M, Swan A, Dieppe P. Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. Implications for pathogenesis. *J Clin Invest* 1994;94(1):25-33.
- (429) Dodge GR, Diaz A, Sanz-Rodriguez C, Reginato AM, Jimenez SA. Effects of interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  on the expression of the genes encoding aggrecan, biglycan, and decorin core proteins in cultured human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1998;41(2):274-283.
- (430) Issack PS, DiCesare PE. Recent advances toward the clinical application of bone morphogenetic proteins in bone and cartilage repair. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 2003;32(9):429-436.
- (431) Wei A, Brisby H, Chung SA, Diwan AD. Bone morphogenetic protein-7 protects human intervertebral disc cells in vitro from apoptosis. *Spine J* 2008;8(3):466-474.
- (432) Takegami K, An HS, Kumano F, Chiba K, Thonar EJ, Singh K, et al. Osteogenic protein-1 is most effective in stimulating nucleus pulposus and annulus fibrosus cells to repair their matrix after chondroitinase ABC-induced in vitro chemonucleolysis. *Spine J* 2005;5(3):231-238.
- (433) Kawakami M, Matsumoto T, Hashizume H, Kuribayashi K, Chubinskaya S, Yoshida M. Osteogenic protein-1 (osteogenic protein-1/bone morphogenetic protein-7) inhibits degeneration and pain-related behavior induced by chronically compressed nucleus pulposus in the rat. *Spine* 2005;30(17):1933-1939.
- (434) Pratta MA, Yao W, Decicco C, Tortorella MD, Liu RQ, Copeland RA, et al. Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *J Biol Chem* 2003;278(46):45539-45545.
- (435) Quattrocchi CC, Wannenes F, Persico AM, Ciafré SA, D'Arcangelo G, Farace MG, et al. Reelin is a serine protease of the extracellular matrix. *J Biol Chem* 2002;277(1):303-309.
- (436) Hack I, Hellwig S, Junghans D, Brunne B, Bock HH, Zhao S, et al. Divergent roles of ApoER2 and Vldlr in the migration of cortical neurons. *Development* 2007;134(21):3883-3891.

- (437) Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 2003 Feb 21;112(4):453-465.
- (438) Chai X, Förster E, Zhao S, Bock HH, Frotscher M. Reelin stabilizes the actin cytoskeleton of neuronal processes by inducing n-cofilin phosphorylation at serine3. *J Neurosci* 2009;29(1):288-299.
- (439) Kim H, Qu T, Kriho V, Lacor P, Smalheiser N, Pappas G, et al. Reelin function in neural stem cell biology. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99(6):4020-4025.
- (440) Strasser V, Fasching D, Hauser C, Mayer H, Bock HH, Hiesberger T, et al. Receptor clustering is involved in Reelin signaling. *Mol Cell Biol* 2004;24(3):1378-1386.
- (441) Katsuyama Y, Terashima T. Developmental anatomy of reeler mutant mouse. *Dev Growth Differ* 2009;51(3):271-286.
- (442) Curran T, D'Arcangelo G. Role of reelin in the control of brain development. *Brain Res Rev* 1998;26(2):285-294.
- (443) Ikeda Y, Terashima T. Expression of reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse. *Dev Dyn* 1997;210(2):157-172.
- (444) Smalheiser NR, Costa E, Guidotti A, Impagnatiello F, Auta J, Lacor P, et al. Expression of reelin in adult mammalian blood, liver, pituitary pars intermedia, and adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97(3):1281-1286.
- (445) Botella-López A, de Madaria E, Jover R, Bataller R, Sancho-Bru P, Candela A, et al. Reelin is overexpressed in the liver and plasma of bile duct ligated rats and its levels and glycosylation are altered in plasma of humans with cirrhosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(4):766-775.
- (446) Perrone G, Vincenzi B, Zagami M, Santini D, Panteri R, Flammia G, et al. Reelin expression in human prostate cancer: a marker of tumor aggressiveness based on correlation with grade. *Mod Pathol* 2007;20(3):344-351.
- (447) Pulido JS, Sugaya I, Comstock J, Sugaya K. Reelin expression is upregulated following ocular tissue injury. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245(6):889-893.
- (448) Krathwohl MD, Kaiser JL. Chemokines promote quiescence and survival of human neural progenitor cells. *Stem Cells* 2004;22(1):109-118.
- (449) Maurin JC, Couble ML, Didier-Bazes M, Brisson C, Magloire H, Bleicher F. Expression and localization of reelin in human odontoblasts. *Matrix biology* 2004;23(5):277-285.
- (450) Magloire H, Couble ML, Thivichon-Prince B, Maurin JC, Bleicher F. Odontoblast: a mechano-sensory cell. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2009;312(5):416-424.
- (451) Hakala BE, White C, Recklies AD. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem* 1993 Dec 5;268(34):25803-25810.

