



Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS

Maria Danielma dos Santos Reis

**Papel funcional do hormônio do crescimento sobre
macrófagos peritoneais de camundongos**

Maceió – Alagoas

2011

MARIA DANIELMA DOS SANTOS REIS

**Papel funcional do hormônio do crescimento sobre
macrófagos peritoneais de camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientadora: Profª Drª Salete Smaniotto

Maceió – Alagoas

2011

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Helena Cristina Pimentel do Vale

R375p Reis, Maria Danielma dos Santos.
Papel funcional do hormônio do crescimento sobre macrófagos peritoneais de camundongos / Maria Danielma dos Santos Reis. – 2011.
75 f.

Orientadora: Salete Smaniotto.
Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2011.

Bibliografia: f. 66-75.

1. Macrófagos – Estudo experimental. 2. Migração celular. 3. Hormônio do crescimento. 4. Fagocitose. I. Título.

CDU: 577.175.3



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

Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna Maria Danielma dos Santos Reis, intitulado: "O papel funcional do hormônio do crescimento sobre macrófagos", orientada pela Profa. Dra. Salete Smaniotto, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 15 de março de 2011.

Os membros da Banca Examinadora, consideraram a candidata APROVADA

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Robson Coutinho Silva - (IBCCF/UFRJ)



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



Profa. Dra. Silvana Ayres Martins – (ICBS – UFAL)

Dedico este trabalho a meus pais, Maria Sônia e José Cícero dos Reis, e à minha querida irmã, Maria Danielle Reis, por me ensinar que os nossos sonhos podem se tornar reais quando nós trabalhamos para isso. Por apoiarem a minha escolha de seguir a carreira acadêmica, mesmo depois de longas discussões, sempre me aconselhando da melhor forma. Sempre serão meus ídolos. Sei da dedicação de vocês para que eu realizasse mais esse sonho. Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

A toda minha grande família por compartilhar comigo as alegrias, tristezas, angústias, derrotas e vitórias, pelo apoio incondicional, pela amizade, carinho e torcida. Vocês são o suporte e a força que me faz seguir em frente.

Aos meus queridos, inesquecíveis e para sempre amigos: Ana Rúbia, Adélia Carla, Clarissa França, Inaura Patrícia, Larissa Vila Nova, Maíra Estanislau, Raíssa Cavalcante, Pedro de Moraes, Pollyane Souto, Paula Walleska, Plácido Fabrício, Sandra Hiromi, Victor Xavier, Washington Soares, William Fernandes e Wagner Soriano. Obrigada pela amizade, carinho e atenção durante todo esse tempo. E aos meus novos e eternamente amigos e parceiros de laboratório: Altair Rogério, Iana Mayane e Larissa Fernanda, pelo auxílio durante os ensaios experimentais e além disso, pela grande amizade e apreço. Vocês são como uma segunda família, que me permiti escolher, com quem vivi muitos momentos felizes e inesquecíveis. Aprendi (e ainda aprendo) muito com vocês e sempre estarão presentes na minha vida, pois em meu coração guardo uma pequena parte de cada um de vocês.

À Prof^a Dr^a Salete Smaniotto, que durante esses anos se tornou muito mais que uma orientadora, é uma amiga por quem tenho muito carinho, respeito e admiração. Agradeço por ter me confiado a execução desse projeto e pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, além de sua compreensão, atenção e o carinho durante esses anos de convivência.

À mestre Juliane Pereira pelo apoio técnico durante os ensaios com citometria de fluxo como também pelo carinho e torcida.

A todos que fazem o Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas – ICBS/UFAL, pelo companheirismo e amizade, pela colaboração durante os experimentos e na discussão dos resultados. Ao Prof. Dr. Emiliano Barreto e à Prof^a Dr^a Silvana Martins pelo apoio durante o desenvolvimento do estudo.

Às funcionárias do Setor de Histologia e Embriologia do ICBS/UFAL, Delma Paz e Fátima Maia que me acompanharam desde a minha iniciação científica sempre muito disponíveis e a quem muitas vezes busquei o auxílio durante as tarefas do laboratório. Obrigada também pelas conversas, amizade e torcida. Também agradeço à Prof^a Dr^a Leonora Tavares Bastos pela amizade e carinho.

Aos meus companheiros de turma pela amizade, atenção e companheirismo empreendidos nesses anos de convivência.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por ter proporcionado a realização desse projeto. Em especial, agradeço à secretária Melânia Ferreira pela atenção e carinho nesses dois anos de curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Alagoas (FAPEAL), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Estudos mostram que o hormônio do crescimento (GH) é um polipeptídeo com propriedades imunomoduladoras. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos *in vivo* e *in vitro* do GH sobre macrófagos, utilizando culturas de macrófagos peritoneais residentes obtidos de camundongos *swiss*. Inicialmente, através da análise microscópica foram observadas alterações na morfologia dos macrófagos em cultura, tratados com GH, nas concentrações de 20 e 200 ng/mL, pelos períodos de 12 e 24 horas, quando comparado às células não-tratadas. A presença de ligantes de moléculas da matriz extracelular em macrófagos foi analisada por imunocitoquímica, em que se evidenciou um aumento na deposição de fibronectina e laminina quando as células foram tratadas com GH nas concentrações de 20 e 200 ng/mL, nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Por citofluorimetria, observou-se que o tratamento com GH (200 ng/mL), por 6 e 24 horas alterou a expressão das integrinas Mac-1 e VLA-6 na superfície dos macrófagos. Além disso, o tratamento com GH, nesta mesma concentração, pelo período de 6 horas, foi capaz de diminuir a adesão de macrófagos à laminina. No ensaio de migração *in vitro*, o tratamento com GH (200 ng/mL), apresentou efeitos opostos nos diferentes tempos de tratamento, aumentando o número de células migrantes após 6 horas e diminuindo o número de macrófagos migrantes após 12 horas de tratamento. Demonstrou-se ainda, que o tratamento *in vitro* com GH, em ambas as concentrações, não modulou a atividade fagocítica dos macrófagos, contudo macrófagos peritoneais obtidos de animais tratados com GH nas doses de 20 e 200 µg/kg, por um período de 7 dias, apresentaram uma maior porcentagem de fagocitose e uma maior capacidade fagocítica quando comparados aos macrófagos de animais do grupo controle. De uma forma geral, os resultados apresentados reforçam os dados já constantes na literatura de que o GH pode agir na resposta imune como um ativador de macrófagos.

Palavras – chave: Macrófagos. Hormônio do crescimento. Migração celular. Fagocitose.

ABSTRACT

Studies have shown that growth hormone (GH) is a polypeptide with immunomodulatory properties. Herein, studies were performed to determine *in vivo* and *in vitro* effects of GH on macrophage by using cultures of resident peritoneal macrophages from swiss mice. The microscopical analyses revealed alterations in the macrophage morphology after GH treatment with 20 and 200 ng/mL for 12 and 24 hours. It was also observed that GH-treated macrophages have an increase in fibronectin and laminin deposition evaluated by indirect immunocytochemistry. By using flow cytometry, it was shown that GH-treatment (200 ng/mL) for 6 and 24 hours altered the Mac-1 and VLA-6 integrins expression on macrophage surface. Moreover, the same GH concentration, during 6 hours of treatment, was able to decrease macrophage adhesion to laminin. In the *in vitro* migration assays, the GH-treated cells (200 ng/mL) showed opposite effects depending on the treatment time, after 6 hours, there was an increase in migrating cells whereas after 12 hours there was a decrease in cell migration. The *in vitro* GH treatment did not influence the phagocytic activity of macrophages but when the GH treatment was performed *in vivo*, for 7 consecutive days, the peritoneal macrophages from GH-treated mice (20 and 200 µg/kg) showed a higher percentage of phagocytosis and also a higher phagocytic capacity than cells from control animals. Taken together, these results reinforce the literature data which show that GH can act as a macrophage activating-factor in the immune response.

Key words: Macrophages. Growth hormone. Cell migration. Phagocytosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Representação esquemática das interações entre os sistemas nervoso, imunológico e endócrino.....	20
Figura 2	- Desenho esquemático da diferenciação de macrófagos ao longo do desenvolvimento	27
Figura 3	- Macrófagos peritoneais residentes após estimulação da fagocitose por zimosan	39
Figura 4	- Aspectos morfológicos de macrófagos peritoneais residentes	41
Figura 5	- Deposição de laminina por macrófagos peritoneais residentes	43
Figura 6	- Deposição de fibronectina por macrófagos peritoneais residentes	44
Figura 7	- Intensidade da fluorescência para as integrinas expressas na superfície de macrófagos peritoneais tratados com GH por 6 horas	47
Figura 8	- Intensidade da fluorescência para as integrinas expressas na superfície de macrófagos peritoneais tratados com GH por 12 horas.	48
Figura 9	- Intensidade da fluorescência para as integrinas expressas na superfície de macrófagos peritoneais tratados com GH por 24 horas	49
Figura 10	- Adesão <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneais tratados com GH.....	51
Figura 11	- Migração <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneais residentes tratados com GH.....	53
Figura 12	- Atividade fagocítica de macrófagos peritoneais tratados <i>in vitro</i> com GH.....	54

Figura 13 - Atividade fagocítica de macrófagos peritoneais após tratamento *in vivo* com
GH 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Expressão de integrinas por macrófagos peritoneais tratados com GH	46
Tabela 2	- Adesão <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneais tratados com GH	52

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH: adrenocorticotropic hormone (hormônio adrenocorticotrópico)
- APC: allophycocyanin (aloficocianina)
- BSA: bovine serum albumin (albumina sérica bovina)
- CD: cluster of differentiation (grupo de diferenciação)
- CD11b: subunidade α_M da integrina
- CD14: receptor para lipopolissacarídeo
- CD18: subunidade β_2 da integrina
- CD29: subunidade β_1 da integrina
- CD4: molécula co-receptora de linfócitos T
- CD49e: subunidade α_5 da integrina
- CD49f: subunidade α_6 da integrina
- CRH: corticotropic release hormone (hormônio liberador de corticotropina)
- DAMP's: damage associated molecular patterns (padrões moleculares associados ao dano)
- FAK: focal adhesion kinase (cinase de adesão focal)
- Fc γ RI: receptor de alta afinidade para a cadeia pesada da imunoglobulina G
- FN: fibronectina
- GAR-FITC: goat anti-rabbit Ig fluorescein isothiocyanate-conjugated (anti-Ig de coelho produzido em cabra conjugado ao isocianato de fluoresceína)
- G-CFU: granulocyte colony-forming unit (unidade formadora de colônia de granulócito)
- GH: growth hormone (hormônio do crescimento)
- GHR: growth hormone receptor (receptor para o hormônio do crescimento)
- GHS: growth hormone secretagogue (secretagogos de GH)
- GHS-R: growth hormone secretagogue receptor (receptores de secretagogos de GH)
- GM-CFU: granulocyte-macrophage colony-forming unit (unidade formadora de colônia granulócito-macrófago)
- GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (fator de crescimento de colônio granulócito-macrófago)
- HAART: highly active antiretroviral therapy (terapia anti-retroviral altamente ativa)

HIV-1: human immunodeficiency virus type 1 (vírus da imunodeficiência humana tipo 1)

HSC: hematopoietic stem cell (célula-tronco hematopoiética)

HSV-1: herpes simplex virus type 1 (vírus do herpes simples tipo 1)

iC3b: fragmento resultante da clivagem da proteína C3 do complemento

ICAM-1: intracellular adhesion molecule 1 (molécula de adesão intracelular 1)

ICBS: Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

IFN- γ : interferon-gama

IGF: insulin-like growth factor (fator de crescimento semelhante a insulina)

IGF-1: insulin-like growth factor 1 (fator 1 de crescimento semelhante a insulina)

IgG: imunoglobulina G

IL: interleucina

JAK: janus kinase (cinase janus)

JAK-2: janus kinase 2 (cinase janus 2)

LDL: low density lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)

LN: laminina

LPS: lipopolissacarídeo

Mac-1: antígeno 1 do macrófago (macrophage antigen-1); integrina β_2 receptor para moléculas da matriz extracelular

MAP: mitogen-activated protein (proteína ativada por mitógeno)

M-CFU: macrophage colony-forming unit (unidade formadora de colônia de macrófago)

MEC: matriz extracelular

MIP-1 α : macrophage inflammatory protein 1 α (proteína 1 α inflamatória do macrófago)

NK: natural killer

NO: nitric oxide (óxido nítrico)

PAMP's: pathogen associated molecular patterns (padrões moleculares associados a patógenos)

PBS: phosphate buffered saline (solução salina tamponada)

PE: phycoerythrin (ficoeritrina)

PRL: prolactina

PRR: pattern recognition receptor (receptor de reconhecimento padrão)

RANTES: regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (citocina regulada sob ativação, expressada e secretada por células T normais)

RPMI: roswell park memorial institute (meio de cultura celular)

ROS: reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio)

SBF: soro bovino fetal

SDS: sódio dodecil sulfato

SNC: sistema nervoso central

SNS: sistema nervoso simpático

TGF: transforming growth factor-beta (fator β de crescimento e transformação)

TLR: toll-like receptor (receptor semelhante ao toll)

TLR-4: toll-like receptor 4 (receptor semelhante ao toll 4)

TNF- α : tumoral necrosis factor-alfa (fator α de necrose tumoral)

UFAL: Universidade Federal de Alagoas

VLA: very late antigen (antígeno de aparecimento tardio)

VLA-5: very late antigen-5 (antígeno 5 de aparecimento tardio); receptor β_1 da família das integrinas para a fibronectina

VLA-6: very late antigen-6 (antígeno 6 de aparecimento tardio); receptor β_1 da família das integrinas para laminina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Interações imunoneuroendócrinas	19
3.2 Hormônio do crescimento	21
3.3 GH e o sistema imune	22
3.4 Macrófagos: aspectos gerais e funcionais	25
3.5 GH e macrófagos	30
4 METODOLOGIA	32
4.1 Animais	32
4.2 Reagentes	32
4.3 Anticorpos	32
4.4 Cultura primária de macrófagos peritoneais residentes	33
4.5 Tratamento com GH	33
4.6 Análise morfológica	34
4.7 Avaliação da deposição de moléculas de matriz extracelular	35
4.8 Avaliação da expressão de integrinas	35
4.9 Ensaio Funcionais	36
4.9.1 Adesão	36
4.9.2 Migração <i>in vitro</i>	37
4.9.3 Atividade fagocítica	38
4.10 Análise estatística	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Efeito do GH sobre a morfologia de macrófagos peritoneais.....	40
5.2 Efeitos do GH na deposição de glicoproteínas da MEC por macrófagos.....	42
5.3 Efeitos do GH sobre a expressão de integrinas por macrófagos	45
5.4 Análise dos efeitos do GH sobre aspectos funcionais de macrófagos peritoneais residentes	50
5.4.1 Efeitos do GH na adesão célula-matriz extracelular	50

5.4.2 Efeitos do GH na migração <i>in vitro</i> de macrófagos	52
5.4.3 Efeitos do GH na atividade fagocítica de macrófagos peritoneais	53
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	65
REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

O controle das atividades do organismo depende do processo de comunicação multidirecional existente entre os sistemas orgânicos. Essa comunicação permite ao organismo interagir com o ambiente ao seu redor, desenvolvendo mecanismos para detectar, identificar, combater e eliminar qualquer objeto, substância ou ser alheio a ele.

A investigação científica vem demonstrando que os sistemas nervoso, endócrino e imunológico atuam de forma conjunta na manutenção da homeostase. Para isso, esses sistemas compartilham um elenco de substâncias, tais como citocinas, hormônios e neurotransmissores que servem como mensageiros num mecanismo de comunicação intersistêmica (Blalock e Smith, 2007).

Influências neuroendócrinas sobre o sistema imune já foram estudadas em diferentes tipos celulares, incluindo os macrófagos. Já foi demonstrado que o hormônio hipofisário prolactina (PRL) é capaz de aumentar a produção de citocinas por macrófagos peritoneais, enquanto que a progesterona aparentemente tem uma ação imunossupressora sobre macrófagos, como demonstrado num estudo recente em que os macrófagos murinos tratados com este esteróide exibiram uma inibição na produção de interleucina-6 (IL-6) e do óxido nítrico (NO) (Kumar *et al.*, 1997; Sodhi e Tripathi, 2008; Su *et al.*, 2009).

Outro hormônio envolvido na atividade de macrófagos é o hormônio do crescimento (GH), um neuropeptídeo hipofisário que, além de suas funções clássicas no metabolismo celular e no crescimento do corpo, é um potente imunomodulador que age em órgãos e células do sistema imunológico (Savino e Dardenne, 1995). Já foi relatado que o GH atua em macrófagos estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), NO e de citocinas (Edwards *et al.*, 1988; Tripathi e Sodhi, 2007; Sodhi e Tripathi, 2008). Devido a ação estimuladora desse hormônio, alguns estudos apontam que o GH pode auxiliar os macrófagos no combate a infecções bacterianas e parasitárias (Edwards *et al.*, 1992a; Frare *et al.*, 2010).

Dessa forma, estudos que busquem compreender a ação do GH sobre a biologia dos macrófagos podem contribuir não somente para o conhecimento sobre

as interações imunoneuroendócrinas, mas também proporcionar subsídios para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes, que auxiliem no tratamento de patologias associadas a distúrbios da função imunológica tais como doenças infecciosas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar *in vitro* e *in vivo* os efeitos do GH sobre a fisiologia de macrófagos peritoneais residentes de camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos do GH na morfologia de macrófagos peritoneais residentes de camundongos;
- Avaliar a expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular em macrófagos peritoneais residentes murinos submetidos aos tratamentos com GH;
- Verificar o potencial do GH na capacidade de adesão e migração de macrófagos peritoneais residentes;
- Avaliar os efeitos *in vitro* e *in vivo* do GH na fagocitose de macrófagos peritoneais residentes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Interações imunoneuroendócrinas

As interações imunoneuroendócrinas resultam do compartilhamento de ligantes e receptores que estabelecem um circuito de comunicação multidirecional entre os sistemas imune e neuroendócrino (Blalock e Smith, 2007). Além disso, anatomicamente, os sistemas nervoso e o imunológico mantêm contato através de inervações do sistema nervoso autônomo (o nervo vago e as fibras do sistema nervoso simpático) presentes no timo, baço, medula óssea, linfonodos e em sítios imunológicos no fígado, pele e trato gastrintestinal (Steinman, 2004).

Nesse esquema de intercomunicação, o sistema imune, além de distinguir o próprio do não-próprio, é capaz de detectar a presença de um antígeno e alertar ao sistema nervoso por meio de citocinas. O sistema nervoso, por sua vez aciona neurotransmissores e neuropeptídios que irão agir em receptores presentes em órgãos e células do sistema imune (Figura 1).

Segundo Steinman (2004), esses sistemas podem interagir de três maneiras: na primeira ambos os sistemas atuam juntos, como na indução da febre provocada por uma reação à infecção ou inflamação; na segunda, o sistema nervoso induz o sistema imune, em casos de estresse em que hormônios do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal modulam as respostas imunes; e na terceira o sistema imunológico regula o sistema nervoso, como durante a infecção.

Estudos anteriores já mostraram que citocinas como interferon-gama (IFN- γ), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-2 (IL-2) interagem com receptores opióides, no hipotálamo e nas glândulas hipófise e adrenal (Blalock, 1989). Outras citocinas como IL-6, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-10 (IL-10), interleucina-12 (IL-12) e quimiocinas também atuam sobre o sistema neuroendócrino, sendo produzidas por células do sistema nervoso, astrócitos e micróglia e em regiões do hipotálamo e na hipófise (Borghetti *et al.*, 2009). Dentre outras ações, essas substâncias atuam na regulação da secreção de hormônios hipofisários, neurotransmissores e na indução da febre durante processos inflamatórios. (Dinarello, 1999, Borghetti *et al.*, 2009).

