

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CICERO FAGNER MESSIAS DE LIMA

**APLICAÇÃO TÓPICA DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO ACELERA A
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS NA PELE DE CAMUNDONGOS**

MACEIÓ-AL

2014

CICERO FAGNER MESSIAS DE LIMA

**APLICAÇÃO TÓPICA DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO ACELERA A
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS NA PELE DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre pela referida Instituição.

Orientador: Prof. Dra. Salete Smaniotto

MACEIÓ- AL

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Maria Auxiliadora G. da Cunha

L732a Lima, Cicero Fagner Messias de.
Aplicação tópica do hormônio do crescimento acelera a cicatrização de feridas na pele de camundongos / Cicero Fagner Messias de Lima. – 2014. 74 f.

Orientadora: Saete Smaniotto.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 67-74.

1. Hormônio do crescimento. 2. Cicatrização de feridas. 3. Pele. 4. Colágeno. 5. Angiogênese. I. Título.

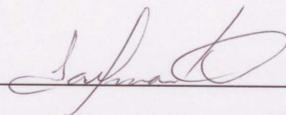
CDU: 616-003.9

Folha de Aprovação

Cicero Fagner Messias de Lima

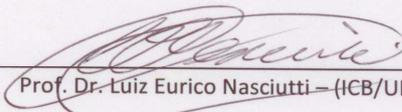
Aplicação tópica do hormônio do crescimento acelera a cicatrização de feridas na pele de camundongos

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 25 de fevereiro de 2014.

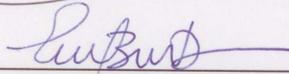


Prof.ª Dr.ª Salete Smaniotto (Orientador)

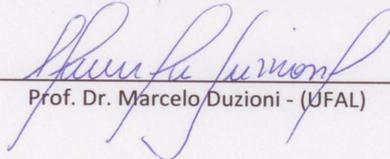
Banca Examinadora



Prof. Dr. Luiz Eurico Nasciutti – (ICB/UFRJ)



Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto – (UFAL)



Prof. Dr. Marcelo Duzioni - (UFAL)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular-LBC, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/ICBS, da Universidade Federal de Alagoas/UFAL, sob orientação da Professora Doutora Salete Smaniotto.

Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Agradeço, por sempre permitir e a me ajudar a realizar os meus *sonhos*, a minha querida mãe, *Maria*. Esta mulher, apenas com palavras conseguiu me formar um homem, mesmo sem ter um exemplo em casa. Neste parágrafo, também, gostaria de dizer obrigado aos meus irmãos, *Wagner* e *Joseane*, aos meus mais queridos sobrinhos, *Nycolas*, *Isabella* e *Felipe*, que mesmo ausentes me deram forças e alegrias para enxergar um futuro próximo.

Não poderia deixar de agradecer os meu grandes amigos: *Victor Vasconcelos*, *Carol Kaya*, *Érica Santana*, *Renato Felipe*, *Isabelle Barbosa*, *Layse Veloso* que foram grandes referências para mim durante estes dois anos de trabalho. Obrigado pelo carinho, pelos risos e pela alegria e conforto de ter vocês como amigos.

À minha querida avó, *Maria Helena* (em memória), que embora não esteja fisicamente ao meu lado, ainda posso sentir suas palavras de sabedoria.

À *UFAL*, o *ICBS* e a *CAPES* cujo investimento possibilitou minha formação acadêmica.

À equipe do *Laboratório de Biologia Celular* que participou diretamente da execução deste trabalho.

À *Jamyllle Nunes* e *Isabella Santos*, por todo apoio técnico na manipulação dos animais e aperfeiçoamento do ensaio de feridas

À *Larissa Fernanda* e *Alex Wanderley*, cujos esforços foram importantes para execução da imunohistoquímica e processamento de dados.

Aos meus grandes mentores: *Silvana Ayres Martins*, *Emiliano Barreto*, *Alessandra Abel Borges*, *Luciana Gitaí*, *Theresinha Calado* e *Biacy Brandão* (em memória) por toda bagagem científica que adquiri ao longo de 7 anos,

desde o momento em que entrei na UFAL como graduando em Ciências Biológicas.

À minha querida orientadora, Salete Smaniotto, pela serenidade na forma de ser, ao me tratar e conduzir a execução deste trabalho. Além disso, pela demonstração de profissionalismo e dedicação durante a nossa convivência que já dura mais de 6 anos.

Tenha coragem de seguir o seu coração e a sua intuição. Eles, de algum modo, já sabem o que você realmente quer.

Steve Jobs

RESUMO

A cicatrização de feridas na pele é um processo complexo de eventos biológicos que envolvem reações cruzadas entre as células da epiderme e da derme, com a participação de citocinas, fatores de crescimento e modulação da matriz extracelular. Neste contexto, o hormônio do crescimento (GH) tem sido apontado como um agente modulador capaz de influenciar aspectos moleculares e celulares da cicatrização de feridas, como visto em pacientes que sofreram queimaduras graves e em animais transgênicos para o GH. Por outro lado, é sabido que altos níveis de GH na circulação podem provocar alterações em vários órgãos do corpo, podendo, inclusive, ter implicações em neoplasias. Dessa forma, tornou-se interessante analisar o efeito do tratamento tópico com GH em feridas cutâneas de camundongos. Para este estudo, camundongos da linhagem Swiss, machos e com 6 meses de idade, sofreram injúria na pele, após administração de anestésico, onde nove animais receberam GH na concentração de 10^{-8} M, nove animais receberam GH na concentração de 10^{-7} M, nove animais receberam PBS e outros nove animais foram tratados com bepantol. Observações macroscópicas foram realizadas diariamente. Os animais foram eutanasiados no 3º, 7º ou 14º dia após o tratamento. Fragmentos da pele foram obtidos e submetidos a coloração HE e tricrômico de Masson para análise dos aspectos morfológicos. A imunofluorescência foi realizada para detecção da produção de colágeno tipo I. Os vasos sanguíneos foram evidenciados a partir da imunoperoxidase para a marcação da molécula CD31. Os resultados mostraram que o tratamento tópico com GH, independente da concentração usada, acelerou, em todos os tempos analisados, o fechamento da área do ferimento quando comparado ao grupo que recebeu PBS. A análise histológica da área da ferida após 3 dias de tratamento revelou a formação de um infiltrado inflamatório mais difuso, no grupo tratado com GH. Após o 7º dia de tratamento observou-se a formação de tecido de granulação em todos os grupos, no entanto, nos animais tratados com GH o infiltrado celular foi aumentado e difuso enquanto que no grupo controle o infiltrado encontrou-se ainda nas regiões periféricas da injúria. A coloração por Masson mostrou aumento na produção de colágeno total nos animais tratados com GH quando comparado com o controle, em todos os tempos analisados. Este efeito foi confirmado pela expressão de colágeno tipo I. Em relação aos aspectos vasculares, o GH aumentou significativamente o número de vasos sanguíneos na área da injúria quando comparado ao grupo controle. Em conjunto, os resultados mostraram que o GH antecipou o recrutamento de células inflamatórias, a deposição de colágeno e a formação de vasos sanguíneos, contribuindo para aceleração da cicatrização tecidual.

Palavras-chaves: Hormônio do crescimento; cicatrização de feridas; pele; colágeno; angiogênese.

ABSTRACT

The healing of skin wounds is a complex process involving biological events cross-reactions between the cells of the epidermis and dermis involving cytokines, growth and modulation of extracellular matrix factors. In this context, the growth hormone (GH) has been appointed as an agent able of influencing molecular modulation and cellular aspects of wound healing, as seen in patients which have suffered severe burns and in transgenic animals to GH. On the other hand, it is known that high levels of GH in the circulation can cause changes in various organs of the body, and may also have implications in cancer. Thus, it is interesting to analyze the effect of topical treatment with GH in skin wounds in mice. For this study, Swiss mice, male and 6 months age, suffered injury in the skin after administration of anesthetic, where nine animals received GH at a concentration of 10^{-8} M, nine animals received GH at a concentration of 10^{-7} M, nine animals received PBS and nine others were treated with Bepantol. Macroscopic observations were made daily. The animals were euthanized on the 3rd, 7th and 14th day after treatment. Skin fragments were obtained and subjected to HE staining and Masson's trichrome for analysis of morphological aspects. Immunofluorescence was performed to detect the production of type I collagen. The blood vessels were detected from the immunoperoxidase labeling for the CD31 molecule. The results showed that topical treatment with GH, independent of the concentration used, accelerated in all periods analyzed, the closure of the wound area when compared to the group that received PBS. Histological analysis of the wound area after 3 days of treatment revealed the formation of a more diffuse inflammatory infiltration in the group treated with GH. After the 7th day of treatment we observed the formation of granulation tissue in all groups. However, in animals treated with GH the cell infiltrate was increased and diffuse while in the control group the infiltrate was also observed in the peripheral regions of injury. The Masson staining showed increased production of total collagen in animals treated with GH compared to control in all periods analyzed. This effect was corroborated by the expression of collagen type I. About vascular aspects, GH significantly increased the number of blood vessels in the area of injury when compared to the control group. Together, these results demonstrated that GH anticipated recruitment of inflammatory cells, deposition of collagen and the formation of blood vessels, contributing to the acceleration of tissue healing .

Keywords: Growth hormone; wound healing; skin; collagen; angiogenesis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Aspectos histológicos da pele humana.	23
FIGURA 2	Esquema representativo da fase inflamatória da cicatrização de feridas na pele	25
FIGURA 3	Esquema representativo da fase de formação de tecido de granulação na pele.	26
FIGURA 4	Esquema representativo da fase de remodelamento.	28
FIGURA 5	Gráfico representativo da deposição dos constituintes de MEC durante a cicatrização de feridas na pele.	28
FIGURA 6	Modelo da área de ferimento no dorso de camundongo	34
FIGURA 7	Efeito tópico do GH no fechamento de feridas na pele de camundongos	39
FIGURA 8	Efeito do hormônio do crescimento no recrutamento inflamatório em feridas cutâneas.	41
FIGURA 9	Efeitos do GH na formação de tecido de granulação na pele de camundongos	44
FIGURA 10	Efeito do tratamento tópico com GH na deposição de colágeno na fase de granulação.	45
FIGURA 11	Efeito do GH na deposição de colágeno tipo I na fase de tecido de granulação.	46
FIGURA 12	Aspectos morfológicos da fase de remodelamento na pele de camundongos que recebeu PBS.	50
FIGURA 13	Efeitos do tratamento tópico com GH 10^{-8}M na remodelação do reparo tecidual na pele de camundongo.	51
FIGURA 14	Efeitos do tratamento tópico com GH 10^{-7}M, na remodelamento do reparo tecidual na pele de camundongos.	52
FIGURA 15	Aspectos da deposição de colágeno na fase de remodelamento na pele de camundongos que recebeu PBS	53
FIGURA 16	Efeitos do tratamento tópico com GH 10^{-8}M na deposição de colágeno na fase de remodelamento.	54

FIGURA 17	Efeitos do tratamento tópico com GH 10^{-7}M na deposição de colágeno na fase de remodelamento	55
FIGURA 18	Efeitos do tratamento tópico com GH na deposição de colágeno tipo I na fase de remodelação	56
FIGURA 19	Aspectos vasculares da pele normal de camundongo	58
FIGURA 20	Efeitos do tratamento tópico com GH nos aspectos vasculares no processo de cicatrização de feridas	59
FIGURA 21	Representação esquemática do efeito do tratamento tópico com hormônio do crescimento.	65

LISTA DE ABREVIATURAS

- BSA:** Albumina do soro bovino
- CRH:** Hormônio liberador de corticotropina
- CD31:** Grupo de diferenciação 31.
- DAB:** Diaminobenzidina
- EPM:** Erro padrão da média
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína
- GH:** Hormônio do crescimento
- GHBP:** Proteínas ligadoras de GH
- GHR:** Receptor do hormônio do crescimento
- GHRH:** Hormônio liberador do hormônio do crescimento
- GHS:** Secretagogos de GH
- GHSR:** Receptores de secretagogos de GH
- HE:** Hematoxilina-eosina
- HIV-1:** Vírus-1 da imunodeficiência humana
- IFN:** Interferon
- IGF-1:** Fator -1 de crescimento semelhante a insulina
- IL:** Interleucina
- JAK:** Janus-cinase
- MEC:** Matriz extracelular
- P.A.:** Porcentagem absoluta
- PBS:** Tampão fosfato-salina
- PDGF:** Fator de crescimento derivado de plaqueta
- SS:** Somatostatina
- STAT:** Transdutor de sinal e ativador de transcrição
- TGF:** Fator de crescimento transformante
- TNF-a:** Fator de necrose tumoral alfa
- VEGF:** Fator de crescimento de endotélio vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

cm: centímetros;

M: molar;

um: micrômetros;

SUMÁRIO

1.0.	INTRODUÇÃO	17
2.0.	OBJETIVOS	19
2.1.	Objetivo Geral	19
2.2.	Objetivos Específicos	19
3.0.	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1.	A pele	20
3.1.1	Embriologia e histologia da pele	20
3.2	Cicatrização de feridas na pele	24
3.2.1	Fase de Coagulação/inflamatória	24
3.2.2	Formação de tecido de granulação	25
3.2.3.	Fase de remodelamento	27
3.3	Interações entre a pele e hormônios	29
3.3.1	Hormônio do crescimento	30
4.0.	METODOLOGIA	33
4.1.	Animais e ensaio de cicatrização	33
4.2.	Processamento histológico	34
4.3.	Técnicas de coloração	35
4.4.	Imunohistoquímica	35
4.4.1.	Imunoperoxidase	35
4.4.2.	Imunofluorescência	36
4.5.	Captura de Imagem e quantificação do CD31 e colágeno tipo I.	36
4.6	Análise estatística.	37
5.0	RESULTADOS	
5.1	O hormônio do crescimento acelerou o fechamento de feridas cutâneas em camundongos.	38
5.2	O hormônio do crescimento acelerou o recrutamento inflamatório em feridas cutâneas de camundongos após o terceiro dia de tratamento tópico.	40

5.3	O recrutamento celular e a deposição de colágeno foram acelerados em resposta ao GH na formação do tecido de granulação.	42
5.4	O GH acelerou a remodelação do tecido de granulação e a re-epitelização.	47
5.5	O GH promoveu a angiogênese durante a fase de tecido de granulação e remodelamento.	57
6.0	DISCUSSÃO	60
7.0	CONCLUSÃO	66
8.0	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas na pele é um processo complexo de eventos biológicos, que requer a participação e integração de várias células do corpo. O objetivo imediato no reparo de feridas é conseguir a integridade do tecido e a homeostase. A sobrevivência de cada tipo celular durante as fases que contribuem para a proliferação, migração, produção de proteínas de matriz extracelular (MEC) e contração da ferida são altamente coordenados (EMING et al., 2007). Qualquer falha ou prolongamento do reparo tecidual pode resultar em retardo da cicatrização ou o não fechamento da ferida. As falhas na cicatrização das feridas são, ainda hoje, um problema clínico significativo, com grande impacto sobre os custos da assistência à saúde.

Nos últimos anos, vários estudos mostraram a ação de produtos solúveis, como citocinas e fatores de crescimento, modulando a comunicação entre as células e regulando o processo de cicatrização de feridas cutâneas (BLOCH et al., 2000; CHRISTOPHERSON, HRONMAS, 2001; EMING et al., 2007). Ainda, são crescentes as evidências mostrando que a pele apresenta alta capacidade metabólica e endócrina (MILTONE, 1988; HOLICK, 1995; BRINCAT et al., 2005), e trabalhos mostram que além de manter a homeostase deste órgão, hormônios e/ou fatores de crescimento apresentam atividade moduladora na cicatrização de feridas (DUNAISKI, BELFORD, 2002; LEE et al., 2010).

A atividade endócrina neste processo e, particularmente, o hormônio do crescimento (GH) tem sido implicado como um modulador que pode influenciar na biologia da cicatrização de feridas. Seguindo esta linha de raciocínio, a terapia sistêmica com GH tem sido utilizada em estudos para investigar seus efeitos na cicatrização de lesões cutâneas. O tratamento com GH tem sido usado em pacientes com severas queimaduras, e na maioria dos casos, foram observadas melhoras na cicatrização e sobrevida dos pacientes (LAL et al., 2000; FALABELA et al., 2001). Em camundongos transgênicos para GH, foi observado um aumento na vascularização e tecido de granulação na área afetada (THOREY et al., 2004).

Embora o GH tenha apresentado efeitos positivos na cicatrização de feridas, como mencionado acima, já tem sido relatado que altos níveis de GH na circulação podem provocar alterações em vários órgãos do corpo, como visto em indivíduos

acromegálicos (BREVETTI et al., 2002), podendo, inclusive, ter implicações em neoplasias, aumentando a agressividade do tumor (EZZAT, MELMED, 1991).

Nesse sentido, por apresentar efeitos colaterais adversos quando administrado sistemicamente, decidiu-se avaliar a aplicação tópica do GH nos processos de reparo tecidual cutâneo, vislumbrando a possibilidade do uso tópico desse hormônio como estratégia terapêutica adicional em injúrias traumáticas, cirúrgicas ou doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar o efeito do tratamento tópico com hormônio do crescimento na cicatrização de feridas cutâneas em camundongos.

2.2 Específicos

- a) Avaliar o fechamento de feridas cutâneas em camundongos;
- b) Analisar os aspectos morfológicos dos tecidos cutâneos nos diferentes estágios de cicatrização;
- c) Analisar a deposição de colágeno no progresso da cicatrização de feridas cutâneas em camundongos;
- d) Avaliar a formação de novos vasos sanguíneos na região de injúria tecidual.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A pele

A pele constitui uma barreira eficaz entre o organismo e o ambiente externo proporcionando mecanismos que são cruciais para a homeostasia. Compreende o maior órgão do corpo humano, é composta pela epiderme e pela derme, e dependendo de sua localização anatômica e influências ambientais, mostra notável diversidade estrutural e funcional (BICKERS, ATHAR, 2006; SLOMINSKI et al., 2000).

3.1.1 Embriologia e histologia da pele

O desenvolvimento da pele surge a partir da justaposição de dois folhetos germinativos embrionários, o ectoderma e o mesoderma. A maioria das estruturas epidérmicas, como os folículos pilosos, as glândulas sebáceas, as glândulas sudoríparas apócrinas e écrinas, originam-se a partir da diferenciação do ectoderma, enquanto que o mesoderma é responsável pela formação das células de Langerhans, uma pequena população de linfócitos T e todos os constituintes dérmicos, com exceção dos nervos e receptores sensoriais que desenvolvem-se do neuroectoderma (BRIGGAMAN, 1982; SLOMINSKI et al., 2000).

