

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

CICERO FAGNER MESSIAS DE LIMA

**INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NOS PROCESSOS
CELULARES E MOLECULARES DA FASE INFLAMATÓRIA DO REPARO
TECIDUAL CUTÂNEO**

MACEIÓ-AL

2018

CICERO FAGNER MESSIAS DE LIMA

**INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NOS PROCESSOS
CELULARES E MOLECULARES DA FASE INFLAMATÓRIA DO REPARO
TECIDUAL CUTÂNEO**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde, da
Universidade Federal de Alagoas, em
cumprimento às exigências para a
obtenção do título de Doutor em
Ciências da Saúde.**

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

MACEIÓ- AL

2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário Responsável: Janis Christine Angelina Cavalcante – CRB:1664

L732i Lima, Cicero Fagner Messias de.
Influência do hormônio do crescimento nos processos celulares e moleculares da fase inflamatória do reparo tecidual cutâneo / Cicero Fagner Messias de Lima. – 2018.
99 f.: il.

Orientador: Salete Smaniotto.
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 84-99.

1. Cicatrização. 2. Hormônio do crescimento (GH). 3. Angiogênese.
4. Macrófago. I. Título.

CDU: 616-003.9



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Cicero Fagner Messias de Lima

Influência do hormônio do crescimento nos processos celulares e moleculares da fase inflamatória do reparo tecidual cutâneo.

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 11 de maio de 2018.

Banca Examinadora

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

Prof.ª Dr.ª Adriana Ximenes da Silva - (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Luciana Aparecida Corá – (UNCISAL)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular (LBC), do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/ICBS, da Universidade Federal de Alagoas/UFAL, sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Salete Smaniotto.

Durante o trabalho contamos com o apoio financeiro dos órgãos: CNPq, CAPES e FAPEAL.

AGRADECIMENTOS

Esta foi a última folha que escrevi desta tese. Nela deixo registrado não só a minha lealdade durante os anos que me dediquei a construir uma ideia, mas todos os *heróis* que me fizeram chegar até aqui.

À incrível equipe do Laboratório de Biologia Celular (LBC), por ter proporcionado um ambiente organizado e adequado para a pesquisa. Estou convencido que somos capazes quanto grupo. Aos geniais professores só tenho a agradecer por toda confiança creditada nesta equipe.

Ao Professor Dr. Emiliano Barreto pelo apoio e dedicação ao LBC que permitiu (e ainda permite) a formação de inúmeros estudantes. Nesse momento, gostaria de dizer mais uma vez que me sinto honrado por ter sido seu aluno durante o curso de Ciências Biológicas. Não lembro exatamente como, mas suas aulas incríveis me mostraram que eu poderia contribuir para a Ciência. Hoje eu o considero como referência de um homem ético e, sem dúvidas, um dos melhores professores que já conheci. Obrigado por tudo.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), em especial, ao Prof. Dr. Emiliano Barreto, à Prof^a. Dr^a. Alessandra Abel Borges, à Prof^a. Dr^a. Iracilda de Moura Lima, ao Prof. Dr. Alexandre Borbely, ao Prof. Dr. Marcelo Duzzioni, ao Prof. Dr. Olagide Castro, à Prof^a. Dr^a. Camila Braga e ao Prof. Dr. Gustavo de Araújo, por todos os ensinamentos, críticas, sugestões e parcerias. Aqui quero deixar por escrito a enorme contribuição das aulas no meu desenvolvimento profissional. Obrigado pela atenção, pelo profissionalismo e até mesmo por me fazer perder noites de sono estudando para os seminários.

À Prof^a. Dr^a. Adriana Ximenes, ao Prof. Dr. Lucas de Araújo e à Prof^a. Dr^a. Maria Danielma Reis pela imensa colaboração e ensinamentos no exame de qualificação. Acho que consegui retirar jswd0 os “através” do texto (risos).

Aos professores idealizadores do PPGCS, que desde 2006 lutam com altruísmo e determinação para realização de sonhos, como este.

Às colaboradoras Dr^a. Jamyle Nunes e Dr^a. Karen Borbely pela dedicação na realização dos ensaios de expressão gênica e citocinas. Valeu gente!

À técnica do laboratório de Biologia Celular, a Msc. Juliane Pereira, pela condução impecável do LBC e por sempre se fazer presente. Obrigado pela parceria técnica

e por me ouvir em momentos de *stress* (risos).

À minha família, que mesmo sem entender de nenhum processo aqui descrito, se honra por ter acreditado que eu conseguiria chegar até aqui. Agradeço, por sempre permitir e a me ajudar a realizar os meus sonhos, a minha querida mãe, Maria. Esta mulher, apenas com palavras conseguiu me formar um homem, mesmo sem ter um exemplo em casa. Neste parágrafo, também, gostaria de dizer obrigado aos meus irmãos, Wagner e Joseane, aos meus mais queridos sobrinhos, Nycolas, Isabella e Felipe, que mesmo ausentes me deram forças e alegrias para enxergar um futuro próximo.

Aos órgãos de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) e a Universidade Federal de Alagoas (UFAL), pelo apoio institucional.

À Coordenação e a Secretaria do PPGCS por estar sempre atenta as solicitações prestadas.

Aos meus amigos de vida e academia, Layse Veloso, Daniela Russo, Claudia Leucas, Janaina Menezes, Igor Menezes, Jualianderson Souza, Marvin Lins, Navyla Candeia, Mariana Santos, Anne (a recém doutora) e Carol Castro por todo incentivo que recebi durante esses anos de doutoramento. Pessoal, obrigado por todos os momentos que estive ao lado de vocês. Acho que isso a gente leva *pra* vida toda.

À minha querida orientadora, Salete Smaniotto, que durante longos 11 anos (e alguns meses), esteve ao meu lado, exercendo papéis incríveis na minha formação. Neste momento, gostaria de agradecê-la por tudo que consegui conquistar. É difícil imaginar como teria sido diferente se não a tivesse conhecido há muito tempo atrás. Seus ensinamentos foram muito além do currículo. Foram para a vida. Eu me sinto honrado pelo apoio e por ter cruzado o seu caminho. Em 2007, quando a conheci, não imaginava que iríamos tão longe. Estamos fechando um ciclo de um bom tempo, mas eu preciso imaginar que não terminaremos por aqui.

E a Deus que, mesmo não estando fisicamente presente, traçou um plano que ainda não entendo mas confio e sigo acreditando que, em breve, os dias serão melhores.

RESUMO

No presente estudo buscou-se investigar *in vivo e in vitro* os efeitos do hormônio do crescimento (GH) nos processos celulares e moleculares envolvidos na fase inflamatória do reparo tecidual cutâneo em camundongos. Para este propósito, foram utilizados camundongos, com 6 meses de idade, machos da linhagem *Swiss* (CEUA/UFAL N° 51/2014). A indução da ferida foi realizada, após a administração de anestésico, com auxílio de um punch dermatológico de 1cm de diâmetro. Após estes procedimentos, os animais foram tratados topicamente com GH (10^{-7} M) por 3 dias consecutivos, uma vez ao dia. O grupo controle recebeu apenas veículo. Os fragmentos de pele foram submetidos a coloração por hematoxilina e eosina (HE) para a contagem de células inflamatórias. Amostras da pele injuriada foram usadas para quantificação das citocinas envolvidas em respostas celulares inflamatórias pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Por imunohistoquímica foi avaliada a presença de macrófagos e células endoteliais, e a deposição de moléculas de matriz extracelular: colágeno III, fibronectina e laminina. Fragmentos do fígado e da pele que sofreu injúria foram utilizados para avaliar a expressão do RNAm para o fator-1 de crescimento semelhante a insulina (IGF-1). *In vitro*, foram utilizados macrófagos da linhagem J774 e células endoteliais tímicas (tEnd.1) para avaliar a formação de estruturas semelhantes a capilares, em matrigel. Fibroblastos da linhagem 3T3 foram utilizados para o ensaio de migração celular. Inicialmente, demonstrou-se que o tratamento tópico com GH por 3 dias acelerou o recrutamento de macrófagos e linfócitos sem alterar os níveis de interleucina-6 (IL-6) quando comparado ao controle. No entanto, o uso tópico do GH revelou aumento dos níveis de IL-10 e diminuição nos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). *In vitro*, o tratamento com GH não alterou os níveis de IL-6 e IL-10 produzidos pelos macrófagos, na concentração de 10^{-7} M, no entanto, o meio condicionado de macrófagos tratado com GH estimulou as células endoteliais na formação de estruturas semelhantes a capilares, em matrigel. Além disso, o GH aumentou a migração de fibroblastos. Verificou-se ainda que o tratamento tópico com GH estimulou a angiogênese a deposição de colágeno tipo III, a deposição de fibronectina e de laminina. Por fim, a análise da expressão gênica revelou que o tratamento tópico com GH não altera os níveis de RNAm para o IGF-1 no fígado e na pele. Em conjunto, os dados obtidos sugerem que o GH modula a cicatrização de feridas cutâneas antecipando o recrutamento de macrófagos, aumentando a deposição de proteínas de matriz extracelular (MEC) e estimulando a angiogênese, independente de IGF-1.

PALAVRAS-CHAVE: Cicatrização; hormônio do crescimento; angiogênese; macrófago.

ABSTRACT

In the present study, we investigated *in vivo* and *in vitro* the effects of growth hormone (GH) on cellular and molecular processes involved in the inflammatory phase of cutaneous tissue repair in mice. For this purpose, we used 6-month-old male mice of Swiss strain (CEUA / UFAL No. 51/2014). The induction of the wound was performed, after anesthetic administration, with the aid of a 1cm diameter metal ring. Then, the animals were treated with GH (10^{-7} M) for 3 consecutive days, once a day. The control group received only vehicle. The skin fragments were stained with HE for the count of inflammatory cells. Injured skin samples were performed for quantification of cytokines (IL-6, IL-10, TNF- α) involved in inflammatory cellular responses by ELISA. Immunohistochemistry assay was used to evaluate the presence of macrophages and endothelial cells, and the deposition of extracellular matrix molecules: collagen III, fibronectin and laminin. Liver and injured skin fragments were used to evaluate the IGF-1 mRNA expression. *In vitro*, J774 lineage macrophages and thymic endothelial cells (tEnd.1) were used to evaluate the formation of capillary-like structures in matrigel. Fibroblasts from the 3T3 strain were used for cell migration assay. Initially, the topical treatment with GH for 3 days has accelerated the recruitment of macrophages and lymphocytes without altering IL-6 levels when compared to control. However, topical use of GH revealed increased levels of IL-10 and decreased levels of TNF- α . *In vitro*, GH treatment did not alter the IL-6 and IL-10 levels produced by macrophages treated with GH (10^{-7} M). However, GH-treated macrophages conditioned medium stimulated endothelial cells in the formation of capillary-like structures in matrigel. In addition, GH increased the fibroblasts migration. It was further found that topical treatment with GH stimulated angiogenesis, type III collagen deposition of fibronectin and laminin. Finally, gene expression analysis revealed that topical treatment with GH does not alter mRNA levels for IGF-1 in both liver and skin. Taken together, our data suggest that GH accelerates the healing of cutaneous wounds, anticipating macrophage recruitment, increasing the deposition of ECM proteins and stimulating angiogenesis, independent of IGF-1.

Keywords: Wound healing; Growth hormone; angiogenesis; macrophage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Aspectos histológicos da pele humana	22
Figura 2- Aspectos histológicos da epiderme e derme da pele humana	24
Figura 3- Esquema representativo da pele e seus elementos efetores.....	26
Figura 4 - Esquema representativo da fase inflamatória da cicatrização de feridas na pele.....	30
Figura 5 - Esquema representativo da fase de formação de tecido de granulação na pele.	31
Figura 6- Esquema representativo da fase de remodelamento.....	33
Figura 7- Gráfico representativo da deposição dos constituintes de MEC durante a cicatrização de feridas na pele.....	35
Figura 8- Modelo da área de ferimento no dorso de camundongo.....	42
Figura 9- Quantificação de área positiva para CD31 por meio do <i>plugin thresholdcolour</i>	48
Figura 10. Microambiente inflamatório alterado em resposta ao tratamento com GH.....	55
Figura 11- Perfil celular inflamatório em resposta ao tratamento com GH.....	56
Figura 12. Presença aumentada de macrófagos (F4/80) na injúria após o tratamento com GH.....	57
Figura 13. O tratamento com GH aumenta os níveis de IL-10 na fase inflamatória.	58
Figura 14. Macrófagos J774 e a produção de citocinas frente ao GH.....	60
Figura 15. O tratamento com GH não altera a viabilidade de macrófagos.....	60
Figura 16. Meio condicionado de macrófagos tratados com GH estimula a formação de estruturas semelhantes a capilares por células endoteliais.....	61
Figura 17. O tratamento tópico com GH estimula a angiogênese.....	63
Figura 18. O tratamento com GH não altera o número de fibroblastos na fase inflamatória.	65
Figura 19. O GH estimula a migração de fibroblastos <i>in vitro</i>	65
Figura 20- O GH não altera a viabilidade de fibroblastos <i>in vitro</i>	66

Figura 21- O GH aumentou a deposição de Colágeno III no reparo tecidual.....	67
Figura 22- O GH aumenta a deposição de laminina no reparo tecidual.....	68
Figura 23- O GH aumenta a deposição de fibronectina no reparo tecidual	69
Figura 24- Expressão gênica para o Igf-1 no fígado.....	71
Figura 25- O tratamento tópico com GH não altera a expressão gênica para Igf-1 na pele.....	72
Figura 26- Representação esquemática dos efeitos do GH na fase inflamatória do reparo tecidual	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Células recrutadas e principais mediadores liberados no reparo tecidual.....	28
TABELA 2. Processamento histológico.....	43
TABELA 3. Técnica de coloração por hematoxilina-eosina.....	44
TABELA 4. Oligonucleotídeos utilizados	50
TABELA 5. Celularidade recrutada na fase inflamatória do reparo tecidual frente ao tratamento com GH.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA: Albumina do soro bovino (*bovine serum albumine*)

CD31: Grupo de diferenciação 31

CD62L: ou L-selectina (*cluster of differentiation*)

DAB: Diaminobenzidina

DC: Célula Dentrítica

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA: Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EPM: Erro padrão da média

eNOS: óxido nítrico-sintase endotelial (*endothelial nitric oxide synthase*)

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*)

FGF: Fator de crescimento fibroblástico (*fibroblast growth factor*)

GH: Hormônio do crescimento (*growth hormone*)

GHBP: Proteínas ligadoras de GH (*growth hormone-binding protein*)

GHr: Receptor do hormônio do crescimento (*growth hormone receptor*)

GHRH: Hormônio liberador do hormônio do crescimento (*growth hormone releasing hormone*)

HE: Hematoxilina-eosina

HIV-1: Vírus-1 da imunodeficiência humana (*human immunodeficiency virus-1*)

IFN: Interferon

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

IL: Interleucina

JAK: Janus-cinase

LFA1 ($\alpha_L\beta_2$): Antígeno 1 associado à função linfocitária (*lymphocyte function-associated antigen 1*)

MAC1 ($\alpha_M\beta_2$): Complexo de Ataque a Membrana (*membrane attack complex type*)

1)

MCP-1: Proteína quimioatraente para monócitos 1 (*Monocyte chemoattractant protein 1*).

MEC: Matriz extracelular

MTT: ([3-(4,5 -dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium) (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).