Os hormônios hipofisários como os hormônios adrenocorticotrópico, tireoestimulante, luteinizante, folículo estimulante, o GH e a PRL já foram comprovados como moduladores da resposta imune (Kelley, 1988; Blalock, 1989; Weigent e Blalock, 1995). Esses hormônios hipofisários, por vezes, ao atuarem sobre a glândula-alvo irão estimular outras substâncias com comprovada ação sobre o sistema imune, dentre as quais podemos citar os glicocorticóides (ação imunossupressora), hormônios tireoidianos e esteróides (Routley e Ashcroft, 2009). Como parte do processo de comunicação multidirecional, os hormônios, por sua vez, regulam a produção de citocinas e quimocinas pelas células do sistema imune, além de atuar na síntese de anticorpos e na atividade de linfócitos T e B, de células *natural killer* (NK), neutrófilos e macrófagos (revisado em Weigent e Blalock, 1995; Borghetti *et al.*, 2009).

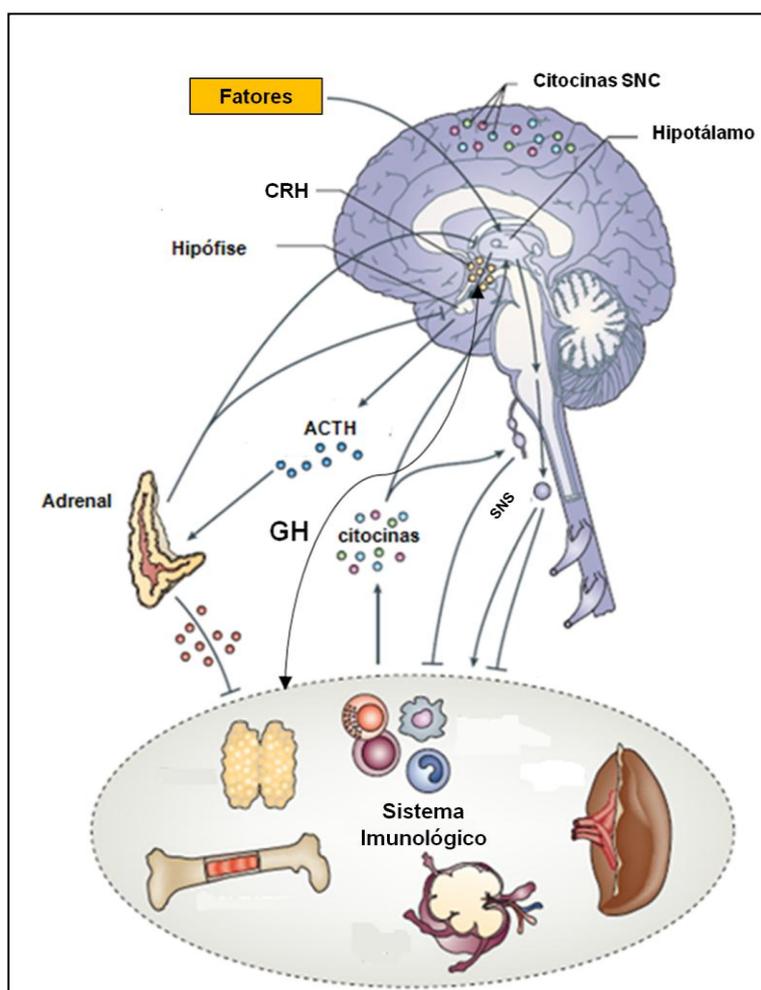


Figura 1 – Representação esquemática das interações entre os sistemas nervoso, imunológico e endócrino. Abreviaturas – ACTH: hormônio adrenocorticotrópico, CRH: hormônio liberador de corticotropina, SNC: sistema nervoso central, SNS: sistema nervoso simpático. Adaptação de Sternberg (2006).

3.2 Hormônio do crescimento

O hormônio do crescimento (*Growth hormone* – GH, hormônio somatotrófico ou somatotrofina) é um polipeptídeo de 22 kDa produzido na hipófise anterior, pertencente ao grupo dos hormônios somatomamotróficos do qual a PRL e a somatotrofina coriônica também são integrantes. O GH é constituído por 191 aminoácidos, com duas pontes dissulfeto, resultante da transcrição do gene cujo locus gênico está situado no braço longo do cromossomo 17 (Kopchick e Andry, 2000). Uma variação menos abundante, com aproximadamente 20 kDa, resultante de um *splicing* alternativo do RNAm também é encontrada na circulação (Weigent, 1996).

Na hipófise, a produção do GH é estimulada pelo hormônio liberador de GH (GHRH), produzido por neurônios do hipotálamo, e é inibida pela somatostatina (Sodhi e Tripathi, 2008). 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 GHS-R 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 e Andry, 2000).

Os efeitos do GH são iniciados a partir da sua ligação ao seu receptor (GHR) presente na membrana plasmática das células-alvo. Esses receptores são membros da superfamília das citocinas/hemopoietina, que também inclui os receptores para PRL, eritropoietina, interleucinas (IL-1 a IL-7 e IL-9) e para o fator de crescimento de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF) (Tripathi e Sodhi, 2007). Já foi observado, em humanos, que o GH pode também se ligar ao receptor para PRL, mimetizando os seus efeitos nas células-alvo (Warwick-Davies *et al.*, 1995a).

Os receptores da superfamília das citocinas/hemopoietina não possuem atividade tirosina-quinase intrínseca, assim quando o GH se liga ao seu receptor, domínios citoplasmáticos próximos à membrana celular interagem com tirosinas-quinases 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 e 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 e 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 conseqüente crescimento tissular (Jeay *et al.*, 2002). Os efeitos mitogênicos do GH já foram observados em vários tipos celulares como condrócitos, fibroblastos, adipócitos, mioblastos, linfócitos T, células endoteliais e em linhagens hematopoiéticas (Merchav *et al.*, 1988; Rymaszewski *et al.*, 1991; Blazar *et al.*, 1995; Postel-Vinay *et al.*, 1997; Jeay *et al.*, 2002; Ramos, 2008).

Além da sua ação no crescimento, o GH também interfere no metabolismo de carboidratos, lipídios e de minerais (Kelley *et al.*, 2007). Neste contexto, duas importantes ações podem ser relacionadas ao GH: uma ação semelhante a da insulina caracterizada por hipoglicemia, aumento da síntese protéica, glicogênese e lipogênese; e outra ação tardia, anti-insulínica, em que ocorre o oposto, com hiperglicemia, hiperinsulinemia, aumento da lipólise e redução do metabolismo da glicose, representando os principais efeitos fisiológicos relacionados ao GH (Kopchick *et al.*, 1999).

3.3 GH e o sistema imune

Além do metabolismo celular, o GH age sobre células e órgãos do sistema imunológico. Este conceito surgiu a partir de estudos com animais hipofisectomizados em que foram observadas alterações na resposta celular e humoral, as quais foram restabelecidas após o tratamento com GH e também com PRL (revisado por Kelley *et al.*, 2007). Em conjunto com esses dados, alterações na função imunológica já foram relatadas em indivíduos com deficiência de GH, tanto em modelos experimentais com animais como em humanos, sendo que no primeiro

foi observada uma maior suscetibilidade a infecções e deficiência na função e desenvolvimento de linfócitos, enquanto no segundo foi demonstrada uma falha na síntese de anticorpos, hipoplasia tímica e redução na atividade de células NK (Kelley, 1989; Jeay *et al.*, 2002). De maneira oposta, nas situações em que o GH está em excesso, como em camundongos transgênicos, já foi demonstrado que altas concentrações de GH podem resultar no desenvolvimento de doenças autoimunes (Jeay *et al.*, 2002).

Receptores para GH no sistema imune foram encontrados primeiramente em linhagem de linfócitos B humanos (Lesniak e Roth, 1976). Também já foram demonstrados em linfócitos T, células NK, monócitos, neutrófilos, macrófagos, na medula óssea, no timo, baço e linfonodos (Hattori, 2009). Além de expressar seu receptor, as células do sistema imune como também as que constituem os órgãos linfóides são capazes de produzir GH, mostrando um mecanismo de ação autócrino/parácrino desse hormônio (Weigent *et al.*, 1988; Savino e Dardenne, 1995, Hattori, 2009).

Vários estudos demonstram que o GH atua sobre órgãos linfóides regulando seu desenvolvimento e função, dentre os quais o timo destaca-se com um dos mais estudados. Já foi mostrado que o GH pode atuar sobre células epiteliais tímicas, aumentando a sua proliferação, a produção de citocinas e quimiocinas, e ainda, a expressão de receptores e moléculas da matriz extracelular (MEC) (Tseng *et al.*, 1997; de Mello-Coelho *et al.*, 1997; Savino e Dardenne, 2000). Em concordância com esses achados, estudos com animais transgênicos para esse hormônio e em animais que receberam injeção intratímica de GH demonstraram a habilidade do hormônio em atuar *in vivo* sobre o timo, modulando a expressão de receptores e ligantes da MEC e quimiocinas, como também a migração intratímica de linfócitos T e seu exporte para órgãos linfóides periféricos (Smaniotto *et al.*, 2004; 2005). Além disso, foi visto que em pacientes adultos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), o tratamento com GH promoveu um aumento na função tímica e no número de linfócitos T CD4+ *naive* e total circulantes (Napolitano *et al.*, 2008).

O GH também atua sobre a medula óssea, estimulando a granulopoiese, a proliferação e a maturação de células progenitoras multipotentes e, ainda, pode atuar na produção de citocinas por células estromais (Merchav *et al.*, 1988; Hanley *et al.*, 2005). Murphy e colaboradores (1992) demonstraram que o tratamento *in vivo*

com GH estimulou a hematopoiese em animais com mielossupressão provocada pela azidotimidina.

Em órgãos linfóides periféricos, os efeitos do GH já foram observados no baço, em que camundongos transgênicos para o GH apresentaram um aumento de células progenitoras mielóides (Blazar *et al.*, 1995). Corroborando com este estudo, mais recentemente, Smaniotto e colaboradores (2010) demonstraram que camundongos transgênicos para GH possuíam um maior número de linfócitos B, T e suas respectivas subpopulações, no baço e nos linfonodos mesentéricos e subcutâneos. Além disso, neste mesmo trabalho foi observado que altos níveis de GH circulante podem modular a migração de linfócitos B e T de órgãos linfóides periféricos, em combinação com quimiocinas e moléculas da MEC.

O GH atua também na atividade das células efetoras do sistema imune. Estudos demonstram que esse hormônio é capaz de estimular a diferenciação de linfócitos B e aumenta a produção das imunoglobulinas G e M após estimulação com *Staphylococcus aureus* (revisado por Hattori, 2009). O GH é capaz de aumentar a capacidade de adesão, a produção de ROS, a migração e a quimiotaxia além de induzir alterações na morfologia de neutrófilos normais (Fu *et al.*, 1992; Petersen *et al.*, 2000). Além disso, o GH também atua melhorando a atividade de neutrófilos de animais velhos, em ação sinérgica com IFN- γ , através do aumento na produção de ROS e da atividade bactericida (Fu *et al.*, 1994). Em um estudo recente, Liu e colaboradores (2010) demonstraram o efeito do GH, em altas concentrações, sobre células dendríticas humanas, induzindo sua diferenciação, aumentando a produção de IL-12 e a sua capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T citotóxicos. Também foi demonstrado que o GH é capaz de estimular diretamente a proliferação de linfócitos T murinos ativados (Postel-Vinay *et al.*, 1997). Ainda, Herasimtschuk e colaboradores (2008) demonstraram que a administração conjunta de GH com a terapia antiviral altamente ativa (HAART) em pacientes lipodistróficos portadores de HIV-1 melhorou a resposta específica de linfócitos T ao vírus.

A capacidade imunomoduladora do GH também vem sendo demonstrada na imunidade contra infecções. Em indivíduos que produzem altas concentrações desse hormônio, foi observado um aumento na atividade bactericida contra *Mycobacterium avium* (revisado em Sodhi e Tripathi, 2008). No modelo de septicemia por *Escherichia coli* em camundongos, um aumento na defesa à infecção

foi observado após tratamento de curto prazo tanto com GH quanto com IGF-1 (Inoue *et al.*, 1995). Além disso, Takagi e colaboradores (1997) em um estudo com modelo murino de injúria termal, demonstraram que animais infectados com vírus do herpes simples tipo 1 (HSV-1), tratados *in vivo* com GH recombinante humano apresentaram um aumento nos níveis de sobrevivência ao vírus. Recentemente, Frare e colaboradores (2010) demonstraram que o GH pode ser utilizado como uma estratégia terapêutica contra infecções provocadas por *Trypanosoma cruzi*.

Edwards e colaboradores (1991a) em seus estudos com animais hipofisectomizados, mostraram que o tratamento com GH pode oferecer proteção e aumentar a sobrevivência à infecção letal por *Salmonella typhimurium*. Segundo os autores, o efeito do GH se deve a sua interação com células fagocíticas do sistema imune, que atuam na resistência contra doenças infecciosas. Este mesmo grupo de pesquisa demonstrou que a administração *in vivo* de GH aumentou a resistência de macrófagos à bactéria *Salmonella typhimurium*, fato que os autores atribuem a capacidade do hormônio em estimular a produção de ROS, responsáveis pela ação bactericida dos macrófagos (Edwards *et al.* 1992a).

Estes estudos, em conjunto, revelam que o GH age sobre órgãos e células do sistema imune, atuando sobre a imunidade adquirida como linfócitos, e também sobre células efetoras da imunidade inata, na qual os macrófagos surgem como importantes alvos para a ação do GH.

3.4 Macrófagos: aspectos gerais e funcionais

Há um século, Elie Metchnikoff em seus estudos com estrelas-do-mar, trazia o conceito de que os animais possuíam células com a capacidade de engolfar partículas estranhas, que foram por ele denominadas de fagócitos (revisado em Stuart e Ezekowitz, 2008). A partir da descoberta de Metchnikoff, atualmente sabe-se que os organismos multicelulares possuem mecanismos de proteção que os defendem contra agentes nocivos. Um desses mecanismos de proteção é a imunidade natural ou inata.

Em animais invertebrados a imunidade natural é composta por células fagocíticas que tem a capacidade de cercar e destruir agentes nocivos (Williams, 2007). Nos vertebrados, as células fagocitárias são denominadas de macrófagos e estão classificadas no sistema fagocitário mononuclear, que também é constituído

por monócitos e seus precursores (Gordon e Taylor, 2005). Anteriormente, essas células eram classificadas juntamente com as células reticulares, células endoteliais e com os fibroblastos em um sistema denominado retículo-endotelial. Após várias investigações realizadas em diversos modelos experimentais, em 1969, durante uma conferência em Lieden, Holanda, os pesquisadores passaram a agrupar os macrófagos, os monócitos e seus precursores no atual sistema fagocitário mononuclear (van Furth *et al.*, 1972).

Os macrófagos se diferenciam a partir de monócitos que são produzidos pela diferenciação de linhagens de células-tronco específicas, em sítios hematopoiéticos. Ainda na vida intra-uterina, a produção de células semelhantes a macrófagos acontece diretamente a partir de progenitores mesenquimais presentes no saco vitelino, então, mais adiante no desenvolvimento passam a ser derivados do fígado fetal, em que são originados de precursores monocíticos e por fim, após o nascimento, a produção é realizada pela medula óssea (Figura 2). Após o nascimento, os macrófagos são encontrados em todos os tecidos do organismo, chegando a constituir cerca de 20% do total de células (Pollard, 2009).

Os monócitos constituem de 5% a 10% da população de leucócitos circulantes do sangue. São células grandes, possuindo entre 10 e 15 μm de diâmetro; apresentam núcleo grande, reniforme e excêntrico; o citoplasma contém inúmeros lisossomos e vacúolos fagocíticos (Gartner e Hiatt, 2003; Gordon e Taylor, 2005). Além disso, apresentam uma heterogeneidade refletida em fenótipos distintos determinados por moléculas de superfície, sendo capazes de se diferenciar em vários tipos de macrófagos e células dendríticas (Gordon e Taylor, 2005). Na medula óssea do humano adulto são produzidos aproximadamente 5×10^9 monócitos por dia, que ao entrarem na circulação sanguínea podem migrar para os tecidos, se diferenciar em macrófagos ou podem permanecer na circulação onde a sua meia-vida é de até 18 horas (Xaus *et al.*, 2001).

Ao migrarem para os tecidos, os monócitos se diferenciam em macrófagos. Essa migração pode ser em consequência de estímulos durante processos inflamatórios ou por processo fisiológico durante o desenvolvimento dos tecidos dando origem aos macrófagos residentes, que podem permanecer nos tecidos durante longos períodos, de meses até anos (Xaus *et al.*, 2001; Gordon, 2007). Os monócitos também podem ser recrutados para renovação do número dos

macrófagos residentes nos tecidos, embora estudos recentes tenham mostrado que essa renovação pode estar mais relacionada com a proliferação dos macrófagos no microambiente do órgão do que pelo recrutamento de monócitos circulantes (revisado em Gordon e Taylor, 2005; Gordon, 2007). Nos tecidos, os macrófagos apresentam-se como células grandes de 10-30 μm de diâmetro, irregulares, com citoplasma basófilo, repleto de vacúolos pequenos e grânulos também pequenos e densos; o núcleo é ovóide, excêntrico, em forma de rim e, em geral, não apresenta nucléolos (Gartner e Hiatt, 2003).

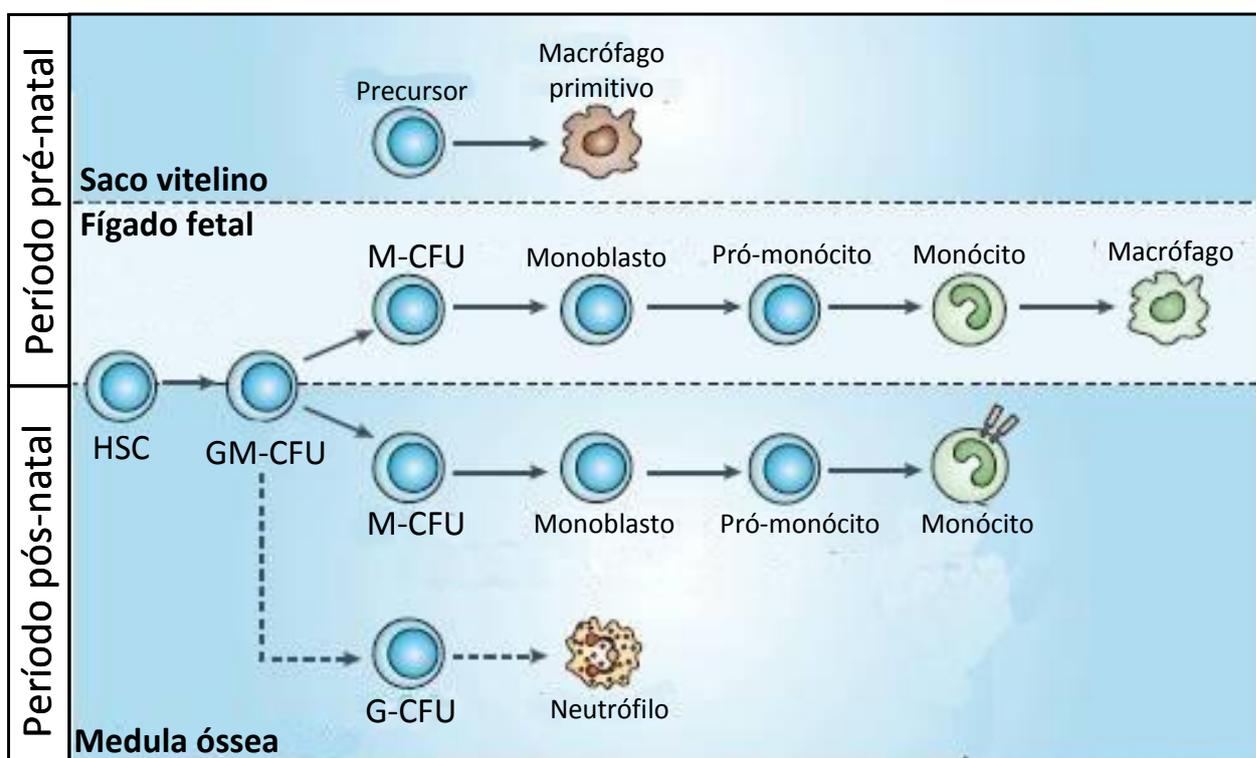


Figura 2 – Desenho esquemático da diferenciação de macrófagos ao longo do desenvolvimento. Os macrófagos são diferenciados a partir de monócitos produzidos em sítios hematopoiéticos que variam de acordo com o desenvolvimento do organismo. No adulto, os monócitos são produzidos na medula óssea e compartilham o mesmo precursor com os neutrófilos. *Abreviaturas* – HSC: célula-tronco hematopoiética, GM-CFU: unidade formadora de colônia granulócito-macrófago, G-CFU: unidade formadora de colônia de granulócito, M-CFU: unidade formadora de colônia de macrófago (Adaptação de Gordon e Taylor, 2005).