- (452) Hu B, Trinh K, Figueira WF, Price PA. Isolation and sequence of a novel human chondrocyte protein related to mammalian members of the chitinase protein family. *J Biol Chem* 1996 Aug 9;271(32):19415-19420.
- (453) Jacques C, Recklies A, Levy A, Berenbaum F. HC-gp39 contributes to chondrocyte differentiation by inducing SOX9 and type II collagen expressions. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15(2):138-146.
- (454) Nyirkos P, Golds EE. Human synovial cells secrete a 39 kDa protein similar to a bovine mammary protein expressed during the non-lactating period. *Biochem J* 1990;269(1):265-268.
- (455) Krause SW, Rehli M, Kreutz M, Schwarzfischer L, Paulauskis JD, Andreesen R. Differential screening identifies genetic markers of monocyte to macrophage maturation. *J Leukoc Biol* 1996;60(4):540-545.
- (456) Rehli M, Krause S, Andreesen R. Molecular characterization of the gene for human cartilage gp-39 (CHI3L1), a member of the chitinase protein family and marker for late stages of macrophage differentiation. *Genomics* 1997;43(2):221-225.
- (457) Lee CG, Hartl D, Lee GR, Koller B, Matsuura H, Da Silva CA, et al. Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis. *J Exp Med* 2009;206(5):1149-1166.
- (458) Areshkov PO, Avdieiev SS, Balynska OV, LeRoith D, Kavsan VM. Two Closely Related Human Members of Chitinase-like Family, CHI3L1 and CHI3L2, Activate ERK1/2 in 293 and U373 Cells but Have the Different Influence on Cell Proliferation. *Int J Biol Sci* 2012;8(1):39-48.
- (459) Recklies AD, White C, Ling H. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase-and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochem J* 2002;365(Pt 1):119-126.
- (460) Recklies AD, Ling H, White C, Bernier SM. Inflammatory cytokines induce production of CHI3L1 by articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2005 Dec 16;280(50):41213-41221.
- (461) Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011 Jan;7(1):33-42.
- (462) Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 2009 Aug;9(8):537-549.
- (463) Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001;107(1):7-12.
- (464) Ling H, Recklies AD. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Biochem J* 2004;380(Pt 3):651-659.
- (465) Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and

MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992 Dec;168(4):357-363.

(466) Essers J, Theil AF, Baldeyron C, Van Cappellen WA, Houtsmuller AB, Kanaar R, et al. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol Cell Biol* 2005;25(21):9350-9359.

(467) Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 2002 May;4(5):E131-E136.

(468) Leppa S, Bohmann D. Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene* 1999 Nov 1;18(45):6158-6162.

(469) Butters M, Redecke J, Köninger J. Long-term results of a randomized clinical trial of Shouldice, Lichtenstein and transabdominal preperitoneal hernia repairs. *Br J Surg* 2007;94(5):562-565.

(470) Weyhe D, Belyaev O, Müller C, Meurer K, Bauer KH, Papapostolou G, et al. Improving outcomes in hernia repair by the use of light meshes—a comparison of different implant constructions based on a critical appraisal of the literature. *World J Surg* 2007;31(1):234-244.

(471) Greca F, Paula J, Biondo-Simoes M, Costa F, Silva A, Time S, et al. The influence of differing pore sizes on the biocompatibility of two polypropylene meshes in the repair of abdominal defects. *Hernia* 2001;5(2):59-64.

(472) Tanaka K, Mutter D, Inoue H, Lindner V, Bouras G, Forgione A, et al. In vivo evaluation of a new composite mesh (10% polypropylene/90% poly-L-lactic acid) for hernia repair. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18(6):991-999.

(473) Sucullu I, Akin ML, Yitgin S, Filiz AI, Kurt Y. Resterilized Mesh in Repair of Abdominal Wall Defects in Rats. *J Invest Surg* 2008;21(4):171-176.

(474) Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14(1):61-86.