P.A.: Porcentagem absoluta

PBS: Tampão fosfato-salina (*phosphate buffered saline*)

PCR: Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaqueta (*platelet-derived growth factor*)

PECAM-1: molécula de adesão celular endotelial plaquetária (*platelet endothelial cell adhesion molecule*)

PI3K: Fosfoinositídeo 3-quinase

RNA: Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

ROS: Espécie reativa de oxigênio (*reactive oxygen species*)

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

S1P: Esfingosina-1-fosfato (*sphingosine-1-phosphate*)

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

SS: Somatostatina

STAT: Transdutor de sinal e ativador de transcrição (*signal transducer and activator of transcription*)

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

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

UV: Radiação ultravioleta

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

VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$): antígeno de aparecimento tardio (*very late antigen-4*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 A pele	21
3.1.1 Aspectos gerais.....	21
3.2 Cicatrização de feridas na pele.....	26
3.2.1 Fase de Coagulação ou Inflamatória.....	28
3.2.2 Formação de tecido de granulação.....	30
3.2.3 Fase de remodelamento.....	33
3.2.4 Matriz extracelular na cicatrização de feridas.....	34
3.3. Interações entre a pele e hormônios.....	36
3.3.1 Hormônio do crescimento.....	37
4 MATERIAIS E METODOS	
4.1. Ensaio <i>in vivo</i>:	
4.1.1 Animais, ensaio de Cicatrização de Feridas e tratamento	41
4.1.2 Processamento histológico.....	42
4.1.3 Técnica de coloração.....	43
4.1.4. Contagem das células recrutadas.....	44
4.1.5 Imunohistoquímica.....	44
4.1.5.1 Imunoperoxidase em corte congelado.....	44
4.1.5.2 Imunoperoxidase em corte parafinado.....	46
4.1.5.3 Imunofluorescência.....	48
4.1.6 Captura de imagem e quantificação do CD31, colágeno tipo III,	

fibronectina e laminina.....	47
4.1.6. Quantificação de Citocinas.....	48
4.1.7. Extração de RNA, síntese de cDNA e Reação de amplificação em cadeia da DNA polimerase (PCR).....	49
4.2. <i>In vitro</i>:	
4.2.1 Cultura de Células Endoteliais murinas.....	50
4.2.2 Cultura de Macrófagos murinos	50
4.2.3. Cultura de Fibroblastos murinos	50
4.2.4 Tratamento com GH.....	51
4.2.5 Ensaio de Viabilidade Celular por MTT.....	51
4.2.6. Quantificação de Citocinas.....	51
4.2.7 Ensaio de formação de estruturas semelhantes a capilares.....	52
4.2.8. Ensaio de migração das células endoteliais em câmara de <i>transwell</i> ..	52
4.3 Análise estatística	53
5. RESULTADOS.....	54
5.1. O microambiente inflamatório foi alterado em resposta ao tratamento com GH.	54
5.2. O GH estimula o recrutamento de macrófagos na região da ferida.....	56
5.3 O tratamento com GH modula a produção de citocinas no tecido.....	58
5.4. Ensaio <i>in vitro</i> com células endoteliais e macrófagos.....	59
5.4.1 Efeitos do GH na produção de citocinas por macrófagos J774.....	59
5.4.2 O meio condicionado de macrófagos tratados com GH estimula a formação de estruturas semelhantes a capilares por células endoteliais.....	60
5.5. O GH estimula a angiogênese <i>in vivo</i>	62
5.6. Efeitos do GH sobre de fibroblastos.....	64
5.6.1 O GH não altera o número de fibroblastos na fase inflamatória do processo de cicatrização.....	64
5.6.2 O GH estimula a migração de fibroblastos.....	65

5.7 O GH modula a produção de proteínas de MEC <i>in vivo</i>	66
5.8. O tratamento com GH não altera a expressão gênica do IGF-1.....	70
6. DISCUSSÃO.....	73
7.0 CONCLUSÃO.....	83
8. REFERÊNCIAS.....	84

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas na pele é um processo fisiológico altamente orquestrado que envolve interações entre plaquetas e uma grande variedade de tipos de células, como neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos, bem como componentes de matriz extracelular (MEC). Este processo, inclui os estágios de inflamação, formação de tecido de granulação e remodelamento (BROUGHTON et al., 2006; ROUSSELLE et al., 2018). O objetivo imediato no reparo de feridas é conseguir a integridade do tecido e a restabelecimento da homeostase. A sobrevivência e funcionalidade de cada tipo celular durante as fases da cicatrização que contribuem para a proliferação, migração, produção de MEC e contração da ferida são altamente coordenados e sensíveis a uma grande diversidade de fatores (EMING et al., 2007a; ROUSSELLE et al., 2018). Falhas ou prolongamento da fase inflamatória, pode resultar em retardo da cicatrização ou o não fechamento da ferida. As falhas na cicatrização das feridas são, ainda hoje, um problema clínico significativo, com grande impacto sobre os custos da assistência à saúde (DE MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009; SEN et al., 2009; KAPP e SANTAMARIA, 2017).

A fase inflamatória é uma fase essencial do reparo tecidual, caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia de leucócitos, liberação local de citocinas e fatores de crescimento, bem como a ativação de células migratórias (WITTE e BARBUL, 1997). Além disso, a formação de um novo tecido de sustentação, composto de colágeno, fibronectina, laminina, vitronectina e elastina são imprescindíveis para manter um microambiente adequado para resolução da resposta inflamatória (DEMIDOVA-RICE et al., 2012; SINGER AJ; e CLARK, 1999). Nos últimos anos vêm sendo demonstradas evidências de que substâncias endócrinas podem agir neste processo, modulando a formação de vasos sanguíneos, a deposição de proteínas de MEC, a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (THOREY et al., 2004; DIOUFA et al., 2010) e estimulando a polarização de macrófagos para o perfil antiinflamatório no início da lesão (LEE et al., 2017).

Nesse contexto, nos últimos 50 anos pesquisas revelaram papéis potenciais

do hormônio do crescimento (GH) na pele e uma série de pesquisas tem focado no uso farmacológico do GH na cicatrização de feridas cutâneas (CAICEDO e ROSENFELD, 2017; DIOUFA et al., 2010; MESSIAS DE LIMA, CF et al., 2017b). Além dos seus efeitos na promoção do crescimento (MULLER et al., 1999), na manutenção do sistema imune e circulatório (LINS et al., 2016; MESSIAS DE LIMA, CF et al., 2017a; TOUW et al., 2000), na plasticidade neuronal (COCULESCU, 1999) e envelhecimento (NASS, 2013) o mecanismo pelo qual o processo de cicatrização de feridas é alterado quando se administra o hormônio do crescimento ainda não é bem entendido.

Dados do nosso grupo demonstraram que o tratamento tópico com GH aumentou a produção de colágeno tipo I, estimulou a angiogênese e acelerou a reepitelização. Além disso, foi observada uma rápida resolução da fase inflamatória, sendo a taxa de contração da ferida cerca de 40% nos animais tratados com GH, contribuindo assim para a aceleração do reparo tecidual (MESSIAS DE LIMA, CF et al., 2017b).

Nesse sentido, a proposta do presente estudo foi de avaliar os efeitos do GH sobre parâmetros celulares e moleculares na fase inflamatória da cicatrização de feridas cutâneas em camundongos. O conhecimento dos efeitos pleiotrópicos do GH em diferentes células recrutadas durante a fase inflamatória, permitirá uma melhor compreensão da ação deste hormônio quando utilizado como estratégia terapêutica na cicatrização de feridas.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vivo* e *in vitro* os efeitos do hormônio do crescimento nos processos celulares e moleculares envolvidos na fase inflamatória do reparo tecidual cutâneo em camundongos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

In vivo:

- ▶ Caracterizar o perfil de células inflamatórias no leito da injúria após o tratamento tópico com GH;
- ▶ Mensurar a produção de citocinas envolvidas na fase inflamatória do reparo tecidual (IL-6, IL-10, TNF-alfa).
- ▶ Analisar a angiogênese após o tratamento tópico com GH;
- ▶ Quantificar a população de fibroblastos presentes na fase inflamatória do reparo tecidual;
- ▶ Avaliar a expressão de proteínas de MEC envolvidas em migração celular e na formação de tecido provisório de reparo tecidual após o tratamento tópico com GH;
- ▶ Analisar a expressão gênica para o IGF-1 no fígado e na ferida cutânea após o tratamento tópico com GH.

In vitro:

- ▶ Analisar o efeito do GH na secreção de citocinas (IL-6, IL-10) pelos macrófagos;
- ▶ Avaliar a formação de estruturas semelhantes a capilares por células endoteliais na presença de meio condicionado de macrófago tratado com GH;
- ▶ Verificar o efeito do GH na migração de fibroblastos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A pele

A pele constitui uma barreira eficaz entre o organismo e o ambiente externo proporcionando mecanismos que são cruciais para a homeostasia. Compreende o maior órgão do corpo humano, composta pela epiderme e pela derme, e dependendo de sua localização anatômica e influências ambientais, mostra notável diversidade estrutural e funcional (BICKERS e ATHAR, 2006; PROKSCH et al., 2008; SLOMINSKI, Andrzej et al., 2000).

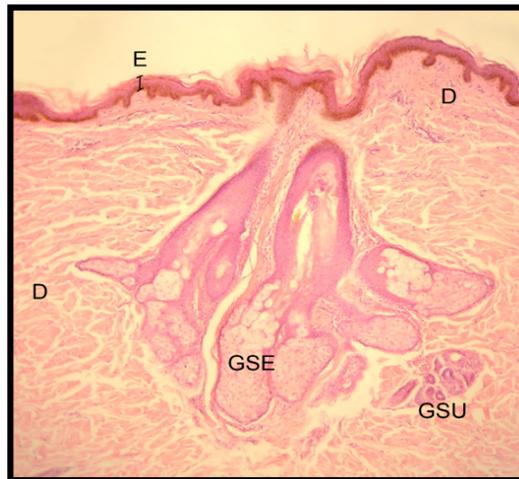
3.1.1 Aspectos Gerais

O desenvolvimento da pele surge a partir da justaposição de dois folhetos germinativos embrionários, o ectoderma e o mesoderma. A maioria das estruturas epidérmicas, como os folículos pilosos, as glândulas sebáceas, as glândulas sudoríparas apócrinas e écrinas, originam-se a partir da diferenciação do ectoderma, enquanto que o mesoderma é responsável pela formação das células de Langerhans, uma pequena população de linfócitos T e todos os constituintes dérmicos, com exceção dos nervos e receptores sensoriais que desenvolvem-se do neuroectoderma (BRIGGAMAN, 1982; DARLENSKI et al., 2011; SLOMINSKI, Andrzej et al., 2000).

Histologicamente, a pele humana é dividida em duas regiões: a epiderme, constituída basicamente por células epiteliais, e a derme, que é composta essencialmente por tecido conjuntivo (Figura 1). Conforme representado na Figura 2 A, a epiderme é composta por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado em que as células epiteliais assumem diferentes aspectos morfológicos em toda a sua extensão. As principais células, tornando-se 95% do total, são os queratinócitos, que movem-se progressivamente, a partir da sua aderência a lâmina basal, para a superfície da pele, formando várias camadas bem definidas durante o seu trajeto. Os queratinócitos formam a barreira da pele passando por um processo de

diferenciação altamente complexo, regulado por um conjunto de citocinas, que envolve a mudança de sua morfologia e integridade estrutural, um processo conhecido como cornificação (HÄNEL et al., 2013).

Figura 1 - Aspectos histológicos da pele humana



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 sobre a derme. Aumento: 100x. Fotomicrografia produzida no Laboratório de Biologia Celular da UFAL coradas com Hematoxilina & Eosina (do autor).

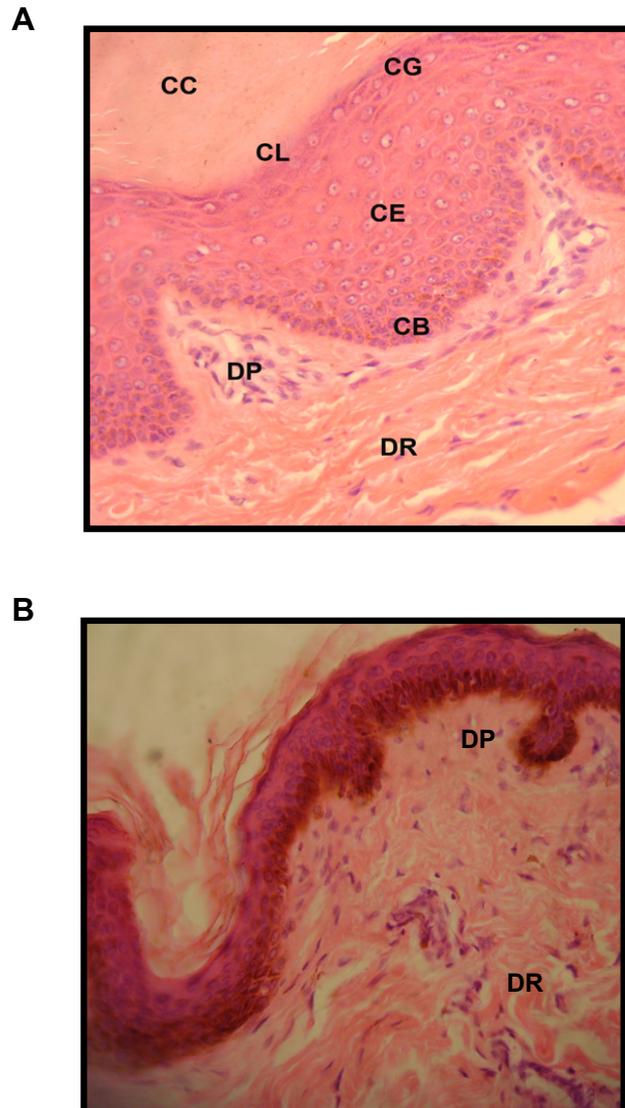
A epiderme pode ser dividida em cinco camadas distintas: a camada basal, que é constituída por células cilíndricas ou cuboides, repousando sobre a membrana basal que separa a epiderme da derme; a camada espinhosa, constituída por células achatadas, de núcleo central e citoplasma com curtas expansões de filamentos de queratina; a camada granulosa, a mais delgada, onde as células são achatadas, apresentam o núcleo central e citoplasma carregado de grânulos basófilos; a camada lúcida, que consiste em uma camada delgada de células achatadas e translúcidas, cujos núcleos e organelas foram digeridos por enzimas lisossomais; e, finalmente, a camada córnea, que apresenta espessura

variável e é constituída por células achatadas e mortas (HÄNEL et al., 2013; MADISON, 2003). Além dos queratinócitos, a epiderme contém três outros tipos celulares: os melanócitos, que produzem melanina, de onde partem prolongamentos que se estendem até a camada basal; as células de Langerhans, que se distribuem em toda a epiderme, mas encontra-se em maior densidade na camada espinhosa, participando do processo de apresentação de antígenos e as células de Merkel, em que são atribuídas as funções mecanorreceptoras da pele (DARLENSKI et al., 2011; PROKSCH et al., 2008).

A epiderme e a derme apresentam uma íntima e firme interface na junção dermo-epidérmica, onde a membrana basal e os hemidesmossomas estão presentes. A membrana basal da epiderme separa as estruturas epiteliais da derme. Abaixo desta membrana encontra-se um tecido que apresenta abundante matriz extracelular, vasos sanguíneos, diversos tipos celulares, nervos e receptores sensitivos. Observa-se, ainda, uma região delgada, que compreende a derme papilar, e outra região mais espessa, a derme reticular (FORE-PFLIGER, 2004; HÄNEL et al., 2013)

A derme papilar e reticular constituem-se de tecido conjuntivo e apresentam características morfológicas próprias (figura 2B). Sua força física depende, em grande parte do tecido conjuntivo vívido e dinâmico, composto principalmente de fibras de colágeno e elastina entrelaçadas (BOS e LUITEN, 2009). A derme papilar é constituída por tecido conjuntivo frouxo, caracterizada por feixes de fibras colágenas tipo I e III extremamente finas intercaladas com fibras elásticas, uma rica rede vascular composta predominantemente de capilares e por células tais como: fibroblastos, macrófagos, plasmócitos e mastócitos. Enquanto que a derme reticular é constituída por tecido conjuntivo denso, apresentando espessos feixes de fibras colágenas entremeadas em redes espessas de fibras elásticas. A derme reticular também contém os vasos sanguíneos, anexos cutâneos e nervos, que servem como pontos finais de uma rede densa proveniente do sistema nervoso central. As células são menos abundantes nesta camada, elas incluem fibroblastos, linfócitos, macrófagos, plasmócitos, mastócitos, e, frequentemente, adipócitos na parte mais profunda da derme reticular (FORE-PFLIGER, 2004; PROST-SQUARCIONI, 2006).

Figura 2 - Aspectos histológicos da epiderme e derme da pele humana



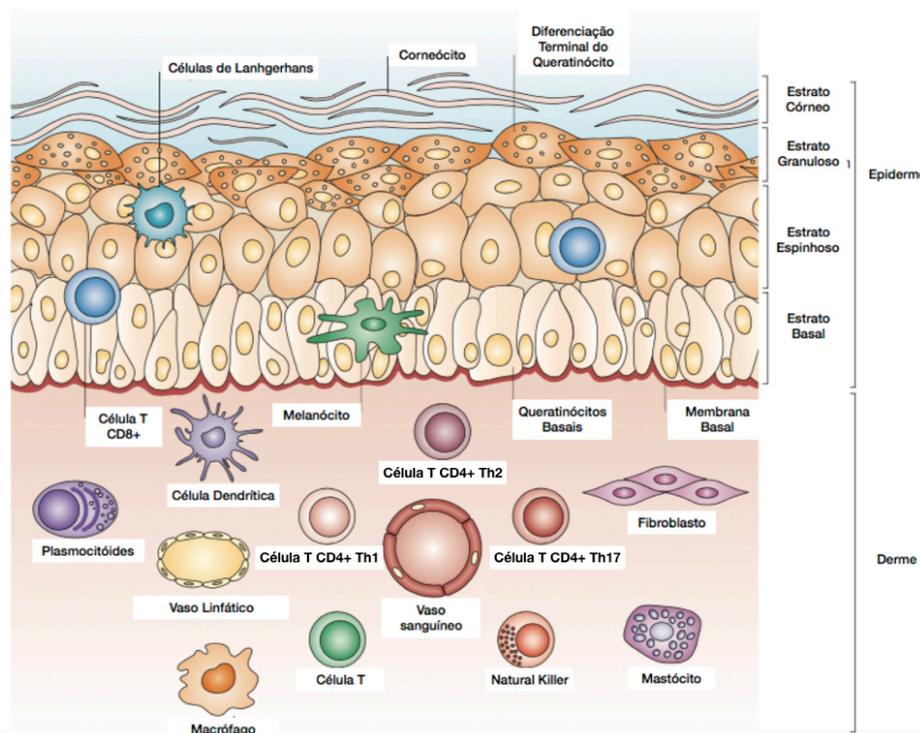
Em **A**, mostra a epiderme constituída por várias camadas de queratinócitos. Em **B**, mostra a derme papilar (DP) formada por tecido conjuntivo frouxo e derme reticular (DR) constituída por tecido conjuntivo denso. Dados: (CC) Camada Córnea; (CL) Camada Lúcida; (CG) Camada Granulosa; (CE) Camada Espinhosa; (CB) Camada Basal; (DP) Derme Papilar; (DR) Derme Reticular. Aumento de 200x. Fotomicrografias produzidas no Laboratório de Biologia Celular da UFAL coradas com Hematoxilina & Eosina (do autor).