Os macrófagos residentes dos tecidos constituem a primeira linha de defesa contra agressões, sendo capazes de iniciar processos de inflamação aguda e

mudanças vasculares através de sua íntima associação com a microvasculatura (Gordon, 2007). Além disso, essas células irão desempenhar funções que auxiliam na homeostasia dos órgãos onde estão localizadas, como os macrófagos alveolares que produzem reagentes oxidantes que eliminam patógenos e removem o excesso de moléculas surfactantes e as células de Kupffer presentes no tecido hepático que atuam no processamento da lipoproteína de baixa densidade (LDL), na neutralização de endotoxinas bacterianas e na remoção de partículas estranhas na circulação portal (Lucas e Greaves, 2001; Laskin *et al.*, 2011).

Componentes essenciais da imunidade inata, os macrófagos atuam diretamente na modulação do processo inflamatório. Quando ocorre um estímulo lesivo ou uma invasão de agentes nocivos como bactérias, fungos ou vírus, os macrófagos residentes dos tecidos são ativados através da interação de receptores na sua superfície com moléculas presentes nos agentes agressores. Esses são chamados de receptores de reconhecimento padrão (PRR) dos quais fazem parte as lectinas, como a dectina-1, os receptores FcγRI de alta afinidade, os receptores semelhantes ao Toll (TLR) que estão presentes na membrana plasmática da célula ou em vesículas no citoplasma, e ainda um grupo de receptores que são domínios intracelulares de reconhecimento de produtos bacterianos, os *nacht-like receptors* (NOD-like) (Gordon, 2007; Medzhitov, 2007). Os ligantes desses PRR's são padrões moleculares únicos presentes em bactérias, fungos e em produtos de dano tecidual denominados de padrões moleculares associados à patógenos (PAMP's) e padrões moleculares associados ao dano (DAMP's) (Medzhitov, 2007). Uma vez que acontece essa interação, é desencadeada uma série de ações, desde a fagocitose do agente agressor, o recrutamento de células inflamatórias, a produção de citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas.

A fagocitose é a principal função efetora dos macrófagos. Uma vez que os PRR's são ativados, uma cascata de sinalização é induzida resultando no englobamento do patógeno e à formação do fagossomo. No citoplasma, o fagossomo se funde com vesículas lisossomais, formando o fagolisossoma que reúne um arsenal de moléculas e produtos que irão contribuir para eliminação do patógeno, dentre os quais se encontram as ROS e o NO (Flannagan *et al.*, 2009).

A interação dos PAMP's com os PRR's também irão ativar os macrófagos para produção de citocinas como o TNF, interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-12), fator de

ativação de plaquetas, prostaglandinas, leucotrienos, fator de crescimento e transformação (TGF), fator de crescimento de fibroblastos e quimiocinas, servindo como pontos-chave do processo inflamatório e na reparação de danos nos tecidos (Gordon *et al.*, 1995; Xaus *et al.*, 2001; Gersch *et al.*, 2002). Além disso, as citocinas IL-1 e IL-6 irão estimular a produção de colectinas, ficolinas e pentraxinas, proteínas da fase aguda da inflamação, que irão atuar na ativação de proteínas do complemento e na opsonização de microrganismos, favorecendo a fagocitose e a eliminação do patógeno (Medzhitov, 2007).

Quando os macrófagos chegam ao foco inflamatório, também são ativados pelo IFN- γ produzido por linfócitos T e células NK que, dentre outras funções, estimula a produção de ânions superóxidos (O_2^-) e NO, aumentando a capacidade microbicida dos macrófagos. Os lipopolissacarídeos (LPS) também podem ativar macrófagos através da via de sinalização LBP (proteína ligante de LPS)/CD14/TLR-4 que induz a transcrição de genes que codificam citocinas (TNF- α e IL-1) e enzimas (Xaus *et al.*, 2001; Abbas e Lichtman, 2005). Além disso, os macrófagos podem ser ativados por uma via alternativa, a partir da indução por IL-4 e IL-10, caracterizando a participação dessas células em processos alérgicos, infecções parasitárias e na resposta humoral (Gordon, 2007).

Além de participarem como efetores na imunidade inata, os macrófagos também desempenham papel importante na imunidade celular e humoral, interagindo com linfócitos T na destruição dos patógenos, expressando receptores para as porções Fc das imunoglobulinas e para produtos do sistema complemento, participando de processos de opsonização mediados por tais moléculas (Abbas e Lichtman, 2005).

No reparo ao tecido lesado, os macrófagos secretam diferentes citocinas e fatores de crescimento que ajudam na remodelação da MEC e no recrutamento de células estruturais como fibroblastos e células do músculo liso (Lucas e Greaves, 2001). Além disso, também produzem e secretam moléculas da MEC como colágeno, fibronectina e laminina (Johansson *et al.*, 1979; Alitalo *et al.*, 1980; Vaage e Lindblad, 1990; Pedraza *et al.*, 2000). Estudos têm demonstrado que a laminina interfere na adesão, fagocitose, citotoxicidade e na migração de macrófagos; e é expressa na superfície de macrófagos murinos ativados (Pedraza *et al.*, 2000). Enquanto que a fibronectina é capaz de estimular a produção do fator de

crescimento celular, aumenta a expressão de receptores Fc e formam uma cobertura sobre restos celulares, facilitando a fagocitose (Mosher, 1984).

A atividade dos macrófagos pode também ser modulada ou inibida por outras moléculas e hormônios, que irão promover o equilíbrio da inflamação, pois sua exacerbação pode levar a ocorrência de processos patológicos. As citocinas envolvidas nesse controle são IL-10, TGF- β e produtos derivados do ácido araquidônico como prostaglandina E₂. Dentre os hormônios estão os glicocorticóides que são potentes anti-inflamatórios capazes de interferir na função de várias células do sistema imune (Gordon, 2007).

Muitas das informações que temos sobre a biologia dos macrófagos é resultado de inúmeras pesquisas desenvolvidas por diferentes grupos, muitas delas realizadas utilizando-se de estudos *in vivo* e *in vitro*. Um modelo experimental amplamente utilizado são macrófagos coletados na cavidade peritoneal, tanto residentes quanto estimulados por antígenos (Gordon, 2007). Estudo recente revelou que existem dois tipos de macrófagos residentes da cavidade peritoneal os quais foram classificados segundo sua morfologia em macrófagos grandes e macrófagos pequenos, que diferem entre si não somente pela forma, mas pela expressão de receptores de superfície, função e origem (Ghosn *et al.*, 2010).

3.5 GH e macrófagos

Estudos têm mostrado que macrófagos são importantes alvos para o GH. Nos fagócitos o GH está envolvido na função e na atividade das células, atuando na quimiotaxia de monócitos durante a migração para os sítios de lesão tecidual e na ativação de macrófagos (Tripathi e Sodhi, 2007). Também já foi relatado que células mononucleares humanas possuem receptor para o hormônio, como também produzem GH semelhante ao secretado pela hipófise (Varma *et al.*, 1993).

Nos monócitos humanos, já foi observado que o GH pode atuar como um fator quimiotático e quimiocinético além de estimular a liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Warwick-Davies *et al.*, 1995a; Kähler *et al.*, 2001). Esse último efeito concorda com o que foi observado anteriormente por Edwards e colaboradores (1988), em que o tratamento com GH modulou a produção de O₂⁻ por macrófagos. Tripathi e Sodhi (2007) mostraram que o tratamento *in vitro* com GH

induziu a transcrição e a tradução do gene da sintase do NO indutível (iNOS), e um conseqüente aumento na produção de NO por macrófagos peritoneais.

Recentemente, foi demonstrado que o tratamento *in vitro* com GH foi capaz de induzir a produção das citocinas IFN- γ , IL-12p40, IL-6 e IL-1 β e das quimiocinas MIP-1 α e RANTES por macrófagos peritoneais (Sodhi e Tripathi, 2008). Outros estudos já haviam mostrado a influência do GH na liberação de TNF- α por macrófagos (Edwards *et al.*, 1991b). Este perfil de citocinas e de quimiocinas induzido pelo GH sugere que este interfere, principalmente, nos eventos de imunidade celular mediada por macrófagos (Sodhi e Tripathi, 2008). Em um estudo anterior, Uronen-Hansson e colaboradores (2003) já haviam observado que o GH é capaz de aumentar a produção de IL-1 α , IL-6 e TNF- α por monócitos estimulados com LPS.

Além da imunidade, os macrófagos têm papel importante no metabolismo de LDL's, removendo-as dos vasos sanguíneos. Mas, LDL's em excesso podem induzir a transformação de macrófagos em células espumosas, dando início a lesões ateroscleróticas (Lucas e Greaves, 2001). Com relação a esse fato, Hochberg e colaboradores (1992) mostraram que tanto o GH quanto o IGF-1 aumentaram a captura e metabolismo de LDL por macrófagos, destacando essas células como um modelo para o estudo dos efeitos do GH no metabolismo de lipídios.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), machos, de 5-8 semanas, da linhagem *Swiss*, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas – UFAL e mantidos no Biotério Setorial do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura ambiente de 22 °C e livre acesso a ração e água. Todos os procedimentos realizados durante o desenvolvimento do projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFAL (Processo nº 028370/2009-07).

4.2 Reagentes

O GH (hormotrop) foi obtido da Dong-A Pharmaceutical Co. (Dongdaemoon-Gu, Seul, Coreia do Sul). Os outros reagentes utilizados foram: meio de cultura RPMI 1640, solução tampão de salina fosfatada (PBS), zimosan A (*Saccharomyces cerevisiae*), aminoácido L-glutamina não animal, albumina sérica bovina (BSA) e fibronectina celular (obtida de fibroblasto de prepúcio humano) todos obtidos da Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, MO, EUA). A laminina foi obtida da Invitrogen (São Paulo, Brasil), enquanto que o soro bovino fetal estéril (SBF) foi obtido da Gibco®, Invitrogen (Canadá). O antibiótico ciprofloxacino (ciprobacter) foi obtido da Isofarma LTDA (Ceará, Brasil) e o meio para montagem rápida de lâminas (Entellan®) da Merck (Alemanha).

4.3 Anticorpos

Para os ensaios de imunofluorescência foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-fibronectina e anti-laminina de camundongo produzidos em coelho e anti-Ig de coelho produzido em cabra conjugado ao isocianato de fluoresceína (GAR-FITC) obtidos da Sigma-Adrich (St. Louis, MO, EUA). Para as análises citofluorimétricas foram utilizados anticorpos específicos conjugados a fluorocromos: anti-CD49e/ficoeritrina (PE) produzido em rato, obtido da BD Pharmingen (San

Diego, CA, EUA), anti-CD49f/ficoeritrina (PE), anti- CD11b/allofocianina (APC) e os isotipos controles IgG 2a e IgG 2b produzidos em rato, ambos controles negativos dos anticorpos conjugados a PE e APC, respectivamente, foram produzidos pela eBioscience (San Diego, CA, EUA).

4.4 Cultura primária de macrófagos peritoneais residentes

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, lavados em álcool 70% e, na cabine de segurança biológica, foram presos em um suporte de isopor onde, com auxílio de pinça e tesoura, a pele da região ventral foi removida e o peritônio exposto. Depois dessa etapa, com auxílio de seringa descartável (10 mL) foi injetado na cavidade peritoneal 8 mL de PBS gelado, tomando cuidado para não atingir nenhum órgão. Após leves batidas para agitar o líquido dentro da cavidade, foi feita a coleta do meio contendo as células, que foi transferido para um tubo de 15 mL e centrifugado a 4 °C em 227 g (1500 rpm) por 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* contendo as células foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF, 1% de L-glutamina e 2 mg/mL do antibiótico Ciprofloxacino (meio completo). Após contagem, as células em suspensão foram plaqueadas e colocadas em estufa de CO₂ por um período de 30 minutos a 2 horas para adesão das células, de acordo com protocolo experimental utilizado. Após este período, as placas foram lavadas com PBS para retirada das células não aderentes, adicionado meio RPMI completo e mantidas na estufa a 37 °C em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ ou utilizadas conforme protocolo experimental desejado.

Essa é uma técnica simples que permite o isolamento de macrófagos peritoneais residentes, uma vez que essas células possuem a propriedade de aderir ao plástico e ao vidro. Com isso, obtivemos uma cultura em que 98% das células são macrófagos, como analisado por citometria de fluxo.

4.5 Tratamento com GH

Para os ensaios de análise morfológica, avaliação da deposição de MEC, expressão de integrinas e para os ensaios de adesão, os macrófagos foram tratados

com GH nas concentrações de 20 e 200 ng/mL, em meio RPMI contendo 2% de SBF e mantidos em cultura por 6, 12 ou 24 horas, exceto nos ensaios de adesão, em que as células foram tratadas somente pelos períodos de 6 e 12 horas. Nos ensaios de migração *in vitro* em insertos *transwell*[®], as células em suspensão foram tratadas com GH nas concentrações de 20 e 200 ng/mL, pelos períodos de 6 ou 12 horas, em meio RPMI contendo 0,5% de BSA. Em todos os esquemas acima descritos, macrófagos não tratados, mantidos nas mesmas condições de cultivo, foram utilizados com controle. Além disso, uma redução de 10% para 2% na concentração do SBF foi utilizada, uma vez que este meio contém vários fatores de crescimento que podem interferir nos resultados obtidos durante os experimentos.

Para os ensaios *in vivo*, foram utilizados camundongos machos *swiss* (6 semanas) tratados, por via intraperitoneal, com GH nas doses de 20 ou 200 µg/kg, diluído em 200 µL de PBS, durante 7 dias consecutivos, tendo animais tratados somente com PBS como controle. Um dia após o último tratamento os macrófagos peritoneais residentes foram coletados como especificado no item 4.4. As concentrações e doses utilizadas neste trabalho foram determinadas de acordo com estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa.

4.6 Análise morfológica

Os macrófagos peritoneais foram cultivados em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro (d=13 mm), num volume total de 2×10^5 células em 500 µL de meio RPMI 1640 completo por poço. As culturas foram colocadas em estufa de CO₂ por 2 horas para adesão das células. Após este período, as placas foram lavadas com PBS para a retirada das células não aderentes, suplementadas com meio RPMI completo e colocadas na estufa por 18 horas. Após este tempo, as células em cultivo foram tratadas com GH, conforme descrito no item 4.5. Terminado o tratamento, os poços foram lavados, fixados com metanol por 10 minutos e corados com Giemsa por 8 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram retiradas dos poços, montadas com Entellan[®] em lâminas histológicas e examinadas ao microscópio óptico de luz acoplado a um sistema de aquisição de imagens equipado com software *NIS elements* para processamento e conversão das imagens (Nikon Eclipse 50i). Para a análise foram escolhidos aleatoriamente 20 campos em cada lamínula, em

cada grupo, em que foram considerados os seguintes aspectos morfológicos: forma do núcleo, tamanho relativo, presença de projeções citoplasmáticas e presença de vacúolos. Os experimentos foram feitos em triplicata e foram repetidos pelo menos duas vezes.

4.7 Avaliação da deposição de moléculas da MEC

Macrófagos peritoneais foram cultivados em placas de 8 poços, com lâminas de vidro (Lab-tek™, Nunc, EUA), com o volume de células ajustado para 10^5 cél./poço e após 18 horas, as células em cultivo foram tratadas com GH como descrito no item 4.5. Depois do tratamento, as células foram lavadas, fixadas em metanol absoluto por 10 minutos e, posteriormente, foram submetidas ao ensaio de imunofluorescência indireta. Primeiramente, as células foram hidratadas com PBS por 5 minutos e incubadas com solução de PBS/BSA a 1% por 30 minutos para bloquear sítios inespecíficos. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos primários específicos para fibronectina e para laminina, por 1 hora, a temperatura ambiente, em recipientes contendo gazes úmidas. Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS (três banhos de 5 minutos) seguido da incubação com anticorpo secundário GAR-FITC durante 45 minutos em câmara escura. Após lavagem com PBS, as placas foram montadas com glicerol com lamínulas de vidro para posterior observação em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 50i. A análise da deposição de fibronectina e laminina foi baseada na avaliação qualitativa da intensidade de fluorescência observada na superfície das células.

4.8 Avaliação da expressão de integrinas

Os macrófagos peritoneais foram cultivados em placas de Petri num volume de 10^6 células em meio RPMI completo e após 18 horas em cultura, as células foram tratadas com GH (vide item 4.5.). Logo após o tratamento, as células foram liberadas das placas com o auxílio de *cell scraper* e de lavagens com PBS 2% SBF, centrifugadas, contadas e 10^5 células foram plaqueadas em placas de 96 poços, em que foram novamente centrifugadas, por 5 minutos a 1500 rpm. Após centrifugação, os macrófagos foram marcados com anticorpos específicos conjugados a

fluorocromos para as cadeias alfa das integrinas VLA-5 (anti-CD49e/PE), VLA-6 (anti-CD49f/PE) e Mac-1 (anti-CD11b/APC) diluídos em PBS, e incubadas por 20 minutos a 4 °C. Após marcação, as células foram lavadas com PBS 2% SBF e fixadas em formaldeído a 2% para posterior análise. As células devidamente marcadas foram analisadas no citômetro de fluxo FACS Canto II equipado com o programa de computador Diva (BD biosciences), após a aquisição de 10.000 células. A análise da marcação e a confecção dos histogramas foram realizadas com programa *Summit 4.3* (Dako Colorado Inc.). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9 Ensaio Funcionais

4.9.1 Adesão

Os ensaios de adesão foram realizados de acordo com os protocolos constantes nos trabalhos de Smaniotto e colaboradores (2005) e Tsukuba e colaboradores (2009), com algumas alterações. Placas de cultura de 96 poços de fundo chato foram revestidas com 50 µL de PBS contendo moléculas de matriz extracelular, laminina e fibronectina, ambas nas concentrações de 10 µg/mL, durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esse tempo, o excesso de revestimento foi retirado e as placas foram deixadas abertas para secar a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, os poços foram lavados com PBS e posteriormente foi adicionado, em cada poço, 50 µL de PBS/BSA a 1% para bloquear as ligações inespecíficas por 45 minutos em estufa de CO₂. Após bloqueio, as placas foram vertidas para retirada total da solução. Enquanto isso, macrófagos peritoneais tratados *in vitro* com GH (conforme descrito no item 4.5.) foram liberados das placas, centrifugados e ressuspensos em 100 µL de meio RPMI sem suplementação para posterior contagem. Um volume ajustado de 5x10⁴ células em 50 µL de RPMI foi distribuído, por poço, nas placas revestidas e estas foram colocadas na estufa de CO₂ por 30 minutos para permitir a adesão celular. Após o tempo de adesão, os poços foram lavados 2 vezes com 100 µL de RPMI aquecido a 37°C para retirada das células não aderentes. As células que permaneceram aderidas foram fixadas com 100 µL de formaldeído a 4% por 15 minutos e após uma nova lavagem com 100

μL de PBS, as células aderentes foram coradas com 50 μL de cristal violeta (5 mg/mL) em álcool a 2% por 10 minutos. Depois da coloração, as placas foram imersas em um recipiente com água destilada para retirar o excesso de corante e colocadas para secar com a parte superior para baixo. Quando as placas estavam completamente secas, foi adicionado 200 μL de solução de SDS a 1% em água destilada, em cada poço, por 30 minutos para solubilizar o corante. Após solubilização, a solução foi recolhida e transferida para outra placa nos poços correspondentes para realização da leitura em leitora de microplaca TP-Reader (Thermoplate[®]). A adesão foi quantificada pela medida da absorbância no comprimento de onda de 540 nm.