Anatomicamente, a pele é dividida em duas regiões: a epiderme, constituída basicamente por células epiteliais, e a derme, que é composta essencialmente por tecido conjuntivo (Figura 1A) (ALBERTS et al., 2010). Conforme representado na Figura 1B, a epiderme é composta por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado em que as células epiteliais assumem diferentes aspectos morfológicos em toda a sua extensão. A principal célula, tornando-se 95% do total, é o queratinócito, que move-se progressivamente, a partir da sua aderência a lâmina basal, para a superfície da pele, formando várias camadas bem definidas durante o seu trajeto. A epiderme pode ser dividida em cinco camadas distintas: a camada basal, que é constituída por células cilíndricas ou cuboides, repousando sobre a membrana basal que separa a epiderme da derme; a camada espinhosa, constituída por células ligeiramente achatadas, de núcleo central e citoplasma com curtas

expansões de filamentos de queratina; a camada granulosa, a mais delgada, onde as células são achatadas, apresentam o núcleo central e citoplasma carregado de grânulos basófilos (chamados de grânulos de querato-hialina); a camada lúcida, que consiste em uma camada delgada de células achatadas e translúcidas, cujos núcleos e organelas foram digeridos por enzimas lisossomais; e, finalmente, a camada córnea, que apresenta espessura variável e é constituída por células achatadas, mortas e sem núcleo (MADISON, 2003; GARTNER, HIATT, 2007). Além dos queratinócitos, a epiderme contém três outros tipos celulares: os melanócitos, que produzem melanina e apresentam citoplasma globoso, de onde partem prolongamentos que se estendem até a camada basal; as células de Langerhans, que se distribuem em toda a epiderme, mas encontra-se em maior densidade na camada espinhosa, participando do processo de apresentação de antígenos e as células de Merkel, em que são atribuídas as funções mecanorreceptoras da pele (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2013).

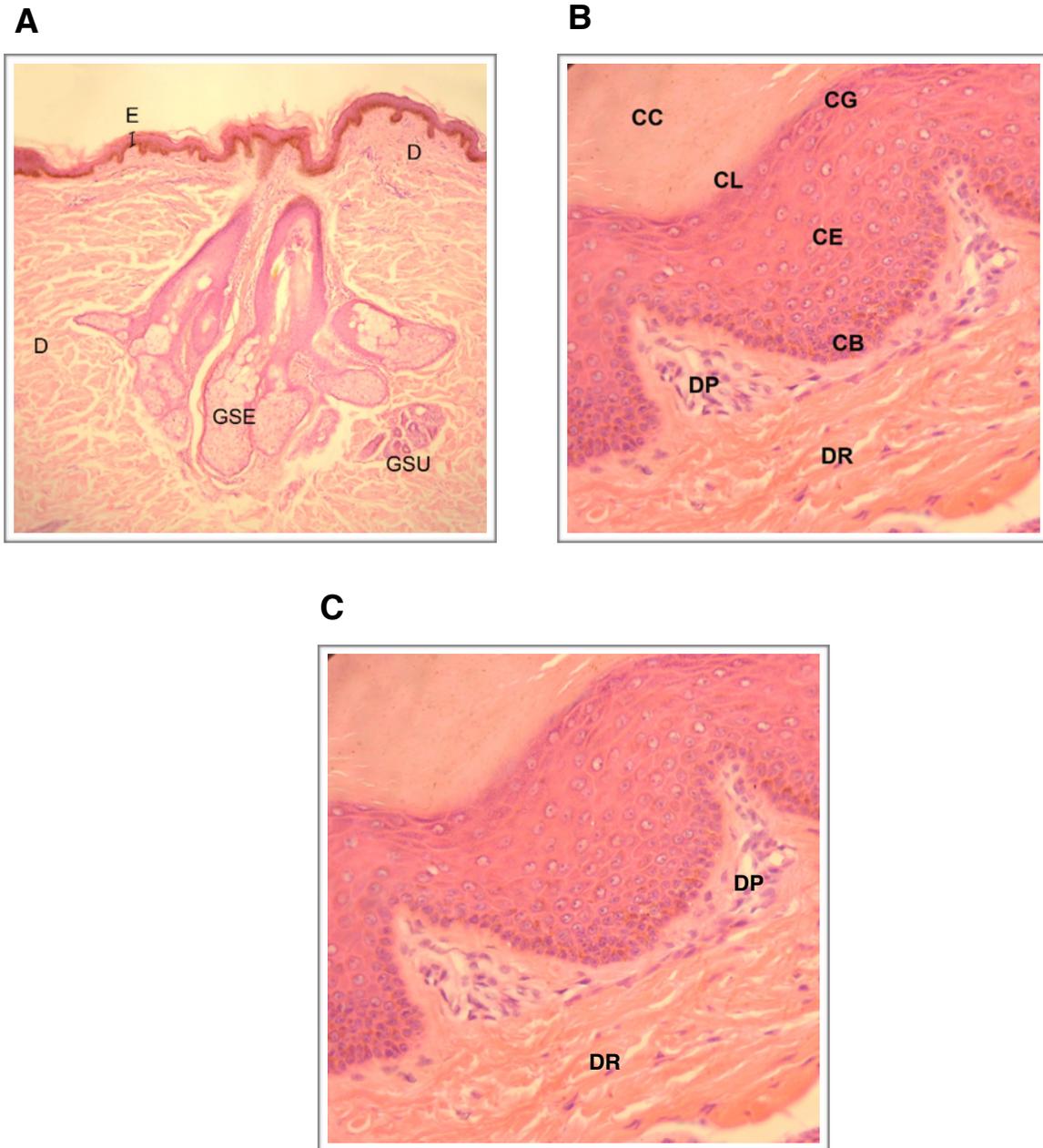
A epiderme e a derme apresentam uma íntima e firme interface na junção dermo-epidérmica, onde a membrana basal e os hemidesmossomas estão presentes. A membrana basal da epiderme separa as estruturas epiteliais da derme. Abaixo desta membrana encontra-se um tecido que apresenta abundante matriz extracelular, vasos sanguíneos, diversos tipos celulares, nervos e receptores sensitivos. Observa-se, ainda, uma região delgada, que compreende a derme papilar, e outra região mais espessa, a derme reticular (GARTNER, HIATT, 2007; JENSEN, PROKSCH, 2009).

A derme papilar e reticular constituem-se de tecido conjuntivo e apresentam características morfológicas próprias (figura 1C). A derme papilar é constituída por tecido conjuntivo frouxo, caracterizada por feixes de fibras colágenas tipo I e III extremamente finas intercaladas com fibras elásticas, uma rica rede vascular composta predominantemente de capilares e por células tais como: fibroblastos, macrófagos, plasmócitos e mastócitos. Enquanto que a derme reticular é constituída por tecido conjuntivo denso, apresentando espessos feixes de fibras colágenas entremeadas em redes espessas de fibras elásticas. A derme reticular também contém os vasos sanguíneos e nervos, e os anexos cutâneos. As células são menos abundantes nesta camada, elas incluem fibroblastos, linfócitos, macrófagos,

plasmócitos, mastócitos, e, frequentemente, adipócitos na parte mais profunda da derme reticular (SLOMINSKI et al., 2000; GARTNER, HIATT, 2007).

Os constituintes do sistema imune presentes na pele são compostos por células residentes, células de recirculação e células recrutadas. A população de células residentes é expressa sob circunstâncias fisiológicas e é representada por queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, mastócitos, macrófagos, linfócitos T e células dentríticas. A população recrutada compreende monócitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilo, bem como, mastócitos e linfócitos T e B. Enquanto que a população de células recirculantes é representado por células dentríticas, células *Natural Killer* e linfócitos T (BOS, LUITEN, 2009). Independente da sua classificação, estas células chegam na pele através de um circuito de vasos sanguíneos que adentram neste órgão e, então, estabelecem um circuito de comunicação fisiológica que garante a homeostase. Nesse sentido, a rede vascular fornece um rico suprimento sanguíneo para a derme e a epiderme. Uma rede linfática acompanha o leito sanguíneo, embora seja separada funcionalmente (SLOMINSKI et al., 2000).

Figura 1 - Aspectos histológicos da pele humana



Fotomicrografias da pele humana. Em **A**, mostra a duas camadas componentes, a epiderme e a derme, bem como os anexos cutâneos. Em **B**, mostra a espessura da epiderme constituída por várias camadas de queratinócitos. Em **C**, mostra a derme papila (DP) formada por tecido conjuntivo frouxo e derme reticular (DR) constituída por tecido conjuntivo denso. (E) Epiderme; (D) Derme; (FP) Folículo Piloso; (GSE) Glândula Sebácea; (GSU) Glândula Sudorípara; (CC) Camada Córnea; (CL) Camada Lúcida; (CG) Camada Granulosa; (CE) Camada Espinhosa; (CB) Camada Basal; (DP) Derme Papilar; (DR) Derme Reticular. Aumento de 100, 400 e 200 x. Fotomicrografias produzidas no Laboratório de Biologia Celular da UFAL (do autor).

3.2 Cicatrização de feridas na pele

A principal função da pele é a de servir com uma barreira protetora contra o ambiente. A perda da integridade de alguma porção da pele, como resultado de uma injúria ou doença, pode levar a deficiência grave ou até mesmo a morte. A cura ou reparação de feridas corresponde a um processo bastante complexo e dinâmico o qual envolve fenômenos bioquímicos ainda não totalmente esclarecidos (SINGER, CLARK, 1999; RUSTHON, 2007).

A cicatrização de feridas agudas é um processo bem organizado que leva ao reparo tecidual em que as plaquetas, queratinócitos, células da vigilância imunológica, células endoteliais, MEC e fibroblastos desempenham um papel chave na restauração e integridade do tecido. A cicatrização é dividida em três fases – coagulação/inflamação, formação de tecido de granulação e remodelamento - que se sobrepõe no tempo (SINGER, CLARK, 1999).

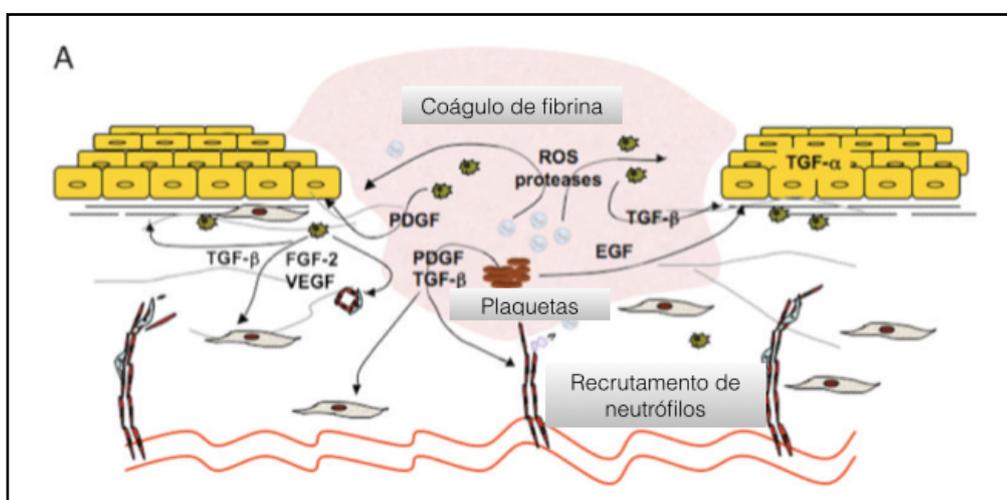
3.2.1 Fase de Coagulação/inflamatória

Uma injúria na pele fará com que ocorra extravasamento de sangue a partir dos vasos sanguíneos danificados. Este evento leva a formação de um coágulo que serve como escudo temporário, protegendo os tecidos expostos e, além disso, fornece uma matriz provisória sobre e através da qual as células podem migrar durante o processo de reparação (Figura 2) (SINGER, CLARK, 1999). O coágulo sanguíneo é formado por plaquetas imersas em uma rede fibrosa de moléculas de fibrina e de pequenas quantidades de fibronectina e vitronectina (MARTIN, 1997). As plaquetas liberam fatores de crescimento tais como o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e o fator de crescimento transformante (TGF) que recrutam células inflamatórias como os neutrófilos, macrófagos e linfócitos para o local da ferida (SINGER, CLARK, 1999; DEMIDOVA-RICE et al., 2012).

Minutos após a lesão, os neutrófilos começam a transmigrar através da parede das células endoteliais dos capilares, e liberam citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1beta, factor de necrose tumoral alfa - (TNF-a), e interferon gama (IFN-g) no local da ferida que ativam os fibroblastos da derme e os queratinócitos da epiderme (KULIDJIAN et al., 1999). Os monócitos são os próximos a serem

recrutados e tornam-se macrófagos que permanecem no local da ferida, pelo menos até o décimo dia, fagocitando bactérias e iniciam a produção e liberação de fatores de crescimento como o TGF- β , PDGF, IGF-1 e FGF que regulam a produção e organização da MEC por fibroblastos e ainda, participam da proliferação e migração de células endoteliais para o local da ferida, permitindo a angiogênese e direcionando o desenvolvimento do tecido de granulação (BEANES et al., 2003).

Figura 2 - Esquema representativo da fase inflamatória da cicatrização de feridas na pele.



Esquema representativo da cicatrização de feridas evidenciando a interação, por meio de fatores de crescimento, de células do sistema imune com células residentes da pele. Adaptado de DEMIDOVA-RICE et al., 2012.

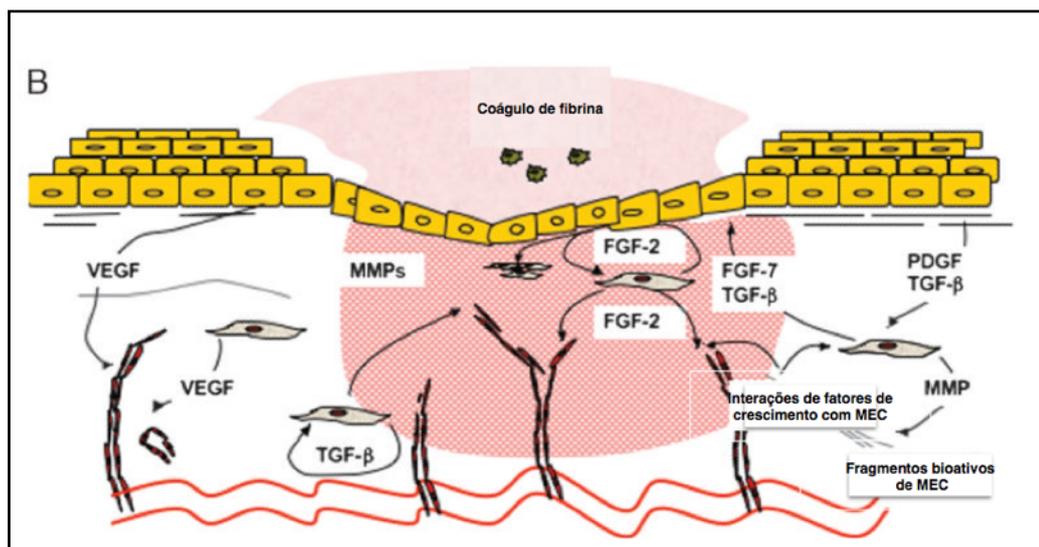
3.2.2 Formação de tecido de granulação

A medida que a fase inflamatória é atenuada, iniciam-se a formação do tecido de granulação e a contração das bordas da ferida (Figura 3). Nesta fase, a síntese de proteínas de MEC, a formação de uma rede capilar e a migração de células são fenômenos essenciais para a homeostase (FALANGA, 2005).

Os fibroblastos desempenham um papel crucial no reparo tecidual (MARTIN, 1997). Estas células são atraídas para a área de injúria em resposta a fatores de crescimento/citocinas, como o PDGF (PIERCE et al., 1991) e, em resposta a outros fatores solúveis, se diferenciam em miofibroblastos (ROCKEY et al., 2013). Enquanto os fibroblastos estão sintetizando proteínas de MEC (principalmente

colágeno), os queratinócitos e as células endoteliais proliferam-se intensamente e migram para o sítio de injúria com o objetivo de garantir o fechamento do epitélio e formar novos vasos sanguíneos, respectivamente (DEMIDOVA-RICE et al., 2012).

Figura 3 - Esquema representativo da fase de formação de tecido de granulação na pele.



Esquema representativo da cicatrização de feridas, evidenciando a proliferação e migração de queratinócitos, de fibroblastos e a síntese de fatores de crescimento. A angiogênese/ neovascularização ocorrem nesta fase. Adaptado de DEMIDOVA-RICE et al., 2012.

A formação de novos vasos sanguíneos é necessário para sustentar o tecido de granulação formado (THOREY et al., 2004). Este processo, chamado de angiogênese, é complexo e dependente da síntese de MEC e da interação, destas proteínas, com a migração de células endoteliais (RISAU, 1997). Dados da literatura mostraram que uma série de fatores, produzidos por fibroblastos, células endoteliais ou até mesmo por células do sistema imunológico, podem estimular a angiogênese (FERRARA, 2001; FERRARA et al., 2003). Além disso, Clark e colaboradores (1982) demonstraram que a fibronectina, um importante constituinte de MEC, é requerida para a formação de novos vasos no reparo de tecido sendo sua produção realizada in situ, pelas próprias células vasculares, indicando que esta proteína serve como um condutor para o movimento das células endoteliais na injúria (PINTUCCI et al., 1996).

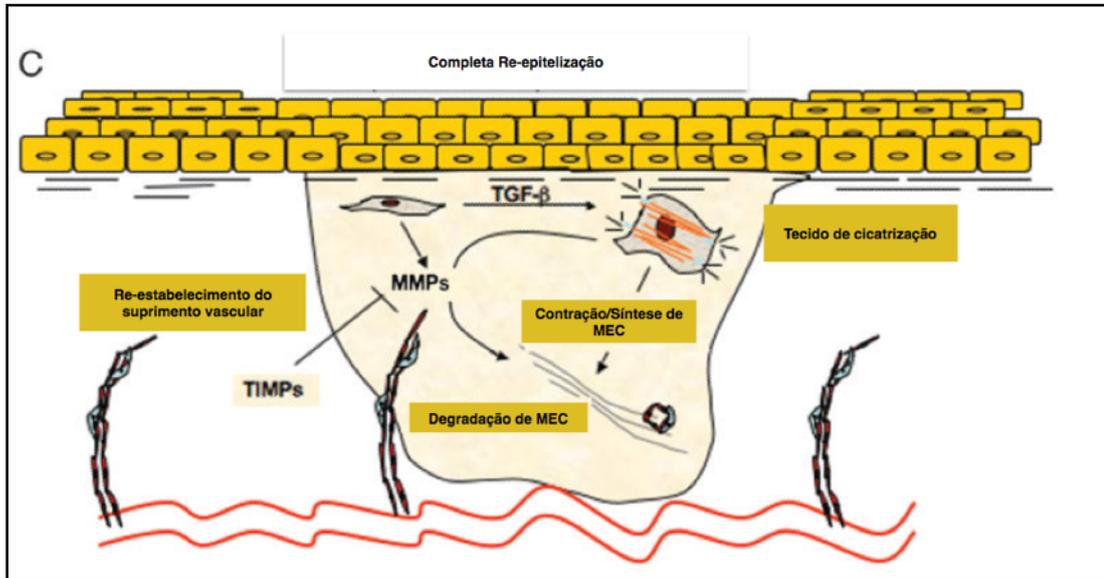
Além do papel de sustentar o tecido de granulação, a formação de novos vasos sanguíneos proporciona uma via para a entrega de oxigênio e de nutrientes, bem como estruturas eficazes para a chegada dos componentes da resposta inflamatória durante a cicatrização de feridas. Tratamentos pró-angiogênicos tem se mostrado capazes de modular o processo de cicatrização de feridas em condições patológicas. Por exemplo, Kirchner e colaboradores (2003) relataram que o uso tópico do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) reduziu 50% o tempo de cicatrização de feridas em camundongos diabéticos. Além disso, um estudo in vitro mostrou que células endoteliais, após tratamento com GH, aumentou a própria habilidade em formar estruturas semelhantes a capilares, através do aumento da expressão de VEGF-A (BRUNET-DUNAND et al., 2009).

