

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

MARIA ELISA DE SOUZA PEREIRA

**EFEITO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS
DE CAMUNDONGOS**

**MACEIÓ, AL
2019**

MARIA ELISA DE SOUZA PEREIRA

**EFEITO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS
DE CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Bacharelado em Ciências
Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas e da
Saúde da Universidade Federal de Alagoas UFAL,
como requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Salete Smaniotto

MACEIÓ, AL

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

P436e Pereira, Maria Elisa de Souza.

Efeito do hormônio do crescimento em fibroblastos dérmicos de camundongos / Maria Elisa de Souza Pereira. – 2019.
56 f. : il., figs. color.

Orientadora: Salete Smaniotto.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: Bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 49-56.

1. Fibroblastos. 2. Hormônio do crescimento. 3. Cicatrização de feridas.
I. Título.

CDU: 577.17: 616-001.4



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e de Saúde
Coordenadoria do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas

ATA DE DEFESA DE MONOGRAFIA

Aos 20 de fevereiro de 2020, às 14 horas, estiveram reunidos na sala 17 do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como Presidente da Banca Examinadora, o(a) orientador(a) Prof.^a Dr.^a Salete Smaniotto e os Membros Titulares a Prof.^a Dr.^a Maria Danielma dos Santos Reis e o Prof. Dr. Marvin Paulo Lins, para a apresentação do Trabalho de Conclusão de Curso do(a) discente **MARIA ELISA DE SOUZA PEREIRA**, matrícula **15211499**, intitulado **"EFEITO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS DE CAMUNDONGOS"**. Após a apresentação pelo aluno(a), seguiu-se a arguição da Banca Examinadora, sendo este Trabalho **APROVADO** com nota 9,5 (*nove inteiros e cinco décimos*). Ficam cientes o(a) orientador(a) e o(a) discente que a nota final do TCC somente será registrada no sistema após o TCC corrigido em versão final "PDF" ser entregue pelo orientador à Coordenadoria do Curso, cumprindo assim a obrigatoriedade da entrega definitiva prevista no inciso III, art. 18, Res. 25/2005/CEPE/UFAL. Nada mais havendo a tratar, eu, Prof.^a Dr.^a Graziela Cury Guapo, lavrei a presente Ata, que vai por mim assinada, e pelos Membros da Banca Examinadora.

Maceió, 20 de fevereiro de 2020.

Prof.^a Dr.^a Salete Smaniotto
Orientador(a)

Prof. Dr. Marvin Paulo Lins
Membro Titular - Examinador 2

Prof.^a Dr.^a Maria Danielma dos Santos Reis
Membro Titular - Examinador 1

Coordenadoria do Curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas

Graziela Cury Guapo
SIAPE 1967102
Coordenadora do Curso
de Bacharelado em Ciências
Biológicas ICBS - UFAL

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por ter me dado forças e saúde para superar todas as dificuldades encontradas no caminho.

Gostaria de agradecer também a minha família, meu alicerce que em todos esses anos me motivou e me proporcionou o suporte necessário para continuar minha jornada acadêmica.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Salete Smaniotto, pela paciência, dedicação e confiança investidos em mim.

A todos os integrantes do Laboratório de Biologia Celular, por todo o apoio e trocas de experiências durante esse período.

Aos meus grandes amigos de universidade que levarei por toda a vida e que compartilharam comigo as alegrias, tristezas e muito conhecimento.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram minha graduação.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

A pele é um órgão complexo que recobre toda a superfície do corpo. Esse órgão constitui um sistema sofisticado que envolve processos químico-físicos elaborados, principalmente quando acometida por lesões, originando um processo de cicatrização. Neste contexto, os fibroblastos presentes na derme são células essenciais no reparo tecidual. Existem evidências consideráveis sugerindo que o hormônio do crescimento (GH) tem efeito positivo na cicatrização de feridas. No presente estudo buscou-se investigar os efeitos do GH em fibroblastos dérmicos de cultura primária. Para isso, foram utilizados camundongos machos com 6 meses da linhagem Swiss (CEUA/UFAL No 51/2014). Foi realizado o isolamento dos fibroblastos a partir da derme de camundongos, determinando suas condições de cultivo. Realizou-se citometria de fluxo para avaliar a presença de contaminantes na cultura celular obtida. Observou-se os aspectos morfológicos e a proliferação dos fibroblastos. A produção de colágeno tipo I, III e laminina foram analisados por imunofluorescência. Posteriormente, os fibroblastos foram tratados ou não com GH na concentração de 100 ng/mL, por 24 horas. A proliferação e o ciclo celular foram avaliados utilizando a contagem de células e marcação com iodeto de propídio, respectivamente. Foi avaliado a produção das molécula de matriz extracelular laminina, fibronectina e colágeno I, por imunofluorescência. Como resultados, constatou-se que a técnica do explante foi eficaz para a obtenção dos fibroblastos dérmicos e por citometria de fluxo foi possível determinar que as células cultivadas eram, em sua maioria, fibroblastos. As células apresentaram heterogeneidade morfológica e capacidade proliferativa. Ainda, os fibroblastos produzem moléculas de matriz extracelular, colágeno tipo I e laminina. Entretanto, não foi observada a produção de colágeno tipo III pelos fibroblastos dérmicos. Quando as células foram tratadas com o hormônio, verificou-se que o GH aumentou significativamente o número de fibroblastos após o tratamento por 24 horas quando comparado ao controle, assim como manteve a sincronização do ciclo celular. O GH foi capaz de aumentar a produção de laminina pelos fibroblastos, porém, não teve ação significativa na produção de fibronectina e colágeno tipo I. Estes dados mostram *in vitro* que o GH exerce um efeito sobre a resposta biológica dos fibroblastos, fortalecendo a hipótese de que este hormônio apresenta um efeito positivo na cicatrização de feridas.

Palavras-chaves: Fibroblastos; hormônio do crescimento; cicatrização de feridas.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Fotomicrografia evidenciando as duas camadas estruturais da pele, a epiderme e a derme	13
FIGURA 2. Fotomicrografia mostrando as camadas da epiderme	14
FIGURA 3. Fotomicrografia da derme papilar e reticular	16
FIGURA 4. Linhagens de dermofibroblastos.	18
FIGURA 5. Características morfológicas dos fibroblastos da pele.....	19
FIGURA 6. Ilustração sequencial dos estágios envolvidos no reparo tecidual .	21
FIGURA 7. Ilustração representativa da fase inflamatória após lesão cutânea.	23
FIGURA 8. Ilustração representativa da fase proliferativa da cicatrização de ferida	26
FIGURA 9. Ilustração representativa da fase de remodelamento da ferida	27
FIGURA 10. Produção das moléculas de matriz extracelular nas fases da cicatrização.....	29
FIGURA 11. Fotomicrografias obtidas após 12 dias de cultivo dos fibroblastos.	36
FIGURA 12. Fotomicrografias obtidas da cultura de fibroblastos.	37
FIGURA 13. Expressão da molécula de adesão de célula epitelial (EpCAM)	37
FIGURA 14. Aspectos morfológicos dos fibroblastos obtidos da derme de camundongos.....	38
FIGURA 15. Produção do colágeno tipo I por fibroblastos.....	39
FIGURA 16. Produção de laminina por fibroblastos	39
FIGURA 17. Produção da molécula de matriz extracelular, colágeno III	40
FIGURA 18. Proliferação dos fibroblastos.	40
FIGURA 19. Efeitos do hormônio do crescimento na proliferação de fibroblastos dérmicos.....	41
FIGURA 20. Efeito do GH na produção de laminina	42
FIGURA 21. Efeito do GH na produção de fibronectina	43
FIGURA 22. Efeito do GH na produção de colágeno tipo I	43

LISTA DE ABREVIATURAS

- α -SMA:** Alfa actina de músculo liso (*alpha smooth muscle actin*)
- APC:** Alofococianina (*allophycocyanin*)
- CD26:** Glicoproteína de superfície celular (*dipeptidyl-peptidase IV*)
- DA:** Dopamina
- DAMP's:** Padrões moleculares associados ao dano (*damage associated molecular patterns*)
- DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- DS:** Fibroblasto do tecido conjuntivo
- EpCAM:** molécula de adesão de célula epitelial (*epithelial cell adhesion molecule*)
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*)
- FDP:** Fibroblastos da derme papilar
- GAR:** Anti-imunoglobulina de coelho produzido em cabra (goat anti-rabbit Immunoglobulin)
- GH:** Hormônio do crescimento (*growth hormone*)
- GHR:** Receptor do hormônio do crescimento (*growth hormone receptor*)
- GHRH:** Hormônio liberador do hormônio do crescimento (*growth hormone releasing hormone*)
- IFN:** Interferon
- IGF-1:** Fator-1 de crescimento semelhante a insulina (*insulin-like growth factor 1*)
- IL:** Interleucina
- IL-1R1:** receptor da interleucina 1
- MEC:** Matriz extracelular
- GH-CSF:** Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*)
- NE:** Norepinefrina
- PAMP's:** Padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns*)
- PBS:** Tampão fosfato-salina (*phosphate buffered saline*)
- PDGFRA:** Receptor A do fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor receptor A*)

PF: Fibroblastos papilar

PI: Iodeto de prípidio

ROS: Espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)

RF: Fibroblastos reticular

SBF: Soro bovino fetal (*fetal bovine serum*)

SS: Somatostatina

TGF: Fator de crescimento transformante (*transforming growth factor*)

TGF- β R: Receptor do fator de crescimento transformante (*transforming growth factor- β receptor*)

TNF: Fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*)

TLR: Receptor semelhante ao Toll (*toll-like receptor*)

UV: Radiação ultravioleta

VEGF: Fator de crescimento de endotélio vascular (*vascular endothelial growth factor*).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS.....	12
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
3.1 Pele.....	13
3.2 Fibroblastos dérmicos: origem embrionária, características e funções.....	17
3.3. Cicatrização de feridas.....	21
3.3.1 Fase de coagulação ou inflamatória	21
3.3.2 Fase proliferativa	23
3.3.3 Fase de remodelamento ou maturação	26
3.4 Matriz extracelular na cicatrização de feridas	28
3.5 Hormônio do crescimento e a pele.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Animais	32
4.2 Isolamento de fibroblastos e cultura primária.....	32
4.3 Análise morfológica dos fibroblastos de cultura primária	33
4.4 Citometria de fluxo com marcação para molécula anti-EpCAM	33
4.5 Ensaio de imunofluorescência para avaliar a produção das moléculas de matriz extracelular pelos fibroblastos de cultura primária	33
4.6 Ensaio de proliferação dos fibroblastos de cultura primária.....	34
4.7 Tratamento <i>in vitro</i> com o hormônio do crescimento	34
4.8 Ensaio de proliferação de fibroblastos dérmicos tratados com GH.....	34
4.9 Ciclo celular em marcação com iodeto de propídio.....	34
4.10 Ensaio de imunofluorescência	35
4.11 Análises estatísticas.....	35
5. RESULTADOS	36
5.1 Cultura primária de fibroblastos	36
5.2 Expressão da molécula de adesão de célula epitelial na superfície celular.....	37
5.3 Aspectos morfológicos dos fibroblastos	38
5.4 Produção de matriz extracelular pelos fibroblastos.....	38
5.5 Proliferação celular	40

5.6 Efeitos do hormônio do crescimento na proliferação de fibroblastos	41
5.7 Efeito do GH na produção de moléculas de matriz extracelular por fibroblastos	42
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÃO	48
8. REFERÊNCIAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

A pele é um órgão complexo que recobre toda a superfície do corpo e é responsável por cerca de 15% do peso total do corpo do adulto. Este órgão é dividido em duas camadas, a epiderme e a derme. A epiderme é uma estrutura avascular, constituída de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. A derme é uma camada bastante vascularizada e composta por tecido conjuntivo, apresentando diversos tipos celulares, como macrófagos, leucócitos e os fibroblastos. Este órgão constitui um sistema complexo que envolve processos químico-físicos elaborados, principalmente quando acometida por lesões, originando um processo de cicatrização (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017; CAMPOS et al, 2007; GANTWERKER e HOM, 2011).

A cicatrização da ferida é um processo altamente organizado que leva à restauração da integridade e das funções. A lesão tecidual é o estímulo inicial para que ocorra o processo cicatricial. Este processo é comumente dividido em fases sucessivas, mas sobrepostas, a fase inflamatória, a fase proliferativa e fase de remodelamento (BALBINO et al, 2005; YANG et al, 2019).

A fase inflamatória inicia-se logo após a ocorrência da lesão, com a liberação de substâncias vasoconstritoras pelas membranas celulares. Nesta ocasião, o endotélio lesado e as plaquetas estimulam uma cascata de coagulação, liberando grânulos que contém diversos fatores de crescimento, atraindo assim, neutrófilos para o local da ferida. Outra célula importante nessa fase é o macrófago, que contribui com a secreção de citocinas e fatores de crescimento, além de contribuir na angiogênese, e síntese de matriz extracelular. A fase proliferativa é constituída por quatro etapas fundamentais: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Nessa etapa, os fibroblastos e o endotélio atuam de forma intensa. Os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para o local da ferida, são ativados, começam a produzir colágeno tipo I e a diferenciarem-se em miofibroblastos, promovendo assim a contração da ferida. A remodelação é a última e mais longa fase da cicatrização. Nessa fase, ocorre uma degradação do colágeno depositado na fase proliferativa e um colágeno mais espesso é produzido, sendo este depositado de forma mais organizada (CAMPOS et al, 2007; BROUGHTON et al., 2006; ROUSSELLE et al., 2018).

Os fibroblastos são células importantes durante a cicatrização saudável, estando presente desde a fase inflamatória tardia até a reepitelização completa. Essas células são responsáveis pela produção e deposição de matriz extracelular, produção de substâncias solúveis e pelo remodelamento da matriz extracelular. Outra característica fundamental dos fibroblastos na cicatrização é a sua capacidade de se diferenciar em miofibroblasto, estes promovem a contração da ferida (MEDEIROS et al, 2016; BAINBRIDGE, 2013).

Vários fatores de crescimento são essenciais para os processos acima mencionados. Dentre eles, o hormônio do crescimento (GH) que promove a divisão celular, a regeneração e o crescimento. Existem evidências consideráveis sugerindo que este hormônio tem efeito positivo na cicatrização de feridas (KIM et al., 2009; LEE et al., 2010; MESSIAS DE LIMA et al., 2017a).

Com base no efeito deste hormônio sobre a cicatrização de feridas e na importância dos fibroblastos neste processo, tem-se despertado o interesse no estudo *in vitro* dos efeitos do GH na biologia de fibroblastos dérmicos.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Avaliar os efeitos do hormônio do crescimento em fibroblastos de cultura primária obtidos da derme de camundongos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Isolar fibroblastos a partir da derme de camundongos;
- Determinar as condições para o cultivo dos fibroblastos isolados da derme de camundongos;
- Avaliar a morfologia dos fibroblastos isolados da derme de camundongos;
- Avaliar a capacidade funcional dos fibroblastos;
- Avaliar a proliferação de fibroblastos após o tratamento com GH;
- Avaliar a produção de moléculas de matriz extracelular por fibroblastos após o tratamento com GH.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Pele

A pele é um órgão complexo que recobre toda a superfície corporal, sendo contínua com as mucosas que recobrem os orifícios do corpo. Representa cerca de 15% do peso de um adulto, é, portanto, considerada o maior órgão do corpo humano. Tem aspecto, estrutura e funções variáveis, de acordo com a região do corpo, sendo um órgão multifuncional. A pele apresenta diversas funções importantes, como: proteção contra agressões externas, perda de água, invasão de microrganismos e radiação ultravioleta. Além disso, a pele exerce uma importante função na percepção sensorial (tato, pressão, dor e calor), síntese de vitamina D, termorregulação e na excreção de íons e lipídios (ATIT, 2018; CESTARI, 2012; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017; KANITAKIS, 2002).

Histologicamente, a pele é dividida em duas camadas: a epiderme e a derme, conforme apresentado na figura 1 (KANITAKIS, 2002).

Figura 1. Fotomicrografia evidencia as duas camadas estruturais da pele, a epiderme e a derme.



A epiderme (E) é constituída por um epitélio de revestimento estratificado pavimentoso queratinizado. A derme (D) é mostrada inferior a epiderme e subdividida em papilar, mais superior, e a reticular, mais inferior e onde as fibras colágenas são densas e não modeladas. Glândulas sebáceas (GSE) e sudoríparas (GSU) são vistas repousando sobre a derme. Adaptado de Lima, 2018.