4.9.2 Migração *in vitro*

Este ensaio foi realizado segundo protocolo experimental utilizado por Furundzija e colaboradores (2010), com algumas adaptações, empregando insertos *transwell* (Nunc, EUA) contendo membranas de policarbonato com 10 mm de diâmetro e poros de 8,0 μm . Primeiramente, os macrófagos peritoneais foram plaqueados em frascos de cultura médios ou pequenos e mantidos em estufa a 37 °C em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ por um período de 30 minutos para adesão. Enquanto isso foi realizado o bloqueio da membrana do inserto, com PBS/BSA a 1%, durante 45 minutos, para tornar a membrana mais homogênea. Em seguida, os macrófagos foram liberados dos frascos de cultura com PBS gelado, contados e um volume de 2×10^5 células foi ressuscitado em 200 μL de meio RPMI acrescido de 0,5% de BSA contendo GH nas concentrações de 20 ou 200 ng/mL. O mesmo volume de células não tratadas foi utilizado como controle. Na câmara inferior foi adicionado 500 μL meio RPMI com 0,5% BSA e as suspensões de células foram adicionadas na câmara superior do *transwell*. Os insertos foram mantidos em cultura por 6 ou 12 horas para a migração das células. Terminado o período de migração, a face superior da membrana dos insertos foi raspada com uma pinça e lavada com PBS para retirada das células não migrantes. Após lavagens, os insertos foram fixados em metanol absoluto por 10 minutos, corados pelo método de Giemsa (1: 2) por 8 minutos e banhados em água destilada para remover o excesso do corante. A análise da migração foi realizada ao microscópio óptico invertido (Nikon

Eclipse TS 100), a partir da contagem das células migrantes em 10 campos aleatórios com objetiva de 40x. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9.3 *Atividade fagocítica*

Este ensaio foi desenvolvido de acordo com os protocolos citados por Bos e de Souza (2000) e por Batista Júnior e colaboradores (2006), com algumas modificações. Os macrófagos peritoneais foram cultivados em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro (d=13 mm), num total de 5×10^5 células por poço, em meio RPMI 1640 completo e colocadas em estufa de CO₂ por 2 horas para adesão das células. Após este período, as placas foram lavadas com PBS para a retirada das células não aderentes, adicionado meio RPMI completo e mantidas na estufa a 37°C em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂. Após tratamento com GH, os poços foram lavados com PBS e uma concentração de 50 µg/mL de zimosan A foi adicionada às culturas. A fagocitose das partículas foi permitida por 2 horas e, após, os poços foram lavados 2 vezes com PBS e, em seguida, as culturas foram fixadas com metanol absoluto por 10 minutos e corados por método de Giemsa por 8 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram retiradas dos poços, montadas com Entellan® em lâminas histológicas e examinadas ao microscópio óptico Nikon Eclipse 50i em objetiva de 100x com óleo de imersão. Foram contadas 100 células por lamínula por grupo, em que foi determinado o número de células que fagocitaram e o número de células que fagocitaram mais que 4 partículas de zimosan (Figura 3). Esses números foram expressos como porcentagem de fagocitose e capacidade fagocítica (CF= nº de células que fagocitaram mais que 4 partículas/100), respectivamente. Os experimentos foram feitos em triplicata e foram repetidos pelo menos 2 vezes.

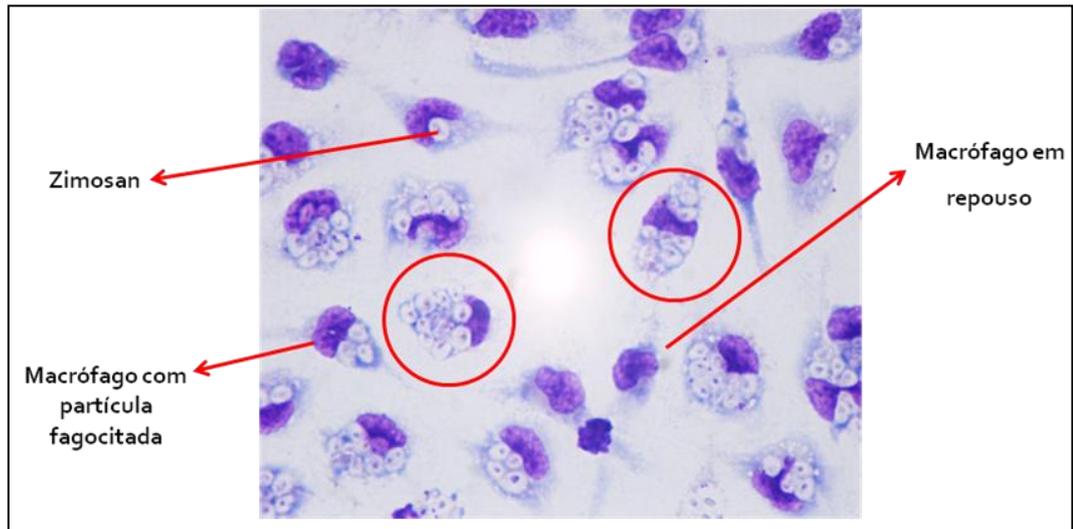


Figura 3 – Macrófagos peritoneais residentes após estimulação da fagocitose por zimosan A. Na fotomicrografia está representado macrófagos peritoneais em cultura após estimulação da fagocitose. Círculo: células que fagocitaram mais que quatro partículas. Aumento de 1000x.

4.10 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o teste *t* de Student. Para as análises e confecção dos gráficos foi utilizado o programa de computador *GraphPad Prism* versão 5.00 (GraphPad Prism Software, Inc.). Os valores obtidos foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do GH sobre a morfologia de macrófagos peritoneais

A partir da observação microscópica dos aspectos morfológicos de macrófagos peritoneais foi possível observar alterações na morfologia das células quando tratadas com GH nas concentrações de 20 e 200 ng/mL, nos tempos de 12 e 24 horas, quando comparadas aos controles.

Como mostrado na figura 4, no período de 12 horas, as células tratadas com GH na concentração de 20 ng/mL apresentaram forma arredonda com citoplasma abundante contendo vacúolos e com núcleo grande excêntrico em forma de rim. As células tratadas com o hormônio na concentração de 200 ng/mL apresentaram formas variadas, algumas arredondas com citoplasma abundante contendo vacúolos e muitas fusiformes com projeções citoplasmáticas. As células não tratadas se mostraram menores, com citoplasma escasso e poucas possuíam projeções citoplasmáticas. Quando as células foram tratadas por 24 horas, nas concentrações de 20 e 200 ng/mL se apresentaram fusiformes ou estreladas com projeções citoplasmáticas irregulares, grandes e numerosas quando comparadas as células não tratadas.

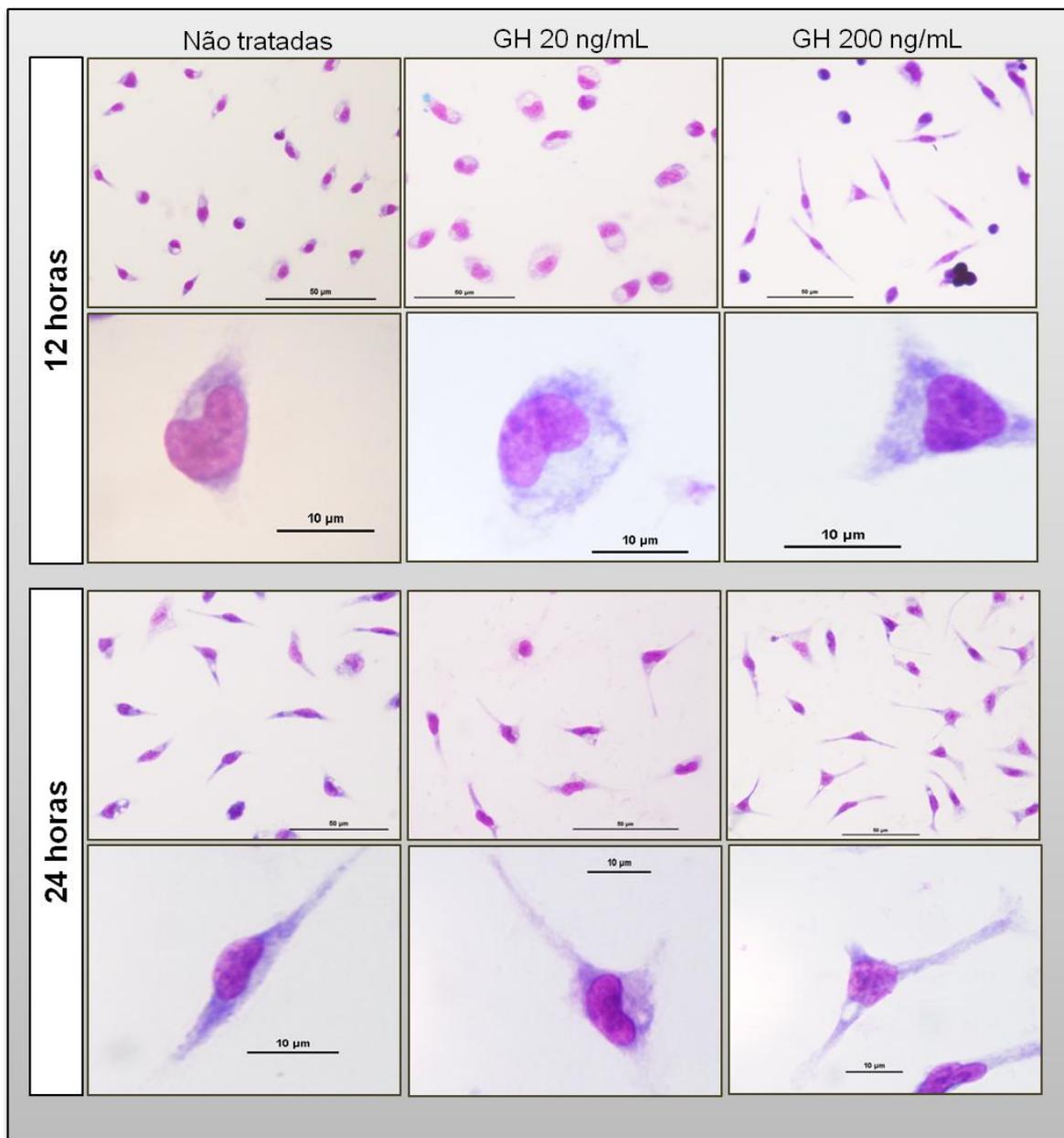


Figura 4 – Aspectos morfológicos de macrófagos peritoneais residentes. As fotomicrografias representam a morfologia das células quando foram tratadas com GH nas concentrações de 20 e 200 ng/mL, nos tempos de 12 e 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Primeira e terceira linha: aumento de 400x; segunda e quarta linha: aumento de 1000x.

5.2 Efeitos do GH na deposição de glicoproteínas da MEC por macrófagos

Culturas de macrófagos peritoneais residentes tratadas ou não com GH foram submetidas ao ensaio de imunofluorescência indireta para avaliação da deposição de glicoproteínas da MEC, fibronectina e laminina, em sua superfície. Em relação à deposição de laminina, quando as células foram tratadas com GH por um período de 6 horas, observou-se que o hormônio na concentração de 200 ng/mL foi capaz de aumentar a deposição desta glicoproteína pelos macrófagos quando comparado as culturas não tratadas. No período de 12 horas, foi visto que o GH nas concentrações de 20 e 200 ng/mL aumentou a deposição de laminina pelos macrófagos em comparação aos controles, sendo esse aumento de maneira dose dependente. Quando as células foram tratadas pelo período de 24 horas, a produção basal encontrava-se diminuída em relação aos outros períodos estudados, contudo, foi possível observar um discreto aumento na deposição de laminina nos macrófagos tratados com GH na concentração de 200 ng/mL quando comparado aos controles (Figura 5).

Conforme apresentado na figura 6, quanto à deposição de fibronectina sobre a superfície dos macrófagos, foi visto que o tratamento com GH nas concentrações de 20 e de 200 ng/mL, pelo período de 6 horas, aumentou a deposição desta glicoproteína quando comparado aos macrófagos não tratados. No tratamento pelo período de 12 horas, foi observado que o GH aumentou a deposição de fibronectina, em ambas as concentrações estudadas, sendo esse aumento mais evidente nas células que foram tratadas com GH, na concentração de 20 ng/mL. No entanto, quando os macrófagos foram tratados por 24 horas, foi observada uma diminuição na produção basal da fibronectina, contudo ainda houve um aumento sutil desta glicoproteína quando os macrófagos foram tratados com GH na concentração de 200 ng/mL.

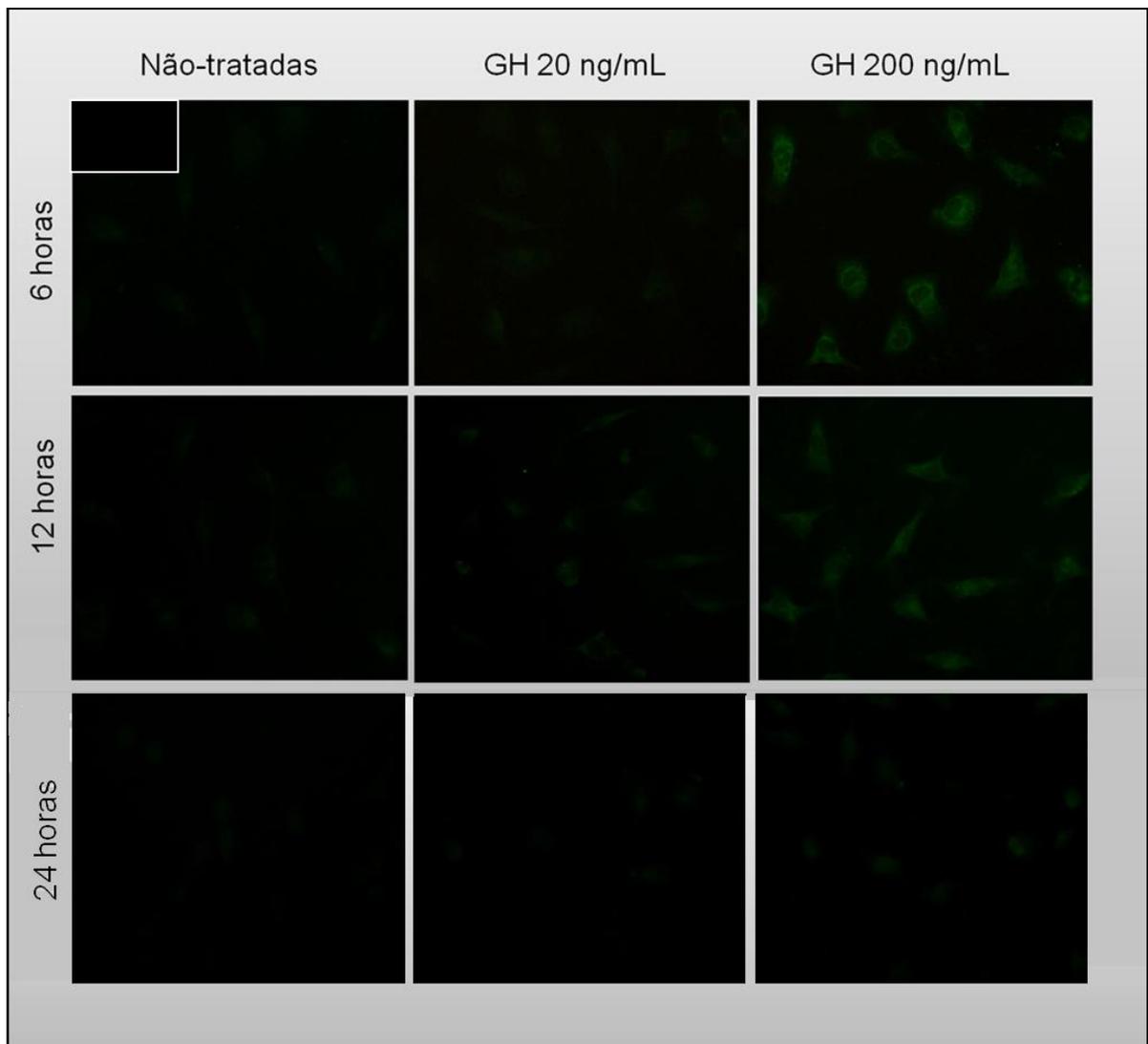


Figura 5 – Deposição de laminina por macrófagos peritoneais residentes. As fotomicrografias mostram a deposição de laminina por macrófagos através de imunofluorescência. As células foram tratadas com GH nas concentrações de 20 e 200 ng/mL, nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Inseto: controle negativo. Aumento de 400x.

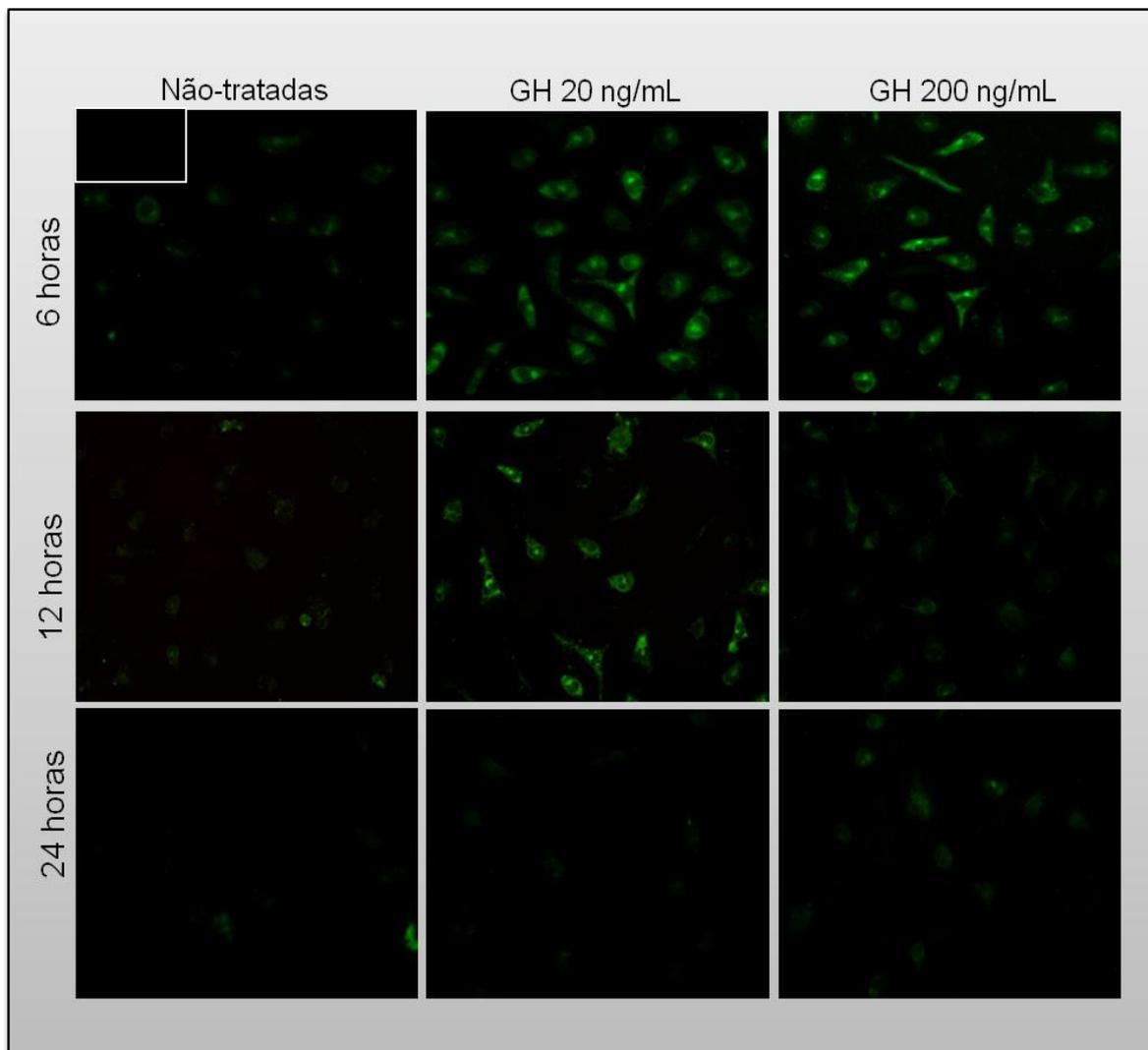


Figura 6 – Deposição de fibronectina por macrófagos peritoneais residentes. As fotomicrografias mostram a deposição de fibronectina por macrófagos através de imunofluorescência. As células foram tratadas com GH nas concentrações de 20 e 200 ng/mL, nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Inseto: controle negativo. Aumento de 400x.