Uma vez que a matriz de colágeno foi depositada na ferida, os fibroblastos param de produzir colágeno, e o tecido de granulação é substituído por uma cicatriz relativamente acelular (DESMOULIERE et al., 1995). A morte celular e, particularmente, a apoptose desempenham um papel chave no controle normal e patológico do crescimento de tecidos (COHEN, 1993).

3.2.3 Fase de remodelamento

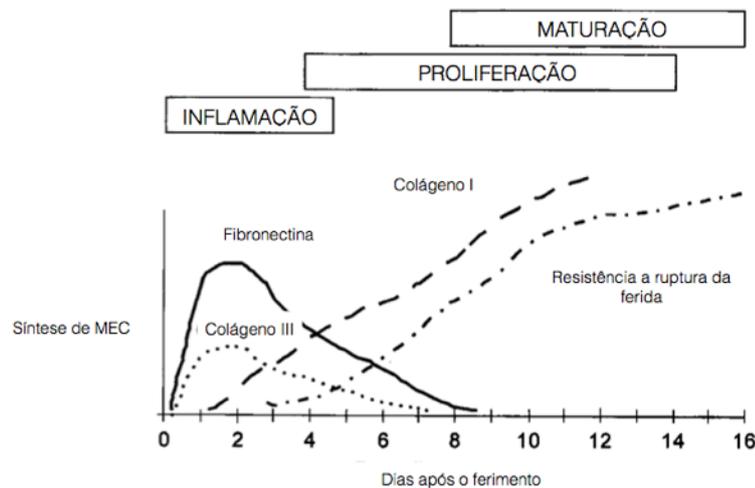
A fase final do processo de cicatrização (Figura 4) envolve diminuição da atividade celular e etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras colágenas (SINGER, CLARCK, 1999). A revisão de Witte & Barbul (1997) faz um compilado de informações a cerca das alterações na composição de MEC ao longo do processo de cicatrização de feridas. Inicialmente a MEC é composta por fibrina e fibronectina, proveniente da resposta causada pela chegada dos macrófagos. Em seguida, ocorre um aumento na deposição de proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Posteriormente, o colágeno torna-se a proteína mais abundante (Figura 5). Na derme, enquanto a MEC é moldada, os vasos sanguíneos, que estão localizados no interior da cicatriz, são re-organizados e sofrem maturação para formar uma rede de capilares funcionais (SHAW, MARTIN, 2009). Esta fase é essencial para a restauração da funcionalidade completa e uma aparência normal para o tecido lesado.

Figura 4 - Esquema representativo da fase de remodelamento.



Esquema representativo da cicatrização de feridas, evidenciando a remodelação da MEC seguida pela apoptose de células residentes, levando a formação de um tecido de cicatrização acelular. Adaptado de DEMIDOVA-RICE et al., 2012.

Figura 5 - Gráfico representativo da deposição dos constituintes de MEC durante a cicatrização de feridas na pele.



A deposição dos componentes de MEC na ferida ao longo do tempo. A fibronectina e o colágeno tipo III constituem a matriz inicial, o colágeno tipo I acumula-se mais tarde, correspondente ao aumento da força do tecido. Dados compilados a partir de uma revisão da literatura. Adaptado de (WITTE, BARBUL, 1997).

3.3 Interações entre a pele e hormônios

A pele é considerada classicamente como alvo de vários hormônios cujos efeitos têm sido reconhecidos e também caracterizados. Por exemplo, o hormônio liberador de corticotropina (CRH) mostrou ser um potente estimulador da lipogênese em células de glândulas sebáceas (ZOUBOULIS et al., 2002). A sua síntese, bem como, a produção de RNAm foi confirmada em um outro ensaio experimental utilizando células da pele humana e indicando uma possível relação deste hormônio com processos fisiológicos e/ou patológicos da pele (SLOMINSKI et al., 1998).

Outro hormônio que apresenta atividade comprovada em células da pele é a leptina. Em estudos utilizando linhagem de células murina, foi demonstrado que este hormônio atua como mitógeno para queratinócitos (dependente da ativação do fator transcrição STAT-3), também, apresentou um papel importante no reparo tecidual, quando foram utilizados camundongos obesos e deficientes para leptina (GOREN et al., 2003). Além disso, este hormônio atua como protetor da morte celular e indução de angiogênese em células endoteliais da veia umbilical humana confirmando a hipótese de que possa ser um importante regulador em diferentes processos celulares (ARTWOHL et al., 2002).

A atividade estrogênica também tem sido relatada, evidenciando aspectos fisiológicos pertinentes na pele. Alterações significativas neste órgão, durante a menopausa, são devido ao efeito sustentado sobre os componentes individuais da pele. O receptor de estrógeno tem sido detectado nos componentes celulares da pele, sugerindo que o metabolismo celular dos componentes epidérmicos e dérmicos são influenciados pelo estado hipoestrogênico da menopausa levando a mudanças nas fibras colágenas. Além disso, estudos fisiológicos sobre o estrógeno e a cicatrização de feridas sugerem que a terapia de reposição hormonal pode desempenhar um papel benéfico na reparação da lesão cutânea (BRINCAT et al., 2005; RAINE-FENNING et al., 2003).

Dados da literatura mostraram que o GH também apresenta atividade biológica na pele (DUNAISKI, BERLFORD, 2002). Foi detectado o receptor do GH (rGH) na epiderme da pele humana e de roedores, e em fibroblastos, adipócitos, glândulas sebáceas e folículos capilares (OAKES et al; 1992; LOBIE et al., 1992; TAVAKKOL et al., 1992). Estudos com humanos suportam

a concepção que o GH é um importante regulador da pele em indivíduos acromegálicos (MATSUOKA et al., 1982; THIBOUTOT, 1995). Em um estudo histológico foi verificado que os indivíduos com altos níveis de GH circulante apresentavam espessamento da epiderme, e elevado número de fibroblastos e aumento na deposição de glicosaminoglicanos na derme (MATSUOKA et al., 1982). Embora o GH possa apresentar seus efeitos fenotípicos diretamente em sua célula-alvo, foram encontradas evidências de que este hormônio também pode agir a partir de um efeito indireto, estimulando células cutâneas a produzir o fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) agindo, em muitos casos, na diferenciação e proliferação de queratinócitos e fibroblastos, e também, um importante modulador do folículo capilar (RUDMAN et al., 1997; LEE et al., 2010).

3.3.1 Hormônio do crescimento

O GH é um polipeptídeo de 22 kDa constituído por 191 aminoácidos e é sintetizado pelas células somatotróficas da hipófise anterior. A secreção do GH é pulsátil, principalmente noturna, e é regulada através de um complexo sistema de controle neuroendócrino que compreende dois principais reguladores hipotalâmicos: o hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) e a somatostatina (SS), exercendo influências estimulatórias e inibitórias, respectivamente, na secreção do GH (MULLER et al. 1999). A secreção do GH também pode ser estimulada por outros peptídeos denominados de secretagogos de GH (GHS), os quais interagem com receptores presentes nas células somatotróficas na hipófise conhecidos como GHSR e dentre os quais se destaca a grelina (HATTORI, 2009). Outros fatores e substâncias são capazes de alterar a secreção de GH, através da alça de retroalimentação ou por alterações na glicemia (hipoglicemia), aumento de aminoácidos (arginina), desnutrição, estresse, exercício físico e o sono (KOPCHICK, ANDRY, 2000).

Os efeitos do GH são iniciados a partir da sua ligação ao seu receptor (GHR) presente na membrana plasmática das células-alvo. O GHR é um membro da superfamília de receptores citocinas/hemopoietina que não possuem atividade tirosina-cinase intrínseca. Assim, quando o GH se liga ao seu receptor, domínios citoplasmáticos próximos à membrana celular interagem com tirosinas cinases do

citoplasma (JAK), que ativam a via de sinalização JAK-STAT. A ativação de JAK-2 pode acionar outra via de sinalização, através da fosforilação de proteínas como as FAK-cinases, Ras e Raf, e a proteína MAP-cinase (JEAY *et al.*, 2002; ROSENFELD, HWA, 2009).

Várias investigações sobre distúrbios de crescimento, em animais de experimentação e em humanos, foram fundamentais para identificação e caracterização do GH como a substância responsável pelo crescimento e desenvolvimento dos tecidos (KOPCHICK, ANDRY, 2000). Atualmente, já está bem estabelecido que o GH atua de maneira direta sobre as células-alvo ou indiretamente pela estimulação da produção de fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF's) e em particular o IGF-1. Tanto o GH quanto IGF-1 estimulam a síntese protéica e de ácidos nucléicos que promovem a proliferação e o consequente crescimento tissular (JEAY *et al.*, 2002).

O GH também pode ser produzido em outros locais, como evidenciado por estudos anteriores mostrando a expressão do gene para a produção do GH em células da pele (SLOMINSKI *et al.*, 2000), e de modo semelhante também foi demonstrado em células do sistema imunológico, por exemplo os linfócitos (WU *et al.*, 1996). Ainda, na pele de humanos, a imunoreatividade para o GHr foi encontrada em camadas epidérmicas e na derme, sugerindo que este hormônio apresenta um papel na modulação de queratinócitos e fibroblastos de forma parácrina e/ou autócrina (OAKES *et al.*, 1992).

Sobre o sistema imunológico, o GH tem sido demonstrado como um importante modulador da biologia de órgãos e células imunológicas exercendo efeitos pleiotrópicos nesse sistema (SAVINO *et al.*, 2012; WELNIAK *et al.*, 2002). Por exemplo, camundongos transgênicos para o GH, bem como tratados com GH, exibem celularidade aumentada no timo. E, além disso, o GH também estimula o microambiente do timo, aumentando a produção de proteínas de MEC (SMANIOTTO *et al.*, 2005). Ainda sobre o sistema imunológico, tem sido descrito que o GH, pelo menos quando administrado por um longo período de tempo, aumenta a timopoiese estimulando o timo a produzir linfócitos T CD4 (+) em adultos infectados com HIV-1 (NAPOLITANO *et al.*, 2008). Golde e colaboradores (1997), mostraram *in vitro* que o GH foi capaz de estimular a eritropoiese em células da medula óssea de camundongos e, alguns anos depois, Merchav e colaboradores (1988)

demonstraram que o GH foi capaz de induzir um aumento na produção de granulócitos.

Dados da literatura tem mostrado que o GH influencia na biologia da célula endotelial (RYMASZEKI et al., 1991; SILHA et al., 2005; RAMOS, 2008; MILJIC et al., 2013). Influências deste hormônio sobre a angiogênese foram observadas por THOREY e colaboradores (2004), em experimentos com animais transgênicos onde se observou que altos níveis circulantes de GH favorece o aumento no número de vasos sanguíneos em regiões de injúria de tecido.

Os dados publicados até aqui, sugerem que o GH apresenta uma íntima relação com várias células do organismo, participando de inúmeros processos fisiológicos, e em muitos casos, apresentando-se como um potente imunomodulador que pode ser visto como uma ferramenta terapêutica adicional (THOREY et al., 2004; SMANIOTTO et al., 2005, 2010, 2011; SAVINO et al., 2012; DEMIDOVA-RICE et al., 2012).

4 METODOLOGIA

4.1 Animais e Ensaio de Cicatrização de Feridas

Foram utilizados camundongos, com 6 meses de idade, machos, da linhagem Swiss e peso variando entre 38/40 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Estes animais foram mantidos com acesso livre a ração e água, iluminação artificial 12 horas claro e 12 horas escuro em gabinete refrigerado. A indução da ferida foi realizado após a administração do anestésico (100 mg/Kg de Ketamina e 10 mg/Kg de Xilasina diluído em PBS). Os camundongos foram depilados dorsalmente e esta área higienizada com álcool etílico a 70%. Uma ferida, por animal, foi realizada com auxílio de um anel metálico, de 1cm de diâmetro, removendo-se toda a pele até o rebordo da hipoderme (Figura 6). Após estes procedimentos, os roedores foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, sendo cada grupo constituído por 9 animais individualizados. O tratamento tópico com GH (10^{-8} ou 10^{-7} M), Bepantol e a administração do veículo (PBS, como controle) foi realizado diariamente, uma única vez ao dia (período de 24 horas), em um volume de aproximadamente 200 μ l. O tratamento foi realizado no período das 15 às 17 horas. Os animais foram fotografados diariamente para análise do fechamento da ferida e foram sacrificados após 3, 7 ou 14 dias de tratamento tópico. Pelo menos três feridas para cada um dos controles (PBS e Bepantol) e GH foram observadas. Para as medições da área da ferida, imagens digitais foram analisadas pelo software ImageJ (NIH).

Neste estudo, utilizou-se como controle positivo o Bepantol. Animais tratados com este composto foram utilizados para comparação diária do fechamento da ferida, por observação macroscópica. Segundo informações do próprio fabricante (Bayer), o dexpanthenol, após a aplicação tópica, penetra rapidamente nas camadas internas da pele e é transformado em vitamina B₅, indispensável para a formação e regeneração natural da pele.

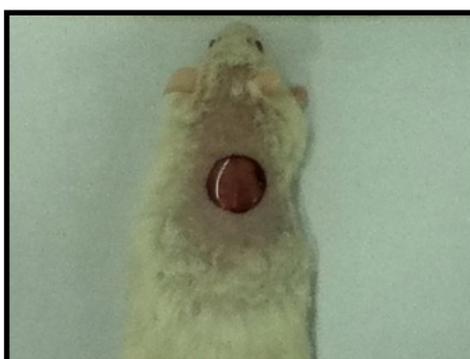
As concentrações utilizadas para o tratamento tópico com GH foram escolhidas devido ao fato de que, em trabalho anterior, produzido pelo próprio grupo de estudo revelaram atividades moduladoras em órgãos linfóides, células do sistema imune e células endoteliais.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da UFAL (Licença nº 028370/2010-07).

4.2 Processamento histológico

Para análise histológica, 3 feridas por grupo, foram analisadas. Após os tratamentos, as feridas cicatrizadas foram removidos, sendo alguns espécimes congelados em tissue TEK (que foram reservados para a imunofluorescência) e outras fixadas, em líquido de *Bouin*, por no máximo 36 horas para as análises histológicas. Após fixação, ocorrida em temperatura ambiente, os espécimes foram conservados e clarificados em sucessivos banhos em álcool 70% para retirar o excesso de fixador. Seguidamente, os fragmentos de pele foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina. Posteriormente, cortes de 5 µm foram obtidos a partir de uma navalha de aço no micrótomo. Os cortes foram distendidos em água previamente aquecida, aderidos em lâmina histológica untada com albumina de *Mayer* em chapa quente a 30° C.

Figura 6 - Modelo da área de ferimento no dorso de camundongo.



Camundongo *Swiss* apresentando a área de ferimento logo após a injúria, onde observa-se a exposição da fáscia muscular dorsal. Procedimento realizado com auxílio de um anel circular metálico com 1cm de diâmetro.

4.3 Técnicas de coloração

Os fragmentos de pele apresentam-se incolores após a microtomia, assim a coloração visa contrastar as estruturas teciduais. Para este propósito utilizou-se a

coloração de hematoxilina-eosina (HE) para evidenciar os aspectos histomorfológicos da pele em diferentes estágios de cicatrização de ferida.

Em síntese, os cortes foram desparafinados em três banhos sucessivos de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico e água destilada. Após, as lâminas foram imersas em solução de hematoxilina, o excesso retirado em água corrente e, em seguida colocadas em uma solução ácida de eosina. Posteriormente os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico e diafanizados pelo xilol para posterior montagem.

Para analisar a expressão de colágeno total na área da cicatrização utilizou-se o kit de coloração tricrômico de Masson. Resumidamente, os cortes foram desparafinados em três banhos sucessivos de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico e água destilada. Após, as lâminas foram imersas em solução de hematoxilina, coradas em uma solução ácida de Biebrich-fucsina, tratadas em ácido fosfotúngstico e coradas em azul de anilina. Em seguida, os cortes foram desidratados em álcool etílico, diafanizados em xilol para posterior montagem. Os espécimes foram analisados utilizando o microscópio de luz.

4.4 Imunohistoquímica

Os imunoenaios foram realizados em cortes histológicos congelados de 5 µm de espessura, distendidos em lâminas de vidro.

4.4.1 Immunoperoxidase

O ensaio foi utilizado para evidenciar a molécula de adesão CD31/PECAM-1 presente em células endoteliais nos cortes histológicos. Para isso, foi utilizado o protocolo padrão de estreptavidina-biotina-peroxidase, sugerido pelo fabricante (BD Biosciences). Resumidamente, os cortes foram fixados em acetona (P.A.), re-hidratados em PBS, e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada em solução de H₂O₂ a 0,3% (diluída em PBS) por 10 minutos. Os cortes foram lavados e então expostos a uma solução, contendo 10% de SBF, para bloqueio das ligações não específicas durante 40 minutos. Após lavagem, as espécimes foram cuidadosamente expostas ao anticorpo primário monoclonal CD31, na proporção de

1:100, por 60 minutos. Após esse tempo, os espécimes foram lavados e, então, expostos ao anticorpo secundário biotilado, na concentração de 10 µg/mL por 30 minutos. Seguidamente, uma solução de peroxidase-estreptavidina foi aplicada junto aos cortes e incubadas por 30 minutos. Após lavagem, a marcação foi revelada com o cromógeno diaminobenzidina (DAB), por 7 a 10 minutos, tendo como substrato o peróxido de hidrogênio. Após a revelação, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina, por 60 segundos, desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizadas em xilol e montadas. Como controle negativo, foi omitido o anticorpo primário para avaliar a presença de possível reação de interferência entre as células e o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase.

Após a coloração, os vasos sanguíneos foram evidenciados pela cor acastanhada em contraste com um fundo discretamente azulado.

4.4.2 Imunofluorescência

O método foi utilizado para avaliar a deposição do colágeno tipo I. Os espécimes congelados foram submetidos ao ensaio de imunofluorescência indireta como descrito previamente (SMANIOTTO et al., 2005). Resumidamente, os espécimes foram lavados com PBS seguido da incubação com BSA a 0,1%. Os tecidos foram incubados com anticorpo primário para a cadeia alfa do colágeno tipo I por 60 minutos, em temperatura ambiente, lavados com PBS, e expostos ao anticorpo secundário GAR-FITC por 30 minutos. As lâminas foram analisadas com microscópio de fluorescência.

4.5 Captura de imagem e quantificação do CD31 e colágeno tipo I

Imagens digitais das imunoperoxidasas foram capturadas de forma padronizada, utilizando-se, para tanto, um microscópio de luz equipado com uma câmera digital (10.1 megapixels). O procedimento compreendeu, inicialmente, uma varredura por toda a área da pele para posterior captura de imagem utilizando a objetiva de 20X. Foram escolhidos, pelo menos, 10 campos por animal.

Após obtenção das fotomicrografias, a análise quantitativa da reatividade do CD31 foi realizada através do Image J 1.45 para Mac OS X (NIH, USA). Após ajustar

o programa para o reconhecimento da cor relativa as estruturas de interesse (os vasos sanguíneos) o programa realizou a determinação do percentual de superfície do campo analisado. Para tanto, realizou o cálculo da densidade de área, que era definida pelo quociente entre a área ocupada pela microvasculatura e a área total do campo analisado.

Para a análise quantitativa da intensidade de fluorescência do colágeno tipo I, foram obtidas fotomicrografias e quantificadas pelo *Image J*, transformando a coloração específica em pixels e dividindo o número total de pixels pela área analisada, obtendo o número de pixels/ μm^2 .