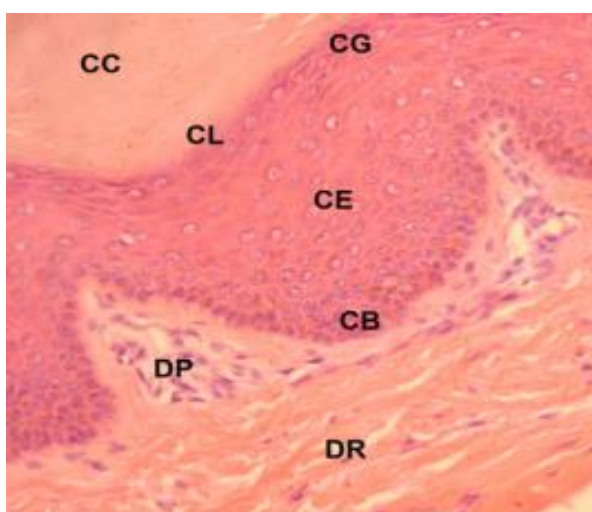
A epiderme tem sua origem embrionária no ectoderma, enquanto a derme, possui origem no mesoderma, estes são interconectados pela junção dermoepidérmica. Nesta junção, estão presentes as membranas plasmáticas das

células basais com seus hemidesmossomos; a lâmina basal; os filamentos de ancoragem (fibras de colágeno VII), conectando os hemidesmossomos com a lâmina densa (fibras de colágeno IV). Todas estas estruturas contribuem para uma forte conexão entre epiderme e derme (ZAIDE e LANIGAN, 2010).

A epiderme é a camada mais superficial da pele, sendo constituída por tecido epitelial estratificado pavimento queratinizado, tendo várias camadas de células justapostas e achatadas. Essa camada não é vascularizada, sendo os pequenos vasos sanguíneos presentes na derme papilar os responsáveis pela nutrição e oxigenação da epiderme. Diversas células constituem a epiderme, 95% destas são queratinócitos e as outras células são melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (ZAIDI e LANIGAN, 2010).

A principal função dos queratinócitos é produzir a queratina. Diferentes tipos de queratinas são encontrados nos diferentes níveis da epiderme, dependendo do seu estágio de diferenciação. A constante diferenciação dos queratinócitos proporciona a formação de uma importante barreira epidermal. Durante essa diferenciação queratinócitos passam por diferentes estágios de desenvolvimento, formando assim, cinco distintas camadas na epiderme: a camada basal (estrato germinativo), a camada espinhosa, a camada granulosa, a camada lúcida e a camada córnea, como observado na figura 2 (HANEL *et al*, 2013; KANITAKIS, 2002; ZAIDI e LANIGAN, 2010).

Figura 2. Fotomicrografia mostrando as camadas da epiderme.



Epiderme constituída por várias camadas de queratinócitos. Dados: (CC) Camada Córnea; (CL) Camada Lúcida; (CG) Camada Granulosa; (CE) Camada Espinhosa; (CB) Camada Basal; (DP) Derme Papilar; (DR) Derme Reticular. Adaptado de Lima, 2018.

A camada basal ou estrato germinativo são as células mais internas, aderidas a membrana basal, e as únicas células da epiderme que conseguem se dividir. Essa camada é composta por uma única fileira de células, apresentando forma colunar com grandes núcleos de coloração mais escuro. O componente básico do seu citoplasma são os filamentos de queratina que se encontram perpendicular à superfície da pele (HWA *et al*, 2011; ZAIDI e LANIGAN, 2010; WONG *et al*, 2016).

No momento em que as células da camada basal se dividem, elas originam a próxima camada de células, o estrato espinhoso. Essa camada apresenta filamentos de queratina irradiados em um padrão concêntrico ao redor do núcleo e inserções de desmossomos periféricos, unindo uma célula a outra, dando o aspecto de “espinhos”. O número de camadas pode variar de 4 a 10. Suas células apresentam um núcleo oval central e o citoplasma rico em tonofilamentos. As células também apresentam diversas organelas, que auxiliam na formação de queratina e na adesão intracelular do estrato córneo (HWA *et al*, 2011; ZAIDE e LANIGAN, 2010).

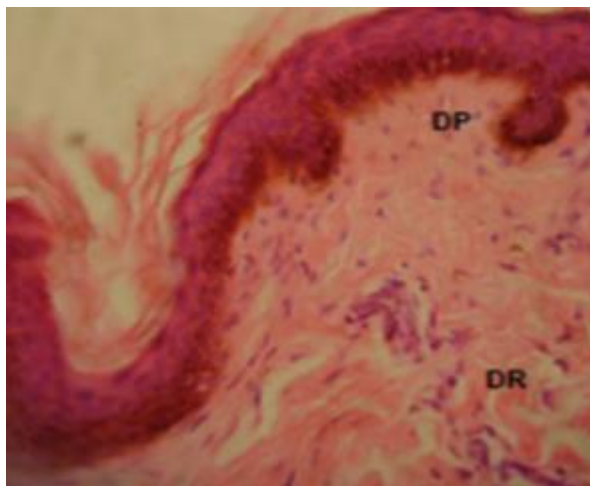
O estrato espinhoso é seguido pela camada granulosa. Essa camada é composta de 3 a 4 fileiras de células, apresentando um aspecto achatado. Possuem o citoplasma carregado de grânulos basófilos e o núcleo central. Esses grânulos (grânulos de querato-hialina) contêm proteínas que ajudam na agregação dos filamentos de queratina (ZAIDE e LANIGAN, 2010; HANEL, 2013). O estrato lúcido é formado por uma zona de células achatadas, sem núcleo e com aspecto homogêneo e translúcido, eosinofílico. Em sua constituição apresenta a eleidina, que impede a entrada ou saída de água. Esse é um estrato bastante fino, podendo não existir em algumas áreas (CESTARI, 2012; ZAIDE e LANIGAN, 2010). A última camada da epiderme é o estrato córneo, sendo assim, a camada mais superficial da pele. As células dessa camada correspondem ao estágio final da diferenciação celular. Estas são células eusino-fílicas, achatadas e com citoplasma repleto de queratina, anucleadas e mortas que se encontram empilhadas umas sobre as outras descamando continuamente (CESTARI, 2012, ZAIDE e LANIGAN, 2010).

Além dessas células, também é possível encontrar na epiderme os melanócitos, células de Langerhans e as células de Merkel. Os melanócitos são as células produtoras de pigmentos da epiderme, sendo encontrados na epiderme basal e folículos pilosos. Nos seres humanos, a pigmentação da pele serve como um filtro de radiação para raios ultravioletas (UV), mecanismo pelo qual diminui-se a irradiação

UV para os núcleos celulares, evitando assim, dano ao DNA (ZAIDE e LANIGAN, 2010; GODWIN *et al*, 2014). Ainda dentro da epiderme, existe uma população celular mononuclear, denominada células de Langerhans. Estão localizadas na interface com o ambiente externo e, como tal, são sentinelas multifuncionais da epiderme. Estas células apresentam antígenos para as células T, onde iniciam uma resposta imune (CHAMBERS e VUKMANOVIC-STEJIC, 2019). As células de Merkel estão localizadas principalmente na pele espessa. Eles são caracterizados por grânulos secretores de núcleo denso e estão ligados aos queratinócitos vizinhos por desmossomos. São células excitáveis em contato próximo com terminações nervosas sensoriais, apresentando uma importante função mecanorreceptora na pele (IRMAK, 2010).

A derme apresenta espessura variável entre 2-4mm e fornece a maior parte da força mecânica da pele (WONG *et al*, 2016). Esta é uma rígida camada fibrosa que consiste em fibras de colágenos, fibras elásticas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, glicoproteínas, fibroblastos, células dendríticas, macrófagos, linfócitos, mastócitos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos (ZAIDE e LANIGAN, 2010). A derme tem duas áreas regionalmente distintas: a derme papilar (superficial) e derme reticular (profunda), como observado na figura 3 (WONG *et al*, 2016).

Figura 3. Fotomicrografia da derme papilar e reticular.



Observa-se a derme papilar (DP) formada por tecido conjuntivo frouxo e derme reticular (DR) constituída por tecido conjuntivo denso não-modelado. Fonte: Adaptado de Lima, 2018.

A derme papilar, chama assim por causa das papilas dérmicas, é constituída principalmente por tecido conjuntivo frouxo. Entre seus componentes, pode-se encon-

trar feixes delicados de fibras colágenas (principalmente do tipo III) e elásticas, dispostas em uma rede frouxa, circundada por abundante gel de mucopolissacarídeos. A derme papilar acompanha a camada basal, é mais delgada e altamente vascularizada. Com o envelhecimento, a derme papilar diminui de volume, fica mais fina e é gradualmente substituído pela reticular (MINE *et al*, 2008).

A derme reticular representa 4/5 da espessura da derme, estando localizada abaixo do nível das cristas epidérmicas. É constituída de fibras colágenas espessas (principalmente do tipo I) entrelaçadas, misturadas com fibras elásticas, reunidas com a substância fundamental (CESTARI, 2012).

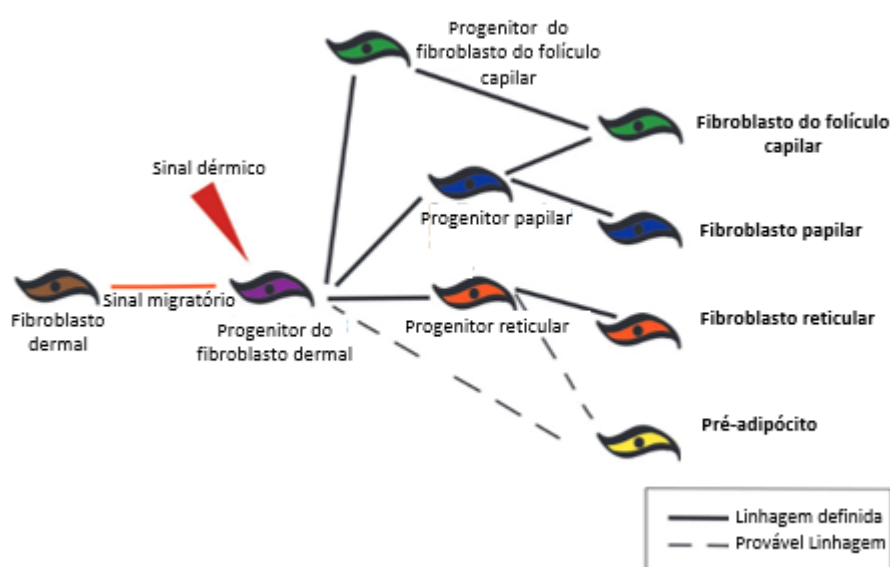
3.2 Fibroblastos dérmicos: origem embrionária, características e funções

Os fibroblastos são um grupo de células multifuncionais heterogêneas de origem mesenquimal e são as células estromais mais abundantes da derme. Convencionalmente, são definidos por sua forma de fuso, expressão de marcadores mesenquimais que incluem a vimentina e o colágeno I. Sabe-se que as populações de fibroblastos mantêm e sustentam a pele secretando os componentes de MEC, sendo a principal característica dos fibroblastos a capacidade de sintetizar o colágeno I. Acredita-se também, que os fibroblastos desempenham um papel importante em quase todos os processos da pele ao longo da vida: no embrião, os fibroblastos direcionam a morfogênese da pele; no organismo maduro eles contribuem para a homeostase da pele; e seu envolvimento em várias condições fisiopatológicas, incluindo: cura, fibrose, envelhecimento, psoríase e câncer de pele (RIPPA *et al*, 2019; SRIRAM *et al*, 2015; NAGALINGAM *et al*, 2019).

A heterogeneidade dos fibroblastos tem sido descrita em pele normal de adulto e em outros órgãos. No entanto, somente nos últimos anos, foram elucidadas as populações distintas de fibroblastos. Em 2013, Driskell *et al*. identificaram que os fibroblastos dérmicos surgem de uma população de progenitores multipotentes que expressa PDGFRF, Dlk1 e Lrig1; e por diferenciação dá origem a todas as linhagens dos fibroblastos da derme. Durante o desenvolvimento inicial, subpopulações que expressam PDGFR, Lrig1 e Blimp1 dão origem a fibroblastos da derme papilar; enquanto PDGFR, Dlk1 e Sca1 expressando a subpopulação dá origem a linhagens de fibroblastos reticulares e hipodérmicas (Figura 8) (SRIRAM *et al*, 2015; ATIT *et al*, 2018; DRISKELL *et al*, 2013). RINKEVICH *et al*. (2015), identificaram duas linhagens

distintas de fibroblastos embrionários, positivos e negativos para Engrailed-1 (En1). A expressão de En1 é responsável pela maior deposição de tecido conjuntivo dérmico durante o desenvolvimento embrionário, cicatrização cutânea e fibrose associada à radiação e estroma de câncer. Além disso, também foi possível demonstrar através deste estudo que a linhagem de fibroblasto fibrogênica pode ser identificada por sua expressão de CD26/DPP4 (RINKEVICHET *et al*; 2015).

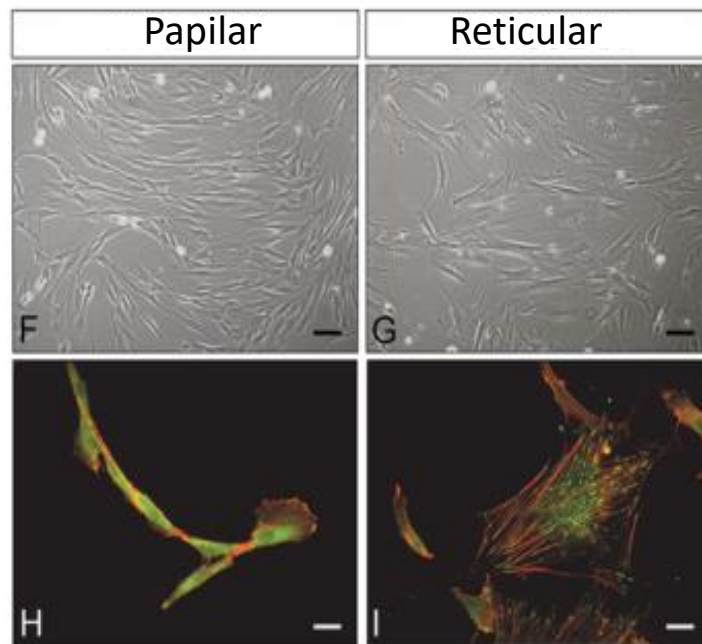
Figura 4. Linhagens de dermofibroblastos.



Os precursores dos fibroblastos dérmicos atingem o destino dérmico através do sinal indutivo regulado pela sinalização Wnt/ β -catenina. Esses progenitores se diferenciam ainda mais em fibroblastos papilares, reticulares, dérmicos condensados / e pre-adipócitos. Modificado de ATIT *et al*, 2018.

Vários estudos demonstraram que os fibroblastos dérmicos papilares e reticulares são distintos morfologicamente e fisiologicamente. Conforme mostrado na figura.9, fibroblastos papilares exibem uma morfologia em forma de fuso, enquanto fibroblastos reticulares são caracterizados por uma aparência mais achatada e ter uma porcentagem maior de células com expressão de actina do músculo liso (α -SMA), marcador de miofibroblasto (MINE *et al*, 2008). Além da diferença nas características morfológicas, a MEC produzida por esses fibroblastos também apresenta diferenças em termos de composição e organização (SORRELL *et al*, 2004a, SRIRAM *et al*, 2015).

Figura 5. Características morfológicas dos fibroblastos da pele.



Fotomicrografias demonstram as diferenças morfológicas dos fibroblastos da pele. Modificado de MINE *et al*, 2008.

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram as diferenças nos componentes da derme papilar e derme reticular. A derme papilar é composta de feixes finos e mal organizados de fibras de colágeno, enquanto feixes grossos e bem organizados de colágeno caracterizam a derme reticular. A derme papilar também apresenta uma taxa mais alta de colágeno tipo III e I, níveis mais altos de decorina e níveis mais baixos do proteoglicano versican e condroitina, em comparação com a derme reticular. Os fibroblastos dérmicos papilares apresentam *in vitro* maior cinética de crescimento e menores propriedades contráteis em comparação com os fibroblastos reticulares correspondentes ao local. No geral, esses estudos indicam a contribuição dos fibroblastos dérmicos papilares e reticulares para diferenças na composição da MEC nos dois compartimentos da derme (AZZARONE e MACIEIRA-COELHO, 1982; SORRELL e CAPLAN, 2004b; SORRELL *et al.*, 2004a, SRIRAM *et al*, 2015).