5.3 Efeitos do GH sobre a expressão de integrinas por macrófagos

Uma vez que o tratamento com GH demonstrou influenciar a produção de laminina e fibronectina pelos macrófagos, despertou-se o interesse de avaliar a expressão dos receptores para tais moléculas na superfície das células. Para isso, macrófagos em cultura tratados com GH nas concentrações de 20 e 200 ng/mL, pelos períodos de 6, 12 e 24 horas, foram submetidos a análise citofluorimétrica para as integrinas Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$), VLA-5 ($\alpha_5\beta_1$) e VLA-6 ($\alpha_6\beta_1$), receptores para as moléculas da MEC, sendo os dois últimos os receptores para as glicoproteínas fibronectina e laminina, respectivamente.

Assim, foi possível observar que no período de 6 horas, as culturas tratadas com GH na concentração de 200 ng/mL apresentaram um aumento no percentual de células que expressam a cadeia alfa da integrina Mac-1, CD11b. Enquanto que nos demais tempos de tratamento e nas concentrações estudadas, não foi vista nenhuma alteração no percentual de macrófagos que expressam CD11b como também para os outros receptores estudados em relação aos seus respectivos controles (Tabela 1).

Quando foi analisada a média de intensidade de fluorescência emitida pelas células dos diferentes grupos nenhuma alteração foi observada nos tratamentos por 6 e 12 horas (Figuras 7 e 8), contudo quando os macrófagos foram tratados por 24 horas houve um aumento na média de fluorescência para a molécula CD11b e uma diminuição para a molécula CD49f (cadeia alfa da integrina VLA-6), nas células tratadas com 200 ng/mL de GH, não sendo observada nenhuma alteração na média de fluorescência para a molécula CD49e (cadeia alfa da integrina VLA-5) em relação aos seus respectivos controles (Figura 9).

Tabela 1 – Expressão de integrinas por macrófagos peritoneais tratados com GH.

Os macrófagos tratados *in vitro* com GH nas concentrações de 20 e 200 ng/mL, pelos períodos de 6, 12 e 24 horas foram submetidos a análise da expressão de integrinas por citometria de fluxo. Na tabela está expresso o número percentual médio de células que expressam as cadeias alfa das integrinas Mac-1, VLA-5 e VLA-6.

Grupos	Mac-1 (CD11b)	VLA-5 (CD49e)	VLA-6 (CD49f)
6 horas			
Não-tratadas	89,87 ± 0,42	91,46 ± 0,69	78,38 ± 10,28
GH 20 ng/mL	90,78 ± 0,56	90,95 ± 0,47	71,11 ± 1,18
GH 200 ng/mL	92,13 ± 0,27*	90,93 ± 0,92	70,18 ± 1,45
12 horas			
Não-tratadas	98,06 ± 0,18	92,24 ± 0,26	77,24 ± 2,21
GH 20 ng/mL	98,24 ± 0,32	91,56 ± 0,52	75,22 ± 1,22
GH 200 ng/mL	98,58 ± 0,21	91,65 ± 0,21	72,40 ± 1,07
24 horas			
Não-tratadas	99,53 ± 0,11	99,74 ± 0,05	98,00 ± 0,24
GH 20 ng/mL	99,40 ± 0,16	99,73 ± 0,13	98,55 ± 0,30
GH 200 ng/mL	99,18 ± 0,05	99,89 ± 0,02	97,73 ± 0,21

Os valores estão expressos como média ± EPM. (*)= p< 0,05 em relação ao grupo não tratado, n=3 por grupo.

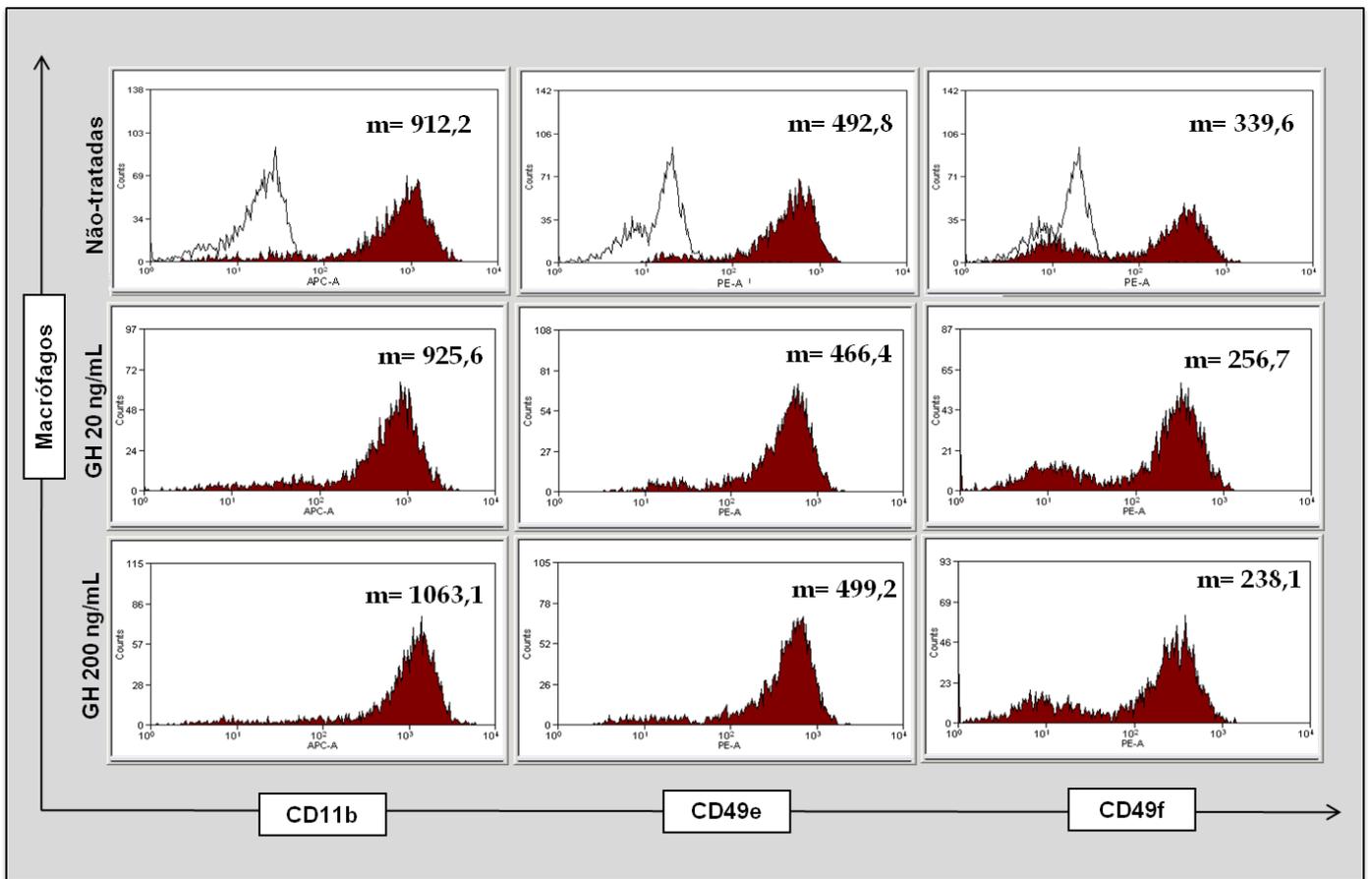


Figura 7 – Intensidade da fluorescência para as integrinas expressas na superfície de macrófagos peritoneais tratados com GH por 6 horas. Os macrófagos tratados *in vitro* com GH nas concentrações de 20 e 200 ng/mL, pelo período de 6 horas, foram submetidos a análise da expressão de integrinas por citometria de fluxo. Nos histogramas estão representadas as médias de intensidade de fluorescência para as cadeias alfa das integrinas Mac-1, VLA-5 e VLA-6 (vermelho cheio) e do controle Ig (preto vazado) de um experimento representativo. Em negrito, a direita, está expressa a média por grupo de tratamento.

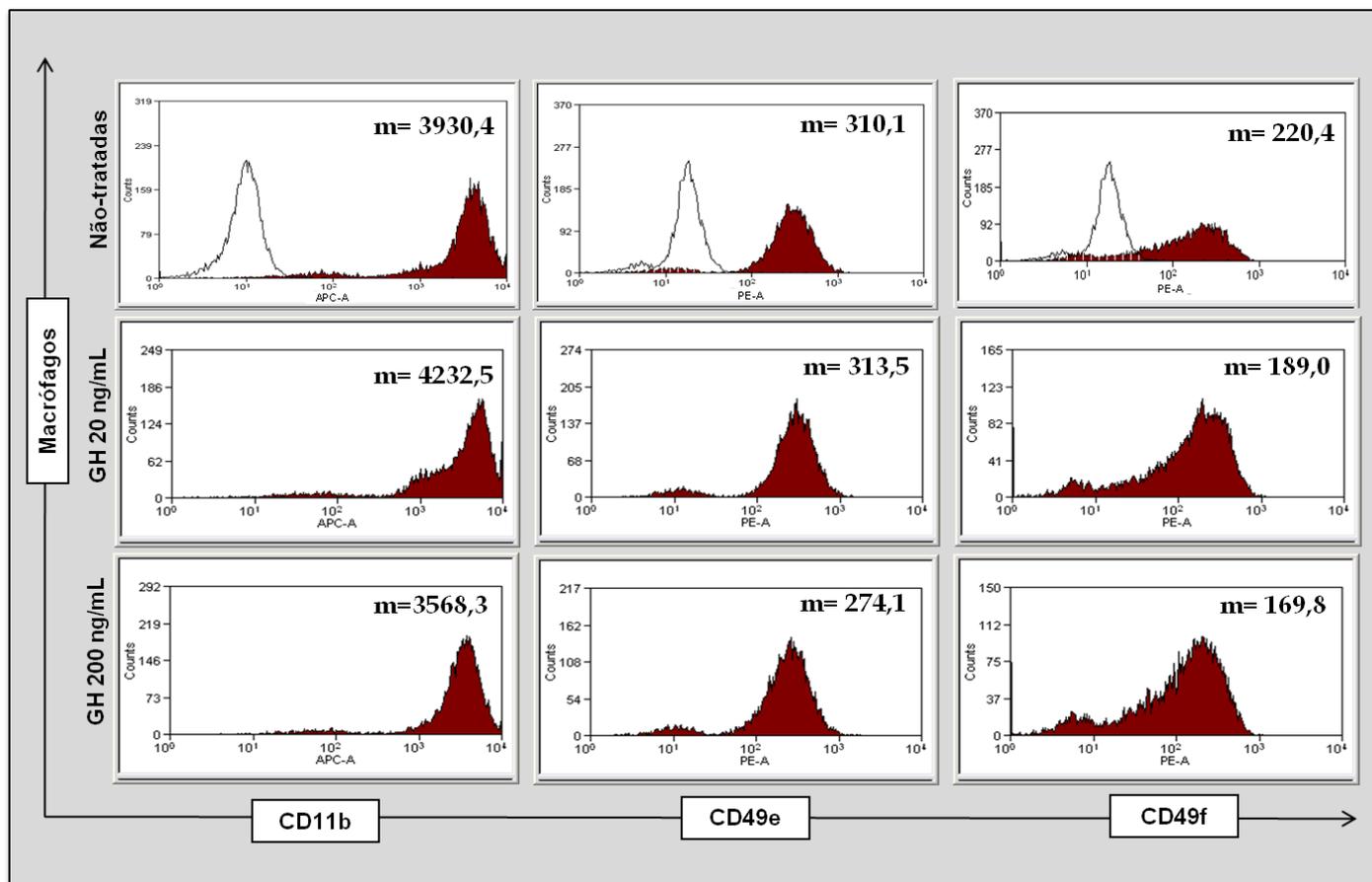


Figura 8 – Intensidade da fluorescência para as integrinas expressas na superfície de macrófagos peritoneais tratados com GH por 12 horas. Os macrófagos tratados *in vitro* com GH nas concentrações de 20 e 200 ng/mL, pelo período de 12 horas, foram submetidos a análise da expressão de integrinas por citometria de fluxo. Nos histogramas estão representadas as médias de intensidade de fluorescência para as cadeias alfa das integrinas Mac-1, VLA-5 e VLA-6 (vermelho cheio) e do controle Ig (preto vazado) de um experimento representativo. Em negrito, a direita, está expressa a média por grupo de tratamento.

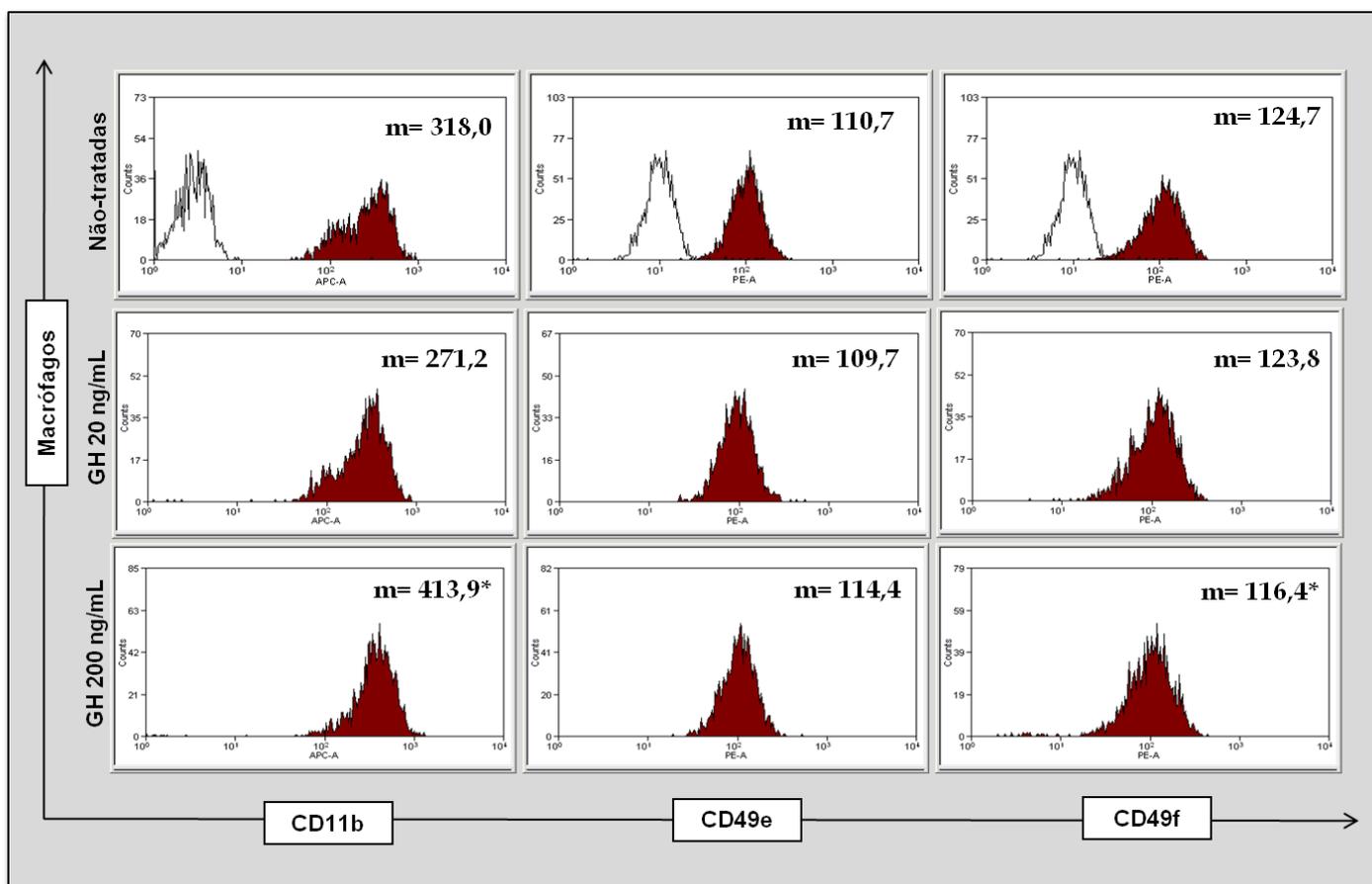


Figura 9 – Intensidade da fluorescência para as integrinas expressas na superfície de macrófagos peritoneais tratados com GH por 24 horas. Os macrófagos tratados *in vitro* com GH nas concentrações de 20 e 200 ng/mL, pelo período de 24 horas, foram submetidos a análise da expressão de integrinas por citometria de fluxo. Nos histogramas estão representadas as médias de intensidade de fluorescência para as cadeias alfa das integrinas Mac-1, VLA-5 e VLA-6 (vermelho cheio) e do controle Ig (preto vazado) de um experimento representativo. Em negrito, a direita, está expressa a média por grupo de tratamento. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado. $n=3$.

5.4 Análise dos efeitos do GH sobre aspectos funcionais de macrófagos peritoneais residentes

5.4.1 Efeitos do GH na adesão célula-matriz extracelular

Macrófagos peritoneais tratados *in vitro* com GH foram submetidos a ensaios de adesão às moléculas de matriz extracelular, laminina e fibronectina, com o objetivo de investigar se o hormônio era capaz de modular essa função nas células em estudo. Assim, foi possível verificar que as células tratadas com GH, na concentração de 200 ng/mL, por um período de 6 horas, apresentaram uma diminuição na adesão à laminina quando comparado ao seu respectivo controle (Figura 10A). Quando as células foram tratadas por 12 horas foi observada uma redução na adesão dessas à laminina, em ambas as concentrações estudadas, semelhante ao fenômeno que pode ser visto quando as células foram permitidas a aderir a BSA, uma molécula não relacionada a adesão (Figura 10B). Por outro lado, não foi observada nenhuma alteração na adesão à fibronectina, nas condições estudadas, nos grupos tratados em relação aos seus respectivos controles (Figuras 10A e 10B). Porém, quando foi comparada a adesão à fibronectina em relação a adesão à BSA e à laminina, observou-se um aumento significativo na adesão dos grupos tratados com GH, na concentração de 200 ng/mL pelo período de 6 horas e em ambas as concentrações pelo período de 12 horas (Tabela 2).