4.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando o teste t de Student para determinar a significância estatística entre os grupos de tratamento e o controle. Além disso, foi utilizado o ANOVA seguido do pós-teste de Dunnet's. Os valores foram apresentados pela média \pm erro padrão da média (EPM) e considerados significativos quando $p \leq 0,05$. Para tabulação dos resultados foi utilizado o programa Numbers® (Apple Inc., California, CA, USA) e análise estatística o Graph Pad Prism® 5.0 (San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 O hormônio do crescimento acelerou o fechamento de feridas cutâneas em camundongos.

Inicialmente foi avaliada macroscopicamente a progressão do fechamento de feridas em camundongos adultos tratados topicamente com GH, durante 14 dias ininterruptos. Animais tratados com bepantol ou somente com PBS serviram como controles.

Na avaliação macroscópica das feridas observou-se edema, hiperemia e formação de uma crosta, em todos os grupos, que persistiu durante a primeira semana de tratamento. Os animais mantiveram-se saudáveis e apresentaram características de cicatrização sem evidências macroscópicas de infecção.

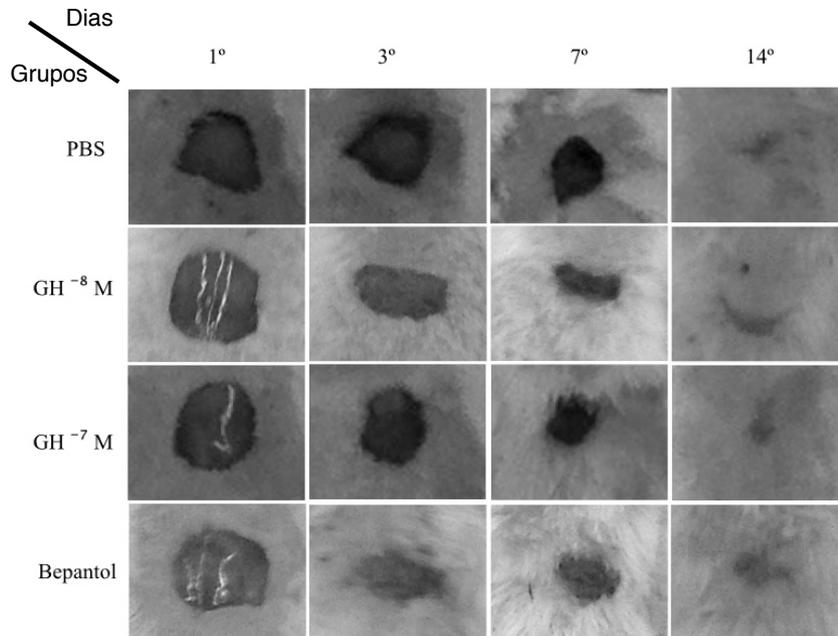
As análises das fotografias (Figura 7A) mostraram que os animais tratados topicamente com GH, independente da concentração utilizada, sofreram uma aceleração no processo de reparo tecidual, em todos os tempos analisados. Quando foi avaliado o percentual de contração das feridas ao longo do tempo constatou-se um efeito estatisticamente significativo quando comparados ao controle PBS, sendo o tratamento com GH 10^{-7} M mais eficaz que o GH 10^{-8} M (Figura 7B).

Além disso, verificou-se que o tratamento com GH teve um resultado similar ao grupo dos animais que foram tratados com bepantol. No entanto, observou-se que o tratamento com bepantol acelerou o processo de cicatrização, em relação ao grupo que recebeu PBS, apenas nos primeiros dias após a injúria, não sendo mais observado este efeito após a primeira semana de tratamento.

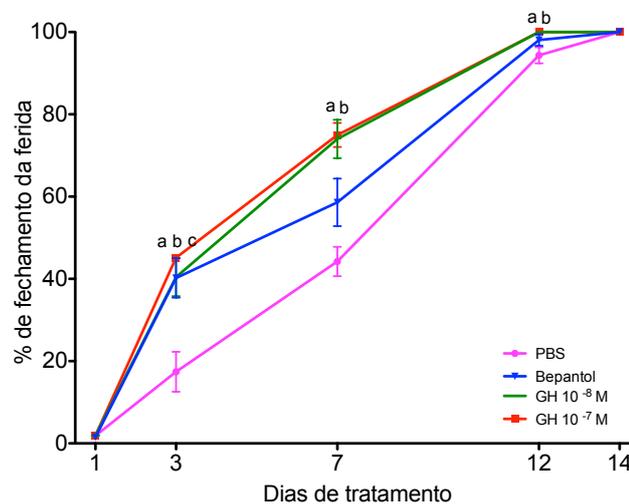
Essa avaliação preliminar permitiu concluir que o tratamento tópico com GH demonstrou um melhor desempenho, quando comparado aos controles, por ter apresentado maior percentual de contração da área das feridas durante todas as fases do processo de cicatrização.

Figura 7 - Efeito tópico do GH no fechamento de feridas na pele de camundongos

A



B



Cicatrização de feridas cutâneas com 1cm de diâmetro em camundongos expostos ao GH, bepantol ou PBS, durante 14 dias de tratamento. Uma ferida foi gerada em cada camundongo. **(A)** Fotografias representativas dos grupos controle (PBS), GH10⁻⁸ M, GH 10⁻⁷M e bepantol, nos dias 1, 3, 7 e 14 após incisões e tratamento tópico. Área da ferida em processo de cicatrização tecidual é mostrada no gráfico **(B)**. Os dados são expressos como média ± EPM em relação à área ferida no dia 1. As diferenças estatísticas foram detectadas por meio do ANOVA seguido do Dunnet's test. (a) = PBS vs. GH 10⁻⁸ M; (b)=PBS vs. GH 10⁻⁷M; (c)= PBS vs. Bepantol; (a,b,c) equivalem ao valor de p<0,05.

5.2. O hormônio do crescimento antecipou o recrutamento de células inflamatórias em feridas cutâneas de camundongos após o terceiro dia de tratamento tópico.

Considerando que o tratamento com GH acelerou o o fechamento da lesão cutânea, tornou-se interessante analisar, microscopicamente, o seu efeito durante as três fases da cicatrização.

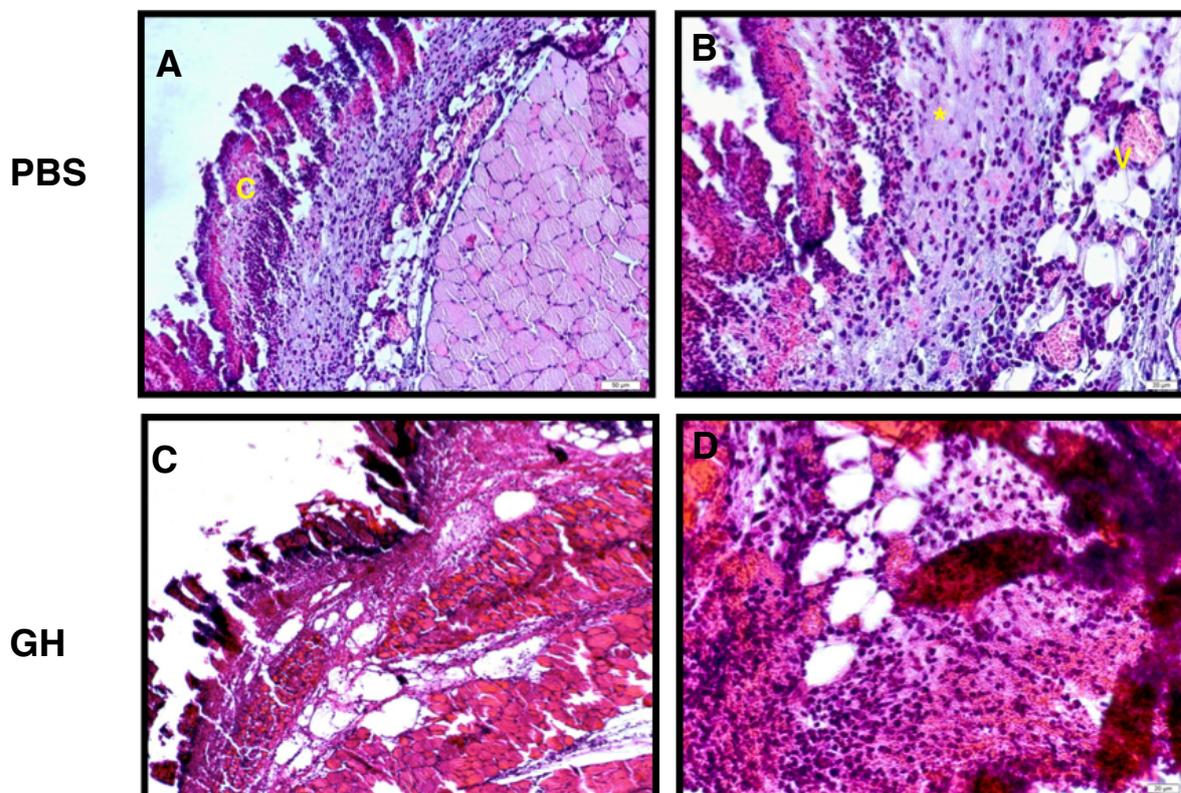
Os eventos iniciais do reparo tecidual em camundongos durante a fase inflamatória, após o terceiro dia de injúria (Figura 8), observou-se a destruição tecidual com infiltrado inflamatório moderado e a presença de um tecido de consistência muito frouxa. Notou-se ainda, a presença de uma crosta na superfície da injúria no tecido de granulação.

Como observado na figura 8B (do grupo PBS), na área correspondente ao tecido de granulação, foi evidenciada a presença de células inflamatórias, caracterizadas por um perfil celular mais arredondado, e de fibroblastos, constituído por um padrão celular mais fusiforme.

No que se refere aos grupos de tratamento, observou-se que os animais tratados com GH, independente da concentração administrada, obtiveram resultados similares. Fotomicrografias representativas desses tratamentos são mostradas nas figuras 8 C e D. Na análise, observou-se qualitativamente que o tratamento com GH acelerou a chegada de células inflamatórias após o terceiro dia, quando comparado ao grupo que recebeu PBS (Figura 8 B). Além disso, foi verificada a presença de vasos sanguíneos, de fibroblastos e de uma crosta marcadamente corada na superfície da injúria.

Não foram realizadas análises histológicas do grupo tratado com bepantol, uma vez que estes animais foram utilizados somente para as avaliações macroscópicas, e assim verificar a eficiência do tratamento com GH no fechamento de feridas cutâneas.

Figura 8 - Efeito do hormônio do crescimento no recrutamento inflamatório em feridas cutâneas.



Fotomicrografias de cortes parafinados do tecido de reparação da pele provenientes de animal do grupo controle e tratado com GH, após o terceiro dia da injúria e tratamento. Nota-se a presença de células inflamatórias e de fibroblastos em todos os grupos analisados. No que se refere ao grupo de tratamento, nota-se que o tratamento com GH acelerou a chegada de células inflamatórias após o terceiro dia de tratamento quando comparado ao grupo controle. **A e C**, aumento de 200x e **B e D**, aumento de 400x. Coloração H&E. Fotomicrografias representativas dos cortes seriados. C=crosta; *= Infiltrado; V= vaso sanguíneo.

5.3. O recrutamento celular e a deposição de colágeno foram acelerados em resposta ao GH na formação de tecido de granulação

Após o sétimo dia de injúria, foi observado uma série de eventos celulares que foram desencadeados desde o início da injúria. Durante este tempo, notou-se a presença de queratinócitos em intensa atividade mitótica e migração, bem como, a formação de um tecido de consistência granulosa, constituído por células e MEC.

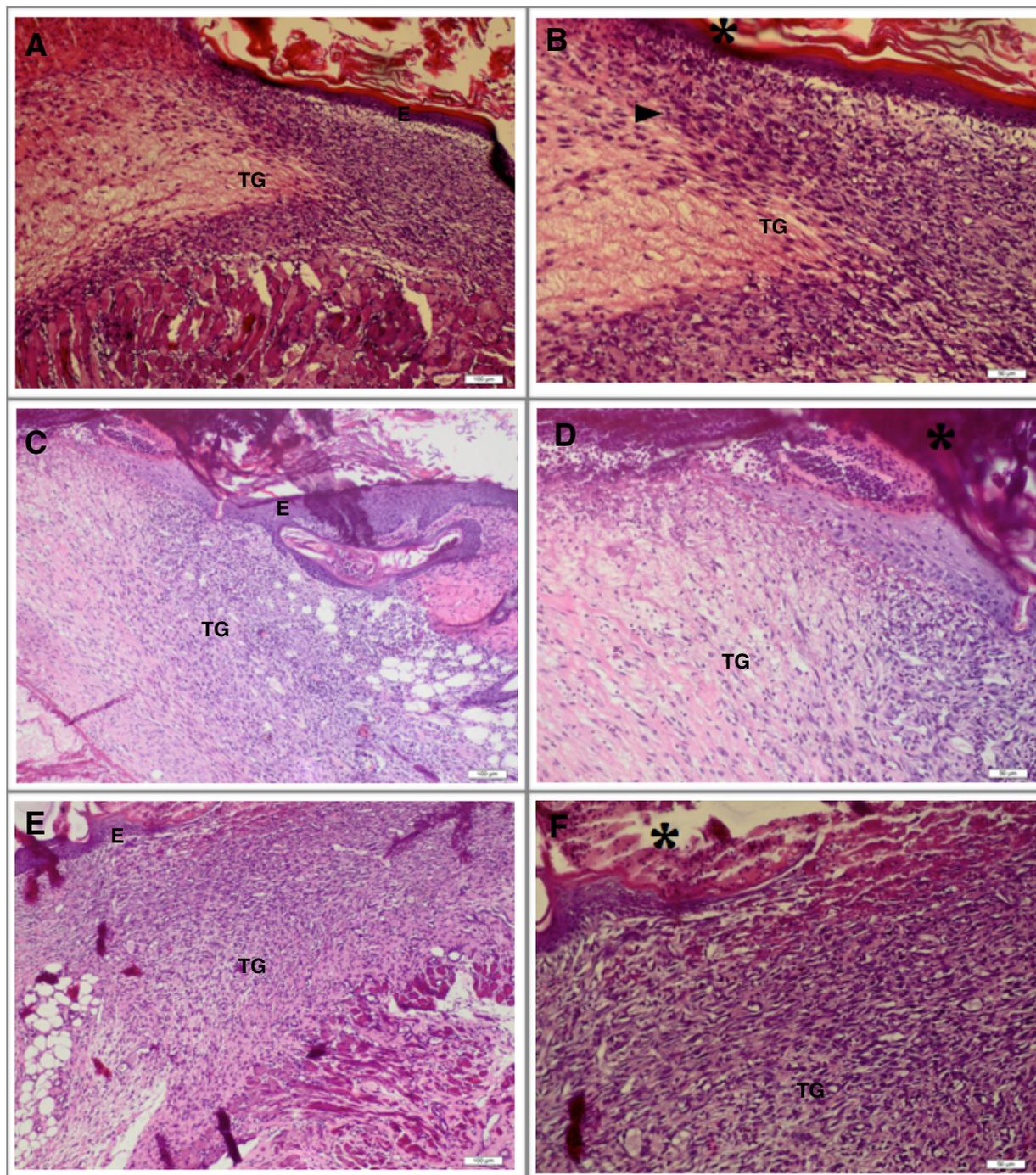
No que se refere a epiderme (Figura 9), o grupo controle apresentou uma estreita camada de células epiteliais na região de lesão. Os grupos que receberam tratamentos com GH apresentaram uma epiderme um pouco mais estratificada quando comparado com o grupo controle, sendo esse fenômeno observado em maior evidência, no grupo tratado com GH na concentração de 10^{-8} M. Acima da epiderme foi possível ainda notar a presença da crosta, formada na fase inflamatória, em todos os grupos analisados.

Na região da derme foram observadas as características do tecido de granulação formado nos três grupos (Figura 9). Quando comparados os grupos que receberam tratamento tópico com GH ao grupo controle que recebeu apenas PBS, verificou-se a presença de um infiltrado celular, constituído por células inflamatórias e fibroblastos difusos em toda a região de granulação. Entretanto, no grupo controle, esse infiltrado encontrou-se concentrado na região periférica da injúria. Diante desses dados, percebeu-se que o GH acelerou a migração e proliferação destas células na primeira semana de tratamento.

Durante a formação do tecido de granulação, os fibroblastos sintetizam proteínas de MEC, principalmente colágeno, que sustenta as células recrutadas e forma a base de construção deste novo tecido. O tratamento com GH aumentou a deposição de colágeno total durante a formação do tecido de granulação conforme mostrado na figura 10. Sobre a deposição desta proteína nos grupos analisados, verificou-se uma maior deposição no grupo que recebeu GH na concentração de 10^{-8} M seguido do tratamento com GH 10^{-7} M. Notou-se, ainda, que a organização do colágeno segue o mesmo padrão visto no recrutamento celular: difuso nos grupos que foram tratados com GH, enquanto que no grupo controle a deposição foi restrita na região periférica.

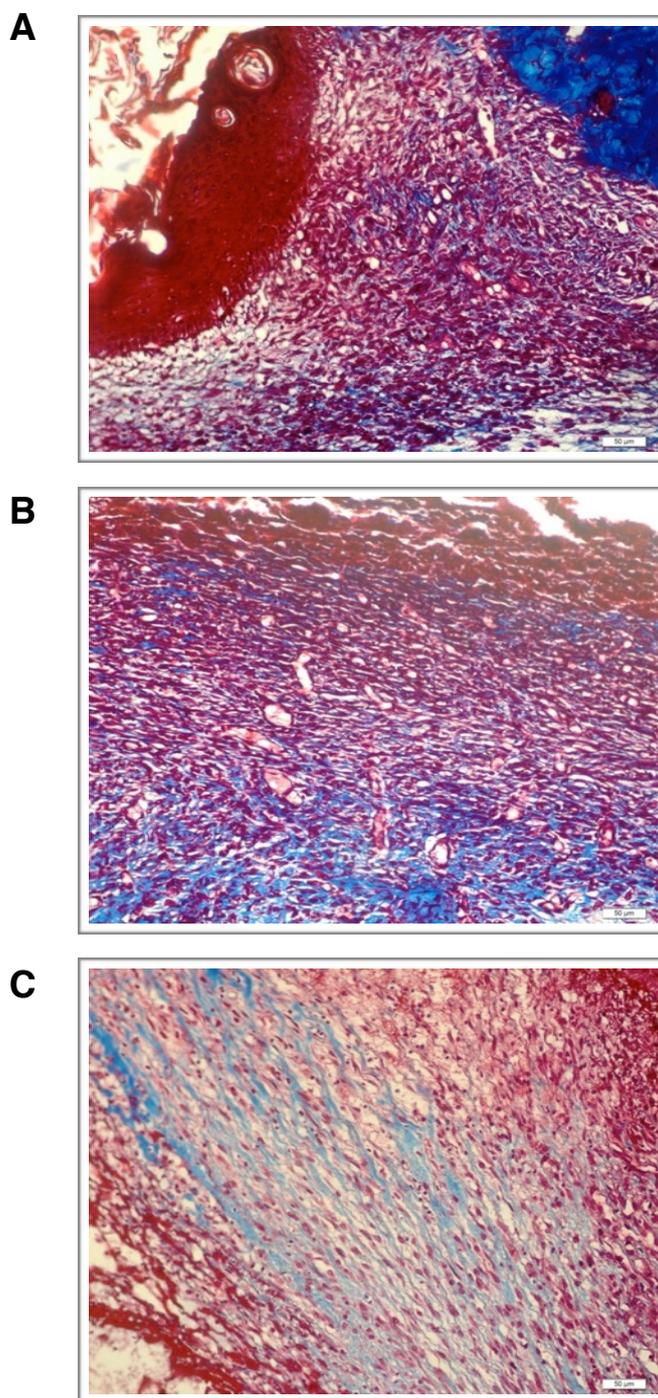
O ensaio de imunofluorescência foi utilizado para evidenciar a expressão do colágeno tipo I. Foi constatado, pela análise qualitativa, que o tratamento tópico com GH aumentou a deposição de colágeno tipo I em feridas cutâneas de camundongos, na primeira semana de tratamento (Figura 11A). A quantificação da intensidade de fluorescência, conforme observado na figura 11B, confirmou que os tratamentos com GH, em ambas as concentrações, foi capaz de aumentar de forma significativa a deposição de colágeno tipo I. Ainda, esse efeito foi mais evidente na concentração de 10^{-8} M.