As populações de fibroblastos dérmicos papilares e reticulares exibem padrões distintos de fator de crescimento e secreção de citocinas que têm implicações profundas na comunicação parácrina com queratinócitos vizinhos. *In vitro* fibroblastos dérmicos papilares produzem uma maior proporção de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) em comparação com os fibroblastos

dérmicos reticulares. Além disso, os fibroblastos papilares dérmicos expressam *in vitro* níveis mais altos de interleucina (IL) -6, tanto de forma constitutiva quanto após a exposição à IL-1 (SORRELL *et al*; 2004a).

O perfil global de expressão gênica revelou que os fibroblastos humanos reticulares expressam genes envolvidos na motilidade celular, organização de citoesqueleto, via de contração do músculo liso e desenvolvimento neuronal. Por outro lado, os fibroblastos dérmicos papilares expressam altos níveis de genes relacionados à via de ativação do complemento, implicando seu papel na resposta imune da pele (JASON *et al*; 2012; SRIRAM *et al*, 2015).

Além dos fibroblastos papilares e reticulares, um terceiro nicho claramente definido na pele é ocupado por uma subpopulação de fibroblastos dérmicos associados a folículos capilares. Os folículos capilares são apêndices cutâneos formados predominantemente por células de origem epidérmica. Os folículos capilares estão associados a duas subpopulações de fibroblastos: fibroblastos FDP e fibroblastos DS. As papilas dérmicas do folículo piloso consistem em um pequeno aglomerado de fibroblastos densamente compactados que são alocados na região do bulbo do folículo piloso. Esses fibroblastos da papila dérmica folicular (fibroblastos FDP), por meio de interações com as células epiteliais do folículo piloso, desempenham um papel primordial na determinação do tamanho do bulbo capilar, comprimento e diâmetro da haste capilar e duração da fase anágena no ciclo capilar. Os fibroblastos DS são os fibroblastos presentes na bainha frouxa do tecido conjuntivo que rodeia todo o folículo piloso (SRIRAM *et al*, 2015; CHUONG *et al*; 2007).

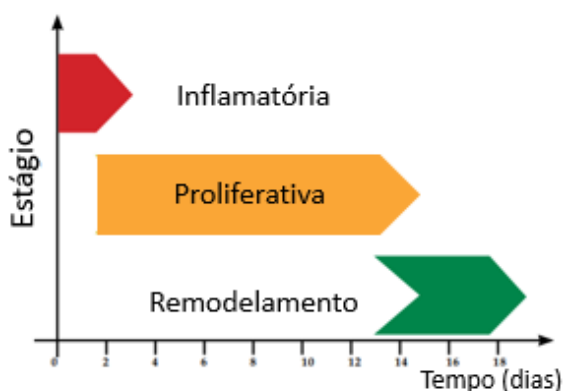
Em suma, os fibroblastos são caracterizados por apresentarem subpopulações distintas, até mesmo dentro de um mesmo tecido, e talvez, também por alguns estados intermediários entre esses grupos distintos. Essa heterogeneidade resulta de diferenças de origem embrionária, local anatômico e estado de diferenciação, além de influências microambientais e processos fisiológicos, como o envelhecimento. Além disso, as diferenças nos perfis morfológicos, bioquímicos e funcionais de várias populações de fibroblastos afetam o crescimento e a diferenciação dos queratinócitos e, portanto, a homeostase da pele. Tais diferenças na composição e organização da MEC desempenham um papel no controle do

comportamento dos fibroblastos e sua resposta na cicatrização de feridas (SRIRAM *et al*, 2015).

3.3. Cicatrização de feridas

A cicatrização cutânea é um processo fisiológico essencial que consiste na colaboração de muitas linhagens celulares, na tentativa de restaurar a lesão induzida por uma agressão local. Uma das principais razões para a cicatrização de feridas na pele parece ser a restauração da função de barreira, a fim de evitar mais danos ou infecções ao tecido (SORG *et al*, 2016; LANDÉN *et al*, 2016). Os estímulos que causam lesões podem ser exógenos ou endógenos, além de físicos, químicos e biológicos. A cicatrização é caracterizada por um processo multifacetado, dividido em fases seqüenciais, mas sobrepostas, incluindo hemostasia/fase de inflamação, fase de proliferação e remodelação (Figura 4) (LINDLEY *et al*, 2016; MASON *et al*, 2002; GONZALES *et al*, 2016).

Figura 6. Ilustração sequencial dos estágios envolvidos no reparo tecidual.



Modificado de GONZALEZ *et al*, 2016.

3.3.1 Fase de coagulação ou inflamatória

Logo após a ocorrência da lesão, a primeira etapa para que ocorra a cicatrização é a fase inflamatória. Essa fase é caracterizada por hemostasia e inflamação (BROUGHTON *et al*, 2006).

Inicialmente, as células da pele são expostas a sinais de fase aguda, como padrões moleculares associados ao dano (DAMP's) ou padrões moleculares associados à patógenos (PAMP's), reconhecidos pelos receptores semelhantes ao

Toll (TLR) iniciando e perpetuando a inflamação (STRBO *et al*, 2014; SORG *et al*, 2016). O colágeno exposto durante a formação da ferida ativa a cascata de coagulação (ambas as vias intrínseca e extrínseca). Após a lesão, as membranas celulares liberam potentes vasoconstritores, o tromboxano A2 e a prostaglandina 2. O coágulo que se forma é composto por colágeno, plaquetas, trombina e fibronectina, e esses fatores liberam citocinas e fatores de crescimento que iniciam a resposta inflamatória (WITTE e BARBUL, 1997; BROUGHTON *et al*, 2006). A fibrina do coágulo serve como andaime para as células que chegam, como neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais. Ela também serve para concentrar as citocinas e os fatores de crescimento (MARTIN, 1997; SORG *et al*, 2016). A infiltração de células imunes no leito da ferida é essencial para a remoção de bactérias e partículas estranhas da ferida; porém, a infiltração crônica pode levar a danos nos tecidos (STUNOVA e VISTEJNOVA, 2018).

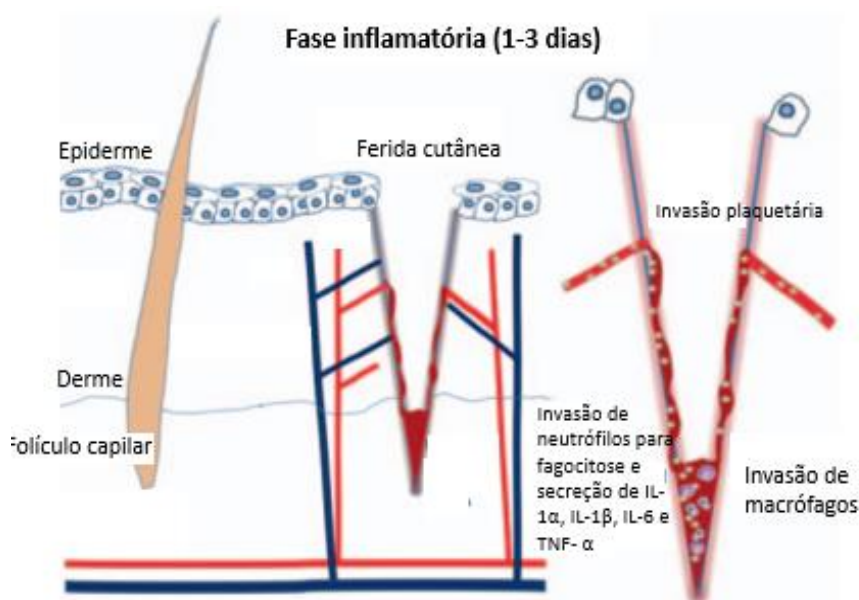
Neutrófilos são as primeiras células imunes a chegar ao local da ferida após dano tecidual. Eles saem passivamente dos capilares danificados ou passam ativamente pelos vasos sanguíneos da ferida por diapedese. Essas células limpam a área ferida onde se encontram os micróbios e detritos teciduais via fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a presença de armadilhas extracelulares de neutrófilos, isto é, estruturas de fibras que desarmam e matam bactérias extracelulares (STUNOVA e VISTEJNOVA, 2018).

As células NK se infiltram na ferida ao mesmo tempo que os neutrófilos, ou seja, durante a fase inflamatória inicial, regulando também a produção de quimiocinas. No entanto, nenhuma dessas duas células são estritamente pró-inflamatórias. Por exemplo, tais células produzem citocinas e quimiocinas que aceleram os aspectos fibro-proliferativos da cicatrização de feridas (SCHNEIDER *et al*, 2011; STUNOVA e VISTEJNOVA, 2018).

Os macrófagos entram no local da ferida aproximadamente 48 horas após o ferimento. Estas células são originárias de tecidos residentes nas proximidades da lesão ou são recrutados a partir de monócitos em circulação (STUNOVA e VISTEJNOVA, 2018). Com base nos perfis de expressão gênica, os macrófagos pode ser classificado como ativado classicamente (M1 pró-inflamatório) e ativado alternativamente (M2 anti-inflamatório e pró-angiogênico) (GONZALES *et al*, 2016). Macrófagos do tipo M2 estão relacionados, principalmente, com a fase de

remodelamento. Já os macrófagos do tipo M1 continuam o processo de limpeza através da fagocitose dos micróbios, detritos teciduais e neutrófilos apoptóticos relacionados ao início fase da inflamação. Os numerosos fatores de crescimento e citocinas produzidos pelos macrófagos são importantes em relação à angiogênese, quimiotaxia e proliferação de fibroblastos e subsequente síntese e degradação do colágeno. Assim, os macrófagos são essenciais no que diz respeito à fase inflamatória precoce e fases subsequentes do processo de reparo (STUNOVA e VISTEJNOVA, 2018; LEIBOVICH e ROSS *et al*, 1976; RAPPOLEE *et al*, 1988). Um esquema da fase inflamatória é mostrado na figura 5.

Figura 7. Ilustração representativa da fase inflamatória após lesão cutânea.



Homeostase e invasão de células inflamatórias. Adaptado de: REINKE e SORG, 2012.

3.3.2 Fase proliferativa

Esta etapa é responsável pelo fechamento propriamente dito da lesão, que inclui angiogênese, fibroplasia e reepitelização. Esses processos começam no microambiente da lesão após 48 horas e podem se desdobrar até o 14º dia após o início da lesão (LI *et al*, 2007). A epitelização ocorre no início do reparo da ferida. As células progenitoras epiteliais permanecem intacto abaixo da ferida (nos anexos da pele) e as camadas normais da epiderme são restauradas em 2 a 3 dias. Se a

membrana basal foi destruída, as células epiteliais localizadas na borda da pele começa a proliferar e a enviar projeções para restabelecer uma barreira protetora (LAWRENCE e DIEGELMANN, 1994; BROUGHTON *et al*, 2016).

A angiogênese, estimulada pelo TNF- α , é marcada pela migração de células endoteliais, ruptura e rearranjo da membrana basal, migração e associação em estruturas tubulares e recrutamento de células perivasculares. A migração de capilares para o leito da ferida é crítico para a cicatrização adequada da ferida, uma vez que a microvasculatura recém-formada possibilita o transporte de fluido, oxigênio, nutrientes e células imuno-competentes para o estroma. (GONZALEZ *et al*, 2016; BROUGHTON *et al*, 2006).

Além da participação ativa de células endoteliais e leucócitos nesse processo biológico, os pericitos constituem um grupo de células decorrente da tensão mesenquimal do músculo liso. Essas células aparecem solitárias, compartilhando a membrana basal dos vasos sanguíneos e células endoteliais. Os pericitos são células do tecido conjuntivo contendo prolongamentos citoplasmáticos longos e finos que revestem os vasos sanguíneos (GONZALEZ *et al*, 2016). Através de longas extensões citoplasmáticas que circundam o tubo endotelial, o pericito faz contato focal com o endotélio através de junções especializadas. Além disso, essa célula influencia na estabilidade do vaso sanguíneo através da deposição de matriz e / ou liberação e ativação de sinais que promovam a diferenciação ou complacência das células endoteliais (XIAN *et al*, 2006; TAKAKURA, 2006; GONZALEZ *et al*, 2016). Farrington-Rock *et al*. relataram seu potencial de diferenciação em osteoblastos, condrócitos, fibroblastos e adipócitos, o que torna essas células bastante pertinente ao reparo tecidual, uma vez que podem oferecer contribuição geral para o reabastecimento de tecido cicatricial (FARRINGTON-ROCK *et al*, 2004; GONZALES *et al*, 2016).

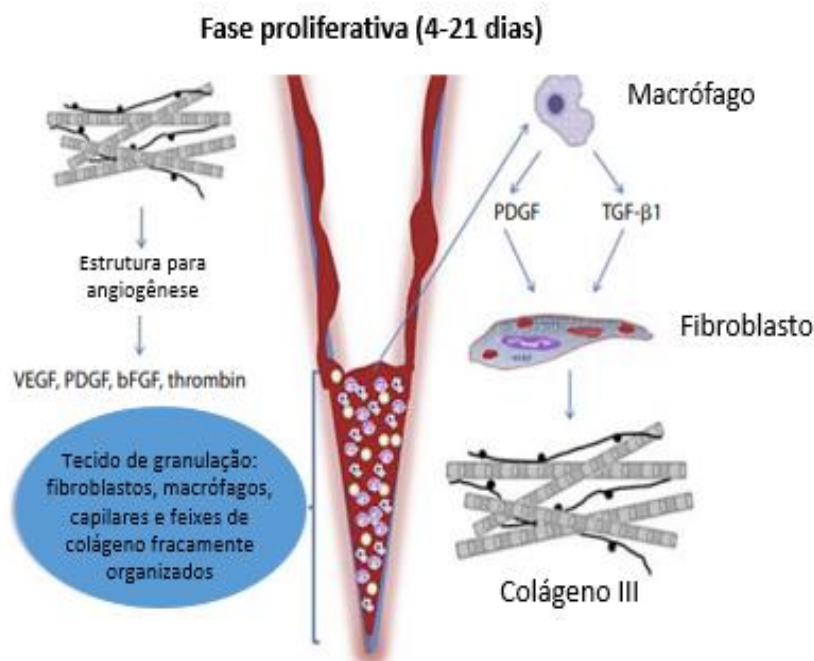
O tecido de granulação começa a se formar aproximadamente quatro dias após a lesão. Seu nome deriva da aparência granular do tecido recém-formado, conferindo essa característica ao novo estroma (GONZALES *et al*, 2016). Alguns mecanismos são importantes para que ocorra a formação desse tecido de granulação, como por exemplo: aumento da proliferação fibroblástica; biossíntese colágena e elástica, produção de fatores quimiotáticos e IFN- β por fibroblastos. Os fibroblastos são os principais responsáveis pela formação da nova matriz. O principal componente do tecido conjuntivo que está em processo de cicatrização é colágeno. Durante esse

estágio inicial de reparo, o colágeno tipo III é predominante, sintetizado por fibroblastos no tecido de granulação. É comum que a contração da ferida se inicie nessa fase, realizada pelos fibroblastos, que são rico em actina de músculo liso, conhecido como miofibroblastos (GONZALES *et al*, 2016; MEDRADO *et al*, 2003).

Sabe-se que os miofibroblastos compreendem uma população heterogênea de células que existem em diferentes estados de ativação para produzir e contrair a matriz extracelular de colágeno. É geralmente aceito que a principal fonte de miofibroblastos são os fibroblastos do tecido conjuntivo local que são recrutados (HIGASHIYAMA *et al*, 2011). A ativação de fibroblasto para miofibroblasto é um evento de várias etapas controlado pela constante mudança química e mecânica no microambiente do tecido em reparo. A tensão mecânica e o enrijecimento na matriz contribuem para a permanência e a diferenciação de novos miofibroblastos (HINZ, 2016; TOMASEK *et al*, 2002; WERNER *et al*, 2003).

Os miofibroblastos também se ligam à fibronectina polimerizada e fibrilas de colágeno através de suas integrinas, isso permite que as fibrilas perpendicularmente à borda da ferida sejam puxadas através do citoesqueleto rico em actina, permitindo que ocorra contração da ferida. Como os miofibroblastos estão ligados entre si por meio de junções tipo *gap*, eles podem funcionar em conjunto ao induzir a contração (TOMASEK *et al*, 2002). Os miofibroblastos são eliminados do local da ferida via apoptose quando a integridade do tecido for suficientemente restaurada. Não está claro se, após a cicatrização, os miofibroblastos podem reverter para o fenótipo fibroblasto presente na pele não lesionada (VAN DER VEER *et al*, 2009). Mais recentemente, foi demonstrado que os miofibroblastos nos folículos capilares em formação recente podem formar adipócitos dérmicos após o ferimento, e essa transição de miofibroblastos para adipócitos reduz a formação de cicatrizes. Os adipócitos dérmicos podem impedir a formação de cicatrizes por aumento da regeneração folicular capilar e ativação de fibroblastos circundantes. Consequentemente, os miofibroblastos desempenham um papel importante nos estágios finais da formação do tecido de granulação (RODRIGUES *et al*, 2019; PLIKUS *et al*, 2017; SCHMIDT e HORSLEY, 2013; TOMASEK *et al*, 2002). Um esquema da fase proliferativa é mostrado na figura 6.