Ainda sobre as características morfofisiológicas da pele, sabe-se, há vários anos que este órgão apresenta-se como um sistema de defesa geral, que envolve ações coordenadas de células da derme e epiderme (STREILEIN, 1978) com uma

intrincada rede de citocinas (SALMON et al., 1994). Na camada mais superficial da pele, a epiderme, células de Langerhans atuam como as principais células apresentadoras de antígenos, e podem desempenhar um papel crítico no sistema imune cutâneo, desenvolvendo um ambiente tolerogênico e imunogênico (LUTZ et al., 2010; PILKINGTON et al., 2017). Além disso, os queratinócitos servem como células acessórias na imunidade cutânea, funcionando como um sistema de alerta precoce, liberando interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF) e uma série de outras citocinas e fatores de crescimento após lesão ou dano celular, evidenciando um sistema de comunicação altamente coordenado entre células epiteliais e células imunes, para manter a homeostase do tecido e restaurar a função normal após uma injúria (NESTLE et al., 2009).

Os constituintes do sistema imune presentes na pele são compostos por células residentes, células de recirculação e células recrutadas. A população de células residentes é expressa sob circunstâncias fisiológicas e é representada por mastócitos, macrófagos, linfócitos T e células dendríticas. A população recrutada compreende monócitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilo, bem como, mastócitos e linfócitos T e B. Enquanto que a população de células recirculantes é representado por células dendríticas, células *Natural Killer* e linfócitos T (BOS e LUITEN, 2009). Independente da sua classificação, estas células chegam na pele por meio de um circuito de vasos sanguíneos que adentram neste órgão e, então, estabelecem um circuito de comunicação fisiológica que garante a homeostase. Nesse sentido, a rede vascular fornece um rico suprimento sanguíneo para a derme e a epiderme. Uma rede linfática acompanha o leito sanguíneo, embora seja separada funcionalmente (SLOMINSKI, Andrzej et al., 2000). A figura 3 mostra de forma esquemática a pele e seus elementos efetores na imunidade, que compreende as camadas de células epiteliais, células de Langherans, linfócitos, macrófagos e células dendríticas.

Figura 3. Esquema representativo da pele e seus elementos efetores.



A estrutura da pele reflete um extenso número de funções e uma complexa rede de informações celulares, apresentando um ativo papel na imunidade. A epiderme contém o estrato basal, o estrato espinhoso, o estrato granuloso e a camada mais externa, o estrato córneo, que é responsável pela função de barreira da pele. As células especializadas na epiderme incluem melanócitos, que produzem pigmento (melanina) e Langerhans. As células T, principalmente células T citotóxicas CD8+, podem ser encontradas no estrato basal e no estrato espinhoso. A derme é composta por colágeno, fibras elásticas e reticulares. Ela contém muitas células especializadas, como subpopulações de células dendríticas (DCs), incluindo DCs dérmicas e plasmocitóides e subpopulações de células T e natural *killer*. Além disso, estão presentes macrófagos, mastócitos e fibroblastos. Os vasos sanguíneos e linfáticos e os nervos também estão presentes em toda a derme. Adaptado de NESTLE et al. (2009).

3.2 Cicatrização de feridas na pele

A pele não é apenas uma barreira física entre ambientes externos e internos, mas também protege o organismo ativamente do estresse causado por lesão, tratamento microbiano, radiação ultravioleta (UV) e toxinas ambientais (MATEJUK, 2017). A perda da integridade de alguma porção da pele, como resultado de uma injúria ou doença, pode levar a deficiência grave ou até mesmo a morte. A cura ou reparação de feridas corresponde a um processo bastante complexo e dinâmico o qual envolve fenômenos bioquímicos e celulares ainda não totalmente esclarecidos

(MATEJUK, 2017; RUSHTON, 2007; SINGER AJ; e CLARK, 1999)

A cicatrização de feridas agudas é um processo bem organizado que leva ao reparo tecidual em que as plaquetas, queratinócitos, células da vigilância imunológica, células endoteliais, MEC e fibroblastos desempenham um papel chave na restauração e integridade do tecido. A cicatrização é dividida em três fases – inflamação, formação de tecido de granulação e remodelamento - que se sobrepõem no tempo (SINGER AJ; e CLARK, 1999). Além disso, sabe-se que nessas fases ocorrem eventos imprescindíveis a homeostase como a coagulação, re-epitelização e neovascularização que são regulados por uma variedade de moduladores, incluindo fatores de crescimento, citocinas, metaloproteinases de matriz, receptores celulares e componentes de MEC (ROUSSELLE et al., 2018). A tabela 1, construída a partir de dados publicados, evidencia as principais células e seus respectivos mediadores que orquestram o processo de cicatrização.

Resumidamente, o processo de reparo tecidual cutâneo tem início a partir de uma lesão que provoca a ruptura dos vasos sanguíneos dérmicos e o extravasamento de constituintes sanguíneos para o interstício. O sangue coagulado leva a formação de uma crosta que restabelece a hemostasia e fornece uma MEC provisória para migração de células recrutadas, como neutrófilos e macrófagos, inicialmente (SINGER AJ; e CLARK, 1999). Concomitante com a resposta inflamatória iniciada, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas são responsáveis pela chegada e proliferação de outras células, como fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais que terão o objetivo de formar, provisoriamente, um novo tecido. Síntese, remodelamento e deposição de moléculas de MEC estruturais são indispensáveis para iniciar o reparo e a progressão da cicatrização (EMING et al., 2007a). A fase final do processo de reparo envolve diminuição da atividade celular e etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras colágenas (DEMIDOVA-RICE et al., 2012).

TABELA 1. Células recrutadas e principais mediadores liberados no reparo tecidual

Tipo Celular	Mediadores
Polimorfonuclear (PMN)	ROS TNF- α , IFN- γ IL-1 β , IL-6, IL-8 VEGF
Macrófagos	TNF- α IL-1 β , IL-6, IL-10 PDGF, VEGF, FGF, TGF- α e TGF- β
Fibroblasto	TGF β 1, VEGF IL-1 β , IL-33, IL-6 IGF-1
Célula Endotelial	PDGF, VEGF, FGF, S1P, eNOS
Queratinócito	FGF, PDGF, TGF- α e TGF- β , IL-1, IL-6, IL-8

ROS, Espécie reativa de oxigênio; TNF- α , Fator de necrose tumoral alpha; IL, Interleucinas; VEGF, Fator de crescimento vascular endotelial; PDGF, Fator de crescimento derivado de plaqueta; FGF, Fator de crescimento fibroblástico; TGF, Fator de crescimento transformante; IGF-1, Fator-1 de crescimento semelhante a insulina. S1P, Esfingosina-1-fosfato; eNOS, óxido nítrico-sintase endotelial. Fonte: (EMINE. et al., 2007b; KENDALL e FEGHALI-BOSTWICK, 2014; MCKAY e LEIGH, 1991; WAHL, 2013).

3.2.1 Fase de Coagulação ou Inflamatória

Essa fase é denominada de inflamatória ou exsudativa devido as reações mediadas por citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento sobre receptores em células alvo. Inicia-se a partir de uma injúria na pele que leva ao extravasamento de sangue a partir dos vasos sanguíneos danificados. Seguidamente, ocorre a formação de um coágulo que serve como escudo temporário, protegendo os tecidos expostos e fornece uma matriz provisória sobre a qual as células podem migrar durante o processo de reparação (Figura 4) (SINGER AJ; e CLARK, 1999). O coágulo sanguíneo é formado por plaquetas imersas em uma rede fibrosa de

moléculas de fibrina, fibronectina e vitronectina (MARTIN, 1997). As plaquetas liberam fatores de crescimento tais como PDGF e TGF que recrutam células inflamatórias como os neutrófilos, macrófagos e linfócitos para o local da ferida (DEMIDOVA-RICE et al., 2012; SINGER AJ; e CLARK, 1999).

Minutos após a lesão, os neutrófilos começam a transmigrar através da parede das células endoteliais dos capilares, e liberam citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ no local da ferida que ativam os fibroblastos da derme e os queratinócitos da epiderme, formando um escudo contra bactérias e outros corpos estranhos (BEANES et al., 2003; DELAVARY et al., 2011). Tem sido descrito que, em feridas agudas de humanos, os neutrófilos somam cerca de 50% do total de células presentes no infiltrado inflamatório e seu declínio lento é acompanhado pela quimiotaxia de monócitos e proliferação de células residentes como fibroblastos e células endoteliais (ENGELHARDT et al., 1998).

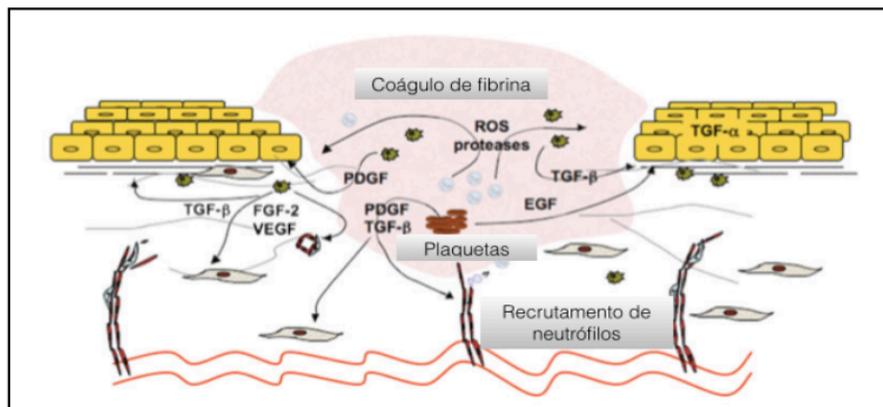
Os monócitos são os próximos a serem recrutados e chegam ao local da lesão por meio de estímulos quimiotáticos, pela vascularização circundante. A migração transendotelial de monócitos começa com o contato inicial de monócitos com endotélio vascular, que é mediado por moléculas de adesão e seus ligantes. Hoje, sabe-se que os monócitos inflamatórios expressam o ligante CD62L (ou L-selectina), LFA1 ($\alpha_L\beta_2$), MAC1 ($\alpha_M\beta_2$), PECAM-1 e VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) que contribuem para a adesão e migração sobre o endotélio em tecidos inflamados (IMHOF e AURRAND-LIONS, 2004).

Aproximadamente 2 a 3 dias após a lesão, os macrófagos, entram na zona de lesão e apoiam o processo em curso por meio da fagocitose de agentes patogênicos e detritos celulares (REINKE e SORG, 2012), e devem ficar no tecido pelo menos até o décimo dia, realizando a produção e liberação de fatores de crescimento como o TGF- β , PDGF, IGF-1 e FGF que regulam a produção e organização da MEC por fibroblastos. Ainda, participam da proliferação e migração de células endoteliais para o local da ferida, permitindo a angiogênese e direcionando o desenvolvimento do tecido de granulação (BEANES et al., 2003).

Os macrófagos são classificados em duas classes principais, baseado na natureza de seus produtos secretados: os macrófagos M1, também chamados de

“classicamente ativados” e macrófagos M2, também conceituados de “alternativamente ativados” (MOSSER e EDWARDS, 2009). Os macrófagos M1 apresentam um fenótipo pró-inflamatório, exibindo atividade fagocítica e secreção de citocinas inflamatórias. Os macrófagos M2 apresentam um fenótipo oposto e exibe altos níveis de citocinas anti-inflamatórias, estimula a formação de vasos sanguíneos e parece estar associado a resolução da cicatrização de feridas (FERRANTE e LEIBOVICH, 2012). Hoje, sabe-se que os macrófagos de reparo tecidual, no estágio inicial de cicatrização, são mais parecidos com o perfil M1 enquanto que os macrófagos com perfil M2 são predominantes em estágios posteriores do reparo em resposta à necessidade de nova formação de tecido. Além disso, múltiplos fatores podem determinar o fenótipo de macrófagos na cicatrização de feridas, incluindo interações de macrófagos com MEC, com outros tipos de células e por fatores como IL-10, TGF- β , lipopolissacarídeo (LPS) (DALEY et al., 2010; WANG et al., 2014).

Figura 4 - Esquema representativo da fase inflamatória da cicatrização de feridas na pele.



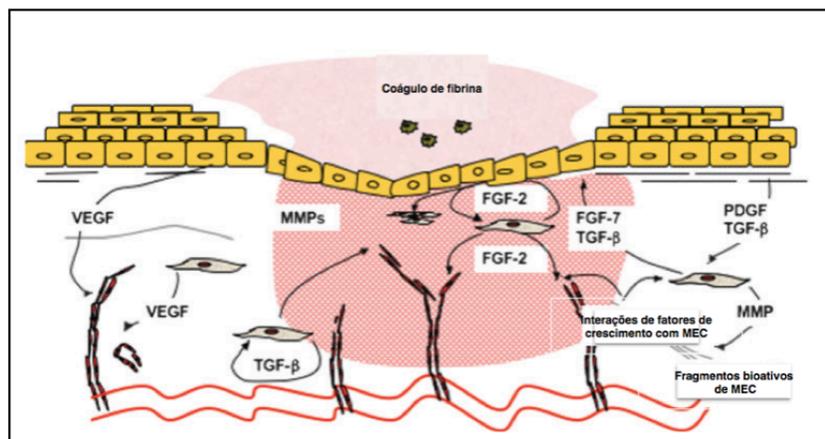
Esquema representativo da cicatrização de feridas evidenciando a interação, por meio de fatores de crescimento, de células do sistema imune com células residentes da pele. Adaptado de DEMIDOVA-RICE et al., 2012.

3.2.2 Formação de tecido de granulação

A medida que a fase inflamatória é atenuada, um novo estroma, muitas vezes

chamado de tecido de granulação, começa a se formar aproximadamente 4 dias após a lesão. O nome deriva da aparência granular do tecido recém formado quando é examinado visualmente (TONNESEN et al., 2000). Nesta fase, a síntese de proteínas de MEC, como o colágeno, a formação de uma rede capilar (neovascularização) e a migração de células, como os queratinócitos, são fenômenos essenciais para a homeostase (SCHREML et al., 2010). Um esquema da fase de granulação é mostrado na figura 5.

Figura 5 - Esquema representativo da fase de formação de tecido de granulação na pele.



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

Os fibroblastos são as células mais importantes do tecido conjuntivo. Este tecido é constituído por fibroblastos imersos em uma ampla rede de proteínas fibrosas e gelatinosas. Os fibroblastos produzem proteínas estruturais, como colágeno e elastina, proteínas adesivas (envolvidas em migração celular), como fibronectina e laminina, e um grupo de outras substâncias como as glicosaminoglicanas (KENDALL e FEGHALI-BOSTWICK, 2014). Além disso, sabe-se que estas células desempenham um papel crucial no reparo tecidual (MARTIN, 1997) e estão presentes em feridas saudáveis desde o início da fase inflamatória até a ocorrência da re-epitelização (THIRUVOTH et al., 2015). Estas células são

atraídas para a área de injúria em resposta a fatores de crescimento/citocinas, como o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) (PIERCE et al., 1991) e, em resposta a outros fatores solúveis, se diferenciam em miofibroblastos (DARBY et al., 2014; ROCKEY et al., 2013; THIRUVOTH et al., 2015). Enquanto os fibroblastos estão sintetizando proteínas de MEC (principalmente colágeno), os queratinócitos e as células endoteliais proliferam-se intensamente e migram para o sítio de injúria com o objetivo de garantir o fechamento do epitélio e a formação de novos vasos sanguíneos, respectivamente (DEMIDOVA-RICE et al., 2012).

A formação de novos vasos sanguíneos é necessária para sustentar o tecido de granulação formado (THOREY et al., 2004). Este processo, chamado de angiogênese, é complexo e dependente da síntese de MEC e da interação destas proteínas com a migração de células endoteliais (RISAU, 1997). Dados da literatura mostraram que uma série de fatores, como o fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento transformante (TGF) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) produzidos por fibroblastos, células endoteliais ou até mesmo por células do sistema imunológico, como os macrófagos M2, podem estimular a angiogênese (HECHT, 1998; SINGER AJ; e CLARK, 1999). Além disso, sabe-se que componentes de MEC, como a fibronectina, laminina e colágeno do tipo III, são requeridos para a formação de novos vasos, demonstrando a importância do contato físico entre constituintes celulares e acelulares na angiogênese (KAESSMEYER et al., 2017).

Além do papel de sustentar o tecido de granulação, a formação de novos vasos sanguíneos proporciona uma via para a entrega de oxigênio e de nutrientes, bem como estruturas eficazes para a chegada dos componentes da resposta inflamatória durante a cicatrização de feridas (CASTILLA et al., 2012; SEN, Chandan, 2009). Tratamentos pró-angiogênicos tem se mostrado capazes de modular o processo de cicatrização de feridas em condições patológicas. Por exemplo, KIRCHNER et al. (2003) relataram que o uso tópico do VEGF reduziu 50% o tempo de cicatrização de feridas em camundongos diabéticos. Além disso, um estudo *in vitro* mostrou que células endoteliais, após tratamento com GH, aumentou a própria habilidade em formar estruturas semelhantes a capilares,

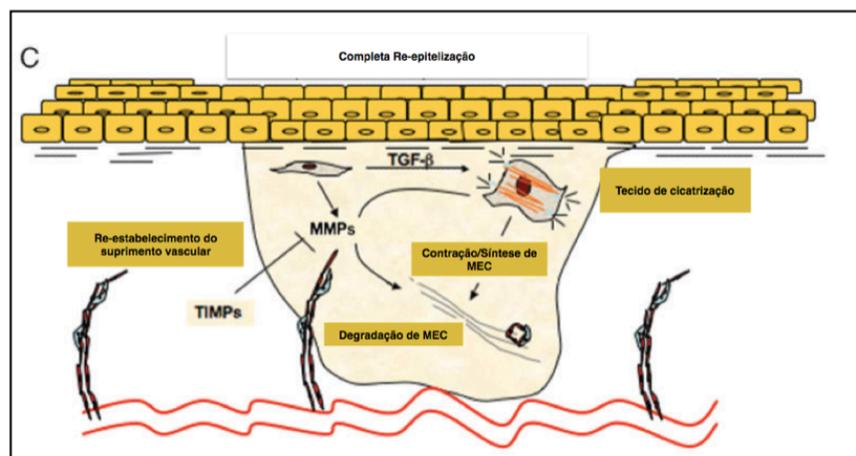
aumentando a expressão de VEGF (BRUNET-DUNAND et al., 2009).