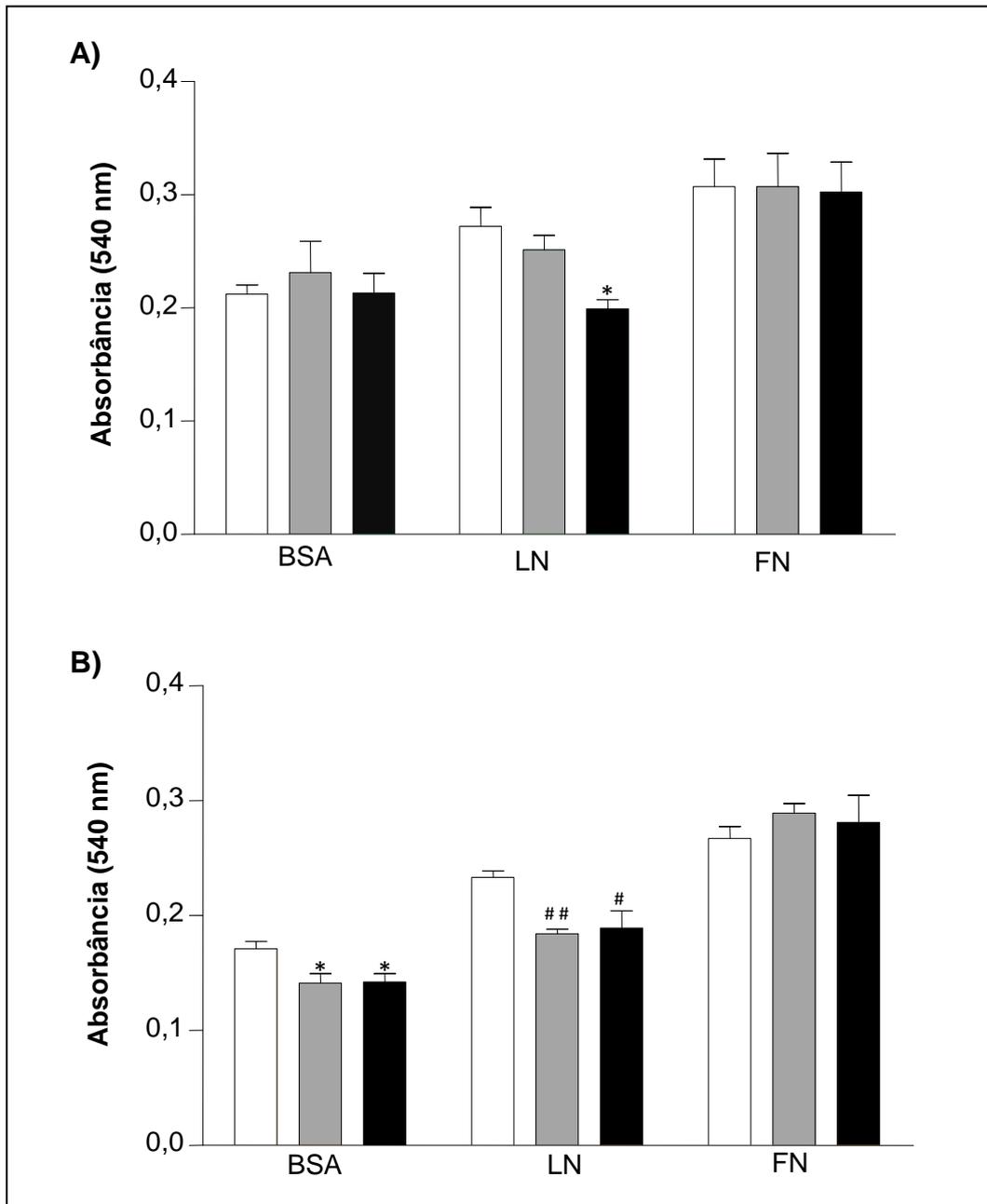


Figura 10 – Adesão *in vitro* de macrófagos peritoneais tratados com GH. Os macrófagos peritoneais tratados *in vitro* com GH, nas concentrações de 20 (cinza) e 200 ng/mL (preto) foram permitidos aderir em superfícies revestidas com laminina (LN), fibronectina (FN) ou BSA. Células não tratadas mantidas nas mesmas condições foram utilizadas como controle (CTR; branco). Nos gráficos estão representadas as médias de absorbância em 540 nm do corante cristal violeta após adesão das células. Em **A** está representado o tratamento por 6 horas e em **B** o tratamento por 12 horas. (*) $p=0,04$ em relação ao controle LN no tratamento por 6 horas; (*) $p < 0,03$ em relação ao controle BSA e (#) $p \leq 0,05$ em relação ao controle LN no tratamento por 12 horas.

Tabela 2 – Adesão *in vitro* de macrófagos peritoneais tratados com GH. Os macrófagos peritoneais tratados *in vitro* com GH, nas concentrações de 20 e 200 ng/mL pelos períodos de 6 e 12 horas foram permitidos aderir em superfícies revestidas com laminina (LN), fibronectina (FN) ou BSA. Na tabela estão expressos os valores de significância (p) quando os grupos foram comparados através do teste *t* de Student.

Grupos	Tratamentos					
	CTR		GH 20 ng/mL		GH 200 ng/mL	
	6 h	12 h	6 h	12 h	6 h	12 h
BSA vs Laminina	0,21	0,40	0,61	0,01	0,39	0,05
BSA vs Fibronectina	0,74	0,18	0,50	0,0003	0,01	0,005
Laminina vs Fibronectina	0,73	0,61	0,23	0,0004	0,002	0,03

5.4.2 Efeitos do GH na migração *in vitro* de macrófagos

Macrófagos peritoneais sob o estímulo do GH foram permitidos a migrar através de uma membrana de policarbonato contendo poros de 8 µm de diâmetro, em diferentes tempos de tratamento. Nessas condições, foi verificado um aumento no número de células migrantes quando os macrófagos foram tratados com GH na concentração de 200 ng/mL, na migração por 6 horas, quando comparado as células não tratadas. Quando as células foram permitidas a migrar por 12 horas sob estímulo do GH, na mesma concentração, foi observada uma redução significativa no número de células migrantes em relação as células que não foram tratadas (Figura 11).

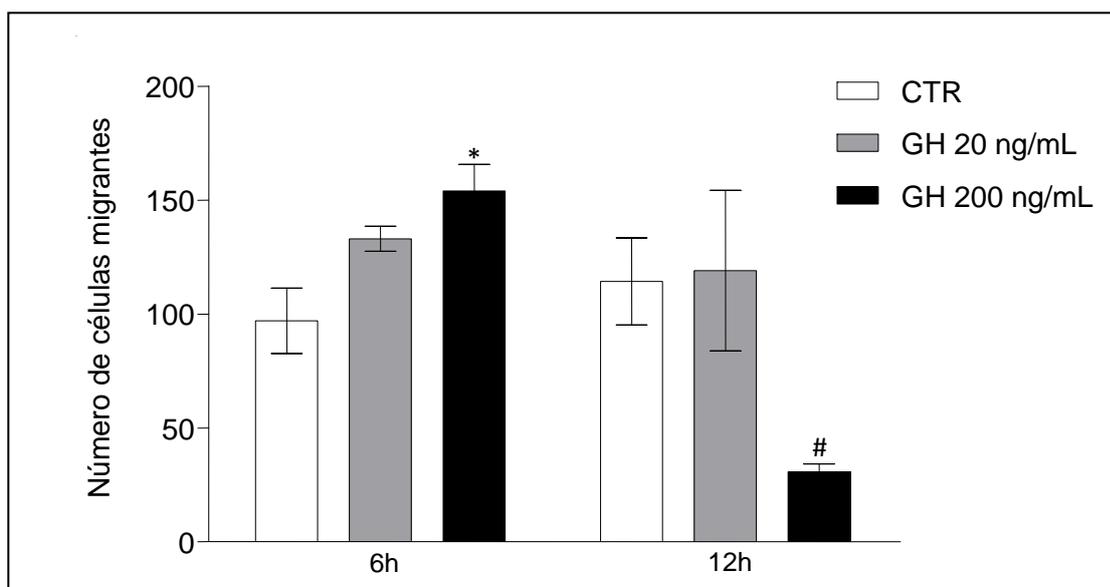


Figura 11 – Migração *in vitro* de macrófagos peritoneais residentes tratados com GH. Macrófagos isolados da cavidade peritoneal foram submetidos ao ensaio de migração em insertos *transwell* sob o estímulo do GH, nas concentrações de 20 e 200 ng/mL, durante 6 e 12 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle (CTR). No gráfico está expressa média \pm EPM do número de macrófagos que migraram para face inferior da membrana. (*) $p= 0,03$ em relação ao CTR no tratamento por 6 horas; (#) $p= 0,01$ em relação ao CTR no tratamento por 12 horas.

5.4.3 Efeitos do GH na atividade fagocítica de macrófagos peritoneais

Macrófagos peritoneais foram tratados *in vitro* com GH nas concentrações de 20 e 200 ng/ml durante 6, 12 ou 24 horas. Após os tempos de tratamento, a fagocitose foi avaliada adicionando 50 μ g/mL de zimosan A às culturas. Nessas condições, foi observado que o tratamento com GH, em ambas as concentrações e nos respectivos tempos de tratamento, não alterou significativamente a porcentagem de células que fagocitaram como também não interferiu na capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais (Figuras 12A e 12B).

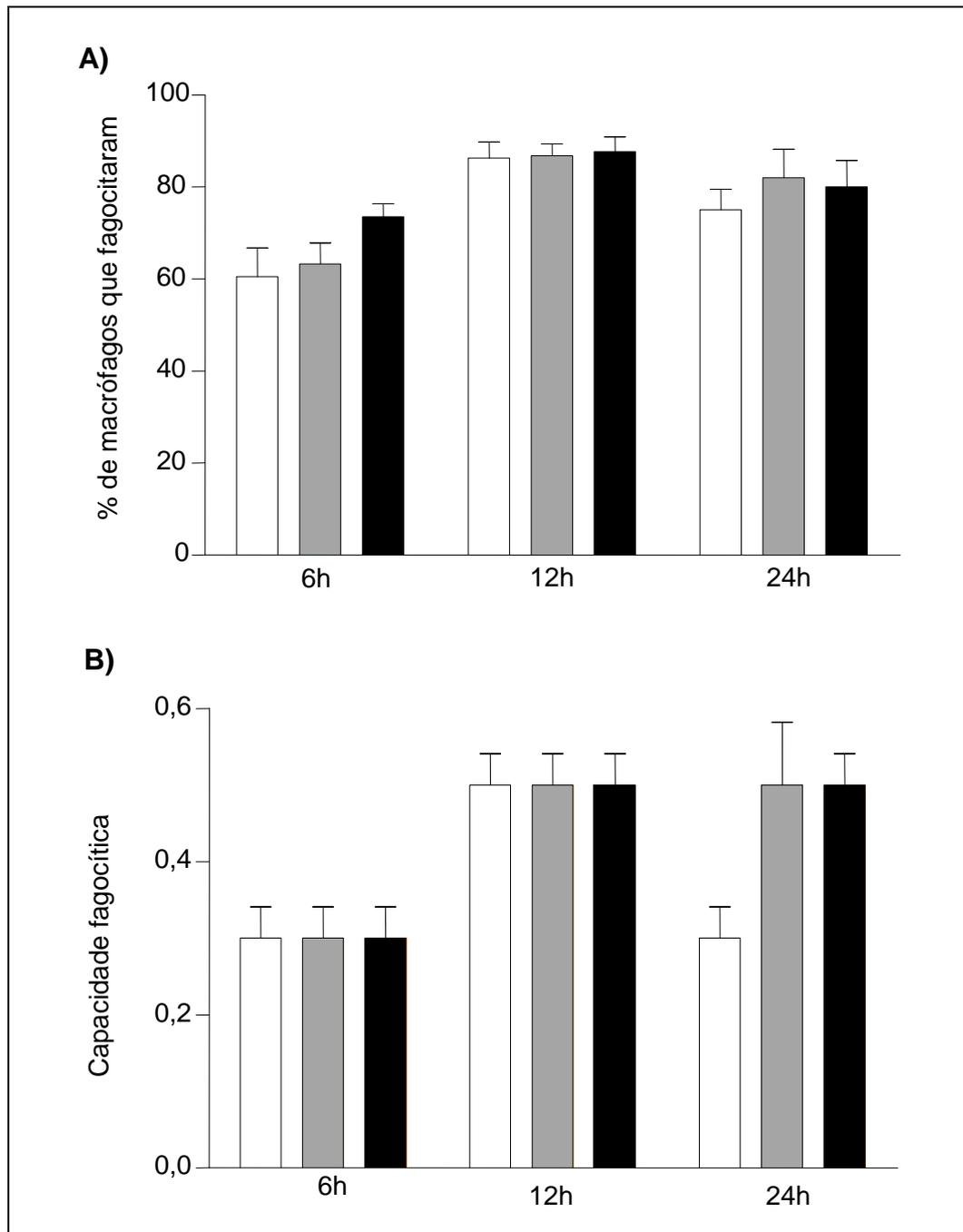


Figura 12 – Atividade fagocítica de macrófagos peritoneais tratados *in vitro* com GH. Macrófagos peritoneais foram tratados com GH nas concentrações de 20 (cinza) e 200 ng/mL (preto), pelos períodos de 6, 12 e 24 horas. Após tratamento, as células foram submetidas ao ensaio de fagocitose com zimosan A. Células não tratadas foram utilizadas como controle (CTR, branco). Em **A** está expresso o número percentual médio de macrófagos que fagocitaram as partículas de zimosan A, enquanto que em **B** representa a média da capacidade fagocítica dos macrófagos após estímulo com zimosan A. Os dados estão representados pela média \pm EPM.

Além de avaliar a atividade fagocítica após o tratamento *in vitro* com GH, também foram realizados ensaios em que camundongos *Swiss* foram tratados com GH nas doses de 20 e 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, por via intraperitoneal, por 7 dias consecutivos. Um dia após o último tratamento, macrófagos peritoneais foram coletados, plaqueados e expostos a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de zimosan A para estimulação da fagocitose. Com isso, foi possível observar que o tratamento *in vivo* com GH, em ambas as doses, aumentou o percentual de células que fagocitaram partículas de zimosan assim como a capacidade fagocítica dos macrófagos quando comparados às células obtidas dos animais tratados com PBS (grupo controle) (Figuras 13A e B).

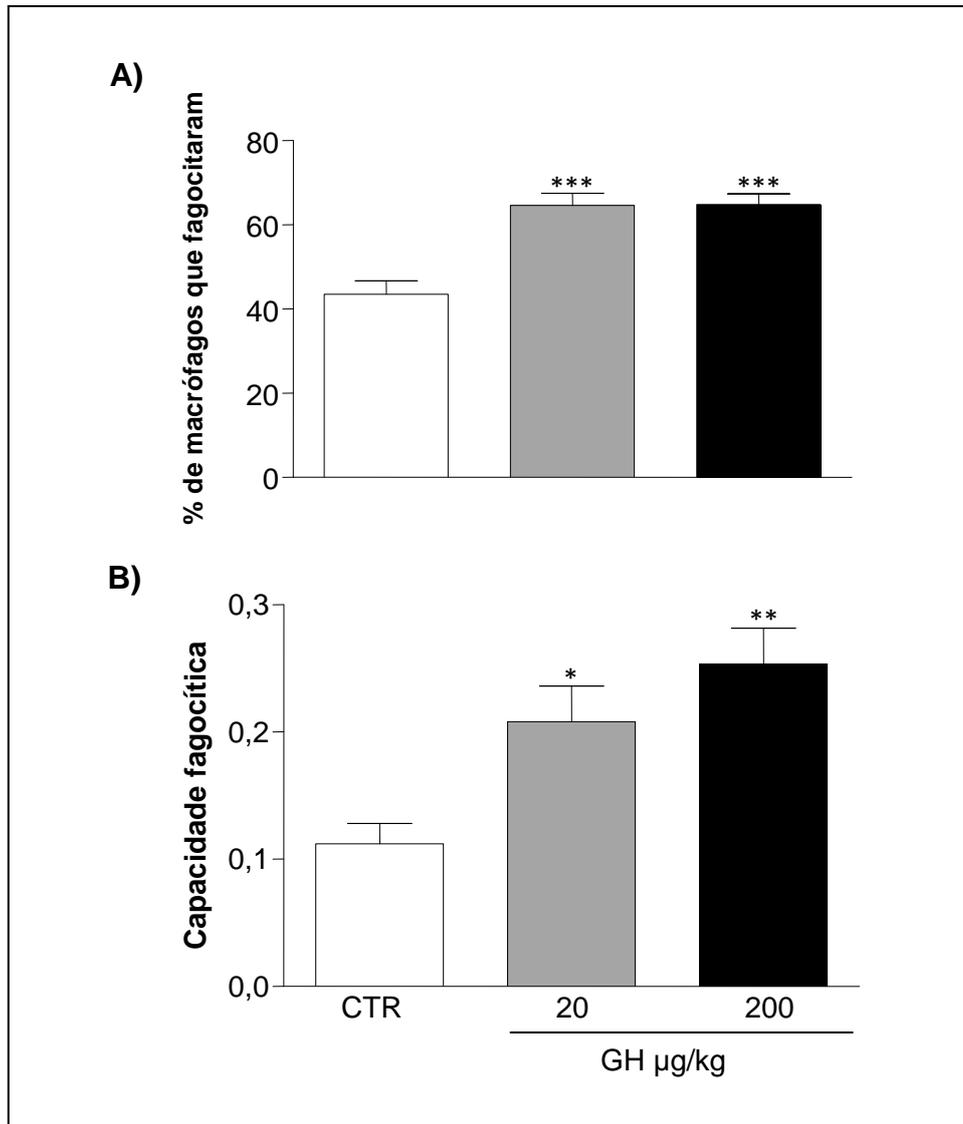


Figura 13 – Atividade fagocítica de macrófagos peritoneais após tratamento *in vivo* com GH. Camundongos *Swiss* foram tratados com GH nas concentrações de 20 (cinza) e 200 µg/kg (preto) durante 7 dias consecutivos. Um dia após a última dose, macrófagos coletados da cavidade peritoneal foram submetidos a ensaio de fagocitose com zimosan. Células dos animais tratados com PBS foram utilizadas como controle (CTR, branco). Em **A** está expresso o número percentual médio de macrófagos que fagocitaram as partículas de zimosan A em que (***) $p < 0,0006$ em relação ao CTR. Em **B** está representada a média da capacidade fagocítica dos macrófagos após estímulo com zimosan A, sendo (*) $p = 0,01$ e (**) $p = 0,003$ em relação ao CTR. Os dados estão representados pela média \pm EPM.

6 DISCUSSÃO

Os sistemas nervoso, imune e endócrino atuam de forma conjunta, através de um mecanismo de comunicação multidirecional que envolve hormônios, neurotransmissores, citocinas e estruturas anatômicas que os mantêm em contato, proporcionando a manutenção da homeostase do organismo. Dentre as substâncias que participam dessa interação está o GH, que tem se mostrado um potente imunomodulador, atuando no desenvolvimento, na atividade e na função de órgãos e células do sistema imunológico (Hattori, 2009). Particularmente, em macrófagos e monócitos, estudos já mostraram que o GH pode modular a produção de citocinas e quimiocinas, a produção de ROS e NO, além de atuar como um importante fator quimiotático e quimiocinético de monócitos (Edwards *et al.*, 1988; Warwick-Davies *et al.*, 1995a; Kähler *et al.*, 2001; Uronen-Hansson *et al.*, 2003; Sodhi e Tripathi, 2008). Ainda assim, alguns aspectos da biologia dos macrófagos sob o estímulo do GH não foram esclarecidos, por isso no presente estudo foram observados aspectos importantes da biologia de macrófagos peritoneais quando tratados *in vitro* e *in vivo* com GH.