(475) Mondrinos MJ, Koutzaki S, Jiwanmall E, Li M, Dechadarevian JP, Lelkes PI, et al. Engineering three-dimensional pulmonary tissue constructs. *Tissue Eng* 2006;12(4):717-728.

(476) Nelson CM, Bissell MJ. Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. *Semin Cancer Biol* 2005;15(5):342-352.

(477) Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(10):839-845.

(478) Bissell MJ, Rizki A, Mian IS. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(6):753-762.

(479) Keller JC, Schneider GB, Stanford CM, Kellogg B. Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Implant Dent* 2003;12(2):175-181.

(480) Rosales-Leal J, Rodriguez-Valverde M, Mazzaglia G, Ramon-Torregrosa P, Diaz-Rodriguez L, Garcia-Martinez O, et al. Effect of roughness, wettability and



---

morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion. *Colloids Surf A* 2010;365(1-3):222-229.

(481) Kramer PR, JanikKeith A, Cai Z, Ma S, Watanabe I. Integrin mediated attachment of periodontal ligament to titanium surfaces. *Dent Mater* 2009;25(7):877-883.

(482) Scopelliti PE, Borgonovo A, Indrieri M, Giorgetti L, Bongiorno G, Carbone R, et al. The effect of surface nanometre-scale morphology on protein adsorption. *PLoS one* 2010;5(7):e11862.

(483) Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng* 2005 Jan-Feb;11(1-2):1-18.

(484) Hildebrand H, Blanchemain N, Mayer G, Chai F, Lefebvre M, Boschin F. Surface coatings for biological activation and functionalization of medical devices. *Surf Coat Technol* 2006;200(22):6318-6324.

(485) Bumgardner J, Wiser R, Elder S, Jouett R, Yang Y, Ong J. Contact angle, protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to chitosan coatings bonded to titanium. *J Biomater Sci Polym Ed* 2003;14(12):1401-1409.

(486) Weyhe D, Hoffmann P, Belyaev O, Mros K, Muller C, Uhl W, et al. The role of TGF-beta1 as a determinant of foreign body reaction to alloplastic materials in rat fibroblast cultures: comparison of different commercially available polypropylene meshes for hernia repair. *Regul Pept* 2007 Jan 10;138(1):10-14.

(487) Garcia AJ. Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions. *Biomaterials* 2005 Dec;26(36):7525-7529.

(488) Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E, Chan-Hui PY. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 1996;134(3):793-799.

(489) Cox BD, Natarajan M, Stettner MR, Gladson CL. New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation. *J Cell Biochem* 2006;99(1):35-52.

(490) Frisch SM, Sreaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13(5):555-562.

(491) Ruoslahti E, Obrink B. Common principles in cell adhesion. *Exp Cell Res* 1996 Aug 25;227(1):1-11.

(492) Huang S, Ingber DE. Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks. *Exp Cell Res* 2000;261(1):91-103.

(493) Subauste MC, Pertz O, Adamson ED, Turner CE, Junger S, Hahn KM. Vinculin modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility. *J Cell Biol* 2004;165(3):371-381.

(494) Peng X, Nelson ES, Maiers JL, DeMali KA. New insights into vinculin function and regulation. *Int Rev Cell Mol Biol* 2011;287:191-231.

- (495) Zamir E, Katz M, Posen Y, Erez N, Yamada KM, Katz BZ, et al. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2000 Apr;2(4):191-196.
- (496) Sottile J, Hocking DC. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell* 2002;13(10):3546-3559.
- (497) Janmey PA. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev* 1998 Jul;78(3):763-781.
- (498) Byun Y, Chen F, Chang R, Trivedi M, Green K, Cryns V. Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ* 2001;8(5):443-450.
- (499) Dinsdale D, Lee JC, Dewson G, Cohen GM, Peter ME. Intermediate filaments control the intracellular distribution of caspases during apoptosis. *Am J Pathol* 2004;164(2):395-407.
- (500) Blain EJ, Gilbert SJ, Hayes AJ, Duance VC. Disassembly of the vimentin cytoskeleton disrupts articular cartilage chondrocyte homeostasis. *Matrix biology* 2006;25(7):398-408.
- (501) Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 2003;116(8):1409-1416.
- (502) Thannickal VJ, Lee DY, White ES, Cui Z, Larios JM, Chacon R, et al. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor- $\beta$ 1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 2003;278(14):12384-12389.