Uma vez que a matriz de colágeno foi depositada na ferida, os fibroblastos suprimem a produção de colágeno, e o tecido de granulação é substituído por uma cicatriz relativamente acelular. A morte celular por apoptose desempenha um papel chave no controle normal do crescimento dos tecidos de granulação (DESMOULIÈRE et al., 1995).

3.2.3 Fase de remodelamento

A fase final do processo de cicatrização (Figura 6) envolve diminuição da atividade celular e etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras colágenas (SINGER AJ; e CLARK, 1999). Além disso, o declínio nos constituintes celulares parece ser resultado da apoptose de células inflamatórias residuais, bem como a regressão da neovasculatura (TORISEVA e KÄHÄRI, 2009). Alguns fibroblastos residuais, por ação de diversos estímulos, podem se diferenciar em miofibroblastos, e comandar a contração da ferida (DE MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009). Aproximadamente 4 dias após a injúria, estas células podem estar presentes na ferida, exercendo uma força contrátil e exercendo um papel fundamental e colaborativo com os queratinócitos (THIRUVOTH et al., 2015; WALLÂ et al., 2009).

Figura 6 - Esquema representativo da fase de remodelamento.



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

3.2.4 Matriz extracelular na cicatrização de feridas

Dentre os componentes que são produzidos na cicatrização, destacam-se a fibronectina e a laminina 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 (WITTE e BARBUL, 1997) (Figura 7).

No reparo de tecido, a secreção da fibronectina é realizada *in situ*, pelas próprias células vasculares, indicando que esta proteína serve como um condutor para o movimento das células endoteliais na injúria (CLARK et al., 1982). Na pele, a fibronectina está presente na parte basal da epiderme, na derme papilar e, em menor quantidade, na derme reticular. No decorrer do reparo tecidual, a fibronectina é depositada sobre o coágulo de fibrina e nas fibrilas do colágeno tipo III. Ao que tudo indica, além de manter um ambiente adequado para a migração de leucócitos, a ligação da fibronectina à fragmentos de colágeno desnaturado pode ser importante na remoção do colágeno durante a remodelação do tecido de granulação da ferida (GRINNELL et al., 1981). A fibronectina medeia uma grande variedade de interações entre células e MEC, além de desempenhar papéis importantes na adesão celular, migração, crescimento e diferenciação, se ligando a uma série de moléculas que incluem heparina, colágeno e fibrina (PANKOV, 2002).

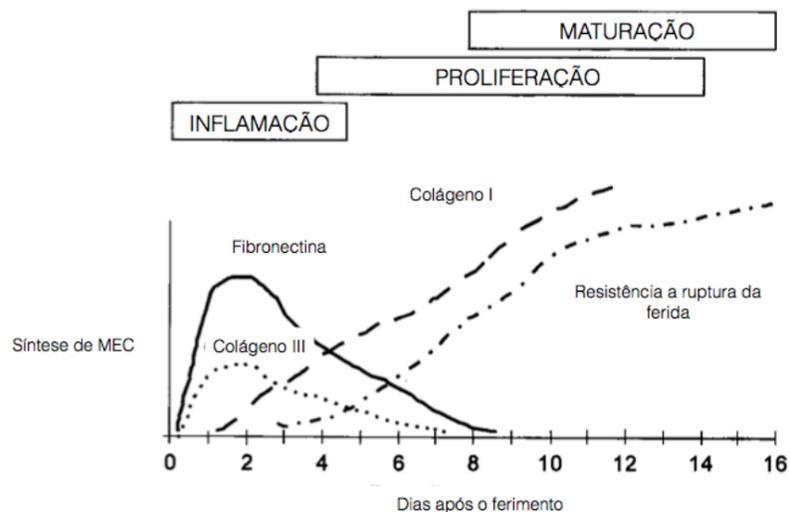
O colágeno constitui um grupo de proteínas fibrosas encontradas em todos os animais. Estas proteínas são produzidas por células do tecido conjuntivo, bem como por uma variedade de outros tipos celulares. Cada molécula de colágeno é composta por três cadeias polipeptídicas dispostas em tripla hélice, sendo o principal componente da MEC e de modo geral, estas proteínas se dispõem num padrão ondulado e exibem extensão bastante variada, e têm papel fundamental na arquitetura tecidual (LYON e BERNARD, 1991). Além disso, a presença dessas

proteínas é relacionada diretamente com a integridade estrutural e a força do tecido (THOREY et al., 2004). Na pele, as fibrilas de colágenos encontradas são do tipo I e III (CANTY, 2005).

A laminina é uma outra glicoproteína, que juntamente com o colágeno e fibronectina, são depositadas na injúria e são essenciais na homeostasia dos tecidos (MINER e YURCHENCO, 2004; WITTE e BARBUL, 1997). Essa macromolécula extracelular controla uma variedade de processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, adesão e migração celular (KIM, Young-Yoon et al., 2018; ZAKHARI et al., 2018).

Na derme, enquanto a MEC é moldada, os vasos sanguíneos, que estão localizados no interior da cicatriz, são reorganizados e sofrem maturação para formar uma rede de capilares funcionais. Esta fase é essencial para a restauração da funcionalidade completa e uma aparência normal para o tecido lesado (SHAW e MARTIN, 2009).

Figura 7 - Gráfico representativo da deposição dos constituintes de MEC durante a cicatrização de feridas na pele.



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

3.3. Interações entre a pele e hormônios

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

Outro hormônio que apresenta atividade comprovada em células da pele é a leptina. Estudo anterior mostrou o papel da leptina na resposta inflamatória no reparo da pele na condição diabética. Neste estudo foi demonstrado que este hormônio atenua a infiltração de neutrófilos e aumenta o recrutamento de macrófagos na fase inflamatória da cicatrização demonstrando que a leptina pode funcionar como uma ligação regulatória entre o sistema endócrino e o sistema imunológico no contexto do reparo da pele (GOREN et al., 2003). Além disso, este hormônio atua como protetor da morte celular e indução de angiogênese confirmando a hipótese de que possa ser um importante regulador celular em situações onde se exige aumento da vascularização (ARTWOHL et al., 2002).

Em ratos, foi demonstrado que o tratamento tópico com hormônio liberador de tireotrofina (TRH) acelerou a cicatrização de ferida aumentando a formação do tecido de granulação e a re-epitelização. Além disso, o TRH promoveu a proliferação e migração de fibroblasto dérmicos (NIE et al., 2014). Anteriormente, foi observado que o tratamento tópico com hormônio tireoidiano (T3) acelerou a cicatrização de feridas em camundongos, aumentando a expressão da citoqueratina 6 em queratinócitos dos folículos pilosos (SAFER et al., 2005).

A atividade estrogênica também tem sido relatada evidenciando aspectos fisiológicos pertinentes na pele. O receptor de estrógeno foi detectado nos componentes celulares da pele, sugerindo que o metabolismo celular dos componentes epidérmicos e dérmicos são influenciados pelos níveis deste hormônio. O tratamento com estrogênio em mulheres na pós-menopausa mostrou

aumento da síntese de colágeno, aumento da espessura dérmica e elasticidade (BRINCAT et al., 2005). Além disso, estudo anterior investigou os efeitos do tratamento tópico com estrogênio na cicatrização de feridas cutâneas em homens e mulheres saudáveis com idade média de 70 anos. Neste estudo foi demonstrado que o tratamento com estrogênio aumentou os níveis de colágeno e fibronectina e diminuição do infiltrado neutrofílico. Ainda, o tratamento com estrogênio foi associado a uma diminuição nos níveis de elastase, um marcador que é regulado positivamente em feridas crônicas, demonstrando que os atrasos na cicatrização de feridas em idosos podem ser significativamente diminuídos pelo tratamento com estrogênio tópico (ASHCROFT et al., 1999).

3.3.1. Hormônio do crescimento (GH)

O GH é um polipeptídeo de 22 kDa constituído por 191 aminoácidos e é sintetizado, principalmente, pelas células somatotróficas da hipófise anterior (MULLER et al., 1999). A liberação do GH, proveniente da adenohipófise, é mediada por mecanismos de feedback, atuando em três níveis. No hipotálamo, o hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) e a somatostatina (SS), exercem influências estimulatórias e inibitórias, respectivamente, na secreção do GH. Uma vez na circulação, o próprio GH pode modular sua liberação atuando no hipotálamo, estimulando a liberação de SS e diminuindo a liberação de GHRH pelos neurônios secretores. A liberação de GH em relação à demanda fisiológica é realizada por meio de uma série de fatores periféricos, como o fator 1 de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), suprimindo a liberação do GH por meio do aumento da liberação de SS (STEYN et al., 2016).

Muitos neurotransmissores e neuropeptídeos modulam a atividade do eixo GH/IGF-1 interagindo com GHRH e/ou SS ou agindo diretamente nos níveis de somatotrofina. Dentre esses fatores, destacam-se os neuromoduladores (como as catecolaminas, serotonina, acetilcolina, hormônio liberador de corticotropina), grelina, insulina, leptina e glicose (STEYN et al., 2016). Além disso, o exercício físico

também parece estar envolvido na estimulação da secreção do GH e a magnitude deste aumento sofre influência de diversos fatores, como a intensidade do exercício e estado de treinamento (CRUZAT et al., 2008). As interações coletivas entre todos os reguladores endógenos da liberação do GH contribuem para padronizar a sua secreção, que é conservada em todas as espécies de mamíferos (STEYN et al., 2016).

Os efeitos do GH são iniciados a partir da sua ligação ao seu receptor (GHR) presente na membrana plasmática das células-alvo. A proteína GHR está posicionada na membrana celular de quase todas as células e apresenta um domínio extracelular (*GH-binding*), um domínio transmembranar e um domínio intracelular (LEUNG et al., 1987). A ligação do GH ao receptor, induz a fosforilação da proteína janus-cinase-2 (JAK2) e, posteriormente, a ativação de moléculas de sinalização como o transdutor de sinal e ativador de transcrição-5 (STAT5) e fosfoinositídeo 3-quinase (PIK3) resultando em transcrição aumentada ou diminuída de uma variedade de genes que respondem ao GH, como IGF-1, caspase3 entre outros (BOGUSZEWSKI et al., 2017). O GH age de forma direta ou indireta sobre as células-alvo (STEYN et al., 2016). A hipótese da somatomedina afirma que o GH atua indiretamente no crescimento dos tecidos por meio da estimulação da produção de IGF-1 (revisado por ROSENBLOOM, 2016).

Além da sua produção central, o GH também pode ser produzido em outros locais, como evidenciado por estudos anteriores mostrando a expressão do gene para a produção do GH em células da pele (SLOMINSKI, Andrzej et al., 2000) e de modo semelhante também foi demonstrado a expressão do gene GH em tecidos linfóides humanos normais e neoplásicos, incluindo células não-linfóides. Esta descoberta suporta a hipótese de que o sistema imunológico humano é um sítio extra-pituitário de expressão do GH que pode servir como um fator autócrino ou parácrino na imunomodulação (WU et al., 1996).

A intercomunicação entre os sistemas imune e neuroendócrino já tem sido bem demonstrado (BLALOCK, 1994). Esses sistemas usam ligantes e receptores semelhantes para estabelecer um circuito de comunicação totalmente integrado que desempenhando um papel importante na homeostase. Evidências

crecentes indicam que hormônios e neuropeptídeos são imunomoduladores potentes, participando de vários aspectos da função do sistema imunológico, tanto em indivíduos saudáveis como durante a doença (BLALOCK, 1994; SPECTOR, 1996). Nesse sentido, o GH tem sido demonstrado como um importante modulador da biologia de órgãos e células imunológicas exercendo efeitos pleiotrópicos nesse sistema (LINS et al., 2016; SAVINO et al., 2002). Por exemplo, camundongos transgênicos para o GH, bem como tratados intratimicamente com GH, exibem celularidade aumentada no timo, aumento da migração celular e produção de proteínas de MEC no timo, fortalecendo a hipótese de uma ação imunomodulatória do GH e que pode ser utilizada em situações de imunodeficiência, como a AIDS (SMANIOTTO et al., 2005). Nesse contexto, tem sido descrito que a terapia com GH, induz a produção de células T CD4⁺ em adultos infectados pelo HIV-1. Além disso foi mostrado que a involução tímica pode ser revertida farmacologicamente sugerindo que terapias baseadas em imunidade poderiam ser usadas para aumentar a timopoiese em indivíduos imunodeficientes (NAPOLITANO et al., 2008).

Dados da literatura mostraram que o GH também 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 e homeostasia da pele. Além disso, a produção de RNAm para o GH por fibroblastos já tem sido demonstrada anteriormente (TAVAKKOL et al., 1992). Disfunções na integridade da pele foram relatadas em pesquisas anteriores utilizando indivíduos acromegálicos (MATSUOKA et al., 1982; THIBOUTOT, 1995). Em um estudo histológico foi verificado que os indivíduos com altos níveis de GH circulante apresentavam espessamento da epiderme, e elevado número de fibroblastos e aumento na deposição de glicosaminoglicanos na derme (MATSUOKA et al., 1982). Embora o GH possa apresentar seus efeitos diretamente em 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 e modulando o desenvolvimento do

folículo capilar (LEE et al., 2010; RUDMAN et al., 1997).

Sobre células endoteliais foi demonstrado que o GH influencia nos aspectos morfofisiológicos destas células, alterando a morfologia e aumentando a deposição das moléculas da matriz extracelular, laminina e fibronectina. Além disso, o GH aumentou a migração destas células, em sistema de *transwell*, e estimulou a formação de estruturas semelhantes a capilares, *in vitro* (MESSIAS DE LIMA, CF et al., 2017a). Influências deste hormônio sobre a angiogênese *in vivo* também foram observadas utilizando animais transgênicos. Neste estudo foi demonstrado que altos níveis circulantes de GH favorecem o aumento no número de vasos sanguíneos em regiões de injúria de tecido (THOREY et al., 2004).

Estudos também demonstraram efeitos do GH sobre a atividade de macrófagos. Recentemente, foi observado que este hormônio estimulou a migração de macrófagos peritoneais residentes e potencializou a atividade fagocítica (DOS SANTOS REIS et al., 2018). Trabalho anterior mostrou que macrófagos RAW 264.7 aumentaram a viabilidade e a proliferação celular e mudanças morfológicas foram observadas após tratamento com IGF-1 e/ou GH por 24 horas (SMITH et al., 2000). Ainda, foi mostrado que monócitos/macrófagos de vários tecidos/órgãos, incluindo sangue periférico, timo e medula óssea produzem RNAm e secretam o GH, sugerindo que este hormônio pode atuar de maneira autócrina ou parácrina nessas células (WEIGENT et al., 1992). Outro estudo mostrou que o GH é um ativador das funções de macrófagos, como a produção de óxido nítrico e TNF- α (TRIPATHI e SODHI, 2007) via JAK2 (TRIPATHI e SODHI, 2009), reforçando a hipótese de que o GH atua sobre essas células em condições inflamatórias.

4 MATERIAIS E METODOS

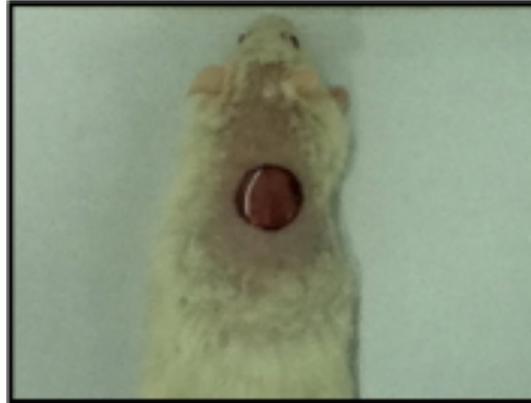
4.1. Ensaios *in vivo*:

4.1.1 Animais, ensaio de cicatrização de feridas e tratamento

Camundongos com 6 meses de idade, machos, da linhagem *Swiss* e peso variando entre 38/40 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) foram utilizados experimentalmente. Estes animais foram mantidos com acesso livre a ração e água, iluminação artificial 12 horas claro e 12 horas escuro em gabinete a temperatura de 22 ± 2 °C. A indução da ferida foi realizada após a administração do anestésico (100 mg/Kg de Ketamina e 10 mg/Kg de Xilasina diluído em tampão fosfato salina). Os camundongos foram depilados dorsalmente e a pele higienizada com etanol a 70%. Posteriormente, realizou-se a incisão da pele da região dorsal, sendo o limite superior às vértebras cervicais e inferior às vértebras torácicas. Uma ferida, por animal, foi realizada com auxílio de um *Punch* dermatológico (1cm de diâmetro) removendo-se toda a pele até o rebordo da hipoderme, conforme mostrado na figura 8. Após estes procedimentos, os roedores foram divididos aleatoriamente em 2 grupos, sendo cada grupo constituído por 15 animais. O tratamento tópico com GH (Eutropin®, da empresa: Aspen Pharma Indústria Farmacêutica Ltda) (10^{-7} M) e a administração do veículo (PBS, como controle) foi realizado diariamente, uma única vez ao dia, em um volume de aproximadamente 200 μ L (MESSIAS DE LIMA CF et al., 2017b). O tratamento foi realizado entre 15 e 17 horas. Os animais foram fotografados diariamente para análise macroscópica da ferida e foram sacrificados após o terceiro dia de tratamento tópico, que corresponde à fase inflamatória (SHAW e MARTIN, 2009).