Figura 9 - Efeitos do GH na formação de tecido de granulação na pele de camundongos.



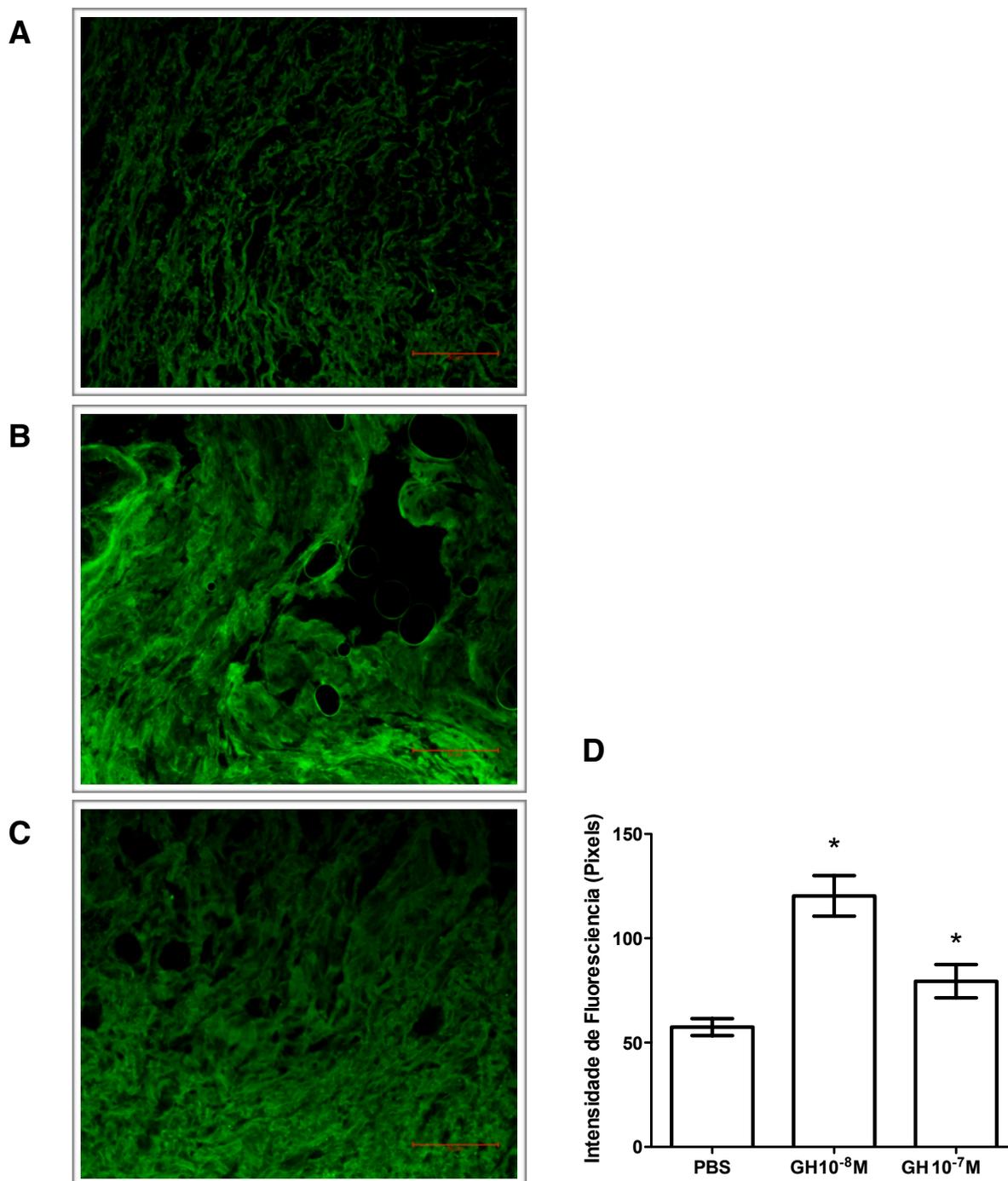
Fotomicrografias representativas dos cortes seriados do tecido de reparação da pele provenientes de animal tratados topicamente com PBS (A, B), GH 10^{-8} M (C, D) ou GH 10^{-7} M (E, F) após o sétimo dia da injúria e tratamento. Observa-se, em todos os grupos analisados, um infiltrado celular na área do tecido de granulação e o processo de re-epitelização das feridas. No grupo controle, nota-se que o infiltrado é restrito nas bordas das feridas, enquanto que nos grupos de tratamento com GH o infiltrado é intenso e difuso em todo o tecido formado. As fotomicrografias A, C e E apresentam aumento de 100x e as fotomicrografias B, D e F apresentam aumento de 200x. Coloração H&E. TG = Tecido de Granulação; E = Epiderme; * = Crosta.

Figura 10 - Efeito do tratamento tópico com GH na deposição de colágeno na fase de granulação.



Fotomicrografias representativas dos cortes seriados do tecido de reparação da pele provenientes de animais tratados topicamente com PBS (**A**), GH 10⁻⁷M (**B**) e GH 10⁻⁸ M (**C**), após o sétimo dia da injúria e tratamento, evidenciando a deposição de colágeno total na ferida. A presença desta proteína é visualizada pela coloração azulada. Nota-se uma maior deposição de colágeno nos grupos de tratamento com GH quando comparado ao grupo controle. As fotomicrografias são visualizadas no aumento de 200x. Coloração tricrômico de Masson.

Figura 11 - Efeito do GH na deposição de Colágeno tipo I na fase de tecido de granulação.



Fotomicrografias de cortes congelados do tecido de reparação provenientes dos animais tratados topicamente com PBS (A), GH 10^{-8} M (B) e GH 10^{-7} M (C), após o sétimo dia de injúria e tratamento que foram submetidas ao ensaio de imunofluorescência. As fotomicrografias são visualizadas no aumento de 200 vezes. (D) Gráfico obtido da quantificação dos pixels dos grupos analisados. Observa-se que o tratamento com GH, independentemente da concentração utilizada, aumenta a expressão de colágeno I. As barras representam a média \pm EPM da intensidade de fluorescência. A análise estatística foi feita com o teste t. * = $p < 0,05$ (GH 10^{-7} M e GH 10^{-8} M Vs. PBS).

5.4 O GH acelerou a remodelação do tecido de granulação e a re-epitelização.

Para avaliar o efeito do tratamento tópico do GH no remodelamento dos tecidos que sofrem injúria, camundongos foram tratados durante 14 dias ininterruptos.

Após o 14º dia de tratamento todos os animais analisados apresentaram a epiderme regenerada. Histologicamente, foi constatado diferenças nas regiões de epiderme e derme em todos os animais tratados com GH quando comparados ao grupo controle PBS.

Como observado na figura 12, as fotomicrografias do grupo controle mostraram que a epiderme encontrou-se totalmente regenerada e constituída por um epitélio espesso e estratificado (Figura 12 A), consistindo de células epiteliais notavelmente ativas, característica observada pela forte coloração de seus núcleos. Ainda na epiderme, notou-se uma fina camada córnea (Figura 12 B). A derme encontrou-se constituída por um infiltrado celular difuso e denso indicando uma atividade inflamatória e/ou remodeladora na área recém formada (Figura 12 A/B). Um ponto importante que merece destaque na epiderme são as estratificações de camadas epiteliais. Notou-se uma diferença entre a área recém reepitelizada em relação a área que não sofreu injúria: o número de camadas epiteliais aumentou e seu ponto mais alto correlacionou-se com o centro da área injuriada. Não foi observado, no tempo analisado, uma diferenciação das regiões de derme papilar e reticular, conforme a maturação e a espessura das fibras colágenas. Além disso, uma desorganização das fibras de MEC e presença elevada de vasos sanguíneos também foi evidente.

Resultados similares foram observados entre os animais tratados com GH. Nas figuras 13 e 14, referentes aos tratamentos com GH nas concentrações de 10^{-8} e 10^{-7} M respectivamente, observou-se uma epiderme totalmente regenerada e constituída por um epitélio com poucas estratificações e muito semelhante ao verificado na região da pele que não foi afetada (13 e 14A - regiões laterais da imagem). Foi observado a presença de uma camada córnea na região da área recém cicatrizada. A derme encontrou-se constituída por um infiltrado celular difuso

muito leve, indicando que o processo inflamatório já foi atenuado. Pode-se notar uma deposição de MEC muito próximo do estado da pele normal, pois evidenciou uma disposição regular e mais uniforme do colágeno.

No 14º dias após a injúria, também foi avaliado a deposição de colágeno nos diferentes grupos estudados. Para isso, cortes micrométricos foram obtidos e corados com tricrômico de Masson.

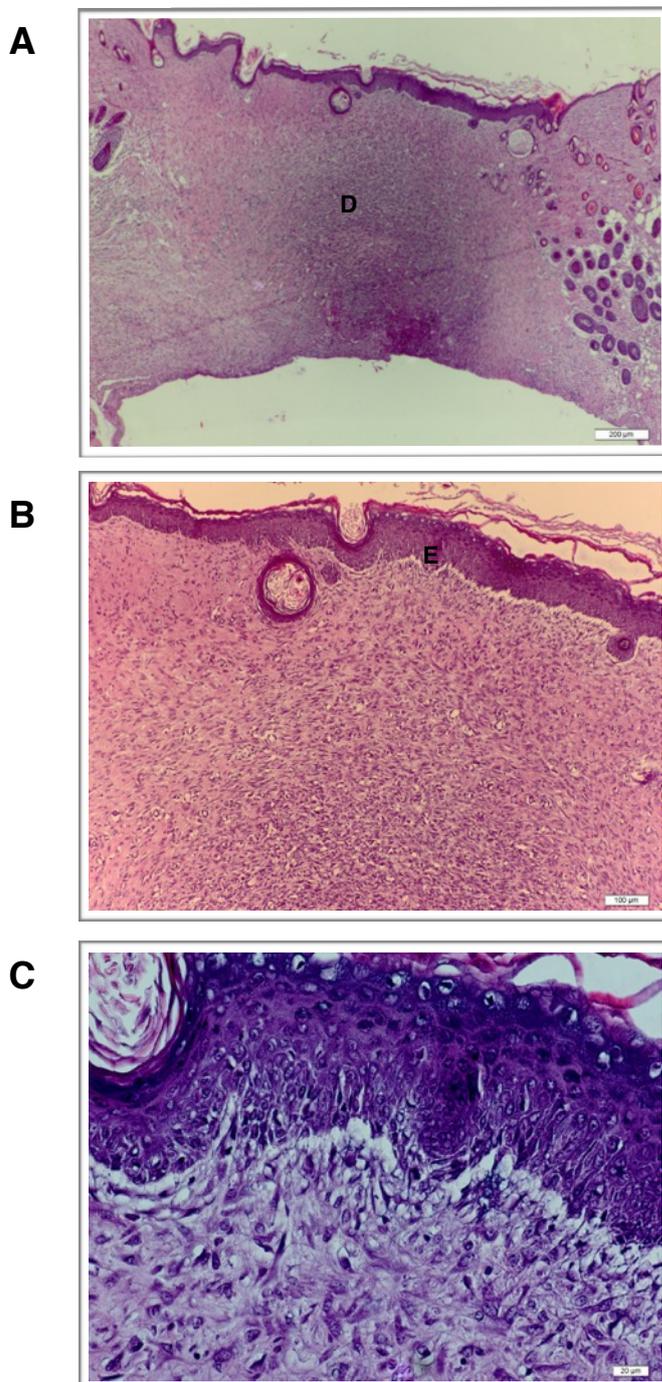
Conforme mostrado na figura 15, o colágeno, principal componente de MEC no tecido de granulação, apresentou-se difuso em todas as regiões analisadas, no entanto, a sua presença foi evidente nas regiões laterais do tecido de granulação. Além disso, as fibras mais espessas, ou maduras, também foram localizadas nestas regiões laterais, indicando o direcionamento e dinâmica do processo de cicatrização de feridas. As diferenças na deposição do colágeno pode ser observado na figura 15B, comparando a região não afetada (à esquerda, fracamente corada em azul) com a área afetada (à direita, fortemente corada em azul). Como demonstrado na figura 15C, o colágeno foi pouco visualizado na região central do tecido, apesar de, nesta região, encontrou-se uma grande população de células imunitárias e próprias do tecido conjuntivo.

As fotomicrografias representativas dos grupos tratados com GH nas concentrações de 10^{-8} M (Figura 16) e 10^{-7} M (Figura 17) mostram as fibras colágenas difusas em toda a região do tecido de granulação (Figuras 16A e 17A), mas, foi predominantemente expressa nas regiões laterais da área cicatrizada no grupo tratado com 10^{-8} M (Figuras 16 B/C), enquanto que no grupo tratado com 10^{-7} M a deposição do colágeno encontrou-se mais homogênea (Figuras 17 B/C). A análise destes espécimes, permitiu demonstrar o amadurecimento do colágeno de acordo com as diferentes tonalidades do azul. Neste sentido, notou-se que o GH aumentou a expressão e acelerou a deposição de colágeno durante o processo de reparo tecidual em até 14 dias. A figura 17C, evidenciou, com bastante clareza, que estas fibras foram fortemente coradas indicando um alto amadurecimento do colágeno que fortalece a nova região cicatrizada.

Através da técnica de imunofluorescência com anticorpo específico para o colágeno tipo I, conforme representado na figura 18A, observou-se uma maior deposição do colágeno nos grupos tratados com GH quando comparado ao grupo controle PBS. A quantificação da intensidade de fluorescência, conforme observado

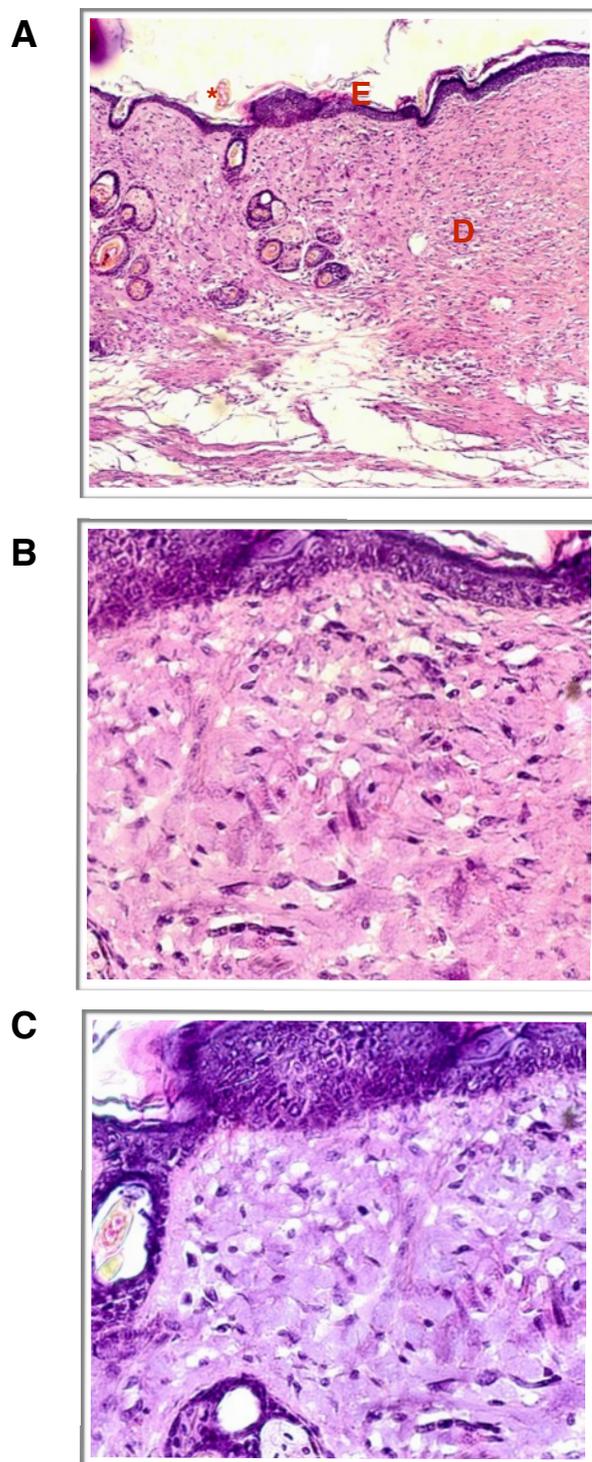
na figura 18B, confirmou que os tratamentos com GH, em ambas as concentrações, foi capaz de aumentar de forma significativa a deposição de colágeno tipo I.

Figura 12. Aspectos morfológicos da fase de remodelamento na pele de camundongos que recebeu PBS.