Figura 8. Ilustração representativa da fase proliferativa da cicatrização de feridas.



Organização de trombo, secreção de fatores de crescimento, síntese de colágeno III e o início da angiogênese. Modificado de: REINKE e SORG, 2012.

3.3.3 Fase de remodelamento ou maturação

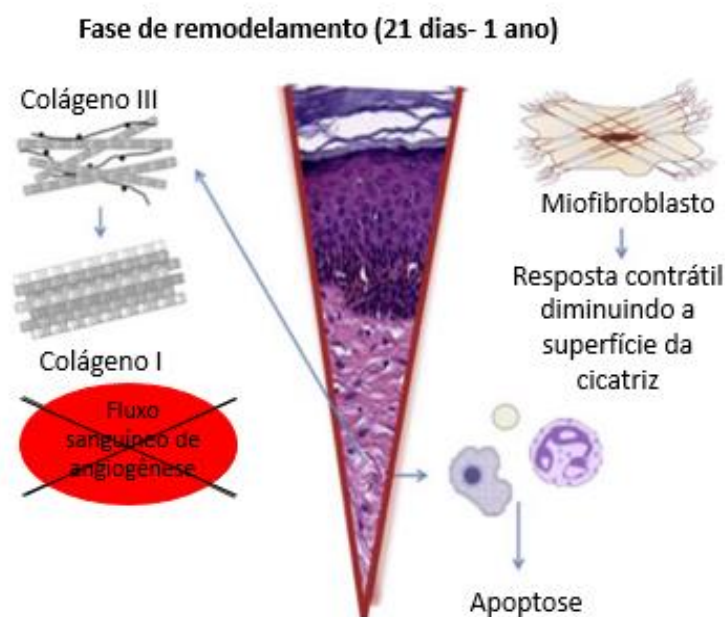
A terceira fase da cicatrização consiste na remodelação, que começa duas a três semanas após o início da lesão e pode durar um ano ou mais. O objetivo principal dessa fase é alcançar a resistência à tração máxima através da reorganização, degradação, e ressíntese da MEC (GONZALEZ *et al*, 2016). Essa etapa consiste em regressão da neovasculatura, bem como deposição periódica à matriz extracelular (MEC) e subsequente reconstituição do tecido de granulação no tecido cicatricial. O tecido de granulação é amplamente composto de colágeno III, que é parcialmente substituído pelo colágeno I mais resistente à medida que a remodelação da ferida progride. Esse processo é resultado da síntese simultânea de colágeno I e lise do colágeno III, que é seguida pela reorganização da MEC (GURTNER *et al*, 2008). A deposição de colágeno é feita a princípio de maneira aleatória tendo como orientação a organização da fibronectina e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras são subsequentemente digeridas pela collagenase, resintetizadas, rearranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes (CLARK, 1985). Com a evolução do processo, acentua-se a deposição de colágeno e a maioria das células

desaparecem (sendo possível notar a apoptose de fibroblastos e células endoteliais) formando finalmente a cicatriz. Atualmente considera-se que a resolução completa de uma ferida, somente pode ser considerada após concluída a maturação e remodelagem da MEC (BALBINO *et al*, 2005).

Macrófagos são importantes durante a remodelação da ferida onde eles assumem um fenótipo fibrolítico, decompondo matriz excessiva e fagocitando detritos de matriz extracelular (WERNING *et al*, 2017).

Ao final desta etapa, os anexos da pele, como folículos pilosos e glândulas sofrem regeneração limitada e a coloração da cicatriz permanece pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficiente e as cicatrizes são hipo-vascularizadas devido ao desaparecimento dos neocapilares (JOHNSTON, 1990; BALBINO *et al*, 2005). Um esquema da fase de remodelamento é mostrado na figura 7.

Figura 9. Ilustração representativa da fase de remodelamento da ferida.



Reorganização do tecido conjuntivo e resposta contrátil. Modificado de: REINKE e SORG, 2012.

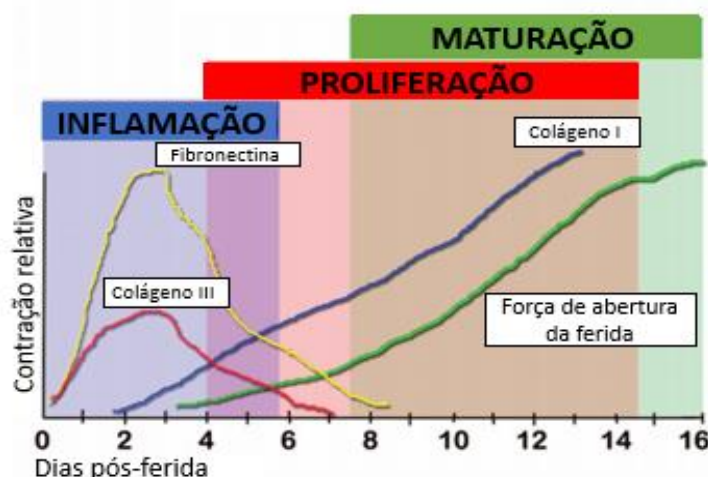
3.4 Matriz extracelular na cicatrização de feridas

Historicamente, a MEC tem sido mal interpretada como andaime relativamente inerte, existindo apenas para suportar células. Essa visão começou a mudar através da descoberta de que crescimento da maioria das células humanas, incluindo células da pele, depende da adesão celular a MEC através de um mecanismo chamado dependência de ancoragem. Além disso, já se sabe que a MEC é um tecido ativo capaz de influenciar a célula na sua sobrevivência, proliferação e funções (ALBERTS *et al*, 2002; CATERSON *et al*, 2016). Dentre os componentes que são produzidos na cicatrização, destacam-se as glicoproteínas que são sintetizadas por diversas células no microambiente, como neutrófilos, linfócitos, fibroblastos e células endoteliais (KASUYA e TOKURA, 2014; SCHULTZ *et al.*, 2012). No início do processo de cicatrização, a MEC é composta por fibrina e fibronectina, proveniente da reposta causada pela chegada dos macrófagos. Em seguida, ocorre um aumento na deposição de proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Posteriormente, o colágeno torna-se a proteína mais abundante no tecido de granulação (Figura 10) (WITTE e BARBUL, 1997).

O colágeno constitui um grupo de proteínas fibrosas encontradas em todos os animais. Estas proteínas são produzidas por células do tecido conjuntivo, principalmente fibroblastos, bem como por uma variedade de outros tipos celulares. A resistência à tração e a compressibilidade do colágeno formador de fibras o tornam uma proteína ubíqua ao corpo humano. Embora 28 tipos de colágeno tenham sido identificados, os colágenos I e III, respectivamente, compõem aproximadamente 90% e 10% do colágeno total em pele, com o colágeno V representando cerca de 2% (XUE e JACKSON, 2015). Durante o processo cicatricial, a produção de colágeno fibrilar aumenta gradualmente. A matriz de colágeno resultante substitui finalmente a matriz provisória de fibrina. O colágeno compreende mais de 50% da proteína no tecido cicatricial e sua produção é essencial para o processo de cicatrização. O colágeno III e fibronectina são depositados nas etapas iniciais de cura; posteriormente, o colágeno III é gradualmente substituído por colágeno I, cuja deposição pode ser observada no dia 7 após o ferimento. O colágeno V está presente na cura da ferida dérmica em termos de modulação do comportamento dos fibroblastos e contração tecidual (ROUSSELLE *et al*, 2018). Estudos relatam que pacientes com síndrome de Ehlers-

Danlos clássica, causada por mutações no gene do colágeno V, mostram fragilidade da pele e cicatrização anormal de feridas (MARTIN *et al*, 2012).

Figura 10. Produção dos constituintes de MEC durante a cicatrização de feridas na pele.



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

As lamininas são glicoproteínas importante da membrana basal que separa epiderme da derme na pele humana (WOODLEY *et al*, 1988). As lamininas contribuem para dois aspectos principais da reparo de feridas, reepitelização e angiogênese, com lamininas específicas desempenhando diferentes papéis durante cada processo. Para reepitelização, as lamininas estão envolvidas no fornecimento do substrato para queratinócitos epiteliais movendo-se para cobrir a ferida para restabelecer uma barreira epitelial intacta. Lamininas também são críticas no crescimento e maturação dos vasos sanguíneos, portanto, são atores importantes na angiogênese (KARIYA *et al*, 2004; LORIO *et al*, 2015).

A fibronectina é um componente complexo da MEC, e é alvo crescente de pesquisas analisando sua capacidade de estimular o crescimento, disseminação, migração e contratilidade (GILDNER *et al*, 2014). Na pele, a fibronectina está presente na parte basal da epiderme, na derme papilar e, em menor quantidade, na derme reticular (GRINNELL *et al*, 1981). No reparo tecidual, a fibronectina desempenha um papel crítico na organização e estabilidade da MEC. Estudo *in vitro* revelou que a

fibronectina é realmente necessária para deposição de colágeno I e outras proteínas estruturais na MEC (SOTTILE e HOCKING, 2002).

3.5 Hormônio do crescimento e a pele

Estruturalmente o hormônio do crescimento (GH) é um polipeptídeo de 22 kDa composto por 191 aminoácidos, sendo ele sintetizado, principalmente, pelas células somatotróficas da hipófise anterior. A secreção de GH pelas células somatotróficas é regulada por interações homeostáticas, mediadas por influências neurais e periféricas (STEYN et al 2016; MULLER et al., 1999). Na hipófise anterior, a secreção do GH é pulsátil, principalmente noturna, e é regulada por um complexo sistema de controle neuroendócrino que compreende dois principais reguladores hipotalâmicos, o hormônio liberador de GH (GHRH) e a somatostatina (SS), exercendo influências estimuladoras e inibitórias, respectivamente, na célula somatotrófica (MULLER et al, 1999). O principal efeito do GH é atuar na síntese de proteínas, diferenciação e proliferação celular e, conseqüentemente, crescimento tecidual. Também é conhecido por interferir na regulação de carboidratos, lipídios, metabolismo de nitrogênio e minerais (KELLEY et al, 2007). Muitas das ações do GH são mediadas pela indução da expressão do fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), sendo o fígado a fonte primária do IGF-1 circulante (KELLEY et al, 2007).

Os efeitos do GH são mediados pelo receptor transmembrana do GH, o GHR, sendo expresso em altos níveis no fígado e em tecidos adiposos. Entretanto, pode ser detectado em outros tecidos, incluindo intestino, pele, cérebro, testículo, coração e músculo esquelético (KELLY et al., 1993). Dessa forma, esse hormônio atua através de dois mecanismos de ação independentes: um ativando os receptores celulares de GH e o outro induzindo a secreção de IGF1 pelo fígado (BIANCHE et al, 2017).

Ainda, o GH é um hormônio pleiotrópico, ou seja, ele é expresso não apenas a nível da hipófise, mas também em várias células e tecidos, que desempenham diferentes funções (endócrino, autócrino/parácrino) muito além daquelas descritos classicamente (ARCE et al, 2013).

Dados da literatura mostraram que o GH apresenta atividade biológica na pele (DUNAISKI e BELFORD, 2002). Foi detectado o receptor do GH na epiderme da pele humana e de ratos, em fibroblastos (LOBIE et al., 1990; MURPHY et al., 1983; OAKES et al., 1992) em adipócitos (GAVIN et al., 1982), sugerindo um papel direto na

modulação da função destas células na homeostasia da pele. Além disso, já foi demonstrada a expressão de RNAm para o GH em fibroblastos (TAVAKKOL et al., 1992). Disfunções na integridade da pele foram relatadas em pesquisas anteriores utilizando indivíduos acromegálicos (MATSUOKA et al., 1982; THIBOUTOT, 1995). Indivíduos com altos níveis de GH circulante apresentavam espessamento da epiderme, e elevado número de fibroblastos e aumento na deposição de glicosaminoglicanos na derme (MATSUOKA et al., 1982). Um estudo mostrou que pacientes com deficiência de GH têm pele mais fina que pessoas com produção normal desse hormônio (LANGE et al, 2001). Embora o GH possa apresentar seus efeitos diretamente na célula-alvo, foram encontradas evidências de que este hormônio também pode agir a partir de um efeito indireto, estimulando células cutâneas a produzir IGF-1 que age na diferenciação e proliferação de queratinócitos e fibroblastos, modulando o desenvolvimento do folículo capilar (LEE et al., 2010; RUDMAN et al., 1997).

Estudos relatam que o GH estimula a proliferação e migração de células endoteliais, assim como, aumenta a deposição de fibronectina e laminina por estas células (MESSIAS DE LIMA et al, 2017a). Em camundongos transgênicos para o GH, tem sido observado excessiva formação de tecido de granulação, redução do tamanho da ferida e aumento na vascularização da área afetada (THOREY et al., 2004). Messias de Lima et al (2017b), verificaram que o tratamento tópico com GH acelera o fechamento da ferida em camundongos, atuando no recrutamento inflamatório e antecipando a fase inflamatória do reparo tecidual. Além disso, neste mesmo trabalho, foi observado que o GH atua nos queratinócitos e fibroblastos, acelerando a reepitelização e a deposição de colágeno, além de estimular a angiogênese durante a formação de tecido de granulação e remodelação tecidual (MESSIAS DE LIMA et al, 2017b). Todos esses dados reforçam a hipótese de que o GH pode ter uma ação positiva sobre os fibroblastos no processo de cicatrização da pele.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Para a obtenção dos fibroblastos da pele, foram utilizados camundongos *Swiss* machos, com 06 meses de idade, provenientes do biotério central da UFAL. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal da UFAL (CEUA Nº 51/2014). Os animais foram mantidos com acesso livre a ração e água, iluminação artificial 12 horas claro e 12 horas escuro em gabinete refrigerado a temperatura de 22 ± 2 °C.

4.2 Isolamento de fibroblastos e cultura primária

Para a obtenção dos fibroblastos foi utilizado o protocolo descrito por FRANCO-BARRAZA e COL 2016, com modificações e descrito a seguir. Para o isolamento das células, primeiramente esses animais foram eutanasiados com aprofundamento do anestésico tiopental 120 mg/Kg, intraperitoneal. Após não apresentarem mais reflexos, os camundongos foram mergulhados em álcool 70% e posteriormente ocorreu a realização da tricotomia na região ventral dos mesmos. Raspou-se todo o pelo da região escolhida com lâmina de barbear. No fluxo laminar, com o auxílio de pinça e tesoura a pele foi cortada, cerca de 4mm, com cuidado para não atingir o tecido muscular, sendo a derme mantida para cima de modo que a pele não dobrasse. A região da pele retirada foi cortada em fragmentos, e estes foram lavados 3 vezes com PBS gelado suplementado com 1% de antibiótico. Placas de 6 poços foram arranhadas com lâminas de bisturi e lavadas com PBS para retirar todos os resíduos da fricção. Esses arranhões são necessários para auxiliarem as células a saírem do tecido. Os fragmentos lavados foram ainda cortados em pedaços de aproximadamente 1 mm³, e estes colocados com a derme para baixo na placa e deixado por 5 minutos secando. Após esse tempo, foi adicionado o meio DMEM (meio Eagle modificado por Dulbecco) suplementado 20% SBF (soro bovino fetal), 1% de penicilina, 0,25% *anfotericina* B e 10 mM de L-glutamina. As culturas foram mantidas na estufa a 37 °C em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ e observadas a cada 24 horas em microscópio de luz invertido com contraste de fase.

4.3 Análise morfológica dos fibroblastos de cultura primária

Para a análise morfológica das células, os fibroblastos de cultura primária foram plaqueadas em placas de 24 poços com meio DMEM suplementado 10% SBF, 1% de penicilina, L-glutamina e mantidas em estufa a 37 °C de atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ durante 24 horas. Posteriormente, o meio foi retirado e as células lavadas com PBS, fixadas com metanol por 10 minutos e coradas com Giemsa por 10 minutos. A placa foi examinada ao microscópio de luz invertido acoplado a um sistema de aquisição de imagens.