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comissão de Ética de uso de animais da UFAL (CEUA 51/2014).

Figura 8 - Modelo da área de ferimento no dorso de camundongo.



Camundongo *Swiss* apresentando a área de ferimento logo após a injúria, onde observa-se a exposição da fáscia muscular dorsal. Procedimento realizado com auxílio de *Punch* dermatológico circular metálico com 1cm de diâmetro [do autor].

4.1.2 Processamento histológico

Para análise histológica, 5 feridas por grupo, foram analisadas. Após os tratamentos, as feridas foram removidas, sendo alguns espécimes congelados em meio de congelamento do tipo *tissue TEK®* (Sakura) que foram reservados para a imunofluorescência e outras fixadas, em líquido de formalina 10% (MERCK), por no máximo 36 horas para as análises histológicas. Após fixação, ocorrida em temperatura ambiente, os espécimes foram conservados e clarificados em sucessivos banhos em álcool 70% para retirar o excesso de fixador. Seguidamente, os fragmentos de pele foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina. Posteriormente, cortes de 5 μm foram obtidos em micrótomo. Os cortes foram distendidos em água previamente aquecida, aderidos em lâmina histológica untada com albumina de *Mayer* em chapa quente a 30° C. A tabela 2 resume as principais etapas do processamento histológico.

TABELA 2. Processamento histológico

Etapas	Procedimentos
Fixação	Formalina 10%(MERCK) em até 36 horas. Cortes conservados em álcool 70%.
Desidratação	Banhos sucessivos (1hora/cada) em álcool etílico (MERCK): Álcool 80%; Álcool 90%; Álcool 100%; Álcool 100%.
Diafanização	Banhos sucessivos em xilol (MERCK): Xilol I; Xilol II.
Impregnação	Em estufa os espécimes foram imersos em parafina líquida (MERCK). Pontos de fusão: 56 °C e 58 °C, sendo 1 hora cada banho. Parafina I (56 °C) e Parafina II (58 °C)
Inclusão	Os espécimes foram incluídos em blocos de parafina líquida III (60 °C).

4.1.3 Técnica de coloração

Os fragmentos de pele apresentam-se incolores após a microtomia, assim a coloração visa contrastar as estruturas teciduais. Para este propósito utilizou-se a coloração de hematoxilina-eosina (SIGMA-ALDRICH) para evidenciar os aspectos histo-morfológicos da pele na fase inflamatória da cicatrização de ferida.

Em síntese, os cortes foram desparafinados em três banhos sucessivos de xilol e hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico e água destilada. Após, as lâminas foram imersas em solução de hematoxilina, o excesso retirado em água corrente e, em seguida colocadas em uma solução ácida de eosina. Posteriormente os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico e diafanizados pelo xilol para posterior montagem. A tabela 3 resume as principais etapas da coloração utilizada.

TABELA 3. Técnica de coloração por hematoxilina-eosina

Etapas	Procedimentos
Desparafinização	Banhos sucessivos em xilol (MERCK), sendo cada banho de 5 minutos: Xilol I, Xilol II e Xilol III.
Hidratação	Banhos sucessivos em álcool etílico (MERCK);, sendo cada banho de 5 minutos: Álcool 100%; Álcool 100%; Álcool 80%; Álcool 70%.
Hidratação	5 minutos em água destilada.
Coloração	Hematoxilina (SIGMA-ALDRICH): 2 minutos. Lavagem em água corrente: 5 minutos Eosina (SIGMA-ALDRICH): 3 minutos.
Desidratação e Diafanização	Banhos sucessivos em álcool etílico (MERCK): sendo cada banho de 5 minutos: Álcool 90%; Álcool 90%; Álcool 100%. Xilol I e Xilol II

4.1.4. Contagem das células recrutadas

A contagem de células inflamatórias e fibroblastos foi realizada na pele de três animais por grupo, nas regiões de injúria tecidual obtida após o terceiro dia de tratamento. Foram escolhidos 21 campos aleatórios para determinar a média de células por grupo de tratamento. As células foram diferenciadas por aspectos morfológicos nucleares e citoplasmáticos. A área do campo foi delimitada com o auxílio de lâmina micrométrica e corresponde a 0,038 mm².

4.1.5 Imunohistoquímica

4.1.5.1 Imunoperoxidase em corte congelado

Os imunoenaios foram realizados em cortes histológicos congelados de 5 μm de espessura, distendidos em lâminas de vidro. Para isso, os espécimes foram congelados em meio de congelamento próprio (meio *tissue TEK*®) e mantidos em ultra freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, cortes seriados de pele injuriada foram obtidos utilizando um criostato (LEICA, *modelo* CM 1850) ajustado para 5 μm , sendo a temperatura para realização do procedimento a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Foi realizado o ensaio para evidenciar a molécula de adesão CD31/PECAM-1 presente em células endoteliais nos cortes histológicos. Para isso, foi utilizado o protocolo padrão de estreptavidina-biotina-peroxidase, sugerido pelo fabricante (BD Biosciences). Resumidamente, os cortes foram fixados em acetona (SIGMA-ALDRICH) (P.A.) por 10 minutos a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, reidratados em PBS (LGC Biotecnologia) e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada em solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LGC Biotecnologia) a 0,3% (diluída em PBS) por 10 minutos. Os cortes foram lavados e então expostos a uma solução, contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) (LGC Biotecnologia), para bloqueio das ligações não específicas durante 40 minutos. Após lavagem, os espécimes foram cuidadosamente expostos ao anticorpo primário CD31 (BD Biosciences), na proporção de 1:100, por 60 minutos. Após esse tempo, os espécimes foram lavados e, então, expostos ao anticorpo secundário biotinilado (BD Biosciences), na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 30 minutos. Seguidamente, uma solução de peroxidase-estreptavidina (BD Biosciences), foi aplicada junto aos cortes e incubadas por 30 minutos. Após lavagem, a marcação foi revelada com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (BD Biosciences), por 7 a 10 minutos, tendo como substrato o peróxido de hidrogênio. Após a revelação, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina (SIGMA-ALDRICH), por 60 segundos, desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (SIGMA-ALDRICH), diafanizadas em xilol (SIGMA-ALDRICH) e montadas. Como controle negativo, foi omitido o anticorpo primário para avaliar a presença de possível reação de interferência entre as células e o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase. Após a coloração, os vasos sanguíneos foram evidenciados pela cor acastanhada em contraste com um fundo discretamente azulado.

4.1.5.2 Imunoperoxidase em corte parafinado

Os imunoenaios foram realizados em cortes histológicos parafinados de 5 μm de espessura, distendidos em lâminas de vidro. Para isso, os espécimes foram processados como descrito na tabela 2. Posteriormente, cortes seriados de pele injuriada foram obtidos utilizando um micrótomo (ANCAP, *modelo* YD355AT) ajustado para 5 μm .

O ensaio de peroxidase foi realizado para evidenciar a presença de colágeno tipo III em feridas da fase inflamatória. Para isso, os espécimes foram desparafinados em sucessivos banhos de xilol e desidratadas em solução de álcool etílico 100%. Posteriormente, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, numa solução a 3% de peróxido de hidrogênio (MERCK) em metanol (MERCK), por 10 minutos. Após, os espécimes foram reidratados em solução de álcool etílico (MERCK) a 95% e 70%, por 10 minutos, e posterior passagem em água destilada e PBS (LGC Biotecnologia). Os sítios antigênicos inespecíficos foram bloqueados com uma solução de pele de peixe a 2%, em PBS, por 1 horas. Além disso, uma outra solução de bloqueio foi utilizada, contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA) (SIGMA ALDRICH) + 10% de soro de camundongo, por 1 hora. Após os bloqueios, os espécimes foram incubados com anticorpo primário, anti-colágeno III (Invitrogen), na proporção de 1:100 em PBS - pele de peixe a 0,05%, por 1 hora. Decorrido o tempo, os espécimes foram lavados em PBS, e expostos ao anticorpo secundário GARPO (Invitrogen) (1:200) em PBS - pele de peixe a 0,05%, por 45 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas e reveladas com DAB (SIGMA-ALDRICH) e contra-coradas com hematoxilina, desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizadas em xilol e montadas. Como controle negativo, foi omitido o anticorpo primário.

4.1.5.3 Imunofluorescência

O método foi utilizado para avaliar a deposição de fibronectina e laminina e

a presença de macrófagos no tecido. Os espécimes congelados foram submetidos ao ensaio de imunofluorescência indireta como descrito previamente (SMANIOTTO et al., 2005). Resumidamente, os espécimes foram lavados com PBS seguido da incubação com BSA a 0,1%. Os tecidos foram incubados com anticorpo primário anti-fibronectina (Invitrogen) ou anti-laminina (Invitrogen) ou anti-F4/80 (Abcam) por 60 minutos, em temperatura ambiente, lavados com PBS, e expostos ao anticorpo secundário anti-coelho conjugado com FITC, produzido em cabra (GAR-FITC) (Invitrogen) por 45 minutos. Posteriormente, espécimes foram lavados em PBS e as lâminas montadas. Os cortes foram analisados utilizando o microscópio de fluorescência (NIKON ECLIPSE Ti).

4.1.6 Captura de imagem e quantificação do CD31, colágeno tipo III, fibronectina e laminina.

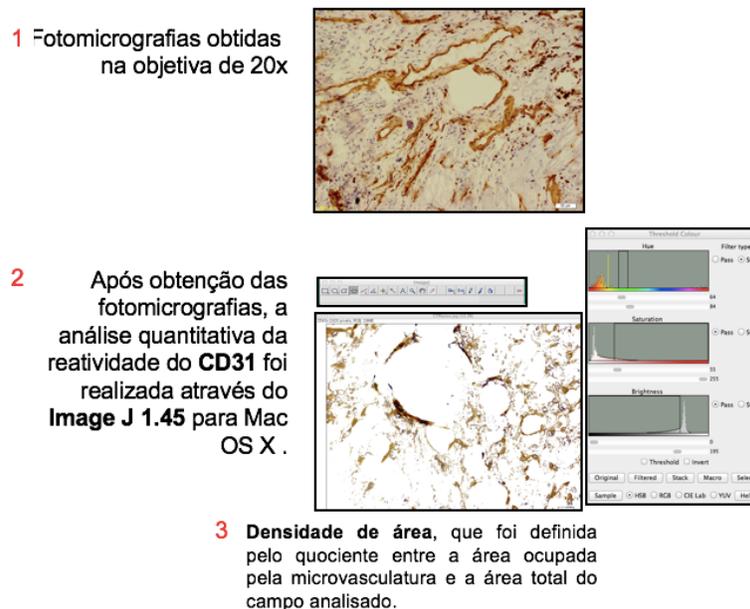
Fotomicrografias das regiões marcadas com os anticorpos foram obtidas de forma padronizada, utilizando-se, para tanto, um microscópio de luz com câmera acoplada (OLYMPUS FSX100) ou microscópio de fluorescência (NIKON ECLIPSE Ti). O procedimento compreendeu, inicialmente, uma varredura por toda a área da pele para posterior captura de imagem utilizando a objetiva de 20X. Foram escolhidos, pelo menos, 10 campos aleatórios, por animal, de cada grupo estudado.

Após obtenção das fotomicrografias, a análise quantitativa da reatividade do CD31 e Colágeno tipo III foi realizada com auxílio do Image J 1.45 para Mac OS X (NIH, USA). O programa foi ajustado para o reconhecimento da cor relativa as estruturas de interesse, utilizando o *plugin thresholdcolour*. O programa determinou o percentual de superfície do campo analisado. Para tanto, realizou o cálculo da densidade de área, que era definida pelo quociente entre a área ocupada pela microvasculatura ou deposição de colágeno e a área total do campo analisado. A figura 9 sumariza o procedimento.

Para a análise quantitativa da intensidade de fluorescência de Fibronectina, Laminina e F4/80, foram obtidas fotomicrografias e quantificadas pelo *Image J*, transformando a coloração específica em pixels e dividindo o número total de pixels

pela área analisada, obtendo o número de pixels/ μm^2 . Após quantificação, os valores obtidos foram organizados no Numbers® (Apple Inc., California, CA, EUA) e o gráfico foi gerado utilizando o programa GraphPad Prism® 5.0 (San Diego, EUA).

Figura 9. Quantificação de área positiva para CD31 por meio do *plugin thresholdcolour*



4.1.6. Quantificação de Citocinas

Os níveis de citocinas da pele, obtidas após o terceiro dia de tratamento, foram obtidos utilizando o ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) com o kit comercializado pela empresa eBioscience (Ready-Ste-Go®, ELISA, ebioscience). Para isso, fragmentos de pele (1 g) foram removidos, triturados e homogeneizados em solução PBS-Triton X-100 0,05% e coquetel inibidor de protease (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) e então quantificadas utilizando o ensaio de ELISA seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos como μg de citocinas/ml.

Para este ensaio foram mensurados os níveis das seguintes citocinas/fatores: IL-6, IL-10 e $\text{TNF}\alpha$.

4.1.7. Extração de RNA total, síntese do DNA complementar (cDNA) e Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)

Avaliou-se os níveis do RNA mensageiro (RNAm) para o gene *Igf-1* da pele e fígado utilizando-se o método de RT-PCR semi-quantitativo. Para isso, fragmentos de pele e de fígado (1 g), foram recolhidos, triturados e homogeneizados na presença de trizol (1 mL), para extração do RNA total. Para obtenção do cDNA, 1 µg de RNA total foi utilizado. Após o tratamento com DNase I para eliminar possível DNA genômico, foi utilizado para síntese de cDNA o Kit enzima RT M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) conforme orientações do fabricante. O cDNA obtido foi utilizado para reações de PCR com oligonucleotídeos específicos indicados na tabela 4.

Para reação de PCR, alíquotas 1 µL dos cDNAs de cada amostra foram misturados com PCR Buffer 1x, MgCl₂ 1,25 mM, dNTP 200 µM, 20 pM oligonucleotídeos específicos para o gene *Igf-1* e para o gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*), 0.5 U de Taq polimerase e água DEPC para obter um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em termociclador (TECHNE: TC-5000) tendo uma fase inicial de desnaturação de 1 minuto a 94 °C seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 95 °C para desnaturação, 45 segundos a 54 °C para anelamento e 30 segundos a 72 °C para extensão nos primers. Ao final da reação, alíquotas de 8 µL de cada amostra foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 2% e visualizadas com o brometo de etídio utilizando Transiluminador UV (Loccus, L-Pix EX 20×20). As análises quantitativas foram realizadas em relação à banda de GAPDH e processadas com o auxílio do programa Image J.

TABELA 4. Oligonucleotídeos utilizados

Gene-alvo	Senso	Anti-senso	Espécie	Tamanho do produto (bp)
<i>Igf-1</i>	5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC- 3' GCTGGTGGATGCTCTTCAGT	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC- 3' CTCCGGAAGCAACACTCATC	<i>Mus musculus</i>	126 bp
<i>Gapdh</i>	5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC- 3'	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC- 3'	<i>Mus musculus</i>	92 bp

4.2. In vitro:**4.2.1 Cultura de Células endoteliais murinas**

As células da linhagem tEnd.1 derivadas de endotelioma de timo murino foram cultivadas de acordo com o protocolo experimental utilizado em nosso laboratório, em garrafas de cultura em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) (Gibco™), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco™) e 100µl/mL de L-glutamina (Gibco™). As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂. A passagem das células, por tratamento com solução de tripsina/EDTA livre de cálcio e magnésio pH 7.2, foi feita quando estas alcançavam o estado de semiconfluência.

4.2.2 Cultura de macrófagos murinos

Linhagem de macrófagos murinos J774 foram cultivados em meio RPMI 1640 inicialmente com 10% de SBF e incubados a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A troca dos meios para estes macrófagos foi realizada a cada três dias e as condições de SBF foram modificadas para 2% durante os experimentos.

4.2.3. Cultura de fibroblasto murinos

Fibroblastos da linhagem 3T3 foram cultivados em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco™), inicialmente com 20% de SBF e incubados a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A troca dos meios para estes fibroblastos foi realizada a cada três dias e as condições de SBF foram modificadas para 2% durante os experimentos.

4.2.4 Tratamento com GH

As células, descritas anteriormente, foram tratadas com GH (Eutropin®, da empresa: Aspen Pharma Indústria Farmacêutica Ltda) por 24 horas, nas concentrações de 10⁻⁹M, 10⁻⁸M ou 10⁻⁷M.

4.2.5 Ensaio de Viabilidade Celular por MTT

Para o ensaio de viabilidade celular, foi utilizado o teste colorimétrico 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT) que consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas.