Primeiramente, foi possível verificar que o hormônio induziu alterações morfológicas em macrófagos peritoneais em cultura. Essas células, naturalmente, se apresentam como células grandes (10-30 μm de diâmetro), irregulares, com citoplasma basófilo, núcleo ovóide e excêntrico, em forma de rim e, em geral, não apresentam nucléolos (Gartner e Hiatt, 2003). Tais características permitiram a identificação dessas células em cultura. Quando os macrófagos estão ativados, eles apresentam uma morfologia característica, com numerosos vacúolos, aumento de projeções citoplasmáticas, citoplasma e núcleo fracamente corados. Além disso, macrófagos ativados apresentam a membrana plasmática repleta de ondulações, aumento na adesão e espraiamento, aumento de enzimas lisossomais, indução da síntese de DNA e aumento da atividade bactericida (Cleary *et al.*, 1999). Neste estudo, algumas dessas alterações estavam presentes nas células quando foram tratadas com GH nas concentrações de 20 e 200 ng/mL, nos tempos de 12 e 24 horas, em que foi possível observar células com citoplasma abundante, núcleo grande e algumas com projeções citoplasmáticas.

Alterações morfológicas semelhantes foram descritas em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 em que as células tratadas com GH, nas concentrações de 4,8 e 48 ng/mL, apresentaram alterações na sua forma, com projeções citoplasmáticas uni e bipolares, formatos irregulares e cromatina pouco condensada quando comparadas aos controles (Smith *et al.*, 2000). Contudo, as mudanças na morfologia descrita no presente estudo foram observadas nas primeiras 12 horas de tratamento diferente do estudo realizado por Smith e colaboradores (2000), em que as alterações foram observadas após o tratamento por 24 horas. Outros dados da literatura mostraram que o tratamento com GH, em altas concentrações, durante 30 minutos, foi capaz de provocar mudanças na morfologia de neutrófilos caninos quando estes foram pré-tratados com IL-8 (Petersen *et al.*, 2000).

Outro aspecto analisado neste trabalho foi a ação do GH sobre a deposição de moléculas da MEC por macrófagos peritoneais. A MEC é um complexo de moléculas, constituído de água, proteínas e polissacarídeos, produzido pelas células, que atuam na sustentação, diferenciação e homeostase dos diferentes tecidos e órgãos do organismo (Frantz *et al.*, 2010). Os dados obtidos no presente trabalho mostraram que macrófagos peritoneais são hábeis em produzir moléculas da MEC, fibronectina e laminina, estando de acordo com vários dados da literatura que demonstram não somente a produção dessas moléculas, mas também de colágeno por essas células (Johansson *et al.*, 1979; Alitalo *et al.*, 1980; Wicha e Huard, 1983; Vaage e Lindblad, 1990).

Foi observado que o tratamento *in vitro* com GH, nas condições estudadas, foi capaz de aumentar a deposição de fibronectina por macrófagos peritoneais. Essa molécula é uma glicoproteína adesiva componente da matriz extracelular, abundante na maioria dos tecidos do corpo, sendo sua principal função a adesão das células ao interstício do tecido, atuando via receptores presentes na superfície das células. Além disso, a fibronectina também atua no controle do crescimento, migração, diferenciação e sobrevivência das células, sendo a sinalização para essas ações realizada através de integrinas presentes na superfície celular (Yi e Ruoslahti, 2001). A fibronectina tem um papel revelante na função de macrófagos em que já foi visto que esta glicoproteína é capaz de estimular a produção do fator de crescimento celular, aumenta a expressão de receptores Fc e forma uma cobertura sobre restos celulares, facilitando a fagocitose (Mosher, 1984). Ainda, a fibronectina produzida

por macrófagos alveolares, em lesões do parênquima pulmonar, é um fator quimiotático para fibroblastos (Rennard *et al.*, 1981).

Dados da literatura mostraram que substâncias que atuam na ativação de macrófagos durante o processo inflamatório podem atuar sobre a produção de fibronectina. O IFN- γ , a principal citocina ativadora de macrófagos, é capaz de aumentar a síntese e a secreção dessa molécula de MEC por macrófagos peritoneais primados (Cofano *et al.*, 1984). Em outros estudos, foi visto que as citocinas IL-1 α , IL-6 e TNF- α são capazes de aumentar a produção de fibronectina por monócitos humanos (Kitamura *et al.*, 2000). Além disso, um trabalho recente demonstrou que a fibronectina é produzida por células imunes de perfil de resposta inflamatória Th₁, destacando a importância dessa molécula em processos inflamatórios (Sandig *et al.*, 2009). De acordo com os dados obtidos no presente trabalho, é possível que o GH atue como um agente pró-inflamatório sobre os macrófagos, induzindo a produção de fibronectina de forma semelhante às citocinas acima relatadas.

O GH também foi capaz de aumentar a deposição de laminina por macrófagos peritoneais. A laminina é uma glicoproteína adesiva presente principalmente na membrana basal dos tecidos de revestimento e, assim como a fibronectina, é capaz de modular a sobrevivência, migração e diferenciação celular pela sua interação com integrinas. Estudos mostraram que a laminina é expressa na superfície de macrófagos peritoneais e que interfere na adesão, fagocitose, citotoxicidade e na migração de macrófagos e monócitos (Shaw e Mercurio, 1989; Pedraza *et al.*, 2000).

Os dados apresentados neste estudo somam-se às investigações anteriores em que foi vista a ação do GH sobre a produção de MEC. No trabalho de de Mello-Coelho e colaboradores (1997), o tratamento *in vitro* com GH aumentou a produção de MEC por células epiteliais tímicas. Em concordância com esses dados, foi observado um aumento na deposição de laminina e fibronectina em timos de camundongos transgênicos para GH, como também nos timos de camundongos tratados *in vivo* com esse hormônio (Smaniotto *et al.*, 2005).

Os macrófagos migram através dos tecidos com o auxílio das moléculas de adesão presentes em sua superfície que, por sua vez, se ligam a moléculas da matriz extracelular. Os eventos resultantes dessa interação são essenciais para a

função dos macrófagos na defesa do organismo e no reparo tecidual (Juliano e Haskill, 1993). Dentre as moléculas de adesão que participam dessas interações estão as integrinas. Essas moléculas compõem uma família de receptores transmembranares heterodiméricos formados por duas cadeias, α e β , associadas através de ligações não-covalentes (Gahmberg *et al.*, 1997).

As integrinas são receptores que atuam na adesão entre as células, na adesão das células com a matriz extracelular e na adesão entre as células e os patógenos, agindo diretamente na transmigração de leucócitos, na migração celular nos tecidos, na formação das sinapses imunológicas e na fagocitose (Luo *et al.*, 2007). Esses receptores podem ainda transduzir sinais para dentro da célula que atuam no rearranjo do citoesqueleto, na transcrição gênica, no movimento, proliferação e sobrevivência da célula e na ativação de funções celulares específicas (Berton e Lowell, 1999). Esse grupo de receptores se divide em subfamílias, de acordo com os tipos de cadeia β , que podem estar associadas a diferentes tipos de cadeia α , criando uma diversidade de receptores que amplia a possibilidade de interações com diferentes ligantes (Humphries *et al.*, 2006).

Tendo em vista que o tratamento com GH alterou a produção de fibronectina e laminina por macrófagos, a próxima etapa deste estudo foi avaliar a expressão das integrinas que atuam como receptores para estas glicoproteínas, em macrófagos peritoneais tratados *in vitro* com GH. Uma das integrinas analisadas foi a $\alpha_M\beta_2$ ou Mac-1 (CD11b/CD18). Ela pertence à subfamília das integrinas β_2 e é expressa em monócitos, macrófagos, neutrófilos e células NK (Gil *et al.*, 2009). É uma integrina conhecida por ter uma variedade de ligantes, dentre eles pode-se destacar o fragmento iC3b do complemento, a fibronectina, a laminina, o colágeno, o fibrinogênio e a molécula de adesão intracelular -1 (ICAM-1) (Rosales e Juliano, 1995; Lishko *et al.*, 2003). Estudos têm mostrado que a Mac-1 está envolvida na migração de macrófagos para os vasos linfáticos durante processos inflamatórios como também medeia a internalização de patógenos por essas células (Cao *et al.*, 2005; Oliva *et al.*, 2008; Gil *et al.*, 2009).

Foi verificado que aproximadamente 90% dos macrófagos peritoneais residentes utilizados neste estudo expressavam a Mac-1, semelhante ao apresentado no trabalho de Ho e Springer (1982) em que foi encontrado um percentual de 86% de macrófagos positivos para esta integrina. Quando os macrófagos foram tratados

com GH, na concentração de 200 ng/mL, este percentual foi de 92%, nas primeiras 6 horas de tratamento. No tratamento por 24 horas, apesar de não ter havido alteração significativa no percentual de células, a média da intensidade de fluorescência foi maior nos macrófagos tratados com GH, na concentração de 200 ng/mL, em comparação com os controles. Essas observações mostram que o GH induz a expressão da Mac-1, corroborando com estudos anteriores em que foi visto um aumento na expressão da integrina em neutrófilos tratados *in vitro* e *in vivo* com GH (Inoue *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 2000).

Outra integrina avaliada foi a $\alpha_6\beta_1$ (CD49f/CD29) ou VLA-6, a qual possui a laminina como um de seus ligantes. Estudos mostraram que essa integrina está envolvida na adesão e na migração de macrófagos frente à laminina (Shaw *et al.*, 1993; Shaw e Mercurio, 1994).

No presente estudo, foi observado que macrófagos peritonais residentes expressavam o VLA-6, contudo tanto o percentual de células que expressavam o receptor quanto a sua média de intensidade de fluorescência foi menor em relação aos outros receptores estudados. Quando as células foram tratadas com GH, na concentração de 200 ng/mL, a expressão do VLA-6 foi ainda menor do que o seu respectivo controle. Esse dado se mostra controverso uma vez que foi verificado que o hormônio, nessa mesma concentração, aumentou a deposição de laminina por macrófagos. Todavia, já foi demonstrado que a integrina Mac-1 é capaz de se ligar a laminina (Lishko *et al.*, 2003). Assim, é possível que o aumento na deposição de laminina observado em macrófagos tratados com GH seja em consequência de sua interação com a Mac-1, integrina que teve sua expressão aumentada pelo GH, como já demonstrado anteriormente.

Ao contrário das outras integrinas estudadas, a integrina VLA-5 ($\alpha_6\beta_1$; CD49e/CD29), receptor para fibronectina, não teve a sua expressão alterada pelo GH, apesar do tratamento com o hormônio ter aumentado a deposição de fibronectina na superfície dos macrófagos. De forma semelhante, nos estudos realizados por Smaniotto e colaboradores (2005) foi demonstrado que o GH não alterou a expressão das integrinas VLA-4, VLA-5 e VLA-6 na superfície de tímocitos, embora tenha sido observado um aumento na deposição de laminina no microambiente tímico.

A adesão das células à MEC é mediada por moléculas de adesão e seus ligantes, constituindo um dos eventos iniciais do processo de migração celular. Sabendo-se que o GH foi capaz de modular tanto a expressão de moléculas de adesão quanto a deposição de glicoproteínas da MEC em macrófagos peritoneais, foi proposto avaliar a adesão dessas células frente a laminina e a fibronectina após tratamento *in vitro* com GH.

Dessa forma, foi observado que macrófagos peritoneais utilizados neste trabalho possuíam uma maior aderência à fibronectina em comparação com a laminina e com o controle BSA. Em outros estudos já foi visto que monócitos e macrófagos aderem preferencialmente a superfícies revestidas com fibronectina do que em revestimentos de laminina (Mercurio e Shaw, 1988; Shaw e Mercurio, 1989). Quando as células foram tratadas com GH, pelo período de 6 horas, na concentração de 200 ng/mL, foi observada uma diminuição na adesão dos macrófagos à laminina. Resultados semelhantes foram observados quando os macrófagos foram tratados por 12 horas com GH em que tanto a adesão à laminina quanto à BSA estava reduzida, em ambas as concentrações estudadas. Esses dados indicam uma possível regulação negativa do GH sobre a adesão dos macrófagos nesses substratos. Corroborando com esses dados, Bauvois e colaboradores (1996) demonstraram uma redução na adesão de monócitos humanos à laminina após o tratamento com IFN- γ por 24 horas. Por outro lado, no estudo de Shaw e Mercurio (1989), o IFN- γ como também o LPS aumentou a aderência de macrófagos peritoneais em superfícies revestidas com laminina.

O tratamento com GH pelos períodos de 6 e 12 horas não alterou a adesão dos macrófagos à fibronectina quando comparado aos seus respectivos controles. Da mesma forma que não foi observada nenhuma alteração na expressão de seu receptor de superfície, o VLA-5 (CD49e/CD29; $\alpha_5\beta_1$). Dados anteriores já haviam demonstrado que o GH não interfere na aderência de monócitos a fibronectina (Warwick-Davies *et al.*, 1995b). De modo semelhante, o trabalho de Shaw e Mercurio (1989) mostrou que tanto o IFN- γ quanto o LPS não têm efeito sobre a adesão de macrófagos à fibronectina. Esses últimos autores acreditam que a adesão à fibronectina seja constitutiva em macrófagos, não sendo necessário um estímulo ou uma ativação prévia, diferente do que foi demonstrado para a adesão à laminina.

Uma análise mais detalhada do fenômeno mostrou que as células tratadas com o GH apresentaram uma melhor aderência à fibronectina em comparação à adesão à laminina e à BSA, indicando uma modulação positiva do hormônio sobre a adesão de macrófagos à fibronectina. Estudos futuros utilizando bloqueadores para os receptores desses substratos podem auxiliar na elucidação do mecanismo existente no processo de adesão dos macrófagos frente às moléculas de matriz extracelular após tratamento com GH.

Durante a vigilância imunológica, os macrófagos migram pelos tecidos, removendo partículas estranhas e células mortas. Os macrófagos também são recrutados para sítios de inflamação onde atuam na eliminação de patógenos, de células infectadas e na resolução do processo inflamatório. Essa movimentação celular é mediada pela interação dos macrófagos com quimiocinas, fatores de crescimento, hormônios e produtos microbianos como o LPS. Estudos anteriores haviam demonstrado que o GH é capaz de atuar como um fator quimiotático e quimicínico em monócitos humanos e em neutrófilos (Petersen *et al.*, 2000; Kähler *et al.*, 2001). Todavia, ainda não há dados na literatura que mostram a ação desse hormônio sobre a migração de macrófagos residentes.

Assim, utilizando um modelo *in vitro* de migração em insertos *transwell*, foi possível observar que macrófagos peritoneais residentes tratados com GH, pelo período de 6 horas, na concentração de 200 ng/mL, apresentaram um aumento no número de células migrantes. Diferentemente, o tratamento com o GH pelo período de 12 horas, na mesma concentração, diminuiu a migração dos macrófagos. A razão pela qual as células responderam de maneira diferente nesse ensaio ainda não está clara. É possível que o tratamento mais longo com o hormônio provoque um bloqueio nas vias de sinalização envolvidas na migração celular, contudo mais estudos são necessários para melhor elucidar essa questão.

A função principal dos macrófagos é a fagocitose, é através deste processo que estas células destroem microrganismos e eliminam restos celulares dos tecidos. O tratamento *in vitro* com GH não foi capaz de alterar a fagocitose de macrófagos peritoneais. Dado semelhante ao demonstrado por Warwick-Davies e colaboradores (1995b) em que o GH *in vitro* não interferiu na fagocitose de *Mycobacterium tuberculosis* por monócitos. Neste trabalho, os autores sugerem que o hormônio pode necessitar de outra substância ou fator, que não está presente *in vitro*, que

atuando de forma conjunta pode auxiliar o GH a atuar como modulador da resposta imune *in vivo*.

Sabe-se que parte das ações estimuladas pelo GH são mediadas indiretamente pelo IGF-1, que é secretado pelo fígado, como também por células do sistema imune, sob estímulo do GH. Estudos mostram que macrófagos sintetizam IGF-1 e que a linhagem de macrófagos murinos J-774, sob estímulo de GH, produz esse fator de crescimento (Rom *et al.*, 1988; Hochberg *et al.*, 1992; Arkins *et al.*, 1993). O IGF-1, de modo semelhante ao GH, é capaz de ativar macrófagos para produção de ânions superóxidos e atua com um fator quimioatraente para macrófagos humanos. (Edwards *et al.*, 1992b; Furundzija *et al.*, 2010). Diante dessas observações, foi realizado o tratamento *in vivo* com GH em que foi possível observar um aumento na atividade fagocítica de macrófagos peritoneais residentes obtidos de animais tratados com GH nas doses de 20 e 200 µg/kg durante 7 dias consecutivos. Estes resultados corroboram com os dados apresentados por Edwards e colaboradores (1992a) em que o GH *in vivo* atua sobre macrófagos peritoneais aumentando a produção de ânions superóxidos e a fagocitose de bactérias.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Em conjunto, os dados apresentados neste trabalho demonstram que o GH possui efeitos importantes na fisiologia de macrófagos. O tratamento *in vitro* com GH altera a morfologia, aumenta a deposição de moléculas da matriz extracelular e modula a expressão de integrinas em macrófagos peritoneais. Além disso, o hormônio interfere em diferentes aspectos da função dessas células. Foi visto que o GH altera a adesão de macrófagos às moléculas da MEC, fibronectina e laminina, como também exerce efeitos distintos na migração dessas células, dependendo do tempo de tratamento. O tratamento *in vitro* com GH não interfere na fagocitose realizada pelos macrófagos, contudo o tratamento *in vivo* com o hormônio é capaz de aumentar a atividade fagocítica dessas células. Assim, corroborando com outros estudos existentes na literatura, fica evidente que o GH pode agir na resposta imune como um ativador de macrófagos, o que contribui para o conhecimento das interações existentes entre o sistema imunológico e o sistema neuroendócrino, em condições fisiológicas e patológicas.

Para maior compreensão dos resultados aqui apresentados e buscando aprofundar o conhecimento sobre os efeitos do GH na fisiologia dos macrófagos, pretende-se dar continuidade a este estudo com a avaliação dos mecanismos envolvidos na migração dos macrófagos frente à moléculas da MEC, sob estímulo do GH. E, ainda, serão analisados quais os efeitos do tratamento *in vivo* com GH sobre a expressão de integrinas, na adesão e na migração de macrófagos peritoneais residentes.

REFERÊNCIAS¹

Abbas AK, Lichtman AH: Imunologia celular e molecular. ed 5. Rio de Janeiro, Elsevier, 2005.

Alitalo K, Hovi T, Vaheri A: Fibronectin is produced by human macrophages. J Exp Med 1980; 151: 602-613.

Arkins S, Rebeiz N, Biragyn A, Reese DL, Kelley KW: Murine macrophages express abundant insulin-like growth factor-I class I Ea and Eb transcripts Endocrinology 1993; 133 (5): 2334-2343.

Batista ML Jr, Santos RV, Cunha LM, Mattos K, Oliveira EM, Seelaender MC, Costa Rosa LF: Changes in the pro-inflammatory cytokine production and peritoneal macrophage function in rats with chronic heart failure. Cytokine 2006; 34 (5-6): 284-290.

Bauvois B, Van Weyenbergh J, Rouillard D, Wietzerbin J: TGF-beta1-stimulated adhesion of human mononuclear phagocytes to fibronectin and laminin is abolished by IFN-gamma: dependence on alpha 5 beta 1 and beta 2 integrins. Exp Cell Res 1996; 222 (1): 209-217.

Berton G, Lowell CA: Integrin signalling in neutrophils and macrophages. Cell Signal 1999; 11 (9): 621-635.

Blalock JE, Smith EM: Conceptual development of the immune system as a sixth sense. Brain Behav Immun 2007; 21: 23-33.

Blalock JE: A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. Physiol Rev 1989; 69 (1): 1-27.

Blazar BR, Brennan CA, Broxmeyer HE, Shultz LD, Vallera DA: Transgenic mice expressing either bovine growth hormone (bGH) or human GH releasing hormone (hGRH) have increase splenic progenitor cell colony formation and DNA synthesis *in vitro* and *in vivo*. Exp Hematol 1995; 23 (13):1397-1406.