4.4 Citometria de fluxo com marcação para molécula anti-EpCAM

Para a realização da citometria de fluxo, foram plaqueadas 2×10^5 de células/poço em placas de 96 poços e de fundo "U". As células foram centrifugadas durante 6 minutos à 1500 rpm e a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e as células foram incubadas com anticorpo anti-EpCAM conjugado com APC (*Allophycocyanin*) ou o isotipo controle por 20 minutos, a 4°C, no escuro. Após a devida incubação, as células foram lavadas com PBS 2% SBF, centrifugadas e posteriormente fixadas com formaldeído 4%. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD) e os dados obtidos foram analisados através do software WinMDI versão 2.8.

4.5 Ensaio de imunofluorescência para avaliar a produção das moléculas de matriz extracelular pelos fibroblastos de cultura primária

Fibroblastos de cultura primária na 3ª passagem foram cultivados em placas de 8 poços, com lâminas de vidro (Lab-tek). Para os experimentos, foram plaqueados 7×10^3 células/poço e mantidas em cultura por 24 horas. Após este período as células foram lavadas, fixadas em metanol e, posteriormente, submetidas ao ensaio de imunofluorescência indireta. Primeiramente, as células foram hidratadas com PBS por 10 minutos e incubadas em solução de PBS/BSA a 1% por 30 minutos para bloquear sítios inespecíficos. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos primários específicos para colágeno tipo I e tipo III ou para laminina durante 1 hora, a temperatura ambiente. Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS e seguido da incubação com anticorpo secundário anti-coelho conjugado ao FITC (GAR-FITC) durante 45 minutos em câmara escura. Após lavagem com PBS, as

lâminas foram montadas com glicerol e lamínulas de vidro para posterior observação em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 50i.

4.6 Ensaio de proliferação dos fibroblastos de cultura primária

Fibroblastos provenientes da 3ª passagem de cultura primária foram descongelados e a cultura estabelecida. Posteriormente as células (4ª passagem) foram plaqueadas na concentração de 1×10^3 em placas de 6 poços, sendo utilizado meio DMEM 20% suplementado. A cultura foi mantida na estufa à 37°C e 5 % de CO₂ durante 48 horas ou 72 horas. Após esses períodos, as células foram desprendidas da placa com tripsina, lavadas e contadas com o auxílio da câmara de Neubauer.

4.7 Tratamento *in vitro* com o hormônio do crescimento

As células descritas anteriormente, foram tratadas com GH, na concentração de 100 ng/mL, durante 24 horas e submetidas aos posteriores ensaios.

4.8 Ensaio de proliferação de fibroblastos dérmicos tratados com GH

Para a realização desse ensaio, 3×10^4 células foram cultivadas, em triplicata, em placas de seis poços, por 24 horas na presença de SBF 10%. Após lavagem com PBS, as células foram tratadas, ou não, com hormônio do crescimento na concentração de 100 ng/mL, por 24 horas, em meio DMEM a 2% de SBF. Em seguida, utilizou-se uma solução de tripsina, para que as células fossem desprendidas da placa, lavadas com o próprio meio e contadas em câmara de Neubauer.

4.9 Ciclo celular em marcação com iodeto de propídio

O iodeto de propídio (PI) é um fluorocromo capaz de marcar o DNA. A marcação com PI proporciona a medida do percentual de células em cada fase do ciclo celular (G1/S/G2/M). Os fibroblastos obtidos da derme de camundongos foram plaqueados 3×10^4 células/poço em placas de 6 poços, sendo eles mantidos em estufa de CO₂ durante 24 horas. Após esse tempo, as células foram tratadas, ou não, com o hormônio do crescimento na concentração de 100 ng/mL, permanecendo durante 24 horas com o tratamento. As células foram soltas em solução de tripsina a 37°C, esta foi neutralizada com a adição de PBS/SBF. Posteriormente, foram centrifugadas e o

pellet ressuspendido em PBS etanol. As células foram centrifugadas novamente e incubadas durante 30 minutos na geladeira. Após esse período, os fibroblastos foram centrifugados, lavados com PBS e ressuspendidos em RNase. Por fim, foi adicionado o PI e mantido na geladeira durante 5 minutos. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD) e os dados obtidos foram analisados utilizando o software WinMDI versão 2.8.

4.10 Ensaio de imunofluorescência

Fibroblastos de cultura primária foram cultivados em placas de 8 poços, com lâminas de vidro (Lab-tek). Para os experimentos, foram plaqueados 7×10^3 células/poço e mantidas em cultura por 24 horas. Após este período, as células foram tratadas, ou não, com o hormônio do crescimento na concentração de 100 ng/mL, permanecendo durante 24 horas com o tratamento. Posteriormente, foram lavadas, fixadas em metanol e submetidas ao ensaio de imunofluorescência indireta. Em seguida, as células foram hidratadas com PBS por 10 minutos e incubadas em solução de PBS/BSA a 1% para bloquear sítios inespecíficos. Após um período de 30 minutos, as células foram incubadas com anticorpos primários específicos para colágeno tipo I, laminina ou fibronectina durante 1 hora a temperatura ambiente. Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS e seguido da incubação com anticorpo secundário GAR-FITC durante 45 minutos em câmara escura. Após lavagem com PBS, as lâminas foram montadas com glicerol e lamínulas de vidro. As lâminas foram avaliadas por microscopia de fluorescência e as fotomicrografias foram obtidas utilizando câmara Nikon modelo DS-Ri1 (Microscópio Nikon Eclipse 50i). A intensidade de fluorescência foi determinada em pixels e quantificada pelo programa Image J 1.44p.

4.11 Análises estatísticas

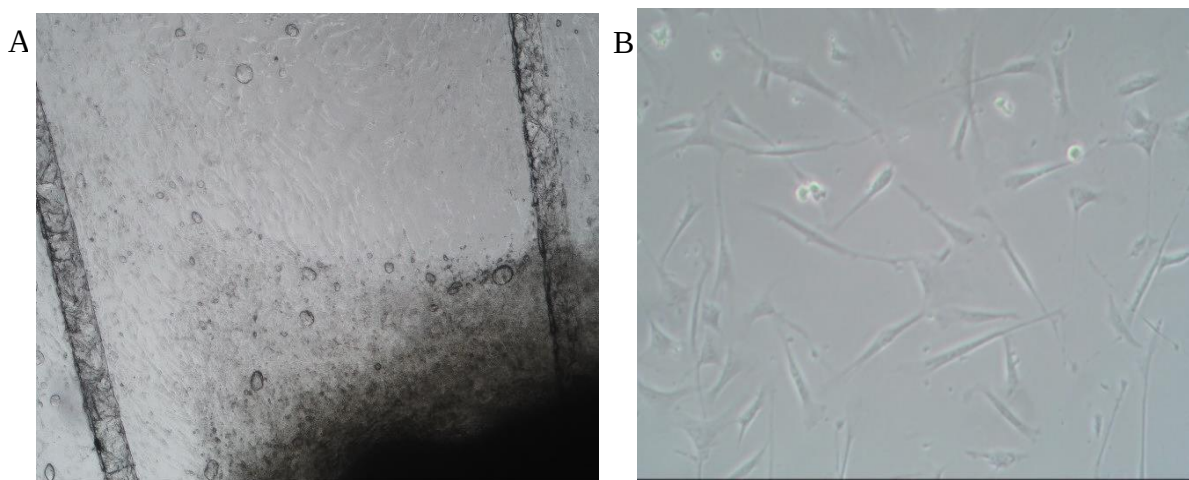
Para as análises estatísticas foi utilizado o teste t de Student. Para as análises e confecção dos gráficos foi utilizado o programa de computador GraphPad Prism versão 5.0. Os valores obtidos foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Cultura primária de fibroblastos

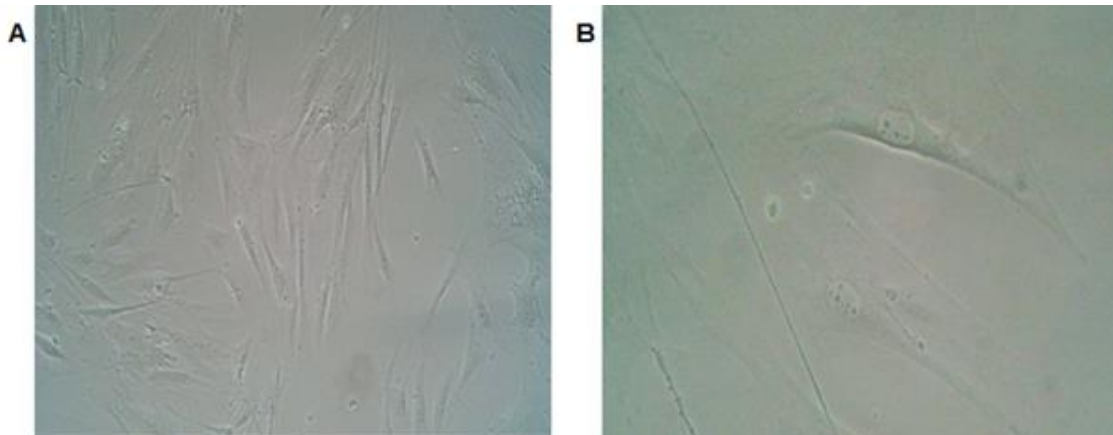
Foram testados diferentes protocolos para o isolamento dos fibroblastos a partir de derme de camundongos e obteve-se o melhor resultado quando foi utilizada a técnica do explante de fragmentos da pele (Figura 11). Como descrito no tópico “Metodologia”, as culturas foram mantidas na estufa a 37 °C em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂, em meio DMEM suplementado 20% SBF, 1% de penicilina, 0,25% *anfotericina* B e L-glutamina (meio completo), foram observadas a cada 24 horas em microscópio de luz invertido com contraste de fase. O meio de cultura foi mudado a cada 4 ou 5 dias removendo metade do volume e reabastecendo com um volume similar. Após 12 a 15 dias de explante, as culturas foram lavadas com PBS, tratadas com solução de tripsina a 0,1 %, neutralizadas com meio de cultura, centrifugadas e cultivadas com meio completo em garrafa de 25 cm², sendo esta a 1ª passagem (Figura 12). Quando as culturas se encontravam em estado de semi-confluência foi realizada a 2ª passagem para uma garrafa de 75 cm² e foi mantida em DMEM completo para expansão. Uma vez que os fibroblastos alcançam a confluência em uma garrafa de 75 cm², as células foram utilizadas para a realização dos experimentos ou congeladas para futuras análises experimentais.

Figura 11. Fotomicrografias obtidas após 12 dias de cultivo dos fibroblastos.



Em **A**, mostra os fibroblastos saindo do fragmento da derme dos camundongos. Aumento de 40X. Em **B**, mostra os fibroblastos na placa de cultura. Aumento de 100X.

Figura 12. Fotomicrografias obtidas da cultura de fibroblastos.



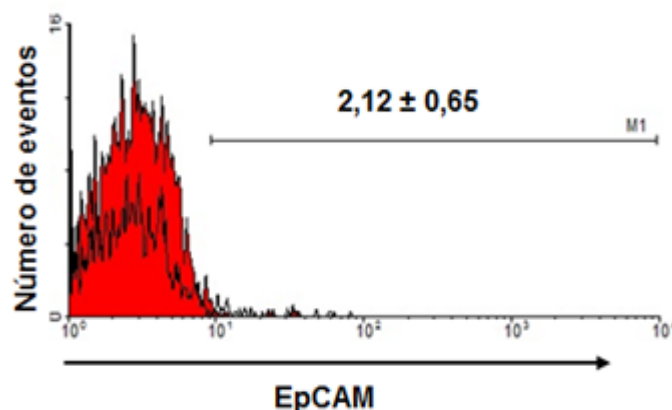
Em **A**, mostra os fibroblastos após a 1ª passagem quando cultivados em garrafa de 25 cm². Aumento de 100X. Em **B**, mostra os fibroblastos no aumento de 200X.

5.2 Expressão da molécula de adesão de célula epitelial na superfície celular

Para avaliar a presença de contaminantes na cultura celular obtida do explante da pele de camundongos foi utilizado um marcador específico de células epiteliais, a molécula de adesão de célula epitelial (EpCAM), por citometria de fluxo.

Como resultado, foi possível observar que somente 2,12% das células expressaram em sua superfície a molécula EpCAM (Figura 13).

Figura 13. Expressão da molécula de adesão de célula epitelial (EpCAM) na superfície celular.

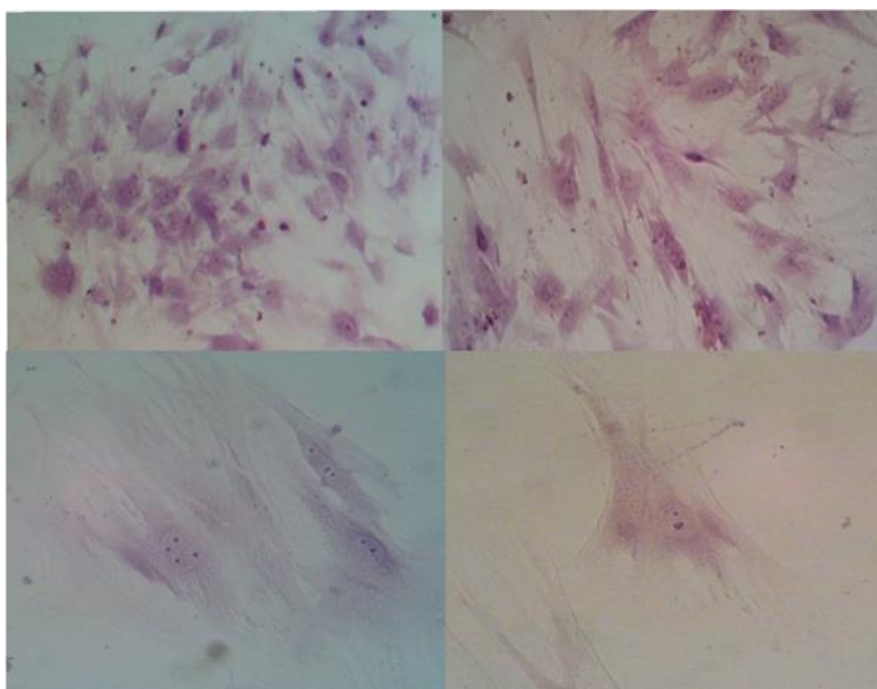


Histograma representativo da expressão de EpCAM com a porcentagem de células que expressam a molécula. O resultado está representado pela média $\pm$ desvio padrão, $n=3$.

5.3 Aspectos morfológicos dos fibroblastos

A partir da análise microscópica, foi possível observar a heterogeneidade morfológica dos fibroblastos. Como mostrada na figura 14, as células apresentaram formas variadas, fusiformes ou na sua maioria estreladas com prolongamentos citoplasmáticos evidentes e núcleo grande, geralmente arredondado e nucléolo evidente.

Figura 14. Aspectos morfológicos dos fibroblastos obtidos da derme de camundongos.



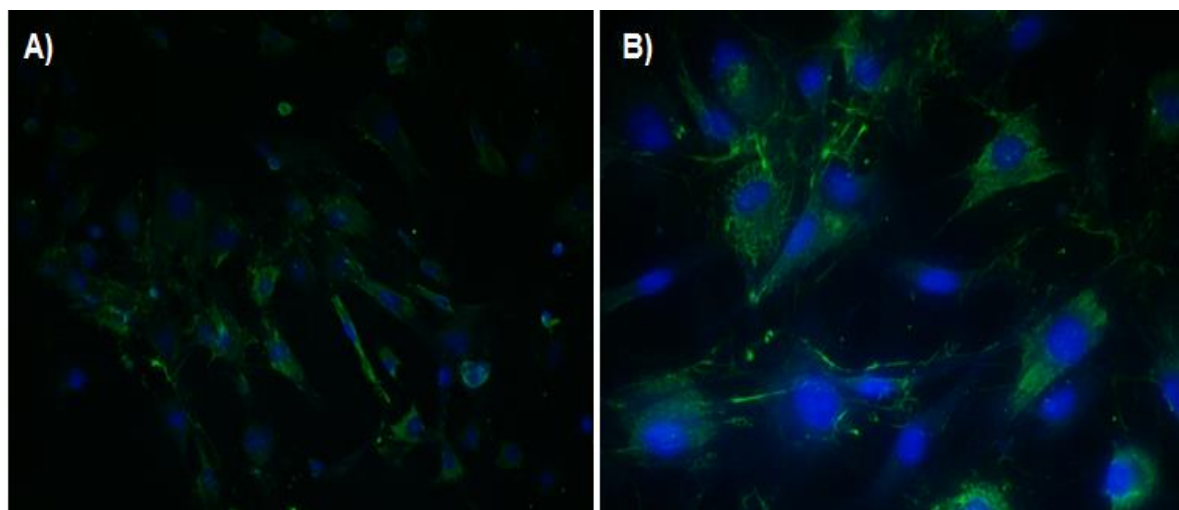
As fotomicrografias mostram a heterogeneidade morfológica dos fibroblastos em diferentes aumentos.