Resumidamente, ao fim da incubação de 24h das linhagens celulares expostas a condições de tratamento em placa de 96 poços, foram adicionados aos poços de cultivo celular, 10 µL de MTT na concentração de 5mg.mL⁻¹. A placa foi então incubada por mais 4 horas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após este período, os cristais de formazan formados foram solubilizados pela adição de 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) e sua concentração quantificada espectroscopicamente por meio de um leitor de microplacas (leitor de Elisa), em comprimento de onda igual a 540nm.

4.2.6. Quantificação de Citocinas

As concentrações das citocinas IL-10 e IL-6 nos sobrenadantes das culturas de J774 foram mensuradas utilizando o ensaio imunoenzimático ELISA (Enzime-

Linked Immunoabsorbent Assay) com o kit comercializado pela empresa eBioscience (Ready-Ste-Go®, ELISA, ebioscience). O ensaio foi realizado usando placas de 96 poços de fundo chato (Costar, Corning Life Science, Lowell, MA, USA). Todas as etapas foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. A densidade ótica foi determinada em Leitora de ELISA ajustada para um comprimento de onda na faixa de 450 nm. Os resultados foram expressos como *pg* de citocinas/mL.

4.2.7 Ensaio de formação de estruturas semelhantes a capilares

Realizou-se um ensaio de co-cultura para analisar o efeito do tratamento *in vitro* com GH na intercomunicação entre macrófagos e células endoteliais. Para isso, células J774 foram tratadas com GH ou não (grupo controle) por 24 horas. Dado o tempo de tratamento, o meio foi coletado e armazenado em ultra freezer.

Para o ensaio de formação de vasos, uma placa de 96 poços foi revestida com 80 µl de matrigel® (BD Biosciences) por poço e incubadas em estufa de CO₂. Após a polimerização da matrigel, realizada à 37°C por 45 minutos, as células endoteliais foram adicionadas sobre o revestimento de matrigel, sendo duas condições experimentais: **a)** o *grupo controle*: 1,5 x 10⁴ células + 100 µL de meio condicionado de J774 sem tratamento e o **b)** *grupo experimental*: 1,5 x 10⁴ células + 100 µL de meio condicionado de J774 tratada com GH. A formação de túbulos semelhantes a capilares foi observada por microscópio de luz invertido (NIKON / SPIN-TS100F) durante as primeiras 6 horas. Posteriormente estas estruturas foram quantificadas em 24 campos aleatórios (por grupo). Foram realizados 02 experimentos independentes em triplicatas.

4.2.8. Ensaio de migração das células endoteliais em câmara de *transwell*

A migração foi realizada *in vitro* utilizando sistema de *transwell*, empregando membranas de policarbonato com 10 mm de diâmetro e poros de 8,0 µm (Corning Costar, Cambridge, USA).

Inicialmente, as membranas foram bloqueadas com solução PBS a 0,1% de

BSA por 45 minutos em estufa a 37° C e 5% de CO₂. Após o bloqueio, 10⁶ fibroblastos em meio DMEN a 2% de SBF (grupo controle) ou 10⁶ fibroblastos em meio DMEN a 2% de SBF + GH 10⁻⁷M foram adicionadas no poço superior da câmara. A migração celular foi desenvolvida por 3 horas em estufa de CO₂, a 37 °C. Posteriormente, as células não migrantes foram raspadas da face superior da membrana e as células que migraram foram coradas com Giemsa e quantificadas a partir de fotomicrografias obtidas no aumento de 40x em microscópio de luz invertido (NIKON / SPIN-TS100F) sendo 10 campos por grupo. Foram realizados 02 experimentos independentes em triplicatas.

4.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando o teste t de Student para determinar a significância estatística entre o grupo de tratamento e o controle. Os valores foram apresentados pela média ± erro padrão da média (EPM) e considerados significativos quando $p \leq 0,05$. Para tabulação dos resultados foi utilizado o programa Numbers® (Apple Inc., California, CA, USA) e análise estatística o Graph Pad Prism® 5.0 (San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

Inicialmente foi avaliada macroscopicamente a progressão do fechamento de feridas em camundongos adultos tratados topicamente com GH, durante 3 dias consecutivos. Na avaliação macroscópica das feridas observou-se edema, hiperemia e formação de uma crosta, em todos os grupos, que persistiu durante os dias avaliados. Os animais mantiveram-se saudáveis e apresentaram características de cicatrização sem evidências macroscópicas de infecção.

5.1. O microambiente inflamatório foi alterado em resposta ao tratamento com GH.

O tratamento com GH mostrou que este hormônio atua positivamente na fase inflamatória contribuindo para o fechamento da ferida. A figura 10 mostra os aspectos histológicos da cicatrização de feridas em animais tratados com GH e controle, na fase inflamatória. Observou-se, em ambos os grupos, destruição tecidual com infiltrado inflamatório evidente e a presença de um tecido de consistência muito frouxa. Notou-se ainda, a presença de uma crosta na superfície da injúria no tecido em formação.

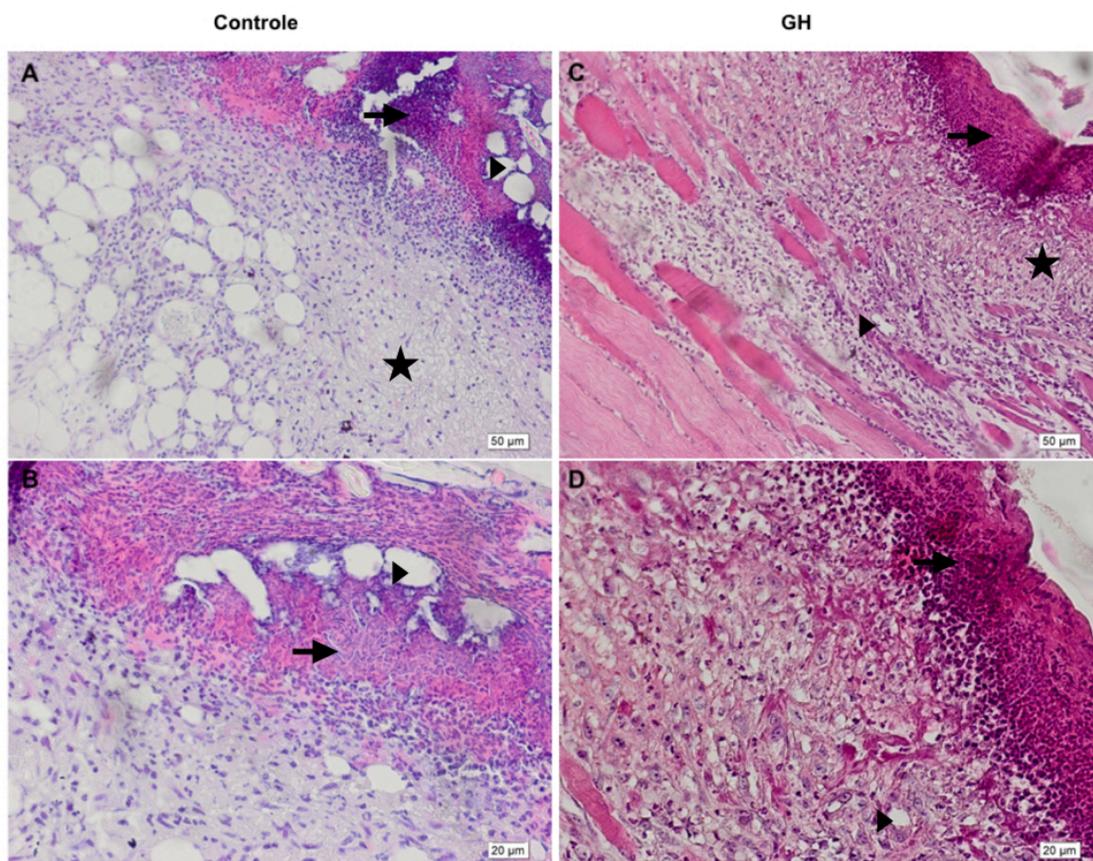
No que se refere ao grupo dos animais tratados com GH, observou-se qualitativamente que o tratamento modula o infiltrado celular, aumentando o recrutamento inflamatório após o terceiro dia, quando comparado ao grupo controle. Além disso, uma análise mais detalhada, evidenciou a presença de vasos sanguíneos, de fibroblastos e de uma crosta marcadamente corada na superfície da injúria.

Uma vez que o infiltrado inflamatório, no reparo tecidual, é composto de diversos tipos de células recrutadas, o próximo passo foi identificar e quantificar as células presentes nesse infiltrado. Para isso, fotomicrografias coradas com HE foram utilizadas e a contagem foi realizada tomando por base os aspectos morfológicos das células.

Foi constatado que o tratamento com GH alterou o recrutamento celular inflamatório. Como mostrado na Figura 11, nos animais tratados com GH, foram

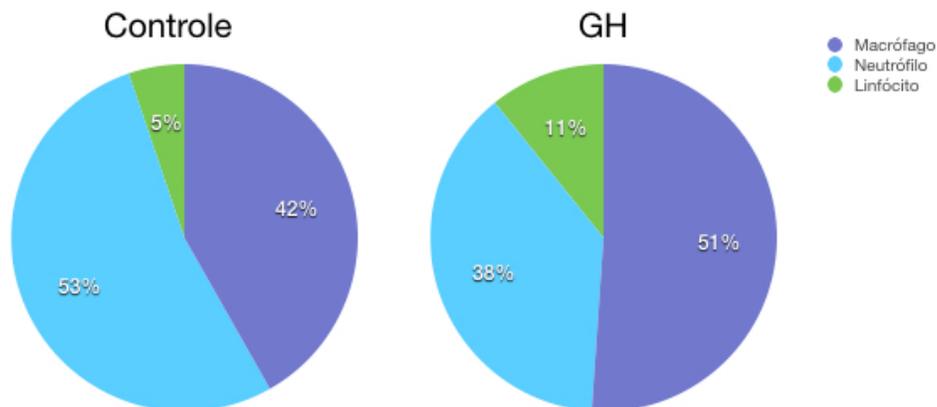
observados um maior número de macrófagos enquanto que no grupo controle, o predomínio do infiltrado foi de neutrófilos. Além disso, ainda foi possível observar uma diferença na porcentagem de linfócitos, que foi maior no grupo tratado (Tabela 5). Notou-se, portanto, um aumento significativo no número de macrófagos e linfócitos no grupo tratado com GH quando comparado com o grupo controle.

Figura 10. Microambiente inflamatório alterado em resposta ao tratamento com GH.



Fotomicrografias representativas dos grupos controle (**A e B**) e tratado com GH (**C e D**) após 3 dias de injúria. Observa-se, na região de cicatrização, a formação de uma crosta sobre o tecido inflamatório (seta), sendo mais evidente no grupo de tratamento quando comparado ao controle. Além disso, um maior infiltrado celular e deposição de MEC (evidenciada pela forte coloração; estrela) também é observado no grupo tratado. Alguns vasos sanguíneos são mostrados (cabeça de seta). **A e C**, aumento de 100x e **B e D**, aumento de 400x. Coloração H&E.

Figura 11. Perfil celular inflamatório em resposta ao tratamento com GH



Os gráficos mostram o percentual, dos diferentes tipos celulares na fase inflamatória do reparo tecidual. A contagem foi realizada em estudo duplo-cego. n= 3 animais/grupo.

TABELA 5. Celularidade recrutada na fase inflamatória do reparo tecidual frente ao tratamento com GH

Células recrutadas	Controle	GH	t test (<i>p</i>)	Número de campos	Número de animais
Neutrófilos	33,55±16,78	23,65±6,71	0,033	21	3
Macrófagos	26,45±6,03	31,70±8,10	0,025	21	3
Linfócitos	3,3±2,1	6,7±2,8	0,0002	21	3

Os valores foram expressos como média ± EPM.

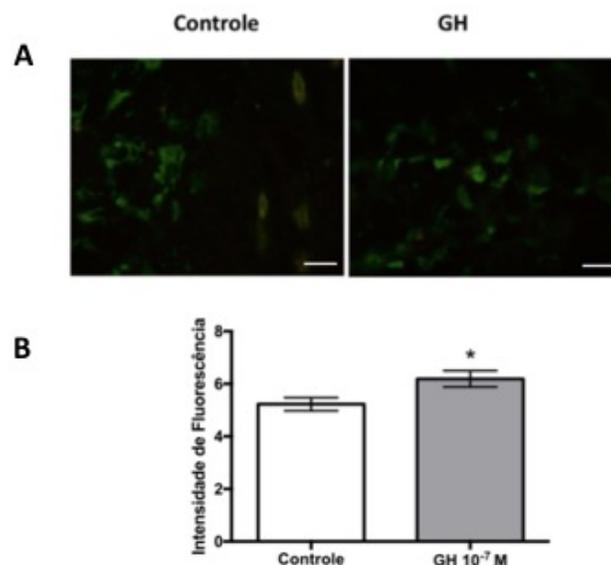
5.2. O GH estimula o recrutamento de macrófagos na região da ferida.

Como constatado previamente, os macrófagos e os linfócitos foram as células em maior porcentagem na contagem diferencial do recrutamento

inflamatório. Considerando a hipótese de que os macrófagos são imprescindíveis para a resolução da fase inflamatória e continuidade da cicatrização de ferida saudável, realizou-se um ensaio de imunofluorescência utilizando anticorpo específico para melhor avaliar a presença de macrófagos teciduais. O anticorpo utilizado reconhece o antígeno F4/80 de camundongo, uma glicoproteína de 160kD expressa por macrófagos murinos.

A partir deste ensaio foi possível observar células positivas (em verde) para F4/80, mostrando a presença de macrófagos na injúria. Foi constatado, pela análise qualitativa, que o tratamento tópico com GH por três dias aumentou a presença destas células em feridas cutâneas de camundongos (Figura 12 A). A quantificação da intensidade de fluorescência confirmou que o tratamento com GH foi capaz de aumentar de forma significativa o recrutamento de macrófagos (Figura 12 B).

Figura 12. Presença aumentada de macrófagos (F4/80) na injúria após o tratamento com GH.



A) Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência para F4/80 (marcador específico de macrófago) do grupo controle e tratado com GH. As células positivas são observadas em verde. **B)** Quantificação em pixels da intensidade de fluorescência. Barras representam a média \pm EPM da intensidade de fluorescência (n=3 animais/grupo) Valor de $p=0,02$ (teste t student). Barra: 20 μ m.

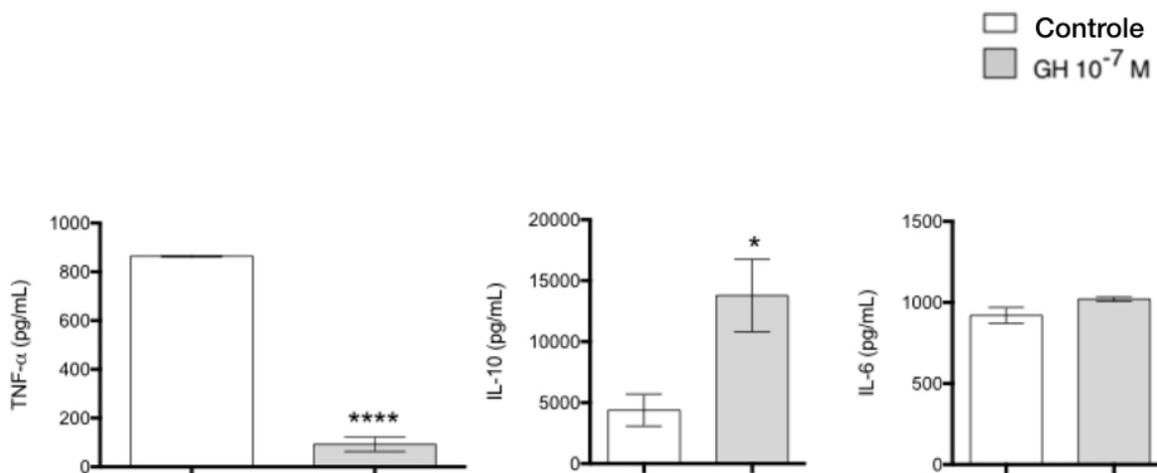
5.3 O tratamento tópico com GH modula a produção de citocinas no tecido

Até o presente resultado, observou-se que os animais tratados com GH apresentaram uma modulação da resposta inflamatória, aumentando e/ou acelerando a chegada das células na área afetada pela injúria. O próximo objetivo foi observar se citocinas, produzidas em grande parte por células inflamatórias, poderiam ser moduladas após o tratamento com GH.

Para isso, fragmentos do tecido foram obtidos após o 3º dia de tratamento dos grupos estudados. Posteriormente, os espécimes foram utilizados para mensurar os níveis de citocinas/fatores: IL-6, IL-10 e TNF α , conforme descrito na seção 4.1.6.

Como resultado, observou-se que os animais tratados topicamente com GH apresentaram elevado nível de IL-10, enquanto que os níveis locais de TNF α estavam diminuídos quando comparado ao grupo controle. Não foi observado diferença em relação aos níveis de IL-6 (Figura 13).

Figura 13. O tratamento com GH aumenta os níveis de IL-10 na fase inflamatória.



Níveis de citocinas na fase inflamatória do reparo tecidual. Amostras de pele, após o 3º dia de tratamento, foram coletadas e processadas para o ensaio ELISA. Barras representam a média \pm EPM. Os valores são expressos em pg/mL. n=3 animais/grupo. A análise estatística foi feita com o teste t. *p=0,046; ***p=0,0001.