Borghetti P, Saleri R, Mocchegiani E, Corradi A, Martelli P: Infection, immunity and the neuroendocrine response. Vet Immunol Immunopathol 2009; 130 (3-4): 141-162.

¹ Referências elaboradas de acordo com o modelo utilizado pelo periódico *Neuroimmunomodulation*. Instruções disponíveis no site: <http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?Aktion=JournalGuidelines&ProduktNr=224176#0>

Bos H, de Souza W: Phagocytosis of yeast: a method for concurrent quantification of binding and internalization using differential interference contrast microscopy. *J Immunol Methods* 2000; 238 (1-2): 29-43.

Cao C, Lawrence DA, Strickland DK, Zhang L: A specific role of integrin Mac-1 in accelerated macrophage efflux to the lymphatics. *Blood* 2005; 106 (9): 3234-324.

Cleary JA, Kelly GE, Husband AJ: The effect of molecular weight and b-1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)-b-D glucan. *Immunol Cell Biol* 1999; 77: 395–403.

Cofano F, Comoglio Pm, Landolfo S, Tarone G: Mouse immune interferon enhances fibronectin production of elicited macrophages. *J Immunol* 1984; 133 (6): 3102-3106.

de Mello-Coelho V, Villa-Verde DM, Dardenne M, Savino W: Pituitary hormones modulate cell-cell interactions between thymocytes and thymic epithelial cells. *J Neuroimmunol* 1997; 76 (1-2): 39–49.

Dinarelli CA: Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect dis* 1999; 179 (Suppl 2): S294–304.

Edwards CK 3rd, Arkins S, Younger LM, Blum A, Dantzer R, Kelley KW: The macrophage-activating properties of growth hormone. *Cell Mol Neurobiol* 1992b; 12 (5): 499-510.

Edwards CK 3rd, Ghiasuddin SM, Libby MY, Lorence RM, Arkins S, Dantzer R, Kelley KW: In vivo administration of recombinant growth hormone or gamma interferon activates macrophages: enhanced resistance to experimental *Salmonella typhimurium* infection is correlated with generation of reactive oxygen intermediates. *Infect Immun* 1992a; 60: 2514–2521.

Edwards CK 3rd, Ghiasuddin SM, Schepper JM, Younger LM & Kelley KW: A newly defined property of somatotropin: priming of macrophages for production of superoxide anion. *Science* 1988; 239 (4841 Pt 1): 769-771.

Edwards CK 3rd, Lorence RM, Dunham DM, Arkins S, Younger LM, Greager JA, Walter RJ, Dantzer R, Kelley KW: Hypophysectomy inhibits the synthesis of tumor necrosis factor alpha by rat macrophages: partial restoration by exogenous growth hormone or interferon gamma. *Endocrinology* 1991b; 128 (2): 989-986.

Edwards CK 3rd, Younger LM, Lorence RM, Dantzer R, Kelley KW: The pituitary gland is required for protection against lethal effects of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991a; 88: 2274-2277.

Flannagan RS, Cosío G, Grinstein S: Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 355-366.

Frantz C, Stewart KM, Weaver VM: The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 2010; 123 (Pt 24): 4195-4200.

Frare EO, Santello FH, Caetano LC, Caldeira JC, Toldo MPA, Prado Jr JC: Growth hormones therapy in immune response against *Trypanosoma cruzi*. *Res Vet Sci* 2010; 88 (2): 273-278.

Fu YK, Arkins S, Fuh G, Cunningham BC, Wells JA, Fong S, Cronin MJ, Dantzer R, Kelley KW: Growth Hormone Augments Superoxide Anion Secretion of Human Neutrophils by Binding to the Prolactin Receptor. *J Clin Invest* 1992; 89:451-457.

Fu YK, Arkins S, Li YM, Dantzer R, Kelley KW: Reduction in Superoxide Anion Secretion and Bactericidal Activity of Neutrophils from Aged Rats: Reversal by the Combination of Gamma Interferon and Growth Hormone. *Infect Immun* 1994; 62 (1): 1-8.

Furundzija V, Fritzsche J, Kaufmann J, Meyborg H, Fleck E, Kappert K, Stawowy P: IGF-1 increases macrophage motility via PKC/p38-dependent α v β 3-integrin inside-out signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394 (3): 786-791.

Gahmberg CG, Tolvanen M, Kotovuori P: Leukocyte adhesion: Structure and function of human leukocyte β_2 -integrins and their cellular ligands. *Eur J Biochem* 1997; 245: 215-232.

Gartner LP, Hiatt JL: *Tratado de histologia em cores*, ed 2. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003.

Gersch C, Dewald O, Zoerlein M, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG: Mast cells and macrophages in normal C57/BL/6 mice. *Histochem Cell Biol* 2002; 118: 41-49.

Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, Bortoluci KR, Almeida SR, Herzenberg LA, Herzenberg LA: Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107 (6): 2568–2573.

Gil M, McCormack FX, Levine AM: Surfactant Protein A Modulates Cell Surface Expression of CR3 on Alveolar Macrophages and Enhances CR3-mediated Phagocytosis. *J Biol Chem* 2009; 284 (12): 7495–7504.

Gordon S, Clarke S, Greaves D, Doyle A: Molecular immunology of macrophages: recent progress. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 24-33.

Gordon S, Taylor PR: Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 953-964.

Gordon S: The macrophage: Past, present and future. *Eur J Immunol* 2007; 37: 9–17.

Hanley MB, Napolitano LA, McCune JM: Growth Hormone–Induced Stimulation of Multilineage Human Hematopoiesis. *Stem Cells* 2005; 23 (8): 1170–1179.

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

Herasimtschuk AA, Westrop SJ, Moyle GJ, Downey JS, Imami N: Effects of recombinant human growth hormone on HIV-1-specific T-cell responses, thymic output and proviral DNA in patients on HAART: 48-week follow-up. *J Immune Based Ther Vaccines* DOI:10.1186/1476-8518-6-7.

Ho M, Springer TA: Mac-1 antigen: quantitative expression in macrophage populations and tissues, and immunofluorescent localization in spleen. *J Immunol* 1982; 128 (5): 2281-2283.

Hochberg Z, Hertz P, Maor G, Oiknine J, Aviram M: Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I Increase Macrophage Uptake and Degradation of Low Density Lipoprotein. *Endocrinology* 1992; 131 (1): 430-435.

Humphries JD, Byron A, Humphries MJ: Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 2006; 119: 3901-3903.

Inoue T, Saito H, Fukushima R, Inaba T, Lin MT, Fukatsu K, Muto T: Growth hormone and insulin like growth factor I enhance host defense in a murine sepsis model. *Arch Surg* 1995; 130 (10): 1115-1122.

Inoue T, Saito H, Tsuno N, Fukatsu K, Lin MT, Inaba T, Han I, Furukawa S, Ikeda S, Matsuda T, Muto T: 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* 1998; 26 (2): 338-343.

Jeay S, Sonenshein GE, Postel-Vinay MC, Kelly PA, Baixeras E: Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: new insights into signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 188: 1-7.

Johansson S, Rubin K, Höök M, Ahlgren T, Seljelid R: In vitro biosynthesis of cold insoluble globulin (fibronectin) by mouse peritoneal macrophages. *FEBS Lett* 1979; 105 (2): 313-316.

Juliano RL, Haskill S: Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1993; 120 (3): 577-585.

Kähler CM, Pischel AB, Haller T, Meierhofer C, Djanani A, Kaufmann G, Wiedermann CJ: Signal transduction pathways in directed migration of human monocytes induced by human growth hormone in vitro. *Int Immunopharmacol* 2001; 1 (7): 1351-1361.

Kelley KW, Weigent DA, Kooijman R: Protein Hormones and Immunity. *Brain Behav Immun* 2007; 21 (4): 384–392.

Kelley KW: Cross-talk between the immune and endocrine systems. *J Anim Sci* 1988; 66 (8): 2095-2108.

Kelley KW: Growth hormone, lymphocytes and macrophages. *Biochem Pharmacol* 1989; 38 (5): 705-713.

Kitamura N, Nishinarita S, Takizawa T, Tomita Y, Horie T: Cultured human monocytes secrete fibronectin in response to activation by proinflammatory cytokines. *Clin Exp Immunol* 2000; 120 (1): 66-70.

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

Kopchick JJ, Bellush LL, Coschigano KT: Transgenic models of Growth hormone action. *Annu Rev Nutr* 1999; 19: 437–461.

Kumar A, Singh SM, Sodhi A: Effect of prolactin on nitric oxide and interleukin-1 production of murine peritoneal macrophages: role of Ca^{2+} and protein kinase C. *Int J Immunopharmacol* 1997; 19 (3): 129-133.

Laskin DL, Sunil VR, Gardner CR, Laskin JD: Macrophages and Tissue Injury: Agents of Defense or Destruction? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011; 51: 267–88.

Lesniak MA, Roth J: Regulation of receptor concentration by homologous hormone. Effect of human growth hormone on its receptor in IM-9 lymphocytes. *J Biol Chem* 1976; 251 (12): 3720-3729.

Lishko VK, Yakubenko VP, Ugarova TP: The interplay between integrins $\alpha_M\beta_2$ and $\alpha_5\beta_1$ during cell migration to fibronectin. *Exp Cell Res* 2003; 283 (1): 116–126.

Liu QL, Wang YS, Wang JX: Effect of growth hormone on the immune function of dendritic cells. *Chin Med J (Engl)* 2011; 123 (8): 1078-1083.

Lucas AD, Greaves DR: Atherosclerosis: role of chemokines and macrophages. *Expert Rev Mol Med* 2001; 3 (25): 1-18.

Luo B, Carman CV, Springer TA: Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 619–647.

Medzhitov R: Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007; 449 (18): 819-826.

Merchav S, Tatarsky I, Hochberg Z: Enhancement of erythropoiesis in vitro by human growth hormone is mediated by insulin-like growth factor I. *Br J Haematol* 1988; 70 (3): 267-271.

Mercurio AM, Shaw LM: Macrophage interactions with laminin: PMA selectively induces the adherence and spreading of mouse macrophages on a laminin substratum. *J Cell Biol* 1988; 107 (5): 1873-1880.

Mosher DF. 1984. Physiology of fibronectin. *Annu Rev Med* 1984; 35: 561-75.

Murphy WJ, Tsarfaty G, Longo DL: Growth Hormone Exerts Hematopoietic Growth-Promoting Effects In Vivo and Partially Counteracts the Myelosuppressive Effects of Azidothymidine. *Blood* 1992; 80: 1443-1447.

Napolitano LA, Schmidt D, Gotway MB, Ameli N, Filbert EL, Ng MM, Clor JL, Epling L, Sinclair E, Baum PD, Li K, Killian ML, Bacchetti P, McCune JM: Growth hormone enhances thymic function in HIV-1-infected adults. *J Clin Invest* 2008; 118 (3): 1085-1098.

Oliva CR, Swiecki MK, Griguer CE, Lisanby MW, Bullard DC, Turnbough CL Jr, Kearney JF: The integrin Mac-1 (CR3) mediates internalization and directs *Bacillus anthracis* spores into professional phagocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105 (4): 1261-1266.

Pedraza C, Geberhiwot T, Ingerpuu S, Assefa D, Wondimu Z, Kortessmaa J, Tryggvason K, Virtanen I, Patarroyo M: Monocytic Cells Synthesize, Adhere to, and Migrate on Laminin-8 ($\alpha_4\beta_1\gamma_1$). *J Immunol* 2000; 165: 5831–5838.

Petersen TK, Smith CW, Jensen AL: Characterization of the Priming Effect by Pituitary Canine Growth Hormone on Canine Polymorphonuclear Neutrophil Granulocyte Function. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000; 7 (2): 226-232.

Pollard, JW: Trophic macrophage in development and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; 9 (4): 259-270.

Postel-Vinay MC, de Mello Coelho V, Gagnerault MC, Dardenne M: Growth Hormone Stimulates the Proliferation of Activated Mouse T Lymphocytes. *Endocrinology* 1997; 138 (5): 1816-1820.

Ramos FWS: Efeitos do hormônio do crescimento sobre as células endoteliais tímicas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Alagoas, 2008.

Rennard SI, Hunninghake GW, Bitterman PB, Crystal, RG. 1981. Production of fibronectin by the human alveolar macrophage: Mechanism for the recruitment of fibroblasts to sites of tissue injury in interstitial lung diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78 (11): 7147-7151.

Rom WN, Basset P, Fells GA, Nukiwa T, Trapnell BC, Crysstal RG: Alveolar macrophages release an insulin-like growth factor I-type molecule. *J Clin Invest* 1988; 82 (5): 1685-1693.

Rosales C, Juliano RL: Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes. *J Leukoc Biol* 1995; 57: 189-198.

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

Routley CE, Ashcroft GS: Effect of estrogen and progesterone on macrophage activation during wound healing. *Wound Repair Regen* 2009; 17: 42–50.

Rymaszewski Z, Cohen RM, Chomcznsk IP: Human growth hormone stimulates proliferation of human retinal microvascular endothelial cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 617-621.

Sandig H, McDonald J, Gilmour J, Arno M, Lee TH, Cousins DJ: Fibronectin is a TH1-specific molecule in human subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124 (3): 528-535.

Savino W, Dardenne M: Immune-neuroendocrine interactions. *Immunol today* 1995; 16 (7): 318-322.

Savino W, Dardenne M: Neuroendocrine control of the thymus physiology. *Endocr Rev* 2000; 21 (4): 412–443.

Shaw LM, Lotz MM, Mercurio AM: Inside-out integrin signaling in macrophages. Analysis of the role of the alpha 6A beta 1 and alpha 6B beta 1 integrin variants in laminin adhesion by cDNA expression in an alpha 6 integrin-deficient macrophage cell line. *J Biol Chem* 1993; 268 (15): 11401-11408.

Shaw LM, Mercurio AM: Interferon gamma and lipopolysaccharide promote macrophage adherence to basement membrane glycoproteins. *J Exp Med* 1989; 169 (1): 303-308.

Shaw LM, Mercurio AM: Regulation of cellular interactions with laminin by integrin cytoplasmic domains: the A and B structural variants of the alpha 6 beta 1 integrin differentially modulate the adhesive strength, morphology, and migration of macrophages. *Mol Biol Cell* 1994; 5 (6): 679-690.

Smaniotto S, de Mello-Coelho V, Villa-Verde DM, Pléau JM, Postel-Vinay MC, Dardenne M, Savino W: Growth hormone modulates thymocyte development *in vivo* through a combined action of laminin and CXCL12. *Endocrinology* 2005; 146 (7): 3005-3017.

Smaniotto S, Mendes-da-Cruz DA, Carvalho-Pinto CE, Araujo LM, Dardenne M, Savino W: Combined role of extracellular matrix and chemokines on peripheral lymphocyte migration in growth hormone transgenic mice. *Brain Behav Immun* 2010; 24 (3): 451-461.

Smaniotto S, Ribeiro-Carvalho MM, Dardenne M, Savino W, de Mello-Coelho V: Growth hormone stimulates the selective trafficking of thymic CD4+CD8- emigrants to peripheral lymphoid organs. *Neuroimmunomodulation* 2004; 11 (5): 299-306.

Smith JR, Benghuzzi H, Tucci M, Puckett A, Hughes JL: The effects of growth hormone and insulin-like growth factor on the proliferation rate and morphology of RAW 264.7 macrophages. *Biomed Sci Instrum* 2000; 36: 111-116.

Sodhi A, Tripathi A: Prolactin and growth hormone induce differential cytokine and chemokine profile in murine peritoneal macrophages *in vitro*: Involvement of p-38 MAP-kinase, STAT3 and NF- κ B. *Cytokine* 2008; 41: 162-173.

Steinman L: Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nat Immunol* 2004; 5 (6): 575-581.

Sternberg EM: Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2006; 6 (4): 318-328.

Stuart LM, Ezekowitz RA: Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat Rev Immunol* 2008; 8 (2): 131-141.

Su L, Sun Y, Ma F, Lü P, Huang H, Zhou J: Progesterone inhibits Toll-like receptor 4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF-kappaB activation and enhancing SOCS1 expression. *Immunol Lett* 2009; 125 (2): 151-155.

Takagi K, Suzuki F, Barrow RE, Wolf SE, Kobayashi M, Herndon DN: Growth Hormone improves immune function and survival in burned mice infected with Herpes Simplex Virus Type 1. *J Surg Res* 1997; 69: 166-170.

Thorey IS, Hinz B, Hoeflich A, Kaesler S, Bugnon P, Elmlinger M, Wanke R, Wolf E, Werner S: Transgenic mice reveal novel activities of growth hormone in wound repair, angiogenesis, and myofibroblast differentiation. *J Biol Chem* 2004; 279 (25): 26674-26684.

Tripathi A, Sodhi A: Production of nitric oxide by murine peritoneal macrophages *in vitro* on treatment with prolactin and growth hormone: Involvement of protein tyrosine kinases, Ca⁺⁺, and MAP kinase signal transduction pathways. *Mol Immunol* 2007; 44 (12): 3185-3194.

Tseng YH, Kessler MA, Schuler LA: Regulation of interleukin (IL)-1a, IL-1b, and IL-6 expression by growth hormone and prolactin in bovine thymic stromal cells *Mol Cell Endocrinol* 1997; 128 (1-2): 117–127.

Tsukuba T, Yanagawa M, Okamoto K, Okamoto Y, Yasuda Y, Nakayama KI, Kadowaki T, Yamamoto K: Impaired chemotaxis and cell adhesion due to decrease in several cell-surface receptors in cathepsin E-deficient macrophages. *J Biochem* 2009; 145 (5): 565-573.

Uronen-Hansson H, Allen ML, Lichtarowicz-Krynska E, Aynsley-Green A, Cole TJ, Höidén-Guthenberg I, Fryklund L, Klein N: Growth hormone enhances proinflammatory cytokine production by monocytes in whole blood. *Growth Hormon IGF Res* 2003; 13 (5): 282–286.

Vaage J, Lindblad WJ: Production of collagen type I by mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 1990; 48 (3): 274-280.

van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL: Le système phagocytaire mononucléaire: nouvelle classification des macrophages, des monocytes et de leurs cellules souches. *Bull World Health Organ* 1972; 47 (5): 651-658.

Varma S, Sabharwal P, Sheridan JF, Malarkey WB: Growth hormone secretion by human peripheral blood mononuclear cells detected by an enzyme-linked immunoplaque assay. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76 (1): 49-53.

Warwick-Davies J, Lowrie DB, Cole PJ: Growth hormone is a human macrophage activating factor. Priming of human monocytes for enhanced release of H₂O₂. *J Immunol* 1995a; 154 (4):1909-1918.

Warwick-Davies J, Lowrie DB, Cole PJ: Growth hormone activation of human monocytes for superoxide production but not tumor necrosis factor production, cell adherence, or action against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1995b; 63 (11): 4312-4316.

Weigent DA, Baxter JB, Wear WE, Smith LR, Bost KL, Blalock JE: Production of immunoreactive growth hormone by mononuclear leukocytes. *FASEB J* 1988; 2 (12): 2812-2818.

Weigent DA, Blalock JE: Associations between the neuroendocrine and immune systems. *J Leukoc Biol* 1995; 57: 137-150.

Weigent DA: Immunoregulatory Properties of Growth Hormone and Prolactin. *Pharmacol Ther* 1996; 69 (3): 237-257.

Wicha MS, Huard TK: Macrophages express cell surface laminin. *Exp Cell Res* 1983; 143 (2): 475-479.

Williams MJ: *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J Immunol* 2007; 178 (8): 4711-4716.

Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Cardó M, Herrero C, Soler C, Lloberas J, Celada A: Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. *Immunobiology* 2001; 204 (5): 543–550.

Yi M, Ruoslahti E: A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98 (2): 620-624.