5.4 Produção de matriz extracelular pelos fibroblastos

Para avaliar a produção de moléculas de matriz extracelular (colágeno tipo I, colágeno tipo III e laminina) produzidos pelos fibroblastos obtidos da cultura primária, foi realizado o ensaio de imunofluorescência. Como resultado, foi possível observar que os fibroblastos produzem, em sua maioria, tanto colágeno tipo I (figura 15), como também da glicoproteína laminina (figura 16). Entretanto, a produção da proteína de matriz extracelular do colágeno tipo III, não foi possível ser observada nos fibroblastos da cultura primária utilizados para este estudo. Para comprovar a eficiência do ensaio de imunofluorescência e a atividade do anticorpo, foi utilizado um controle positivo com fibroblastos da linhagem 3T3. A figura 17A mostra somente o núcleo dos

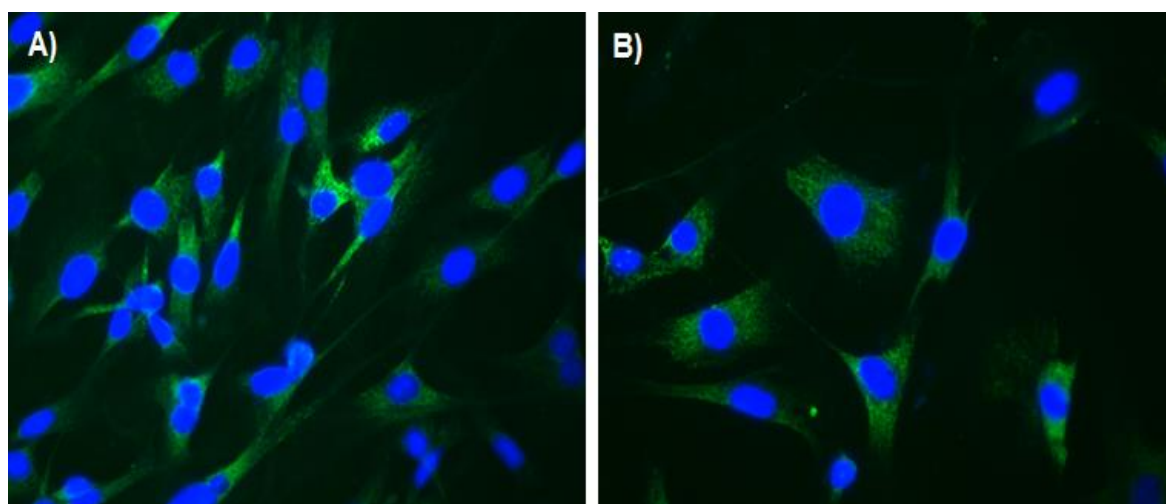
fibroblastos dérmicos da cultura primária uma vez não houve a marcação da fluorescência, devido à ausência do colágeno tipo III. Entretanto, na figura 17B é notável a deposição dessa molécula nas células de linhagem 3T3.

Figura 15. Produção de colágeno tipo I por fibroblastos.



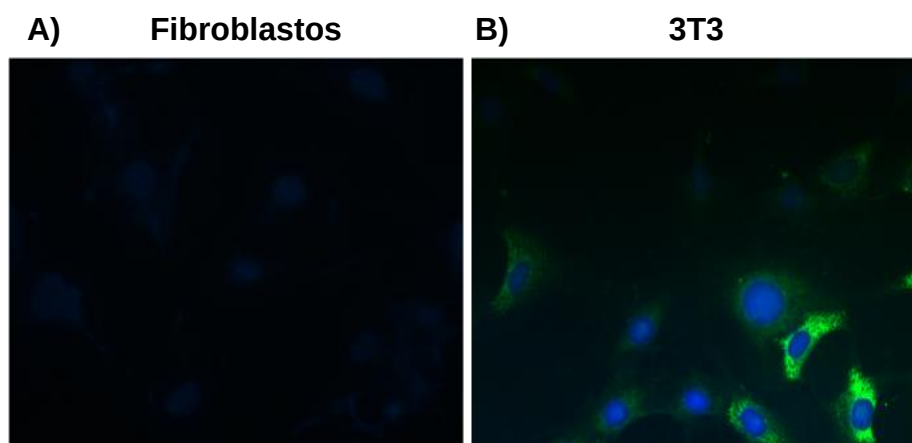
As células provenientes da 3ª passagem foram submetidas ao ensaio de imunofluorescência. As fotomicrografias demonstram a produção da proteína colágeno tipo I por fibroblastos (em verde). Em azul estão marcados os núcleos das células (DAPI). Aumento: em A, 200x e em B, 400x.

Figura 16. Produção de laminina por fibroblastos.



As células provenientes da 3ª passagem foram submetidas ao ensaio de imunofluorescência. As fotomicrografias demonstram a produção da glicoproteína por fibroblastos (em verde). Em azul estão marcados os núcleos das células (DAPI). Aumento: em A, 200x e em B, 400x.

Figura 17. Produção da molécula de matriz extracelular, colágeno tipo III.

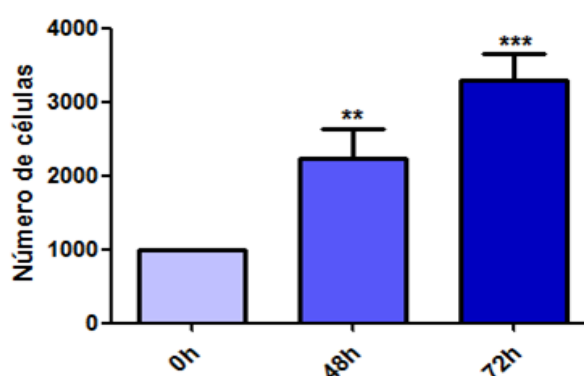


(A) as fotomicrografia mostram a ausência da produção de colágeno III, pelos fibroblastos de cultura primária. (B) Observa-se a presença da molécula nos fibroblastos de linhagem 3T3). A detecção foi realizada por ensaios de imunofluorescência indireta, utilizando anticorpos específicos para colágeno III, (fluorescência verde). Em azul estão marcados os núcleos das células (DAPI). Aumento: 400x.

5.5 Proliferação celular

Para avaliar a capacidade mitótica dos fibroblastos, foi realizado um ensaio de proliferação. As células foram plaqueadas e mantidas em cultura durante os tempos de 48 ou 72 horas. Como observado na figura 18, foi possível perceber que tanto após 48 horas, como também após 72 horas a proliferação das células apresentou significância. Assim, podemos inferir que a capacidade mitótica dos fibroblastos é mantida na 4ª passagem da cultura celular.

Figura 18. Proliferação dos fibroblastos.

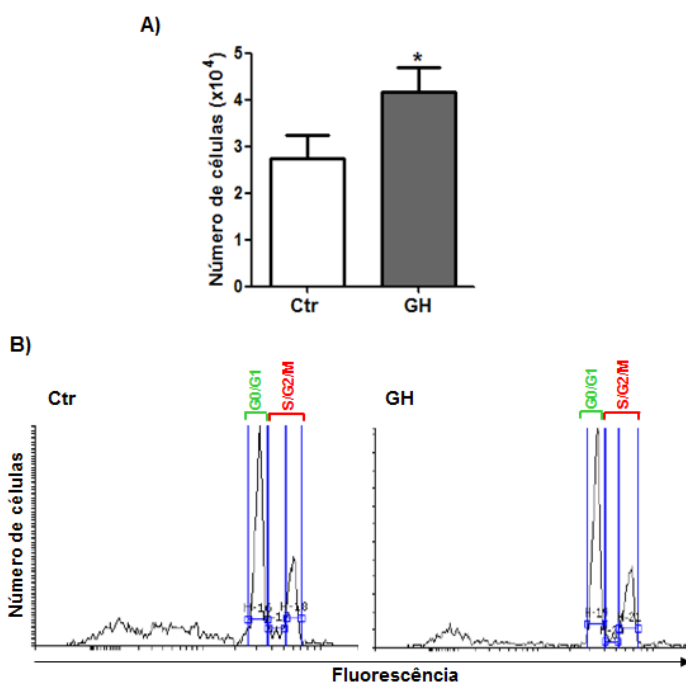


As células da 4ª passagem de cultura primária foram plaqueadas e deixadas em cultura durante 48 ou 72 horas para avaliar a proliferação celular. As barras representam médias com correspondente desvio padrão, sendo $n=3$. A análise estatística foi feita utilizando o teste t de Student. $**p<0,01$ e $***p<0,001$ em relação ao tempo 0 horas.

5.6 Efeitos do hormônio do crescimento na proliferação de fibroblastos

Para avaliar o efeito do GH na proliferação e no ciclo celular dos fibroblastos dérmicos, foi realizada a contagem celular e o ensaio de ciclo celular. Os dados quantitativos da contagem celular demonstraram que o tratamento com o GH na concentração de 100 ng/mL por um período de 24 horas, foi capaz de aumentar significativamente o número de células quando comparado ao grupo controle (Figura 19A). Também foi possível observar que as células estão em sincronização no seu ciclo celular, demonstrando todas as suas respectivas fases (Figura 19B).

Figura 19. Efeito do hormônio do crescimento na proliferação de fibroblastos dérmico:



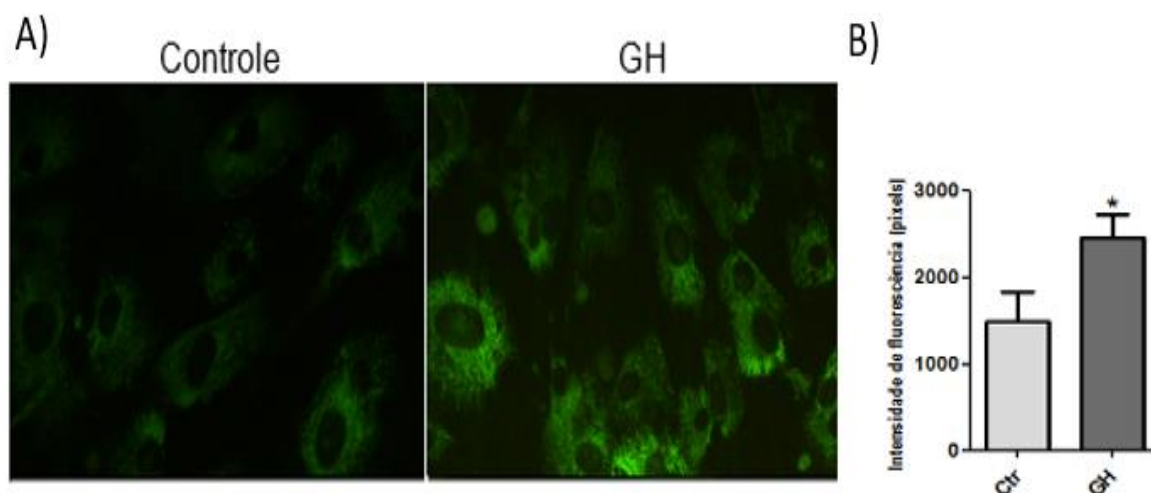
Cultura primária de fibroblastos foram tratados ou não com GH na concentração de 100 ng/mL, por 24 horas. Em **A**, observa-se o número de fibroblastos após 24 horas de tratamento. As barras representam médias com correspondente desvio padrão, sendo n=6. A análise estatística foi feita através do teste t de Student. *p<0,05 em relação ao controle. Em **B**, histogramas representativos do ciclo celular em marcação com iodeto de propídio avaliado por citometria de fluxo após 24 horas de tratamento.

5.7 Efeito do GH na produção de moléculas de matriz extracelular por fibroblastos

Para avaliar a produção de moléculas de matriz extracelular, as glicoproteínas laminina e fibronectina, e a proteína colágeno tipo I, produzidos pelos fibroblastos dérmicos, foi realizado o ensaio de imunofluorescência.

A partir da análise qualitativa foi constatado um aumento na produção de laminina no grupo tratado com o GH (Figura 20A). A quantificação da intensidade de fluorescência confirmou que o tratamento estimulou de forma significativa a produção de laminina quando comparado ao grupo controle (Figura 20B).

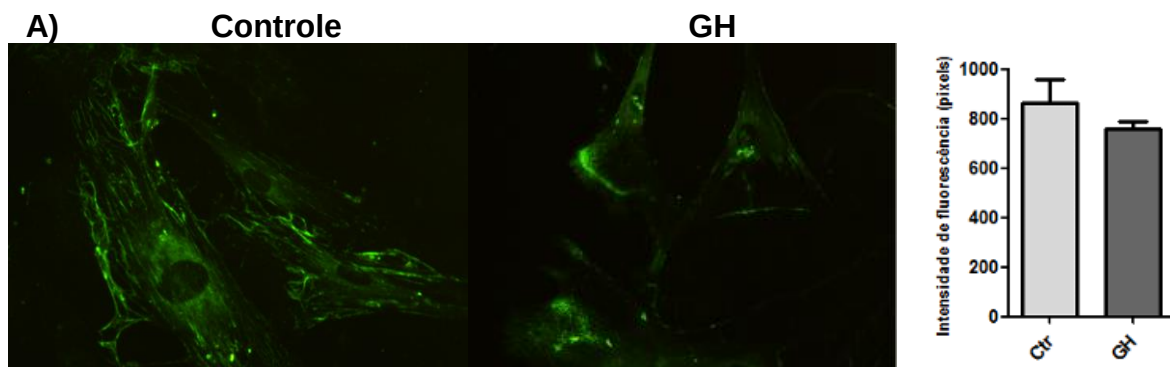
Figura 20. Efeitos do GH na produção de laminina.



Em **A**, as fotomicrografias mostram a produção de laminina, cultivadas na ausência (controle) ou presença de GH (100 ng/mL). A detecção foi realizada por ensaios de imunofluorescência indireta, utilizando anticorpos específicos para laminina (fluorescência verde). Aumento: 400x. **(B)** As barras representam a média $\pm$ EPM da intensidade de fluorescência e correspondem a análise quantitativa da expressão de laminina. Os resultados foram analisados usando o teste t de Student. * $P < 0,05$.

A produção da glicoproteína fibronectina pelos fibroblastos não foi alterada com o tratamento de GH por 24 horas quando comparada ao grupo controle (Figura 21A e 21B). Entretanto, foi verificado que o GH alterou a orientação das fibras de fibronectina, de um padrão de feixes paralelos ao longo do eixo celular para um padrão intrincado em rede (Figura 21A).

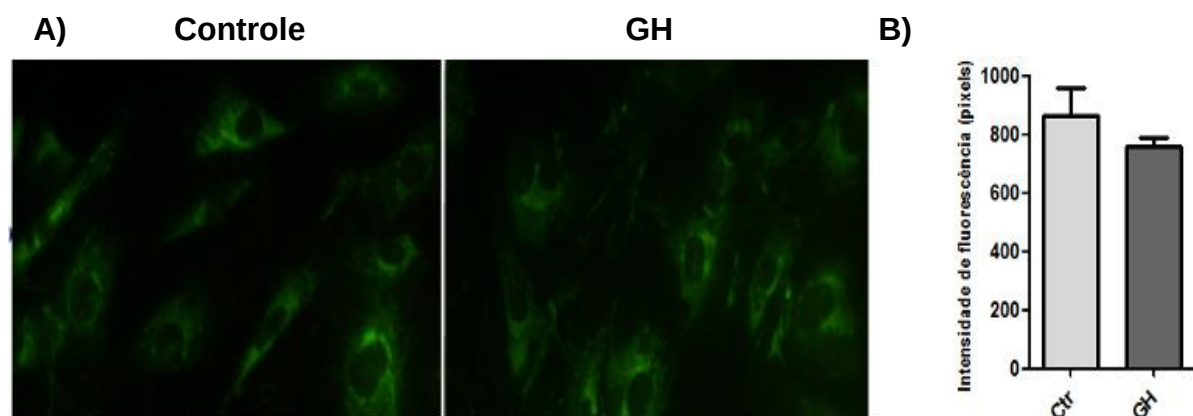
Figura 21. Efeitos do GH na produção de fibronectina.