5.4. Ensaios *in vitro* com células endoteliais e macrófagos

Os resultados *in vivo* mostraram que o GH atuou na fase inflamatória do reparo tecidual, estimulando o recrutamento inflamatório, principalmente de macrófagos, e aumentando a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e diminuindo o nível de citocina inflamatória, como $\text{TNF}\alpha$.

Como as citocinas desempenham um papel importante na cicatrização de feridas e são produzidas e secretadas por diversas células deste microambiente, foram realizados ensaios *in vitro* para compreender o efeito do GH sobre macrófagos e células endoteliais na produção de citocinas e indução da angiogênese *in vitro*.

5.4.1 Efeitos do GH na produção de citocinas por macrófagos J774.

Para a mensuração dos níveis de citocinas produzidas por macrófagos J774, as células foram semeadas em placas de 24 poços e tratadas com GH nas concentrações de 10^{-9}M , 10^{-8}M e 10^{-7}M por 24 horas. Posteriormente, o ensaio de ELISA foi realizado como descrito na seção 4.2.6.

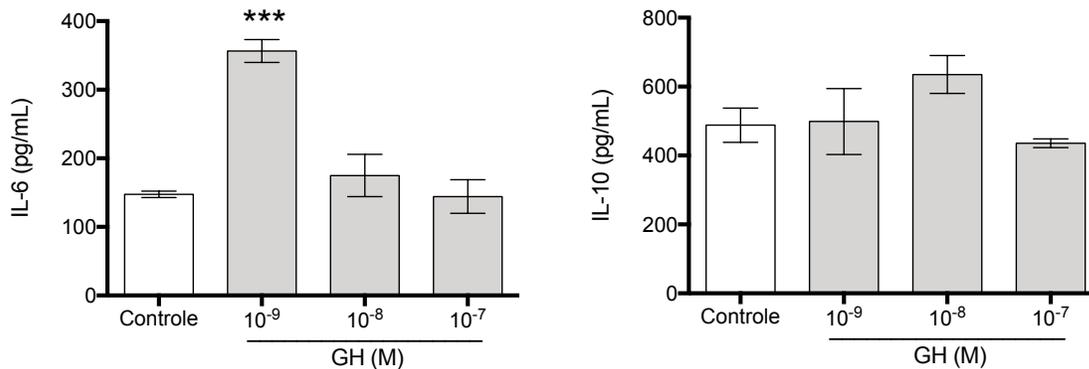
Foi observado que o tratamento com GH, apenas na concentração de 10^{-9}M aumenta os níveis de IL-6, no sobrenadante. Em relação as concentrações de 10^{-7}M e 10^{-8}M não foram encontradas diferenças nos níveis de IL-6 (Figura 14).

Para IL-10, nenhuma das concentrações de GH utilizadas foi capaz de alterar os níveis da citocina no sobrenadante (Figura 14).

Com propósito de descartar o efeito citotóxico do GH, foi realizado o ensaio de viabilidade celular. Para isso, os macrófagos J774 foram tratados com GH nas concentrações de 10^{-9}M , 10^{-8}M e 10^{-7}M , em placas de 96 poços. Posteriormente, o ensaio de MTT foi realizado como descrito na seção 4.2.5.

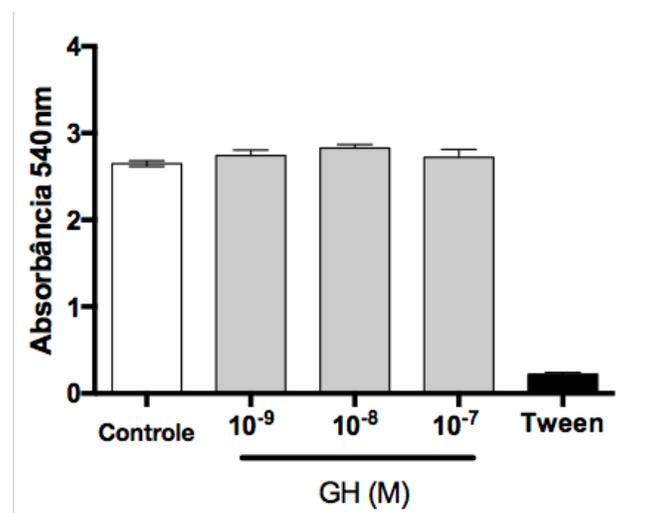
Como resultado, foi observado que o tratamento com GH, nas concentrações testadas, não foi capaz de interferir na viabilidade das células quando comparado ao grupo controle (Figura 15).

Figura 14. Macrófagos J774 e a produção de citocinas frente ao GH.



Cada barra representa a média \pm EPM dos níveis de citocinas IL-6 e IL-10 do sobrenadante das culturas de macrófagos J774. Os valores são expressos em pg/mL. n=3/grupo. A análise estatística foi feita com o teste t. ***p=0,0003.

Figura 15. O tratamento com GH não altera a viabilidade de macrófagos



Ensaio de viabilidade celular por MTT. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados são expressos como média \pm EPM. n=3

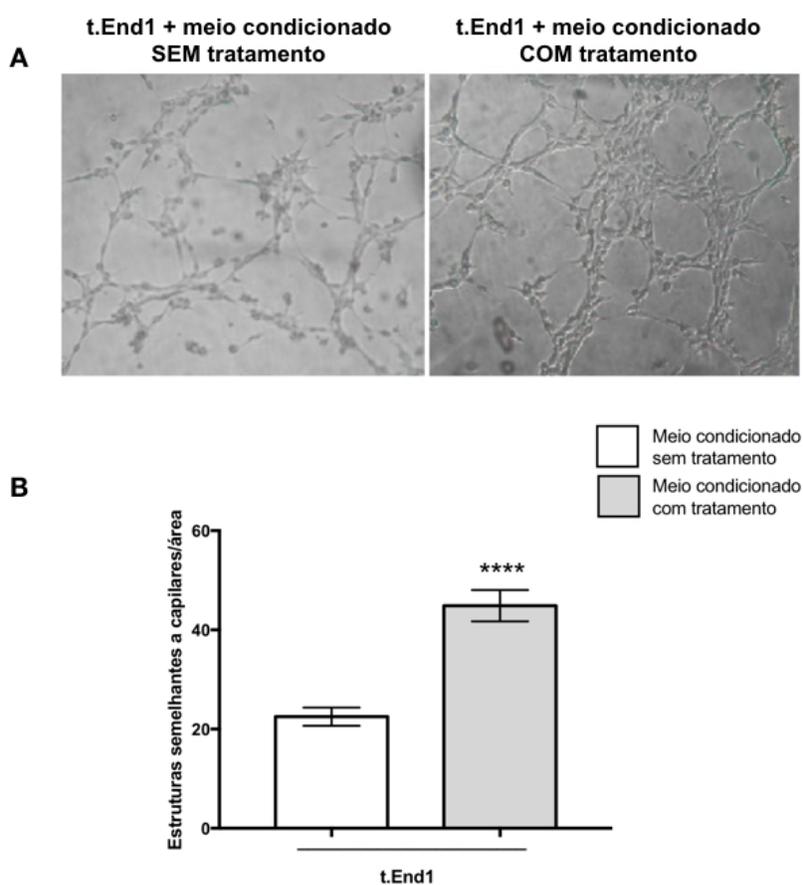
5.4.2 O meio condicionado obtido de macrófagos tratados com GH estimula a formação de estruturas semelhantes a capilares por células endoteliais.

Foi realizado um ensaio de co-cultura com o objetivo de avaliar se macrófagos tratados com GH produzem fatores que estimulam células endoteliais

(t.End1) a formarem estruturas semelhantes a capilares, conforme descrito na seção 4.2.7.

Como resultado, observou-se que o meio condicionado de macrófagos tratados com GH, na concentração de $10^{-7}M$, estimulou células endoteliais a formarem estruturas semelhantes a capilares em matrigel por 6 horas. Sendo este efeito, 2 vezes maior nas células que receberam o meio condicionado com o tratamento quando comparado a condição controle (Figura 16 A, B).

Figura 16. Meio condicionado de macrófagos tratados com GH estimula a formação de estruturas semelhantes a capilares por células endoteliais.



A) Fotomicrografias representativas de células endoteliais cultivadas sobre um gel de matrigel que receberam meio condicionado de macrófagos tratados com GH ou não (meio condicionado sem tratamento) por 6 horas. **B)** Quantificação de estruturas semelhantes a capilares por células endoteliais. As barras representam a média+EPM. Pelo menos 20 campos aleatórios foram contados por grupo. As fotomicrografias são mostradas no aumento de 400x. A análise estatística foi feita com o teste t. ****p=0,0001. Experimento foi realizado em triplicata. n=3

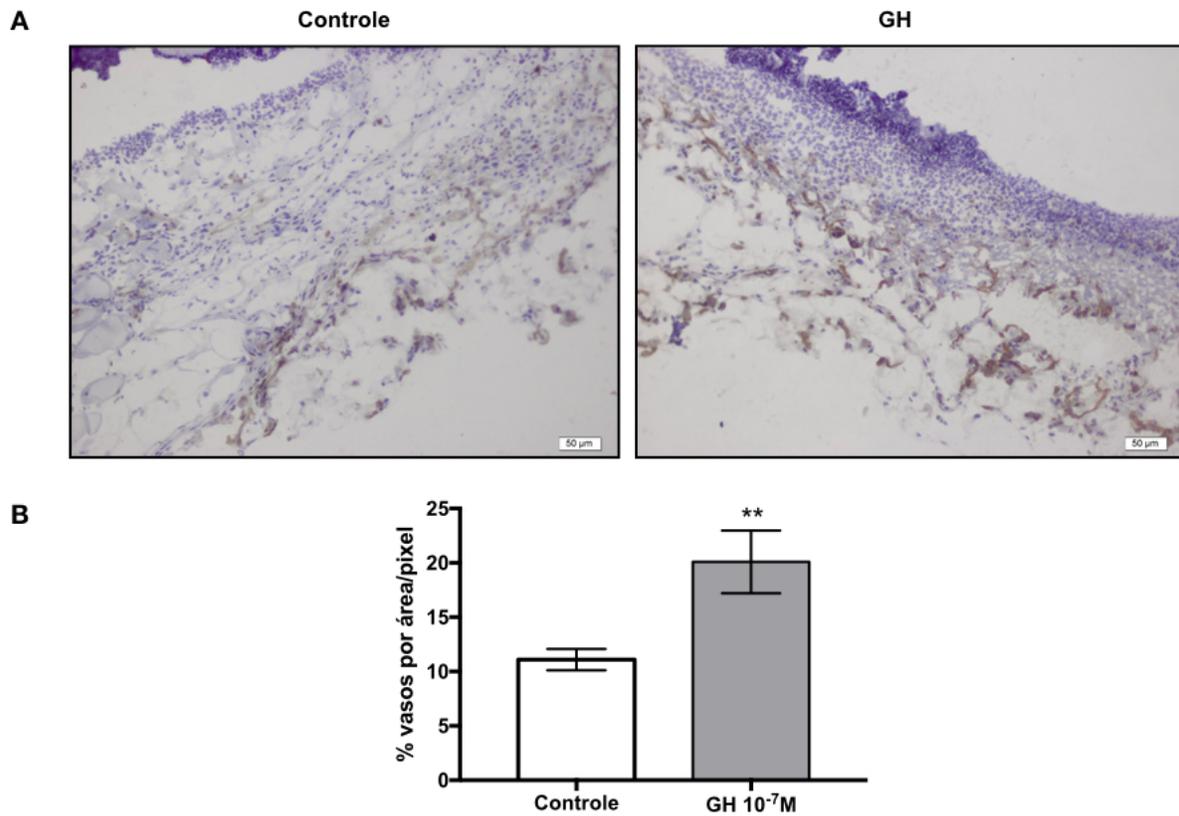
5.5. O tratamento tópico com GH estimula a angiogênese *in vivo*

Resultados anteriores mostraram que o tratamento tópico com GH atuou na fase inflamatória da cicatrização de feridas e *in vitro* o GH foi capaz de modular a função de macrófagos permitindo um aumento/aceleração na formação de estruturas semelhantes a capilares em matrigel por células endotélias. O próximo passo foi observar o efeito do tratamento tópico com GH na formação de vasos sanguíneos na região de injúria.

Para este propósito, espécimes foram obtidos a partir de amostras congeladas da pele. Fragmentos micrométricos foram submetidos a imunomarcação específica para a molécula CD31, conforme descrito na seção 4.1.5.1.

Como resultado, observou-se que o tratamento com GH aumentou a presença de vasos sanguíneos na injúria após o 3º dia de tratamento (Figura 17 A/B). A reação pode ser vista qualitativamente pela cor acastanhada nas fotomicrografias representativas (Figura 17 A).

Figura 17. O tratamento tópico com GH estimula a angiogênese



Em **A**, fotomicrografias representativas do grupo controle e dos animais que foram tratados com GH na concentração de 10^{-7} M. Foram utilizados espécimes congelados do 3º dia após a injúria (aumento 100x). A imunoperoxidase foi realizada segundo protocolo preconizado pelo próprio fabricante, utilizando o anticorpo primário CD31. Em **B**, gráfico obtido da quantificação em pixels das áreas que sofreram reatividade com o anticorpo. As barras representam a média \pm EPM. A análise estatística foi feita com o teste t. ** $p < 0,0056$. $n=3$ animais/grupo.

5.6. Efeitos do GH sobre fibroblastos

Para avaliar a ação do GH sobre os fibroblastos, utilizou-se metodologias *in vitro* e *in vivo*.

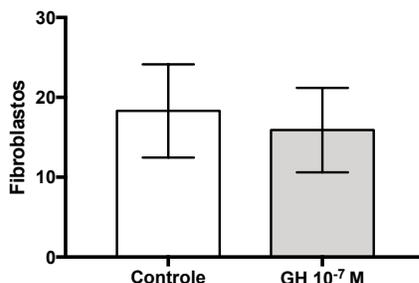
Os fibroblastos são células importantes na cicatrização de feridas, uma vez, que são capazes de produzir fatores de crescimento, agindo de forma autócrina e/ou parácrina, produzindo um arcabouço de proteínas fibrilares que sustentam as células recrutadas, em todas as fases do reparo tecidual. Além disso, se diferenciam em miofibroblastos e participam do processo de contração da ferida (BAINBRIDGE, 2013; THOREY et al., 2004).

5.6.1 O GH não altera o número de fibroblastos na fase inflamatória do processo de cicatrização

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que injúrias tratadas com GH apresentaram 40% de contração da ferida, após o terceiro dia de tratamento, enquanto que o grupo controle, neste mesmo tempo, obtiveram 17% de contração (MESSIAS DE LIMA, CF et al., 2017b). Esse resultado, nos motivou a investigar se o número de fibroblastos estaria aumentado na fase inflamatória, em resposta ao GH.

Para isso, os espécimes foram processados histologicamente, corados com HE e foi realizada a contagem de células. Como mostrado na figura 18, foi observado que o tratamento tópico com GH não alterou o número de fibroblastos na fase inflamatória.

Figura 18. O tratamento com GH não altera o número de fibroblastos na fase inflamatória.

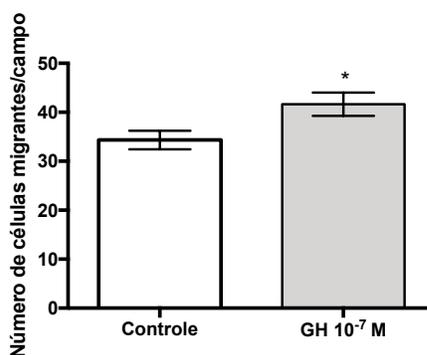


As barras representam a média ± EPM do número de fibroblastos identificados por aspectos morfológicos em cortes histológicos. n=3 animais/grupo.

5.6.2 O GH estimula a migração de fibroblastos

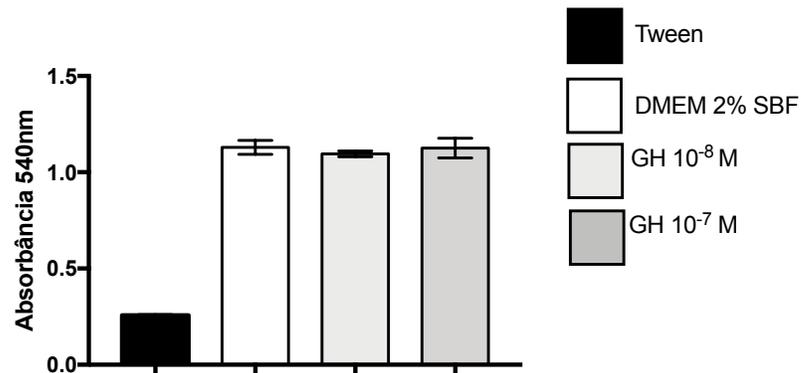
Nosso próximo passo foi investigar *in vitro* o efeito do GH na capacidade migratória de fibroblastos. Para isso, foi utilizado o ensaio de migração em sistema de *transwell* por um período de 3 horas na presença ou ausência do GH. Foi observado que o tratamento com GH aumentou o número de células migrantes quando comparado ao grupo controle, conforme mostrado na figura 19, indicando que este hormônio age em fibroblastos potencializando uma das atividades requeridas no reparo tecidual, sem alterar a viabilidade celular (Figura 20).

Figura 19. O GH estimula a migração de fibroblastos *in vitro*



Cada barra representa a média ± EPM do número de células migrantes usando o sistema de *transwell*. Os experimentos foram realizados em triplicata. A análise estatística foi feita com o teste t. * $p=0,02$. n=3.

Figura 20. O GH não altera a viabilidade de fibroblastos *in vitro*.