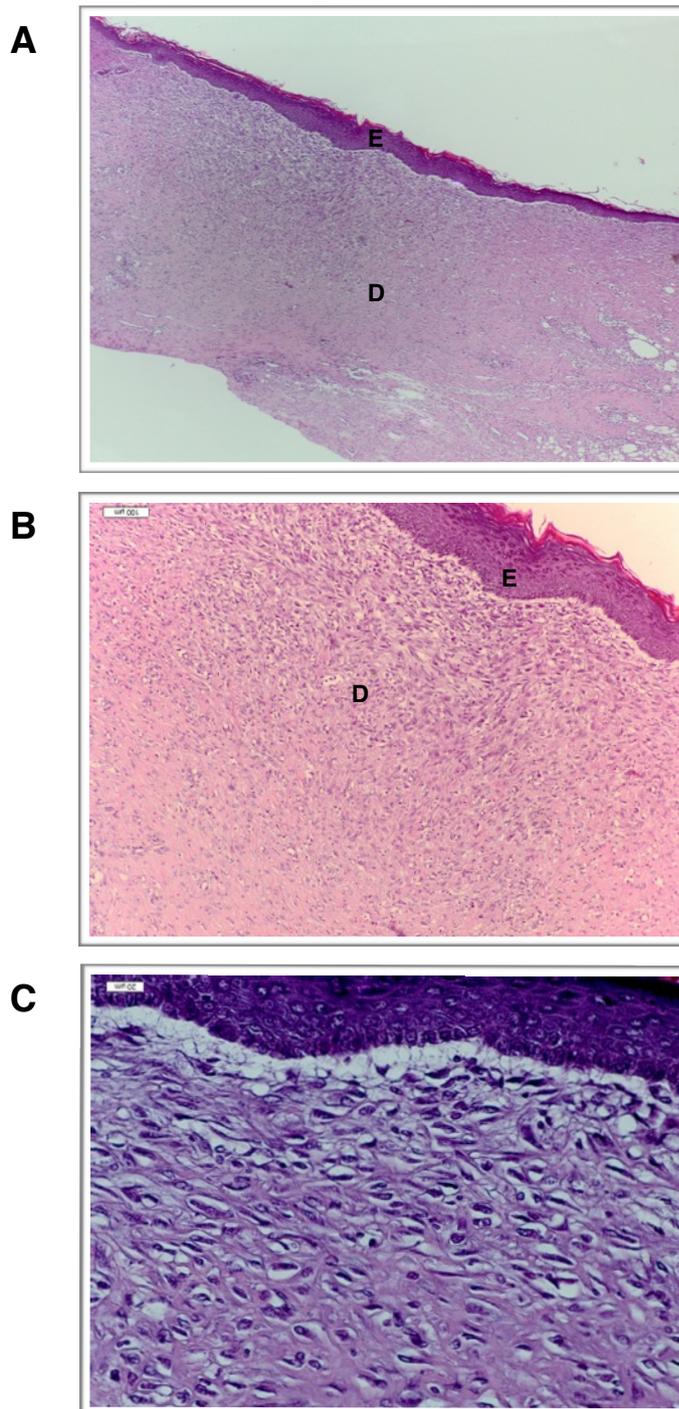
Fotomicrografias representativas dos cortes seriados do tecido de reparação da pele provenientes de animal que recebeu PBS após o 14º dia da injúria e tratamento. As fotomicrografias evidenciam os aspectos gerais da fase de remodelamento. Nota-se, um infiltrado celular intenso na derme e a epiderme apresentando várias estratificações. As fotomicrografias apresentam aumento de 40x, 200x e 400x respectivamente. Coloração H&E. D = derme; E = epiderme

Figura 13 - Efeitos do tratamento tóxico com GH 10^{-8} M na remodelação do reparo tecidual na pele de camundongo.



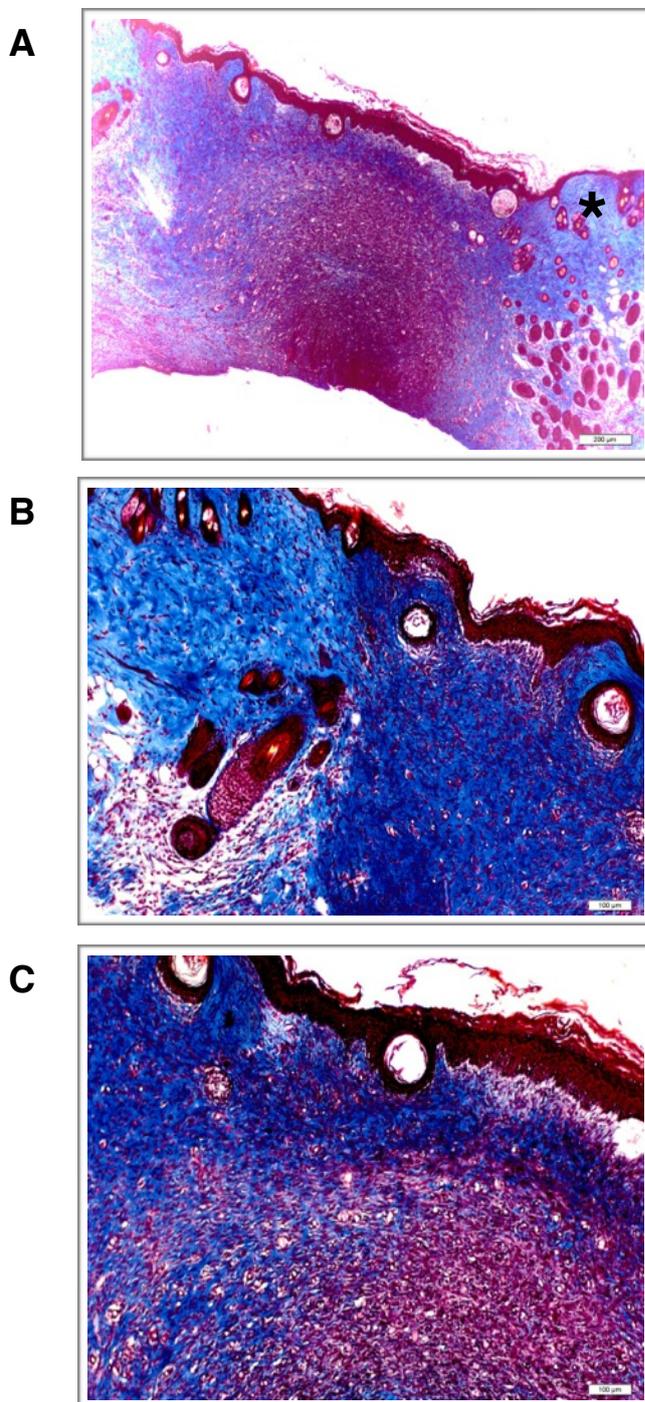
Fotomicrografias representativas dos cortes seriados do tecido de reparação da pele provenientes de animal tratado topicamente com GH na concentração de 10^{-8} M, após o 14º dia de tratamento. As fotomicrografias evidenciam os aspectos gerais da fase de remodelamento. Nota-se, um infiltrado celular muito discreto com algumas figuras de folículos pilosos na derme. A epiderme é formada por um epitélio estratificado muito semelhante ao da epiderme que não sofreu injúria (asterisco). As fotomicrografias apresentam aumento de 40x, 200x e 400x, respectivamente. Coloração H&E. **E** = epiderme; **D** = derme.

Figura 14. Efeitos do tratamento tóxico com GH 10^{-7} M na remodelamento do reparo tecidual na pele de camundongos.



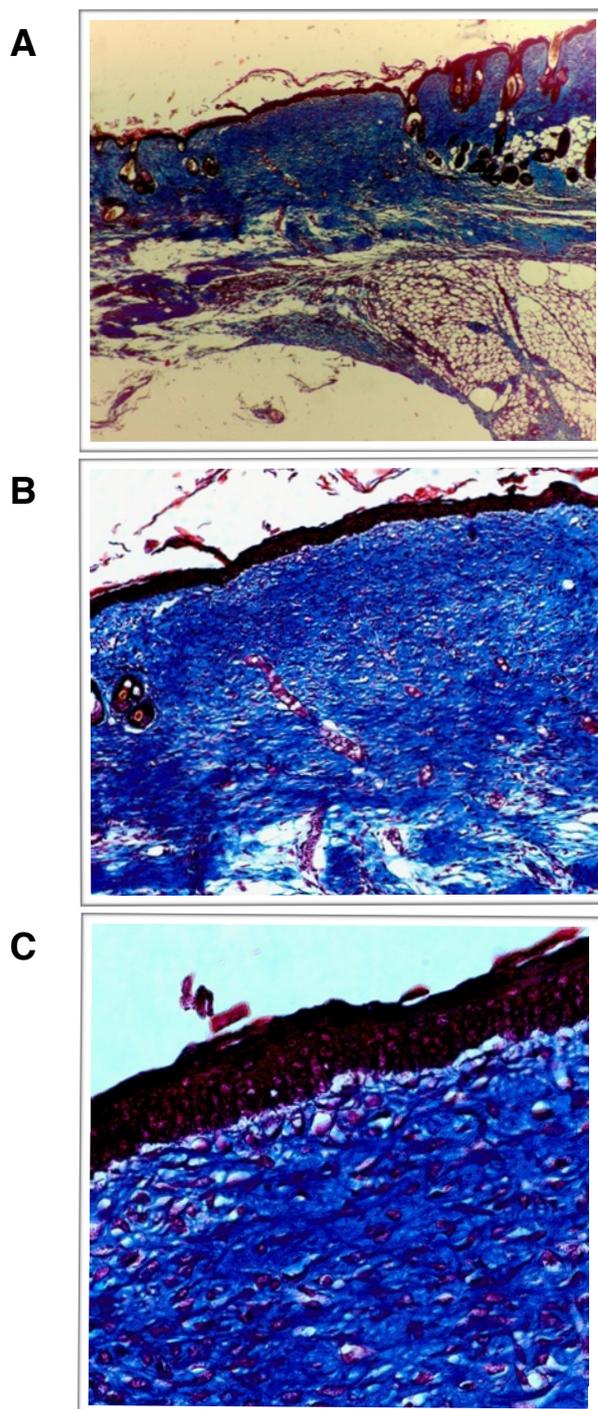
Fotomicrografias representativas dos cortes seriados do tecido de reparação da pele provenientes de animal tratado topicamente com GH na concentração de 10^{-7} M, após o 14º dia de tratamento. As fotomicrografias evidenciam os aspectos gerais da fase de remodelamento. Nota-se, um infiltrado celular moderado na derme. A epiderme é formada por um epitélio um pouco mais estratificado em relação a epiderme que não sofreu injúria. As fotomicrografias apresentam aumento de 40x, 200x e 400x, respectivamente. Coloração H&E. **E** = epiderme; **D** = derme.

Figura 15 - Aspectos da deposição de colágeno na fase de remodelamento na pele de camundongos que recebeu PBS.



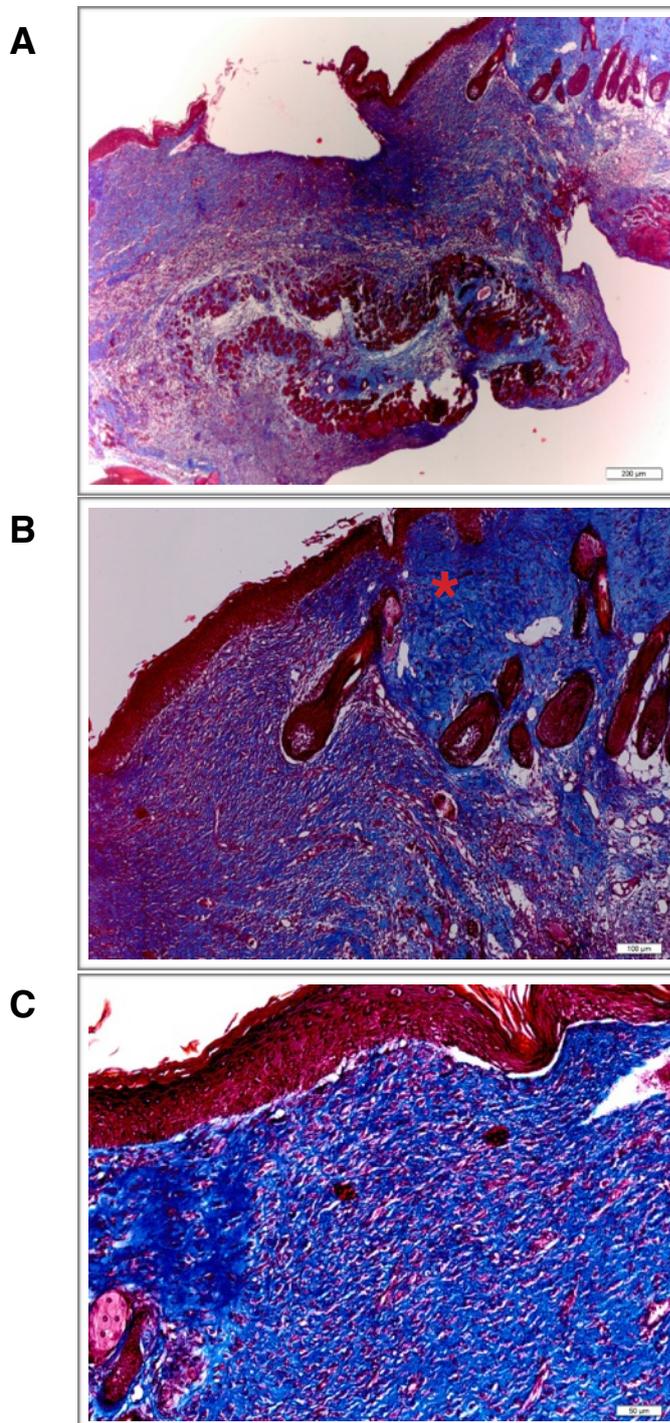
Fotomicrografias representativas dos cortes seriados do tecido de reparação da pele provenientes de animal do grupo que recebeu PBS após o 14^o dia depois da injúria. As fotomicrografias evidenciam a deposição de colágeno total no tecido de granulação. Nota-se, uma deposição de colágeno discreta e restrita apenas as bordas do tecido de reparação. *= fragmento de pele que não sofreu injúria. As fotomicrografias apresentam aumento de 40x, 200x e 400x, respectivamente. Coloração tricrômico de Masson.

Figura 16 - Efeitos do tratamento tóxico com GH 10^{-8} M na deposição de colágeno na fase de remodelamento.



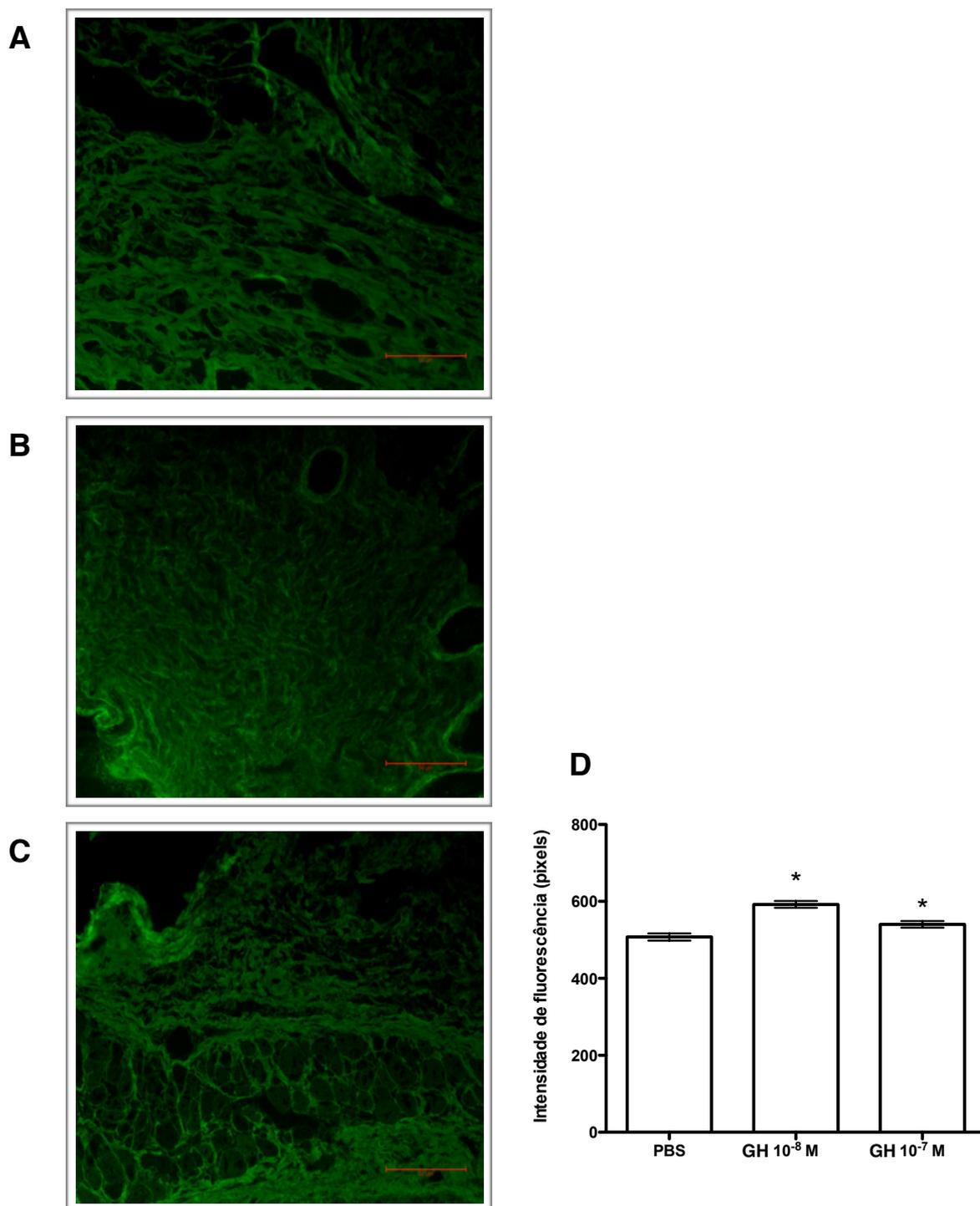
Fotomicrografias representativas dos cortes seriados do tecido de reparação da pele provenientes de animal tratado tópicamente com GH na concentração de 10^{-8} M após o 14^o dia da injúria e tratamento. As fotomicrografias evidenciam a deposição de colágeno total no tecido de granulação. Nota-se, uma deposição de colágeno intensa e difusa por tecido de granulação. As fotomicrografias apresentam aumento de 40x, 200x e 400x, respectivamente. Coloração tricrômio de Masson.

Figura 17 - Efeitos do tratamento tópico com GH 10^{-7} M na deposição de colágeno na fase de remodelamento.



Fotomicrografias representativas dos cortes seriados do tecido de reparação da pele provenientes de animal tratado topicamente com GH na concentração de 10^{-7} M após o 14º dia da injúria e tratamento. As fotomicrografias evidenciam a deposição de colágeno total no tecido de granulação. Nota-se, uma deposição de colágeno moderada e difusa no tecido de granulação. * = fragmento de pele que não sofreu injúria. As fotomicrografias apresentam aumento de 40x, 200x e 400x, respectivamente. Coloração tricrômico de Masson.

Figura 18 - Efeitos do tratamento tópico com GH na deposição de colágeno tipo I na fase de remodelação.



Fotomicrografias de cortes congelados do tecido de reparação da pele provenientes de animal tratados topicamente com PBS (A), GH 10⁻⁸ M (B) e GH 10⁻⁷ M (C), após o 14^o dia da injúria e tratamento que foram submetidos ao ensaio de imunofluorescência. Observa-se que o tratamento com GH aumenta a expressão de colágeno tipo I. As fotomicrografias são visualizadas no aumento de 200x. (D) Gráfico obtido da quantificação em pixels da intensidade de fluorescência dos grupos analisados. Barras representam a média ± EPM da intensidade de fluorescência. A análise estatística foi feita com o teste t. * = p < 0,05 (GH 10⁻⁸ e 10⁻⁷ M vs. PBS).