(A) As fotomicrografias mostram a produção de fibronectina, cultivadas na ausência (controle) ou presença de GH (100 ng/mL). A detecção foi realizada por ensaios de imunofluorescência indireta, utilizando anticorpos específicos para fibronectina (fluorescência verde). Aumento: 400x. **(B)** As barras representam a média $\pm$ EPM da intensidade de fluorescência e correspondem a análise quantitativa da expressão de fibronectina. Os resultados foram analisados usando o teste t de Student.

Em relação ao colágeno tipo I, percebeu-se que sua produção foi homogênea pelos fibroblastos e foi constatado pela análise qualitativa que o tratamento com GH por 24 horas, não foi capaz de alterar a sua produção conforme mostrado na figura 22A. A quantificação da intensidade de fluorescência confirmou que o tratamento não estimulou a produção de colágeno tipo I quando comparado ao grupo controle (figura 22B).

Figura 22. Efeitos do GH na produção de colágeno tipo I.



(A) As fotomicrografias mostram a produção de colágeno tipo I cultivadas na ausência (controle) ou presença de GH (100 ng/mL). A detecção foi realizada por ensaios de imunofluorescência indireta, utilizando anticorpos específicos para colágeno tipo I (fluorescência verde). Aumento: 400x. **(B)** As barras representam a média $\pm$ EPM da intensidade de fluorescência e correspondem a análise quantitativa da expressão de colágeno 1. Os resultados foram analisados usando o teste t de Student.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foram isolados fibroblastos a partir da derme de camundongos e avaliada a influência do GH sobre a cultura primária de fibroblastos, tendo em vista avaliar a ação do GH na cicatrização de feridas. A cicatrização de feridas cutâneas é um processo fisiológico complexo que consiste na participação de muitos eventos celulares na tentativa de restaurar a lesão induzida por uma agressão local, resultando na cicatrização tecidual da pele e garantindo a homeostase (SHAW e MARTIN, 2009; EMING et al, 2007).

Inicialmente, foi padronizada a obtenção dos fibroblastos e seu estabelecimento como cultura primária, tendo em vista a importância destas células no processo de cicatrização de feridas e a necessidade de aprofundar o conhecimento sobre os efeitos do GH no reparo tecidual. O método de explante de tecidos para a obtenção de culturas primárias de células é um dos mais antigos e mais eficazes. A importância do uso de células primárias, em vez de linhas celulares de câncer, para estudos biológicos está se tornando amplamente reconhecida. As células primárias são preferidas em estudos de controle do ciclo celular, apoptose e reparo do DNA, pois as células cancerígenas carregam mutações nos genes envolvidos nesses processos. Os fibroblastos necessitam de uma superfície de contato para que possam secretar e organizar a MEC, que fornece suporte estrutural para sua adesão, migração e organização tecidual, além de regular funções celulares como crescimento e sobrevivência (FRANCO-BARRAZA et al., 2016).

Em nosso estudo, foi possível realizar o isolamento dos fibroblastos a partir da derme de camundongos pela técnica do explante de fragmentos da pele. Esta técnica permite que os fibroblastos migrem para fora do tecido (FRANCO-BARRAZA et al., 2016). Após o isolamento, foi observado que se tratava de células grandes, com diversos prolongamentos, núcleo e nucléolos bem definidos e o citoplasma bastante volumoso (Figuras 12). Os fibroblastos normais são células grandes com saliências proeminentes (lamelipódios). Uma cultura em crescimento saudável contém 1-10% de células no estágio M, reconhecidas como células arredondadas, elevadas sobre a superfície da placa, mas não destacadas da placa. Quando as células enchem uma placa, elas param a proliferação no estágio G1. A placa confluenta típica de fibroblastos contém uma camada de células firmemente compactadas (SELUENOV et al,

2010). Segundo FRANCO-BARRAZA e COL 2016, os fibroblastos podem ser utilizados até a 6ª passagem, sem alteração do fenótipo.

Neste estudo, utilizando a citometria de fluxo, foi avaliada a expressão da molécula de superfície EpCAM com o objetivo de demonstrar a pureza da cultura celular. Foi possível inferir que as células isoladas, na sua maioria, apresentavam um fenótipo de fibroblastos, sendo 98% negativas para a molécula EpCAM (Figura 13). De acordo com Kahounova *et al* (2018), é importante que se faça a marcação negativa com a molécula EpCAM para a identificação de fibroblastos de tecidos de tumores da mama e da próstata (KAHOUNOVA *et al*, 2018).

Foi demonstrado que os fibroblastos obtidos da derme de camundongos apresentaram morfologia heterogênea, alguns com característica morfológica fusiforme e outros estrelada (Figura 14). Estudos mostraram que os fibroblastos da pele apresentam subpopulações morfológica e funcionalmente heterogêneas. Por exemplo, a população de fibroblastos nas camadas superficiais da derme (a derme papilar) é fisiologicamente distinta daquela que reside em camadas mais profundas (a derme reticular) e ainda, é diferente da população associada aos folículos pilosos (SRIRAM *et al.*, 2015). MINE *et al*, observaram que a coloração com actina mostra uma organização difusa do citoesqueleto em fibroblastos da derme papilar, enquanto isso não ocorre com as células da derme reticular.

A homeostase tecidual é dependente do perfeito balanço entre proliferação e morte celular, que são eventos intimamente associados (ANAZETTI *et al*, 2007). Esse controle é vital para a manutenção do ritmo de proliferação, para garantir a correta replicação do material genético, segregação dos cromossomos, e coordenar os processos de diferenciação, senescência e morte (MALUMBRES *et al*, 2009). A desregulação desse ciclo pode gerar uma produção demasiada e descontrolada de células, levando a formação de tumores (ALBERTS *et al*, 2004). Em nosso trabalho, foi possível observar que os fibroblastos de cultura primária conseguiram manter sua capacidade mitótica até a 4ª passagem (Figura 18).

O GH atua como um fator mitogênico em uma diversidade de células, incluindo células musculares lisas, células endoteliais e fibroblastos, exercendo funções reguladoras no controle do metabolismo, crescimento equilibrado e diferenciação celular (YUN *et al.*, 2016). Neste estudo, verificamos que o GH foi capaz de aumentar significativamente o número de fibroblastos dérmicos após tratamento por 24 horas,

quando comparado com as células não tratadas (grupo controle) (Figura 19). Isto sugere que o GH atua estimulando a proliferação e/ou apresenta um efeito anti-apoptótico nestas células. Este achado corrobora com investigações anteriores, onde foi demonstrado que a proliferação de fibroblastos humanos foi significativamente maior no grupo tratado *in vitro* com GH e comparado ao grupo controle (LEE et al., 2010). Mesias de Lima et al. (2017b), demonstraram que GH estimulou, *in vitro*, a proliferação de células endoteliais tímicas. Ainda, camundongos tratados intratimicamente com GH, apresentaram 10-15% mais timócitos nas fases S e G2/M do ciclo celular (SMANIOTTO et al., 2005).

O ciclo celular é dividido em quatro fases: G1, S, G2 e M (NORBURY e NURSE, 1992). Durante a fase G1, as células respondem a sinais extracelulares que determinam se estas irão se dividir novamente ou se entrarão em estado G0. Após a passagem do ponto de restrição em G1, a célula se torna comprometida com novo ciclo de divisão, independente dos sinais externos de crescimento (SHERR e ROBERTS, 1999). Na fase S ocorre a duplicação do DNA. A fase G2 que é uma outra fase de crescimento e a fase M que representa a divisão celular propriamente dita (BRUCE et al., 2002). A progressão normal da fase G1/S é dependente de estímulos mitogênicos e pode ser alterada pelo estímulo de citocinas (PARDEE, 1989; SHERR, 1994).

Os fibroblastos são as principais células da derme, fornecendo resistência, tração e elasticidade através da produção de diversas moléculas de matriz extracelular (ROH et al, 2010). Entre essas moléculas, o colágeno é a proteína mais abundante, principalmente no tecido conjuntivo em fase de cicatrização. O colágeno é uma proteína fibrosa encontrada em todo o reino animal que apresenta propriedades mecânicas singulares, e é quimicamente inerte (SILVA et al, 2012). O colágeno tipo I é o mais frequente, correspondendo a aproximadamente 90% do colágeno predominante na pele (TRACY et al, 2016; CAMPOS et al, 2007).

A laminina é outra molécula de MEC, sendo uma glicoproteína importante da membrana basal que separa epiderme da derme na pele humana (WOODLEY et al, 1988). Esta molécula é de grande importância no processo de cicatrização, apresentando atividades de sinalização para promover a reepitelização, a angiogenese e a migração celular no microambiente da ferida. (LORIO et al, 2015). Neste trabalho, verificamos que os fibroblastos de cultura primária são capazes de produzir tanto a

molécula de colágeno I, como a glicoproteína laminina (Figura 15 e 16). Entretanto, não foi observada a produção de colágeno tipo III pelos fibroblastos dérmicos da cultura primária (Figura 17). Verificamos ainda, que o GH foi capaz de aumentar a produção da laminina por fibroblastos dérmicos (Figura 20). Este resultado corrobora com investigações anteriores, onde foi demonstrado, *in vitro*, que o GH aumentou a produção de laminina por células epiteliais tímicas (LINS et al., 2016). Células endoteliais expostas ao GH aumentaram a deposição de laminina e fibronectina e, consequentemente, a migração celular e angiogênese (MESSIAS DE LIMA, et al., 2017b). Ainda, em camundongos tratados ou transgênicos para o GH, foi observado aumento na deposição de laminina no microambiente tímico em comparação com os controles (SMANNIOTTO et al., 2005). Em trabalho anterior, foi observado que o tratamento tópico com GH aumentou a deposição de colágeno tipo I (MESSIAS DE LIMA et al., 2017a). No presente estudo, o tratamento com GH não alterou a deposição de colágeno tipo I e da fibronectina pelos fibroblastos dérmicos da cultura primária (Figuras 21 e 22). No entanto, um estudo demonstrou que em feridas realizadas em porcos e tratadas com GH não aumentaram a deposição de colágeno III, sendo este efeito observado apenas em relação ao colágeno I (KIM et al., 2009).

7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesse trabalho demonstraram que os fibroblastos foram obtidos da derme de camundongos utilizando a técnica do explante; a população celular apresentou heterogeneidade morfológica, deposição tanto colágeno tipo I como laminina e também mantendo a capacidade mitótica. Ainda, o GH foi capaz de acelerar o processo de proliferação celular em fibroblastos de cultura primária, mantendo a sincronização do seu ciclo celular e estimulando a deposição da glicoproteína laminina. Estes dados mostram *in vitro* que o GH exerce um efeito sobre a resposta biológica dos fibroblastos, fortalecendo a hipótese de que este hormônio apresenta um efeito positivo na cicatrização de feridas.

8. REFERÊNCIAS

- ALBERTS J, JOHNSON B, LEWIS A. **The Extracellular Matrix of Animals**. New York: Garland Science, 2002.
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. **Biologia Molecular e Celular**. 2004, 4.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 235.
- ANAZETTI MC, MELO PS. **Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular**. Metrocamp Pesquisa. 2007, v. 1, n. 1, p. 37-58.
- ATIT R, THULABANDU V, CHEN D. **Dermal fibroblast in cutaneous development and healing**. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2018, v.7, n.2.
- ARCE VM, DEVESA P, DEVESA J. **Role of growth hormone (GH) in the treatment on neural diseases: from neuroprotection to neural repair**. Neurosci Res. 2013; 76: p.179-186.
- AZZARONE B, MACIEIRA-COELHO A. **Heterogeneity of the kinetics of proliferation within human skin fibroblastic cell populations**. J. Cell Sci. 1982, v.57, p.177-187.
- BAINBRIDGE P. **Wound healing and the role of fibroblasts**. J. Wound. Care. 2013 22(8):407-408, 410-412.
- BALBINO CA, PEREIRA LM, CURI R. **Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão**. Rev. Bras. Cienc. Farm. 2005, v. 41, n. 1, p. 27-51.
- BIANCHI VE, LOCATELLI, RIZZI L. **Neurotrophic and Neuroregenerative Effects of GH/IGF1**. Int J Mol. Sci. 2017, v.18, n.11, p.2441.
- BROUGHTON G, JANIS JE, ATTINGER CE. **Wound healing: an overview**. Plast Reconstr Surg. 2006, v.117, n.7, p.12S-34S.
- BRUCE A, ALEXANDER J, JULIAN L, MARTIN R, KEITH R, PETER W. **Molecular Biology of the Cell**. Garland Science. 2002, 4 ed, p.1616.
- CAMPOS ACL, BORGES-BRANCO A, GROTH AK. **Cicatrização de feridas**. Arq Bras Cir Dig. 2007; v.20, n.1, p.51-58.
- CATERSON EJ, TRACY LE; MINASIAN RA. **Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound**. Adv Wound Care (New Rochelle). 2016, V.5, N.3, p.119-136.
- CESTARI SCP. **Noções de anatomia e histologia da pele**. Dermatologia Pediátrica. 2012.
- CHAMBERS e VUKMANOVIC-STEJIC. **Skin barrier immunity and ageing**. Imunologia. 2019.
- CHUONG CM; COTSARELIS G; STENN K. **Defining hair follicles in the age of stem cell bioengineering**. J. Invest. Dermatol. 2007, 127, p.2098–2100

- CLARK, R. A. F. **Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations I.** Journal of the American Academy of Dermatology, v. 13, p. 701-725, 1985.
- DRISKELL RR, LICHTENBERGER BM, HOSTE E, KRETZSCHMAR K, SIMONS BD, CHARALAMBOUS M, FERRON SR, HERAULT Y, PAVLOVIC G, FERGUSON-SMITH AC, WATT FM. **Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair.** Nature. 2013, v.504, n.7479, p. 277–281.
- DUNAISKI, V. e BELFORD, D. A. **Contribution of circulating IGF-I to wound repair in GH-treated rats.** Growth Horm IGF Res. 2002, v. 12, n. 6, p. 381-387.
- EMING SA, KRIEG T, DAVIDSON JM. **Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms.** J Invest Dermatol. 2007, v.127, p.514-25.
- FRANCO-BARRAZA J, BEACHAM DA, AMATANGELO MD, CUKIERMAN E. **Preparation of Extracellular Matrices Produced by Cultured and Primary Fibroblasts.** Curr Protoc Cell Biol. 2016, v.71, p.10.9.1-10.9.33
- FARRINGTON-ROCK C, CROFTS NJ, DOHERTY MJ, ASHTON BA, GRIFFIN-JONES C, CANFIELD AE. **Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes.** Circulation. 2004, v.110, p.2226-32.
- GANTWERKER EA, HOM DB. **Skin: Histology and Physiology of Wound Healing.** Facial Plast Surg Clin North Am. 2011, v.19, n. 3, p.441-53.
- GAVIN JR, SALTMAN RJ, TOLLEFSEN SE. **Growth hormone receptors in isolated rat adipocytes.** Endocrinology. 1982, v. 110, n. 2, p. 637–643.
- GILDNER CD, ROY DC, FARRAR CS, HOCKING DC. **Opposing effects of collagen I and vitronectin on fibronectin fibril structure and function.** Matrix Biol.2014, v.34, p.33–45.
- GODWIN LS, CASTLE JT, KOHLI JS, GOFF PS, CAIRNEY CJ, KEITH WN, SVIDERSKAYA VE, BENNETT DC. **Isolation, Culture, and Transfection of Melanocytes.** 2014, v.63, p. 1.8.1-1.8.20
- GONZALEZ AC, COSTA TF, ANDRADE ZA, PEIXOTO MEDRADO ARA. **Wound healing - A literature review.** An Bras Dermatol. 2016, v.91, n.5, p.614-20.
- GRINNELL F, BILLINGHAM RE, BURGESS L. **Distribution of fibronectin during wound healing in vivo.** Journal of Investigative Dermatology, 1981, v. 76, n. 3, p. 181–189.
- GURTNER GC, WERNER S, BARRANDON Y, LONGAKER MT. **Wound repair and regeneration.** Nature. 2008, v.453, p.314 –321.
- HÄNEL KH, CORNELISSEN C, LÜSCHER B, BARON JM. **Cytokines and the Skin Barrier.** Int J Mol. Sci. 2013, v.14, n.4, p.6720-45.

HINZ B. **The role of myofibroblasts in wound healing.** CURR RES TRANSL MED. 2016, v.64, n. 4, p. 171-177

HIGASHIYAMA R, NAKAO S, SHIBUSAWA Y, et al. **Differential contribution of dermal resident and bone marrow-derived cells to collagen production during wound healing and fibrogenesis in mice.** J Invest Dermatol. 2011, v.131, n.2, p.529–536.

HWA C, BAUER AE, COHEN DE. **Skin biology.** Dermatologic Therapy. 2011, v. 24, p.464–470.

IRMAK KM. **Multifunctional Merkel cells: Their roles in electromagnetic reception, finger-print formation, Reiki, epigenetic inheritance and hair form.** Medical Hypotheses. 2010, v.75, p.162–68.

JANSON DG, SAINTIGNY G, VAN ADRICHEM A, MAHE CEL, GHALBZOURI A. **Different gene expression patterns in human papillary and reticular fibroblasts.** J. Invest. Dermatol. 2012, v.132, p.2565–2572.

JOHNSTON DE. **Wound healing in skin.** Veterinary Clinics of North America: small animal practice. 1990, v. 20, n.1, p. 1-25.

JUNQUEIRA LCU, CARNEIRO J. **Histologia Básica Texto e Atlas.** 13ª edição. Editora Guanabara Koogan. 2017.

KANITAKIS J. **Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin.** Eur J Dermatol. 2002, v.12, n.4, p.390-9.

KARIYA Y, YASUDA C, NAKASHIMA Y, ISHIDA K, TSUBOTA Y, MIYAZAKI K. **Characterization of laminin 5B and NH2-terminal proteolytic fragment of its alpha3B chain: promotion of cellular adhesion, migration, and proliferation.** J Biol Chem 2004, v.279, p.24774–24784

KAHOUNOVA Z , KURFÜRSTOVÁ D , BOUCHAL J , KHARAISHVILI G , NAVRÁTIL J , REMŠÍK J , ŠIMEČKOVÁ Š , ŠTUDENT V , KOZUBÍK A , SOUČEK K . **The fibroblast surface markers FAP, anti-fibroblast, and FSP are expressed by cells of epithelial origin and may be altered during epithelial-to-mesenchymal transition. Cytometry.** 2018, v.93, n.9, p.941-951.

KASUYA A, TOKURA Y. **Attempts to accelerate wound healing.** J Dermatol Sci. v. 76, n. 3, p. 169–172, 2014.

KELLY PA, ALI S, ROZAKIS M, GOUJON L, NAGANO M, PELLEGRINI I, GOULD D, DJIANE J, EDERY M, FINEDORI J. **The growth hormone/prolactin receptor family.** Recent Prog Horm Res. 1993, v.48, p.123-164.

KELLEY KW, WEIGENT DA, KOOIJMAN R. **Protein hormones and immunity.** Brain Behav Immun. 2007, v.21, n.4, p.384–392.

- KIM SH, HEO EJ, LEE SW. **The effect of topically applied recombinant human growth hormone on wound healing in pigs.** Wounds: a compendium of clinical research and practice. 2009, v. 21, n. 6, p. 158–163.
- LANDÉN NX, LI D, STAHL M. **Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing.** Cell Mol Life Sci. 2016, v.73, p.3861–3885
- LANGE M, THULESEN J, FELDT-RASMUSSEN U, SKAKKEBAEK NE, VAHL N, JØRGENSEN JO, et al. **Skin morphological changes in growth hormone deficiency and acromegaly.** Eur J Endocrinol. 2001, v.145, p.147-153.
- LAWRENCE W, DIEGELMANN, R. **Growth factors in wound healing.** Clin. Dermatol. 1994, v.12, p.157.
- LEE SW, KIM SH, KIM JY, LEE Y. **The effect of growth hormone on fibroblast proliferation and keratinocyte migration .** J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010, v. 63, p. 364-369.
- LEIBOVICH SJ, ROSS R, **Macrophage-dependent factor that stimulates proliferation of fibroblasts in vitro.** Am. J. Pathol. 1976, v.84, n.3, p.501–513.
- LI J, CHEN J, KIRSNER R. **Pathophysiology of acute wound healing.** Clin Dermatol. 2007, v.25, p.9-18.
- LIMA CFM. **Influência do hormônio do crescimento nos processos celulares e moleculares da fase inflamatória do reparo tecidual cutâneo.** Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas. Maceió-AL. 2018.
- LINDLEY LE, STOJADINOVIC O, PASTAR I, TOMIC-CANIC M. **Biology and biomarkers for wound healing.** Plast Reconstr Surg 2016, v.138, n.3, p.18-28.
- LINS MP, ARAUJO VIEIRA LF, ROSAAA, SMANIOTTO S. **Growth hormone in the presence of laminin modulates interaction of human thymic epithelial cells and thymocytes *in vitro*.** Biological research. 2016, v. 49, n. 1, p. 37.
- LOBIE PE, BREIPOHL W, LINCOLN DT, GARCÍA-ARAGÓN J, WATERS MJ. **Localization of the growth hormone receptor/binding protein in skin.** J Endocrinol. 1990, v.126, p.467-71.
- LORIO V, TROUGHTON LD, HAMILL KJ. **Laminins: Roles and Utility in Wound Repair.** Advances in wound care. 2015, v. 4, n. 4, p. 250-263.
- MALUMBRES M, BARBACID M. **Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm.** Nat Rev Cancer. 2009, v.9, n.3, p.153-166.
- MARTIN, P. **Wound healing-aiming for perfect skin regeneration.** Science. 1997, v.276, p.75.
- MARTIN P, TEODORO WR, VELOSA AP, MORAIS J, CARRASCO S, CHRISTMANN RB. **Abnormal collagen V deposition in dermis correlates with skin thickening**

and disease activity in systemic sclerosis. Autoimmun. Rev. 2012, v.11, p.827–835.

MASON DE, MITCHELL KE, LI Y, FINLEY MR, FREEMAN LC. **Molecular basis of voltage-dependent potassium currents in porcine granulosa cells.** Mol Pharmacol. 2002, v.61, n.1, p.201-13.

MATSUOKA LY, WORTSMAN J, KUPCHELLA CE, ENG A, DIETRICH JE. **Histochemical Characterization of the Cutaneous Involvement of Acromegaly.** Arc Inter Med. 1982, v. 142, n. 10, p.1820–1823.

MEDRADO AR, PUGLIESE LS, REIS SR, ANDRADE ZA. **Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts.** Lasers Surg Med. 2003, v.32, p.239-44.

MESSIAS DE LIMA CF, SANTOS REIS MD, SILVA RAMOS FW, AYRES-MARTINS S, SALETE S. **Growth hormone modulates in vitro endothelial cell migration and formation of capillary-like structures.** Cell Biol Int. 2017, v.41, n.5, p.577-584.a

MESSIAS DE LIMA CF, ARAUJO VIEIRA LF, CARVALHO WANDERLEY LA, SOUZA FERRO JN, SMANIOTTO S. **Topical Growth Hormone Accelerates Wound Healing in Mice.** Wounds : a compendium of clinical research and practice. 2017, v. 29, n. 12, p. 387– 392. B

MINE S, FORTUNEL NO , PAGEON H, ASSELINEAU D. **Aging Alters Functionally Human Dermal Papillary Fibroblasts but Not Reticular Fibroblasts: A New View of Skin Morphogenesis and Aging.** PLoS One. 2008, v.3, n.12.

MULLER EE, LOCATELLI V, COCCHI D. **Neuroendocrine Control of Growth Hormone Secretion.** Physiol Ver. 1999, v.79, n.2, p.511–607.

MURPHY LJ, VRHOVSEK E, LAZARUS L. **Identification and characterization of specific growth hormone receptors in cultured human fibroblasts.** J Clinical Endocrinol Metabol. 1983, v. 57, n. 6, p.1117–1124.

NAGALINGAM RS, AL-HATTAB DS, CZUBRYT MP. **What's in a name? On fibroblast phenotype and nomenclature.** Can J Physiol Pharmacol. 2019, v. 97, n.6, p.493-49.

NORBURY C, NURSE P. **Animal cell cycles and their control.** AnnuRev Biochem. 1992. v.61, p.441-70.

OAKES SR, HAYNES KM, WATERS MJ, HERINGTON AC, WERTHER GA. **Demonstration and localization of growth hormone receptor in human skin and skin fibroblasts.** J Clin Endocrinol Metab. 1992.v. 75, n. 5, p. 1368–73.

PARDEE AB. **G1 events and regulation of cell proliferation.** Science. 1989, v. 246, n.4930, p. 603-8.

PLIKUS MV, GUERRERO-JUAREZ CF, ITO M, LI YR, DEDHIA PH, ZHENG Y, SHAO M, GAY DL, RAMOS R, HSI TC, OH JW, WANG X, RAMIREZ A,

KONOPELSKI SE, ELZEIN A, WANG A, SUPAPANNACHART RJ, LEE HL, LIM CH, NACE A, GUO A, TREFFEISEN E, ANDL T, RAMIREZ RN, MURAD R, OFFERMANN S, METZGER D, CHAMBON P, WIDGEROW AD, TUAN TL, MORTAZAVI A, GUPTA RK, HAMILTON BA, MILLAR SE, SEALE P, PEAR WS, LAZAR MA, COTSARELIS G. **Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing.** Science. 2017, v.355, n.6326, p.748-752.

REINKE JM, SORG H. **Wound Repair and Regeneration.** Eur Surg Res. 2012, v.49, n.1, p.35-43.

RINKEVICH Y, WALMSLEY GG, HU MS, MAAN ZN, NEWMAN AM, DRUKKER M, JANUSZYK M, KRAMPITZ GW, GURTNER GC, LORENZ HP, WEISSMAN IL, LONGAKER MT. **Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential.** Science. 2015, v.17.

RIPPA AL, KALABUSHEVA EP, VOROTELYAK EA. **Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved.** Cells. 2019; v.8, n.6.

RODRIGUES M, KOSARIC N, BONHAM CA, GURTNER GC. **Wound healing: a cellular perspective.** Physiol Ver .2019, v.99, p.665–706.

ROUSSELLE P, MONTMASSON M, GARNIER C. **Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization.** Matrix Biol. 2018.

RUDMAN SM, PHILPOTT MP, THOMAS GA, KEALEY T. **The Role of IGF-I in Human Skin and its Appendages: Morphogen as Well as Mitogen?** J Invest Dermatol. 1997, v. 109, n. 6, p. 770–777.

SCHMIDT BA, HORSLEY V. **Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing.** Development. 2013, v.140, n.7, p.1517-27.

SCHNEIDER DF, PALMER JL, TULLEY JM, SPEICHER JT, KOVACS EJ, GAMELLI RL, FAUNCE DE. **A novel role for NKT cells in cutaneous wound repair.** J. Surg. Res. 2011, v.168, n.2, p.325–U214.

SCHULTZ GS et al. **NIH Public Access.** 2012, v. 19, n. 2, p. 134-148.

SELUANOV A, VAIDYA A, GORBUNOVA V. **Establishing Primary Adult Fibroblast Cultures From Rodents.** J Vis Exp. 2010, n.44, p. 2033.

SHAW TJ, MARTIN P. **Wound repair at a glance.** J. Cell Sci. 2009, v.122, p.3209–3213.

SHERR CJ, ROBERTS JM. **CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1- phase progression.** Genes Dev. 1999, v.13, n.12, p.1501-12

SHERR CJ. **G1 phase progression: cycling on cue.** Cell. 1994, v.79, n.4, p.551-5

SILVA TF, PENNA ALB. **Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais.** Rev Inst Adolfo Lutz. 2012, v.71, n.3, p. 530-539.

SMANIOTTO S, DE MELLO-COELHO V, VILLA-VERDE DM, PLÉAU JM, POSTELVINAY MC, DARDENNE M, SAVINO W. **Growth hormonemodulates**

thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXCL12. Endocrinology. 2005. v. 146, n. 7, p.3005-3017.

SORG H, TILKORN DJ, HAGER S, HAUSER J, MIRASTSCHISKI U. **Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts.** Eur Surg.Res. 2017, v. 58, n.1-2, p.81-94.

SORRELL JM, BABER MA, CAPLAN AI. **Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes.** J. Cell. Physiol. 2004, v.200, p.134–14a

SORRELL JM, CAPLAN AI. **Fibroblast heterogeneity: more than skin deep.** J.Cell Sci. 2004, v.117, p.667–675b

SOTTILE J, HOCKING DC. **Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions.** Mol Biol Cell 2002, v.13, p.3546–3559.

SRIRAM G, BIGLIARDI PL, BIGLIARDI-QI M. **Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models *in vitro*.** Eur J Cell Biol. 2015, v.94, n.11, p.483-512.

STEYN FJ, TOLLE V, CHEN C, EPELBAUM J. **Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone Secretion.** Compr Physiol. 2016, v.6, n.2, p.687-735.

STRBO N, YIN N, STOJADINOVIC O: **Innate and adaptive immune responses in wound epithelialization.** Adv Wound Care. 2014, v.3, p.492–501.

STUNOVA A, VISTEJNOVA L. **Dermal fibroblasts—A heterogeneous population with regulatory function in wound healing.** Cytokine Growth Factor Rev. 2018, v.39, p.137-150.

TAKAKURA N. **Role of hematopoietic lineage cells as accessory components in blood vessel formation.** Cancer Sci. 2006, v.97, p.568-74.

TAVAKKOL A, ELDER JT, GRIFFITHS CE, COOPER KD, TALWAR H, FISHER GJ, KEANE KM, FOLTIN SK, VOORHEES JJ. **Expression of Growth Hormone Receptor, Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) and IGF-1 Receptor mRNA and Proteins in Human Skin.** J Invest Dermatol. 1992, v. 99, n. 3, p. 343-349.

THIBOUTOT DM. **Clinical review 74: Dermatological manifestations of endocrine disorders.** J Clinical Endocrinol Metabol. 1995, v. 80, n. 10, p. 3082-7.

THOREY IS, HINZ B, HOEFELICH 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.

- TOMASEK JJ, GABBIANI G, HINZ B, CHAPONNIER C, BROWN RA. **Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2002, v.3, p.349–63.
- TRACY LE, MINASIAN RA, CATERSON EJ. **Extracellular Matrix and Dermal.** Adv Wound Care. 2016, v.5, n.3, p.119–136.
- VAN DER VEER WM, BLOEMEN MC, ULRICH MM, MOLEMA G, VAN ZUIJLEN PP, MIDDELKOOP E, NIESSEN FB. **Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation.** Burns, 2009, v.35, p.15–29.
- XIAN X, HÅKANSSON J, STÅHLBERG A, LINDBLOM P, BETSHOLTZ C, GERHARDT H, SEMB H . **Pericytes limit tumor cell metastasis.** j clin invest. 2006, v.116, n.3, p.642-51.
- XUE M, JACKSON CJ. **Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring.** Adv Wound Care (New Rochelle). 2015, v.4, n.3, p.119–136
- ZAIDI Z, LANIGAN SW. **Skin: Structure and Function.** In: Dermatology in Clinical Practice. 2010.
- ZOUBOULIS CC, PICARDO M, REICHRATH J. **The sebaceous gland and the pilosebaceous unit as an endocrine organ.** Dermato-Endocrinology 2009, v.1, p.63- 107.
- ZOUBOULIS CC. **The skin as an endocrine organ.** Dermato-Endocrinology. 2009, v.1, n.5, p.250-252.
- WERNER S, GROSE R. **Regulation of wound healing by growth factors and cytokines.** Physiol Rev. 2003, v.83, p.835–70.
- WERNIG G, CHEN SY, CUI L, VAN NESTE C, TSAI JM, KAMBHAM N, VOGEL H, NATKUNAM Y, GILLILAND DG, NOLAN G, WEISSMAN IL. **Unifying mechanism for different fibrotic diseases.** Proc Natl Acad Sci. 2017, v.114, p.4757– 4762.
- WITTE M, BARBUL A. **General principles of wound healing.** Surg. Clin. North Am. 1997, v.77, p.509.
- WOODLEY DT, STANLEY JR, REESE MJ, O'KEEFE EJ. **Human dermal fibroblasts synthesize laminin.** J Invest Dermatol. 1988, v.90, n.5, p.679-83.
- WONG R, GEYER S, WENINGER W, GUIMBERTEAU JC, WONG JK. **The dynamic anatomy and patterning of skin.** Exp Dermatol. 2016, v.25, n.2, p.92-8.
- YANG R, LIU F, WANG J, CHEN X, XIE J, XIONG K. **Epidermal stem cells in wound healing and their clinical applications.** Stem Cell Res Ther. 2019, v.10, n1, p229.
- YUN HM, CHANG SW, PARK KR, HERR L, KIM EC. **Combined effects of growth hormone and mineral trioxide aggregate on growth, differentiation, and angiogenesis in human dental pulp cells.** J Endod. 2016, v.42, n.2, p.269–75.