5.5 O GH promoveu a angiogênese durante a fase de tecido de granulação e remodelamento.

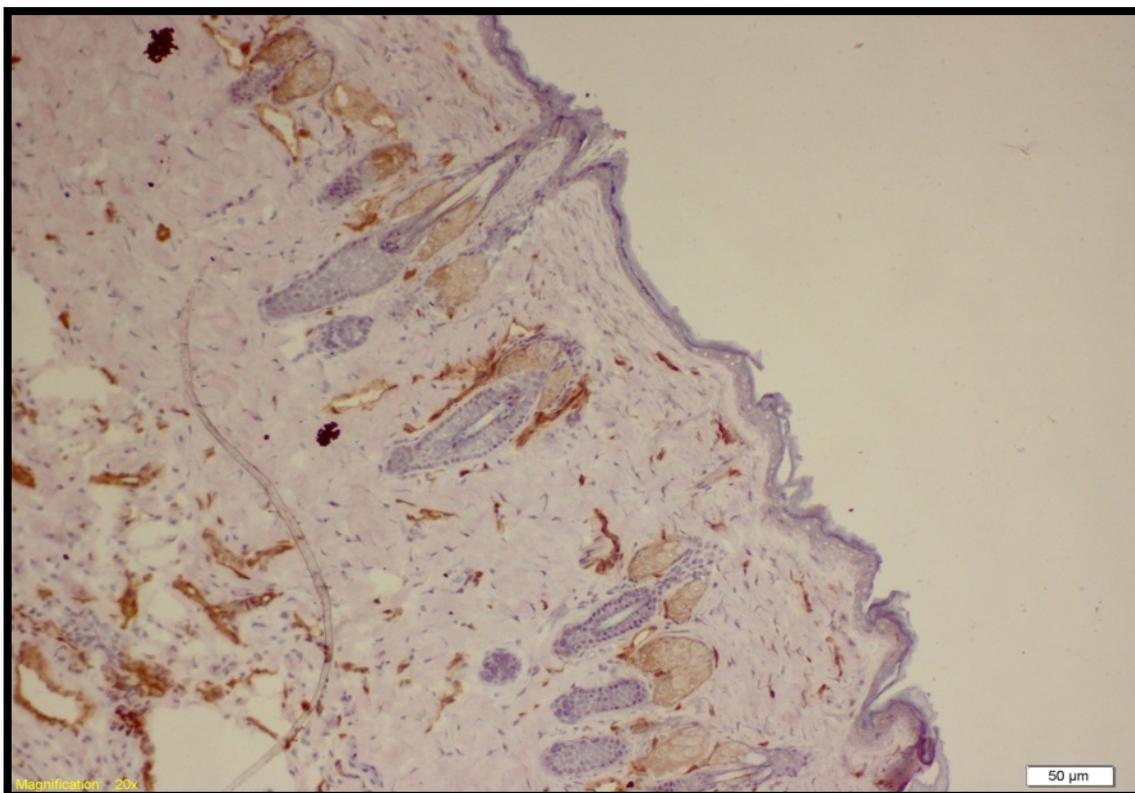
A formação de novos vasos sanguíneos é um processo necessário para manter o ambiente de cicatrização de feridas. São através destas estruturas, que as células e produtos solúveis, chegam até o local da ferida interferindo em suas fases. Neste estudo foi observado que o GH acelerou o recrutamento de células inflamatórias no reparo tissular, bem como, na biologia do fibroblasto (uma célula importante para formação do tecido de granulação). Sabendo-se que estes eventos estão relacionados ao suprimento sanguíneo derivado da rede vascular, analisou-se o efeito tópico do GH na angiogênese no 7º e 14º dia após o tratamento.

Para este propósito, espécimes foram obtidos a partir de amostras congeladas da pele. Fragmentos micrométricos foram expostos ao anticorpo primário específico para a molécula CD31. Um fragmento da pele de um animal que não sofreu injúria, demonstrado na figura 19, foram visualizados os vasos sanguíneos, com coloração acastanhada sobre um fundo discretamente pálido, dispersos por toda a região da derme.

Conforme observado na figura 20, o GH na concentração de 10^{-7} M, após o sétimo dia de tratamento, promoveu um aumento no número de vasos sanguíneos, na região de tecido de granulação quando comparado ao grupo controle. No entanto, neste mesmo período de tratamento, o GH na concentração de 10^{-8} M não foi capaz de alterar o número de vasos quando comparado ao grupo controle.

Além disso, ao final do processo de reparo tecidual, o GH manteve o seu efeito pró-angiogênico, preservando os vasos sanguíneos da região remodelada. Notou-se, portanto, que o tratamento com GH, independente da concentração utilizada, apresentou aumento estatisticamente significante no número de vasos na derme quando comparado ao grupo controle.

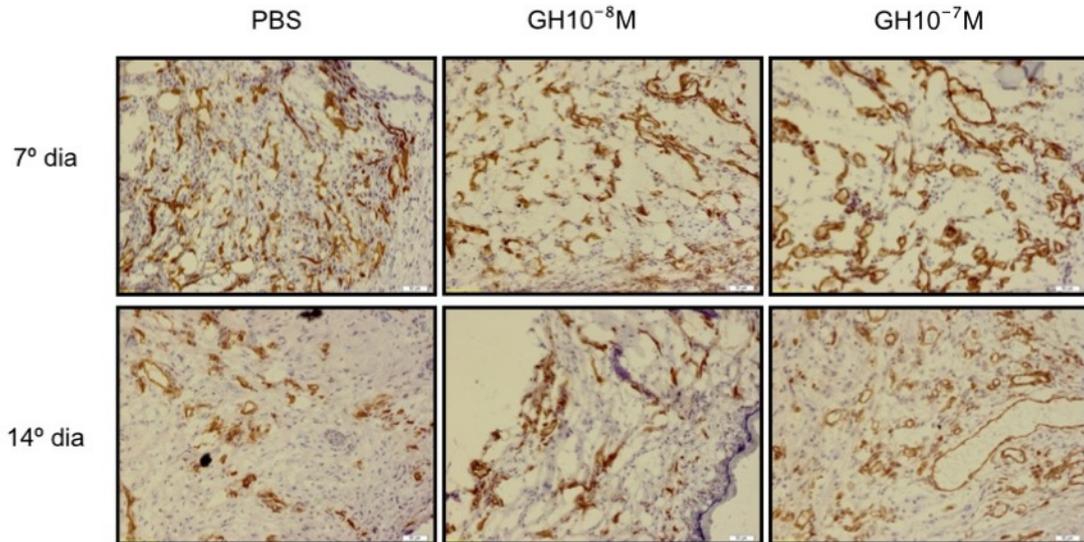
Figura 19 - Aspectos vasculares da pele normal de camundongo.



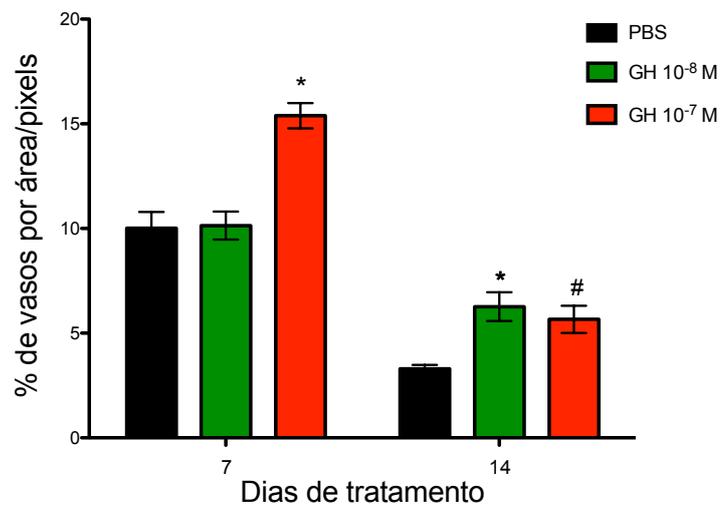
Fotomicrografia obtida após a imunohistoquímica para marcação da molécula CD31 presente no endotélio vascular. Os vasos sanguíneos podem ser visualizados na derme com coloração acastanhada. Aumento de 200x.

Figura 20 - Efeitos do tratamento tópico com GH na vascularização no processo de cicatrização de feridas.

A



B



Em **A**, fotomicrografias representativas do grupo controle e dos animais que foram tratados com GH nas concentrações de 10⁻⁸M e 10⁻⁷M. Foram utilizados espécimes congelados do 7º e 14º dia após a injúria e tratamentos. A imunoperoxidase foi realizada segundo protocolo preconizado pelo próprio fabricante, utilizando o anticorpo primário CD31. Em **B**, gráfico obtido da quantificação em pixels das áreas que sofreram reatividade com o anticorpo. As barras representam a média ± EPM. A análise estatística foi feita com o teste t. *; # equivalem ao valor de p < 0,05. Cada grupo de tratamento foi comparado com o grupo controle (PBS) do período correspondente.

6.0 DISCUSSÃO

O presente estudo evidenciou efeitos positivos do tratamento tópico com GH na cicatrização de feridas cutâneas em camundongos adultos. A cicatrização é dependente de eventos celulares e moleculares complexos: como proliferação e migração celular, apoptose e angiogênese. Estes eventos, dirigidos em grande parte por citocinas e/ou fatores de crescimento levam as células residentes na derme a sofrerem proliferação e a interagirem com outras células da área afetada, resultando na cicatrização tecidual da pele (DORSET - MARTIN, 2004; BEANES et al., 2003).

Inicialmente, mostrou-se que o GH, pelo menos quando administrado por um período de 14 dias, acelerou o processo de fechamento de feridas cutâneas em camundongos. Foi observado, inclusive, que os animais que receberam GH, a partir do 12º dia de tratamento já apresentavam reparo tecidual completo. Esse resultado apontou para um papel fisiológico do GH, colocando-o como um forte candidato no grupo das moléculas que apresentam ações pleiotrópicas em células da pele. Este achado corrobora com investigações anteriores, onde foi demonstrado, após injúria na pele, o processo de cicatrização de feridas utilizando camundongos transgênicos para o GH. Nestes animais, independente do sexo, altos níveis de GH circulante estimulou a reepitelialização e a formação de granulação tecidual (THOREY et al., 2004). Além disso, outro estudo mostrou que a aplicação sistêmica do GH estimulou a formação de tecido de granulação em feridas de ratos mal-nutridos contribuindo para o reparo tecidual (ZAIZEN et al., 1995).

Está bem estabelecido que o GH tem ação anabólica, ao estimular o crescimento tecidual; e metabólica, alterando o fluxo, a oxidação e o metabolismo dos nutrientes na circulação (STROBL & THOMAS, 1994). Sabe-se que o GH é produzido, principalmente, pelas células somatotróficas da adeno-hipófise e na circulação apresenta-se ligado a proteínas transportadoras específicas, denominadas de GHPB (do inglês *growth hormone binding proteins*), e age nas células-alvo através da ligação com seu receptor transmembrana, que é responsável pela ativação quinases intracelulares (MULLER et al., 1999; BAUMANN, 1991). O estudo de Oakes e colaboradores (1992) caracterizou e demonstrou o GHr em fibroblastos e queratinócitos da pele humana. Além deste estudo, outro trabalho tem evidenciado a presença deste receptor em células adiposas, no folículo piloso, em

glândulas sudoríparas e na musculatura esquelética (LOBIE et al., 1990). Baseados nestas evidências científicas, foi sugerindo neste estudo que o GH apresentou um papel direto na função de células da pele, principalmente em fibroblastos e células epidérmicas.

O tratamento tópico com GH acelerou positivamente o recrutamento de células inflamatórias na primeira fase do processo de cicatrização de feridas. Foi visto que no terceiro dia de tratamento, o infiltrado celular imunitário foi mais evidente nos animais tratados com GH quando comparado ao grupo controle. Segundo Inoue e colaboradores (1998) o pré-tratamento dos animais com GH recombinante humano, em um modelo de peritonite, reduziu a contagem de bactérias no leito peritoneal e aumentou o número de neutrófilos exsudativos. Ainda, NAPOLITANO e colaboradores (2002), demonstraram aumento do tecido tímico em todos os pacientes após seis meses de tratamento com GH, e que esta mudança no padrão de atrofia tímica foi acompanhada de um aumento no número de linfócitos T CD4 positivo. Nestes casos, o GH apresentou-se como um imunomodulador capaz de restaurar e/ou estimular a função imunológica. Alterações no sistema imunológico de pacientes com deficiência em GH também foram descritas. Estas alterações incluem redução da atividade das células *natural killer*, da síntese de anticorpos, diminuição do tecido tímico e atraso significativo na rejeição de enxertos de pele (PIERPAOLI et al., 1969; SERRI et al., 1999).

Em conjunto, os resultados listados acima, suportam a hipótese de que o tratamento tópico com GH modula o recrutamento inflamatório e a reorganização da área da ferida, possibilitando assim uma aceleração na fase de limpeza no tecido em formação.

O efeito do GH no recrutamento celular após o 7º dia de tratamento, mostrou que houve um aumento da infiltração celular nos animais tratados com GH em comparação ao grupo controle. Nestes animais, na região de injúria, as células inflamatórias, os fibroblastos e os miofibroblastos ocupam a área da ferida de forma difusa, enquanto que no grupo controle, apenas foi observado essa infiltração nas bordas das feridas analisadas. Este resultado encontrado indica que o GH, direta ou indiretamente, acelerou a migração e o recrutamento de células, como por exemplo, os fibroblastos.

Como já foi mencionado neste estudo, o GH exerce efeitos diversos, diretamente ou através do IGF-1, que é produzido principalmente no fígado em resposta ao GH (GREEN et al., 1985). O IGF- I é mitógeno para os queratinócitos da epiderme (EMING et al., 1996), e além disso, este peptídeo é um importante estimulador da síntese de proteínas de MEC por fibroblastos da derme (KURODA et al., 2001), além de estimular a proliferação destas células (TAVAKKOL et al., 1992). Este compilado de informações, juntamente com os resultados obtidos experimentalmente, admitiu-se que este também pode ser um mecanismo de ação do GH na pele.

No presente estudo, avaliou-se também o efeito do GH na deposição de colágeno durante o processo de reparo tecidual. Este parâmetro foi analisado através da coloração por tricrômico de Masson e por imunofluorescência para expressão de colágeno tipo I. A análise dos espécimes mostrou que o tratamento tópico com GH, independente da concentração utilizada, aumenta a deposição de colágeno total no 7º e 14º após de tratamento. Dados da literatura tem mostrado que a produção de colágeno, na área da ferida, representa um dos fatores mais significativos para a recuperação da derme (FALANGA, 2005; MARTIN, 1997). O colágeno constitui um grupo de proteínas fibrosas encontradas em todos os animais. Estas proteínas são produzidas por células do tecido conjuntivo, bem como por uma variedade de outros tipos celulares. Cada molécula de colágeno é composta por três cadeias polipeptídicas dispostas em tripla hélice, sendo o principal componente da MEC perfazendo aproximadamente 25% da massa proteica total do organismo e de modo geral, estas proteínas se dispõem num padrão ondulado e exibem extensão bastante variada, e têm papel fundamental na arquitetura tecidual (ALBERTS et al., 2010; GARTNER & HIATT, 2007).

A derme intacta é composta predominantemente por colágeno tipo I (80 - 90%) e por colágeno tipo III (10 - 20%). No tecido de granulação, o colágeno tipo III é aumentado 30%, enquanto que no tecido de cicatrização maduro ele é reduzido a 10%. Durante o reparo tissular, a deposição de colágeno tem início por volta do 3º dia, atinge o máximo de deposição em três a seis semanas e entra em fase de remodelação. O colágeno tipo III é inicialmente depositado, sendo substituído por colágeno tipo I à medida que ocorre maturação do tecido cicatricial (WITTE & BARBUL, 1997).

Dados da literatura mostraram que roedores tratados com GH, aumentaram o tecido de granulação, em modelo de injúria na pele (RASMUSSEN et al., 1995). Em outro estudo, foi observado que o GHRH, além de sua ação hipofisária em estimular a secreção do GH apresentou um papel importante na fisiologia do reparo tecidual. Foi demonstrado in vivo, que o tratamento tópico com este peptídeo estimulou a proliferação de fibroblastos, elevando o número destas células em até 80% quando comparado ao grupo controle. Além disso, foi observado que o tratamento com GHRH acelerou o fechamento da epiderme, estimou a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e modulou positivamente a deposição de colágeno (DIOUFA et al., 2010).

Uma característica notável que surge com o tecido de granulação é a formação de novos vasos sanguíneos. Foi observado que em 7 dias de tratamento, o GH estimulou a formação de capilares e este efeito persistiu até a segunda semana de tratamento. Este pode ser um efeito direto do GH, pois foi descrito que este hormônio é um indutor da angiogênese (THOREY et al., 2004).

A migração celular é essencial em muitos processos fisiológicos, tais como na angiogênese e na cicatrização de feridas. Em particular, a angiogênese que envolve uma complexa interação entre células endoteliais e o microambiente. Sob a ação dos estímulos angiogênicos, as células endoteliais a partir de vasos pré-existentes, migram e proliferam para iniciarem o brotamento capilar, posteriormente se diferenciam, assumem a forma tubular e durante o estado de maturação formam uma nova lâmina basal. Os tubos microvasculares se unem por anastomose e originam a cadeia circulatória funcional (MENDONÇA et al., 2009; RISAU, 1997).

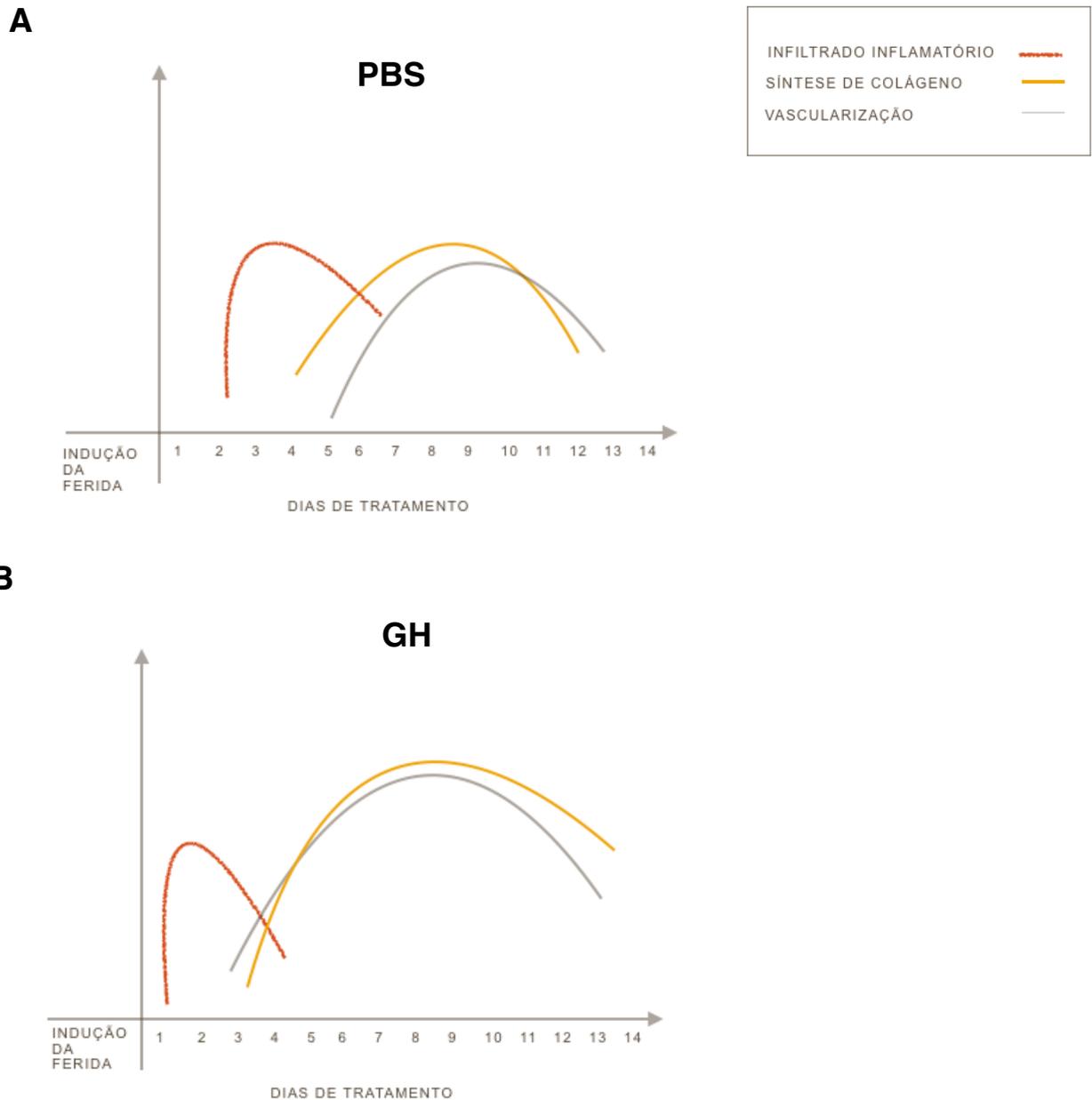
As células endoteliais expressam o receptor para o GH (THUM et al., 2007), e Silha e colaboradores (2005) demonstraram o envolvimento deste hormônio na função endotelial, principalmente no que se refere à produção de moduladores do crescimento tecidual, fatores de crescimento angiogênico e mudanças na morfologia dos vasos sanguíneos. Além disso, Corbacho e colaboradores (2002) mostraram que o GH pode estimular ou inibir vários estágios da formação ou remodelação de novos vasos sanguíneos, incluindo a proliferação de células endoteliais, a migração celular, a produção de proteases e apoptose. Animais transgênicos para o GH apresentaram aumento de vasos sanguíneos no reparo tecidual (THOREY et al.,

2004). Dessa forma, pode-se sugerir que neste estudo o tratamento tópico com GH modulou a atividade das células endoteliais, estimulando a angiogênese.

Os resultados apresentados neste estudo, representados na figura 21, permitem considerar que o GH atuou no mecanismo fisiológico do reparo tecidual. Em síntese, foi visto que o GH acelera o recrutamento inflamatório na área da injúria. Este efeito foi importante, pois contribuiu para antecipar a deposição de MEC no tecido de granulação. Além disso, foi observado que nos animais tratados com o hormônio ocorreu um aumento no número de vasos sanguíneos. Esses efeitos, imprescindíveis para que ocorra a cicatrização de feridas, foram observados após o tratamento tópico.

No que se refere ao método de administração do GH para se avaliar a dinâmica do reparo tissular, os estudos referem sua utilização de maneira sistêmica (STEENFOS & JANSSON, 1992; GILPIN et al., 1994; LAL et al., 2000), ou através de animais transgênicos, ou ainda, em um modelo que simula a acromegalia (THOREY et al., 2004). Há quase três décadas, vários trabalhos vêm relatando os diversos efeitos colaterais em consequência dos elevados níveis circulante de GH/IGF-1 (ITUARTE et al., 1984; BRUNNER et al., 1990). Foi relatado, inclusive, que pacientes com acromegalia, situação em que o IGF-1 permanece elevado, deve ser considerada como um risco, particularmente elevado, para o desenvolvimento de neoplasia (JENKINS et al., 2000). Além disso, foi demonstrado que a ação estrogênica na progressão do câncer de mama está intimamente ligado ao eixo GH/IGF-1 (FELICE et al., 2013). Os autores demonstram que o GH pode ter efeito importante em células cancerosas, no que se refere a proliferação celular, e que este efeito não parece está relacionado a mudanças nos níveis de IGF-1 e de seu receptor. Até o momento, não foram encontradas evidências de estudos que utilizaram o GH com este método de aplicação. Dessa forma, demonstrou-se, aqui, pela primeira vez, que o GH quando administrado topicamente acelera a cicatrização de feridas na pele de camundongos.

Figura 21 - Representação esquemática do efeito do tratamento tópico com hormônio do crescimento.



Representação esquemática gerada com os resultados obtidos a partir de um estudo experimental utilizando camundongos tratados topicamente com GH. Resumidamente, os animais sofreram uma injúria na pele e foram tratados diariamente com GH ou veículo (PBS) por até 14 dias. Foi observado que o GH, quando administrado topicamente, antecipou o recrutamento inflamatório nos primeiros dias do processo de cicatrização. Esse efeito, influenciou no adiantamento da deposição de colágeno, no leito da ferida. Além disso, também foi observado que o GH aumenta o número de vasos sanguíneos na região de injúria em todos os tempos analisados, contribuindo para uma melhor troca de gases e entrega de nutrientes, fatores de crescimento e citocinas.

7.0 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho sustentam a hipótese de que o tratamento com GH possui efeitos importantes na fisiologia da pele. Em conclusão, os achados demonstram que o tratamento tópico com GH:

- A) Acelera o fechamento de feridas cutâneas em camundongos;
- B) Atua no recrutamento inflamatório, antecipando a fase inflamatória do reparo tecidual;
- C) Atua em queratinócitos e fibroblastos, acelerando a reepitelialização e a deposição de colágeno ;
- D) Estimula a angiogênese durante a formação do tecido de granulação e remodelação tecidual.

Para maior compreensão dos resultados aqui apresentados e buscando aprofundar o conhecimento sobre os efeitos tópicos do GH no reparo tecidual, pretende-se dar continuidade a este estudo com a avaliação dos mecanismos moleculares sob influência deste hormônio.

8.0 REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. *Biologia molecular da célula*. Porto Alegre: **Artmed**. 2010.
- ARTWOHL M. et al. Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells. **Int J Obes Relat Metab Disord**. Apr;26(4):577-80, 2002.
- BAUMANN, G. Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. **Endocrinol. Rev.**, v.12, p.424-449, 1991.
- BEANES SR. et al. Skin repair and scar formation: the central role of TGF-beta. **Expert Rev Mol Med**. Mar 21;5(8):1-22, 2003.
- BICKERS DR, ATHAR M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. **J Invest Dermatol**. 126(12):2565-75. 2006.
- BLOCH W. et al. The angiogenesis inhibitor endostatin impairs blood vessel maturation during wound healing. **FASEB J**. Dec;14(15):2373-6, 2000.
- BOS JD & LUITEN RM. Skin immune system. **Cancer Treat Res**. 146:45-62, 2009.
- BREVETTI G. et al. Early vascular alterations in acromegaly. **J Clin Endocrinol Metab**. Jul;87(7):3174-9, 2002.
- BRIGGAMAN RA. Epidermal-dermal interactions in adult skin. **J Invest Dermatol**. Jul;79 Suppl 1:21s-24s, 1982.
- BRINCAT MP, BARON YM, GALEA R. Estrogens and the skin. **Climacteric**. Jun; 8(2):110-23, 2005.
- BRUNET-DUNAND SE. et al. Autocrine human growth hormone promotes tumor angiogenesis in mammary carcinoma. **Endocrinology**. Mar;150(3):1341-52, 2009.
- BRUNNER et al. Colon cancer and polyps in acromegaly: increased risk associated with family history of colon cancer. **Clin Endocrinol (Oxf)**. Jan;32(1): 65-71. 1990.
- CHRISTOPHERSON K & HROMAS R. Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. **Stem Cells**. 19(5):388-96, 2001.

CLARK RA et al. Fibronectin is produced by blood vessels in response to injury. **J Exp Med.** Aug 1;156(2):646-51, 1982.

COHEN JJ. Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. **Hosp Pract.** Dec 15;28(12):35-43, 1993.

CORBACHO AM, MARTÍNEZ EG, CLAPP C. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. **J Endocrinol** 173: 219-238, 2002.

DEMIDOVA-RICE TN, HAMBLIN MR, HERMAN IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. **Adv Skin Wound Care.** Jul;25(7):304-14, 2012.

DESMOULIÈRE A. et al. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. **Am J Pathol.** Jan;146(1): 56-66 1995.

DIOUFA N. et al. Acceleration of wound healing by growth hormone-releasing hormone and its agonists. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 107(43):18611-5. 2010.

DORSETT-MARTIN WA. Rat models of skin wound healing: a review. **Wound Repair Regen.** 12(6):591-9, 2004.

DUNAISKI V & BELFORD DA. Contribution of circulating IGF-I to wound repair in GH-treated rats. **Growth Horm IGF Res.** Dec;12(6):381-7, 2002.

EMING SA, KRIEG T, DAVIDSON JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **J Invest Dermatol.** Mar;127(3):514-25, 2007.

EMING SA. et al. Targeted expression of insulin-like growth factor to human keratinocytes: modification of the autocrine control of keratinocyte proliferation. **J Invest Dermatol.** Jul;107(1):113-20, 1996.

EZZAT S & MELMED S. Clinical review 18: Are patients with acromegaly at increased risk for neoplasia? **J Clin Endocrinol Metab.** Feb;72(2):245-9, 1991.

FALANGA V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. **Lancet.** Nov 12;366(9498):1736-43, 2005.

FELICE et al. Growth hormone potentiates 17β -estradiol-dependent breast cancer cell proliferation independently of IGF-I receptor signaling. **Endocrinology**. 154(9):3219-27. 2013.

FERRARA N, GERBER HP, LECOUTER J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**. Jun;9(6):669-76, 2003.

FERRARA N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. **Am J Physiol Cell Physiol**. Jun;280(6):C1358-66, 2001.

GARTNER & HIATT. Tratado de histologia. Edição, 3. **Guanabara- Koogan**, 2007.

GILPIN et al. Recombinant human growth hormone accelerates wound healing in children with large cutaneous burns. **Ann Surg**. 220(1):19-24. 1994.

GOLDE DW, BERSCH N, LI CH. Growth hormone: species-specific stimulation of erythropoiesis in vitro. **Science**. Jun 3;196(4294):1112-3, 1997.

GOREN I, PFEILSCHIFTER J, FRANK S. Determination of leptin signaling pathways in human and murine keratinocytes. **Biochem Biophys Res Commun**. Apr 18;303(4):1080-5, 2003.

GREEN H, MORIKAWA M, NIXON T. A dual effector theory of growth-hormone action. **Differentiation**. 29(3):195-8, 1985.

HATTORI N: Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. **Growth Horm IGF Res**. 19 (3): 187–197. 2009.

HOLICK MF. Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. **Am J Clin Nutr**. Mar;61(3 Suppl):638S-645S, 1995.

INOUE et al. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on opsonin receptor expression on local and systemic phagocytes in a lethal peritonitis model. **Crit Care Med**. 26 (2): 338-343, 1998.

ITUARTE EA, PETRINI J, HERSHMAN JM. Acromegaly and colon cancer. **Ann Intern Med**. 101(5):627-8. 1984

JEAY S. Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: new insights into signaling pathways. **Mol Cell Endocrinol.**188: 1-7, 2002.

JENKINS et al. Insulin-like growth factor I and the development of colorectal neoplasia in acromegaly. **J Clin Endocrinol Metab.** 85(9):3218-21. 2000

JENSEM, PROKSCH. The skin's barrier. **G Ital Dermatol Venereol.** 144(6): 689-700, 2009.

JUNQUEIRA & CARNEIRO. Histologia Básica. Ed., 12. **Guanabara- Koogan,** 2013.

KIRCHNER LM et al. Effects of vascular endothelial growth factor on wound closure rates in the genetically diabetic mouse model. **Wound Repair Regen.** Mar-Apr;11(2):127-31, 2003.

KOPCHICK JJ, ANDRY JM: Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. **Mol Genet Metab;** 71 (1-2): 293-314. 2000.

KULIDJIAN AA, INMAN R, ISSEKUTZ TB. Rodent models of lymphocyte migration. **Semin Immunol.** Apr;11(2):85-93, 1999.

KURODA K. et al. Up-regulation of putative hyaluronan synthase mRNA by basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor-1 in human skin fibroblasts. **J Dermatol Sci.** Jun;26(2):156-60, 2001.

LAL SO, WOLF SE, HERNDON DN. Growth hormone, burns and tissue healing. **Growth Horm IGF Res.** Apr;10 Suppl B:S39-43, 2000.

LEE SW et al. The effect of growth hormone on fibroblast proliferation and keratinocyte migration. **J Plast Reconstr Aesthet Surg.** Apr;63(4):e364-9, 2010.

LOBIE PE. et al. Cellular localization of the growth hormone binding protein in the rat. **Endocrinology.** May;130(5):3057-65, 1992.

LOBIE PE. et al. Localization of the growth hormone receptor/binding protein in skin. **J Endocrinol.** Sep;126(3):467-71, 1990.

LOSADA F. et al. Effects of human recombinant growth hormone on donor-site healing in burned adults.**World J Surg.** Jan;26(1):2-8, 2001.

MADISON. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. **J Invest Dermatol.** 121(2):231-41. 2003.

MARTIN P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. **Science.** Apr 4;276(5309):75-81, 1997.

MATSUOKA LY. et al. Histochemical characterization of the cutaneous involvement of acromegaly. **Arch Intern Med.** Oct;142(10):1820-3, 1982.

MENDONÇA RJ, COUTINHO-NETTO J. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol.** 84(3): 257-62, 2009.

MERCHAV S, TATARSKY I, HOCHBERG Z. Enhancement of human granulopoiesis in vitro by biosynthetic insulin-like growth factor I/somatomedin C and human growth hormone. **J Clin Invest.** Mar;81(3):791-7, 1988.

MILJIC D. et al. Growth hormone replacement normalizes impaired fibrinolysis: New insights into endothelial dysfunction in patients with hypopituitarism and growth hormone deficiency. **Growth Horm IGF Res.** Dec;23(6):243-8, 2013.

MILTONE LM. Effector functions of epidermal keratinocytes. **Ann N Y Acad Sci.** 548:1-3, 1988.

MULLER EE, LOCATELLI V, COCCHI D. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. **Physiol Rev.** 79(2):511-607, 1999.

NAPOLITANO LA. et al. Growth hormone enhances thymic function in HIV-1-infected adults. **J Clin Invest.** 118 (3): 1085-1098, 2008.

NAPOLITANO LA. et al. Increased thymic mass and circulating naive CD4 T cells in HIV-1-infected adults treated with growth hormone. **AIDS.** 16 (8): 1103-1111, 2002.

OAKES SR. et al. Demonstration and localization of growth hormone receptor in human skin and skin fibroblasts. **J Clin Endocrinol Metab.** Nov;75(5):1368-73, 1992.

PIERCE GF. et al. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. **J Cell Biochem.** Apr;45(4):319-26, 1991.

PIERPAOLI W et al. Reconstruction of antibody production in hormonally deficient mice by somatotrophic hormone, thyrotropic hormone and thyroxin. **Immunology**. 16:217–230, 1969.

PINTUCCI G. et al. Angiogenesis and the fibrinolytic system. **Semin Thromb Hemost.** 22(6):517-24, 1996.

RAINE-FENNING NJ, BRINCAT MO, MUSCAT-BARONY. Skin aging and menopause: implications for treatment. **Am J Clin Dermatol**. 4(6):371-8. 2003.

RAMOS FWS: Efeitos do hormônio do crescimento sobre as células endoteliais tímica. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Alagoas, 2008.

RASMUSSEN LH. et al. Dose response profiles of human growth hormone in subcutaneous wound chambers in rats. **Eur J Surg**. Mar;161(3):157-62, 1995.

RISAU W. Mechanism of angiogenesis. **Nature**. 386:671–674, 1997.

ROCKEY DC, WEYMOUTH N, SHI Z. Smooth Muscle α Actin (Acta2) and Myofibroblast Function during Hepatic Wound Healing. **PLoS One**. Oct 29;8(10):e77166, 2013.

ROSENFELD RG, HWA V: The Growth Hormone Cascade and Its Role in Mammalian. **Growth. Horm Res.**71 (suppl 2): 36–40. 2009.

RUDMAN SM. et al. The role of IGF-I in human skin and its appendages: morphogen as well as mitogen? **J Invest Dermatol**. Dec;109(6):770-7, 1997.

RUSHTON I. Understanding the role of proteases and pH in wound healing. **Nurs Stand**. Apr 18-24;21(32):68, 70, 72, 2007.

RYMASZEWSKI Z, COHEN RM, CHOMCZYNSKI P. Human growth hormone stimulates proliferation of human retinal microvascular endothelial cells in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 88(2):617-21, 1991.

SAVINO W. et al. Growth hormone modulates migration of thymocytes and peripheral T cells. **Ann N Y Acad Sci**. Jul;1261:49-54, 2012.

SERRI O. et al. Alterations of monocyte function in patients with growth hormone (GH) deficiency: effect of substitutive GH therapy. **J Clin Endocrinol Metab**. Jan;84(1):58-63, 1999.

SHAW TJ & MARTIN P. Wound repair at a glance. **J Cell Sci.** Sep 15;122(Pt 18):3209-13, 2009.

SILHA JV. et al. The effects of growth hormone status on circulating levels of vascular growth factors. **Clin Endocrinol.** 63 (1): 79-86, 2005.

SINGER AJ & CLARK RA. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med.** Sep 2;341(10):738-46, 1999.

SLOMINSKI A. Characterization of corticotropin-releasing hormone (CRH) in human skin. **Clin Endocrinol Metab.** Mar;83(3):1020-4, 1998.

SLOMINSKI A. et al. Human skin expresses growth hormone but not the prolactin gene. **J Lab Clin Med.** Dec;136(6):476-81, 2000.

SMANIOTTO et al. Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. **Endocrinology.** 146 (7): 3005-3017, 2005.

SMANIOTTO S. et al. Combined role of extracellular matrix and chemokines on peripheral lymphocyte migration in growth hormone transgenic mice. **Brain Behav Immun.** Mar;24(3):451-6, 2010.

SMANIOTTO S. et al. Growth hormone is a modulator of lymphocyte migration. **Neuroimmunomodulation.** 18(5):309-13, 2011.

STEENFOS HH & JANSSON JO. Growth hormone stimulates granulation tissue formation and insulin-like growth factor-I gene expression in wound chambers in the rat. **J Endocrinol.** Feb;132(2):293-8, 1992.

STROBL, J. S. & THOMAS, M. J. Human growth hormone. **Pharmacol. Rev.**, v. 46, p.1-34, 1994.

TAVAKKOL A. et al. Expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and IGF-1 receptor mRNA and proteins in human skin. **J Invest Dermatol.** Sep;99(3):343-9, 1992.

THIBOUTOT DM. Clinical review 74: Dermatological manifestations of endocrine disorders. **J Clin Endocrinol Metab.** Oct;80(10):3082-7, 1995.

THOREY IS. et al. Transgenic mice reveal novel activities of growth hormone in wound repair, angiogenesis, and myofibroblast differentiation. **J Biol Chem.** Jun 18;279 (25):26674-84, 2004.

THUM T. et al. Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1. **Circ Res.** Feb 16;100(3):434-43, 2007.

WELNIAK LA; Sun R; Murphy WJ. The role of growth hormone in T-cell development and reconstitution. **J Leuk Biol.** 71 (3): 381-387, 2002.

WITTE, BARBUL. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am.* 77(3):509-28, 1997.

WU H, DEVI R, MALARKEY WB. Localization of growth hormone messenger ribonucleic acid in the human immune system--a Clinical Research Center study. **J Clin Endocrinol Metab.** Mar;81(3):1278-82, 1996.

ZAIZEN Y. et al. Growth hormone effects on wound healing in malnourished animals: a histological study. **Eur J Pediatr Surg.** Aug;5(4):226-30. 1995.

ZOUBOULIS C et al. Corticotropin-releasing hormone: an an autocrine that promotes lipogenesis in human sebocytes. **Proc Natl Acad Sci USA.** 14; 99 (10):7148-53, 2002.