Ensaio de viabilidade celular por MTT. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados são expressos como média ± EPM. n=3

5.7 O GH modula a produção de proteínas de MEC *in vivo*.

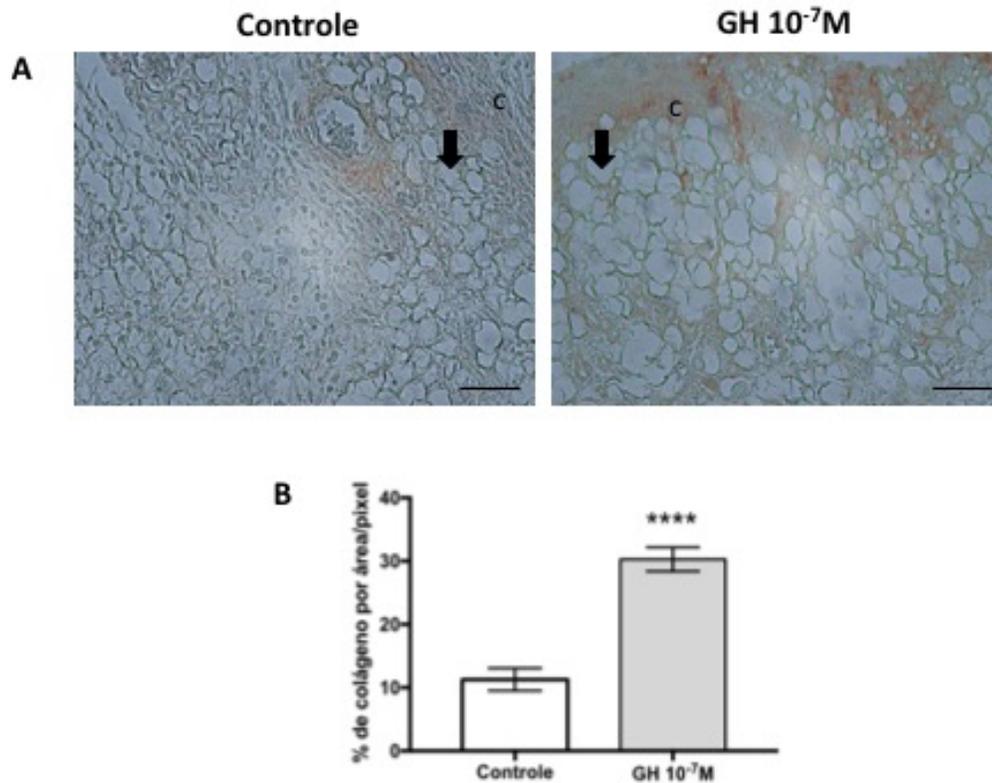
Para observar a deposição de proteínas de MEC, na fase inflamatória, foi coletado fragmentos de pele após o terceiro dia de tratamento. Após o processamento das amostras, espécimes de tecido foram submetidas as técnicas de imunoperoxidase, para o colágeno III, e imunofluorescência, para fibronectina e laminina. Fotomicrografias foram obtidas e a intensidade de fluorescência ou imunomarcção foram quantificadas usando o *Image J*.

Conforme mostrado nas figuras 21, 22 e 23 observou-se que o GH aumentou a deposição de proteínas de MEC, requeridas nos primeiros dias de injúria de tecido, como colágeno III, fibronectina e laminina, contribuindo para uma aceleração na resolução do processo de cicatrização de feridas. Para o colágeno III, a imunomarcção no grupo tratado com GH mostrou uma maior deposição da proteína na superfície da injúria, ou crosta, e o padrão de deposição é mais uniforme na região de tecido de granulação. No entanto, no grupo controle, não foi observado alterações na deposição desta proteína quando se comparam as regiões de crosta e tecido de granulação (figura 21).

Em relação a imunomarcção para laminina e fibronectina não observamos alterações na localização da deposição destas proteínas, no entanto, uma maior

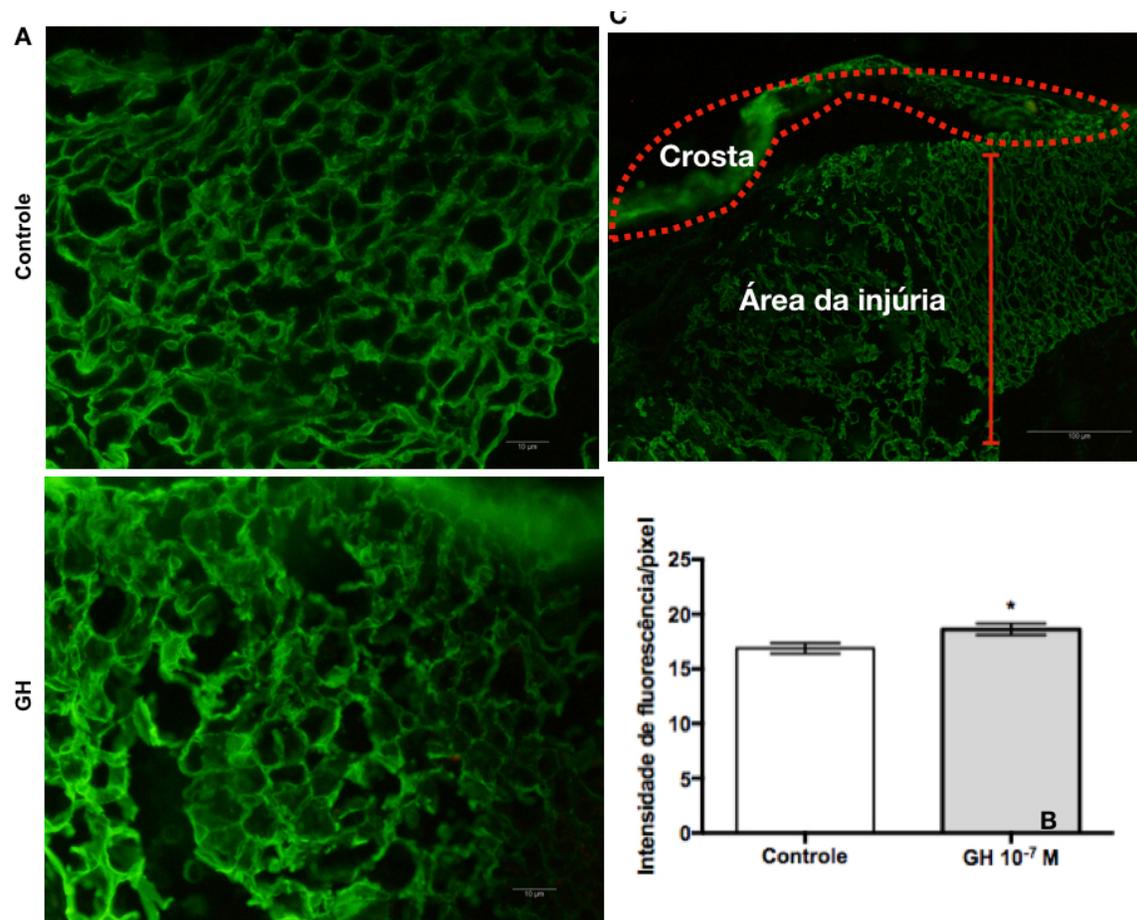
deposição é observada no grupo tratado com GH (Figuras 22 e 23).

Figura 21. O GH aumentou a deposição de Colágeno III no reparo tecidual



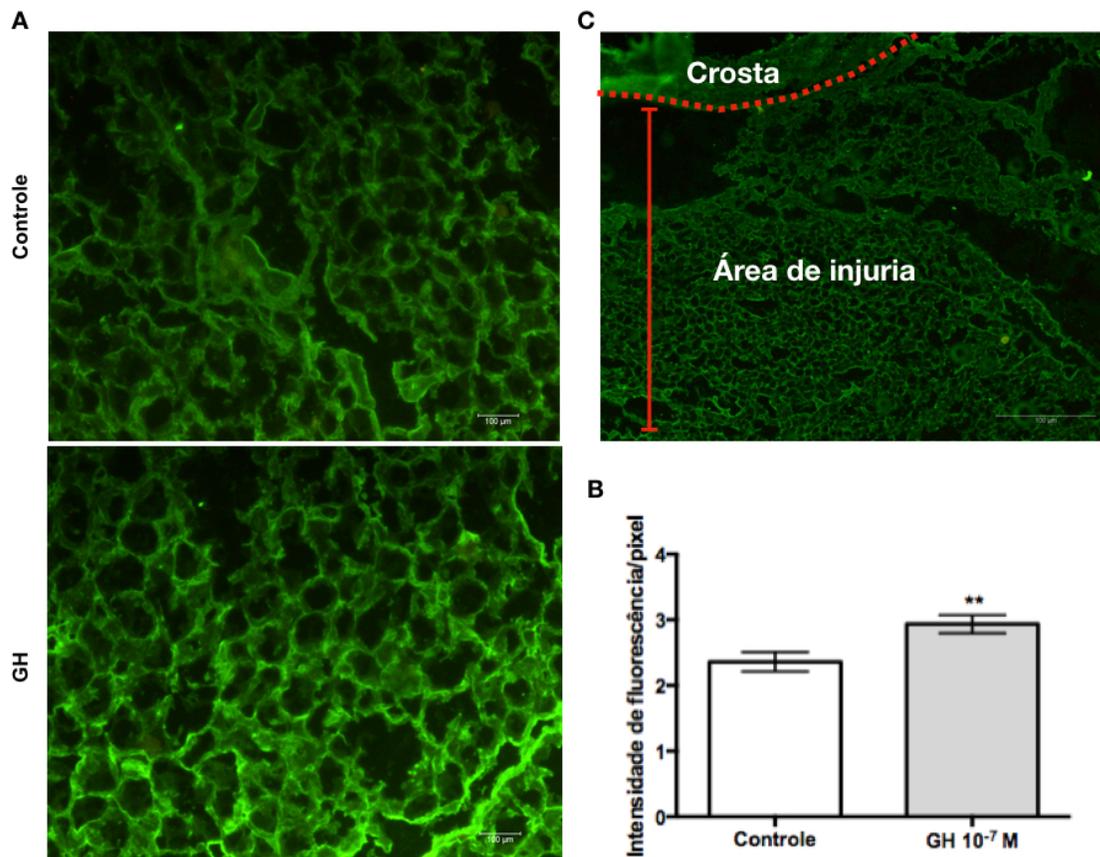
A) Fotomicrografias representativas mostram a deposição de colágeno tipo III do grupo controle e do grupo tratado com GH $10^{-7}M$ após o terceiro dia de tratamento. C: crosta; Seta: identifica a região abaixo da crosta (tecido de granulação). Em **B**, quantificação em pixels das áreas que sofreram reatividade com o anticorpo. As barras representam a média \pm EPM. A análise estatística foi feita com o teste t. **** $p=0,0001$; $n=3$ animais/grupo. Escala: 50 μm .

Figura 22. O GH aumenta a deposição de laminina no reparo tecidual



(A) Fotomicrografias representativas mostram a deposição de laminina do grupo controle e do grupo tratado com GH 10^{-7} M após o terceiro dia de tratamento. (B) Quantificação em pixels da intensidade de fluorescência. Barras representam a média \pm EPM da intensidade de fluorescência (C) Fotomicrografia representativa evidenciando a área analisada para quantificar a intensidade da deposição de laminina. Para o grupo controle e tratado com GH, todas as mensurações foram realizadas dentro da área da injúria. A análise estatística foi feita com o teste t. * $p=0,02$; $n=3$ animais/grupo.

Figura 23. O GH aumenta a deposição de fibronectina no reparo tecidual



(A) Fotomicrografias representativas mostram a deposição de fibronectina do grupo controle e do grupo tratado com GH 10^{-7} M após o terceiro dia de tratamento. (B) Quantificação em pixels da intensidade de fluorescência. Barras representam a média \pm EPM da intensidade de fluorescência. (C) Fotomicrografia representativa evidenciando a área analisada para quantificar a intensidade de deposição de fibronectina. Para o grupo controle e tratado com GH, todas as mensurações foram realizadas dentro da área da injúria. A análise estatística foi feita com o teste t. ** $p=0,007$; $n=3$ animais/grupo.

5.8. O tratamento com GH não altera a expressão gênica do IGF-1.

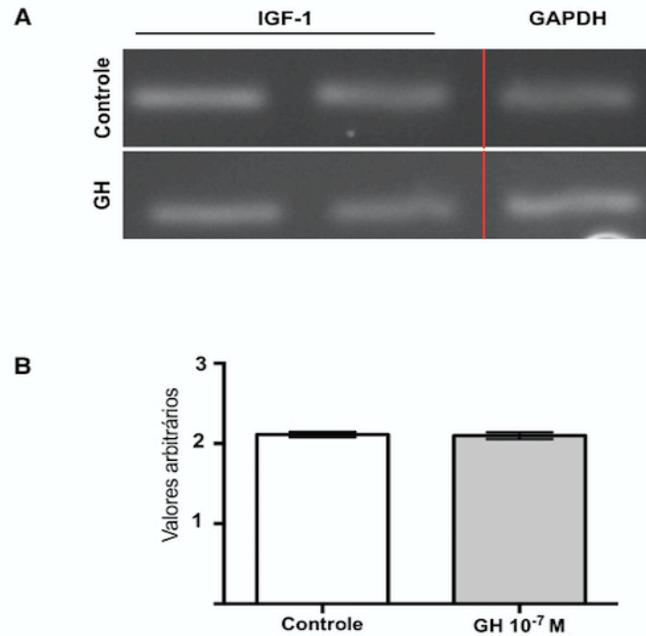
Foi realizado um ensaio para avaliar se o tratamento tópico com GH poderia modular os níveis IGF-1. Para isso, o fígado dos animais tratados com GH e controle foram removidos após o terceiro dia de tratamento e submetidos a técnica de PCR semiquantitativo para analisar os níveis da expressão gênica do *Igf-1*.

Foi constatado que o tratamento tópico com GH não altera a expressão de RNA mensageiro de IGF-1 no fígado de animais tratados quando comparado o grupo controle (Figura 24). Analisou-se também a expressão do *Igf-1* após o 7º e 14º dia de tratamento e verificou-se que os níveis gênicos para o *Igf-1* permanecem inalterados (dados não mostrados).

Os resultados descritos anteriormente mostram um papel relevante do GH sobre células da pele. No entanto, sabe-se que o GH pode agir nas células de forma indireta estimulando a produção de IGF-1. Para excluir a hipótese do efeito indireto do GH realizou-se um ensaio para mensurar a expressão gênica de *Igf-1* na pele.

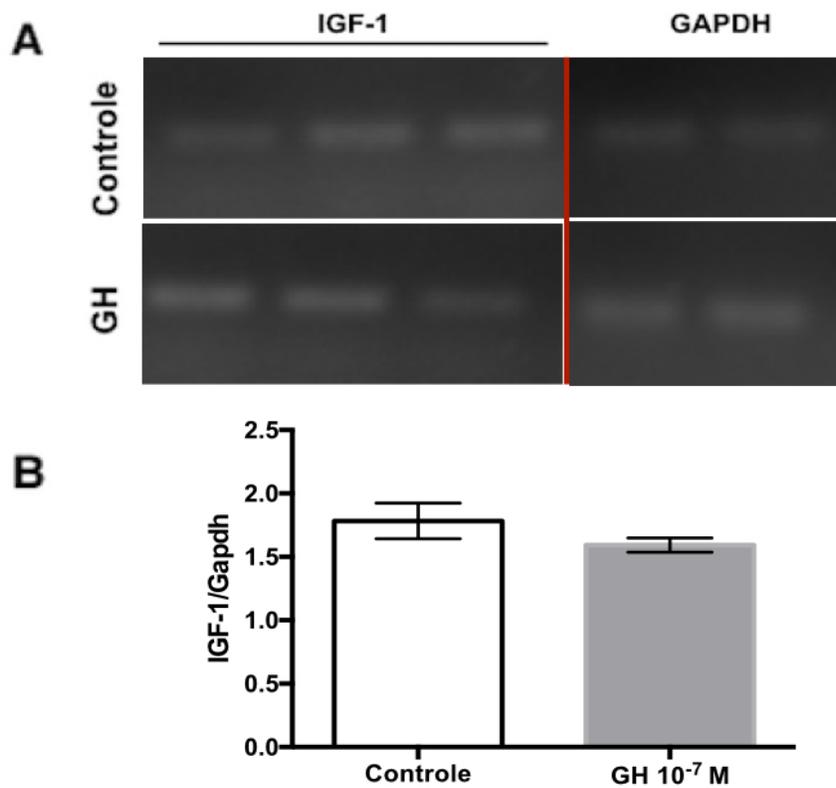
Para isso, a pele da região da injúria dos animais tratados com GH e controle foram coletadas e processadas como descrito na seção 4.1.7. Como resultado, observou-se que o tratamento com GH não alterou os níveis de expressão para o RNAm de *Igf-1* (Figura 25).

Figura 24. Expressão gênica para o IGF-1 no fígado.



A) Fotografias representativas do gel de agarose com os produtos do PCR para o RNAm de IGF-1. O GAPDH foi utilizado como gene constitutivo. Foram realizados 2 experimentos independentes em duplicata. **B)** Nível da expressão gênica para o IGF-1, no fígado. Para a análise de expressão utilizou-se como normalizador o controle endógeno GAPDH; Valor de $p= 0,829$ (teste t student); $n=4$ animais.

Figura 25. O tratamento tópico com GH não altera a expressão gênica para IGF-1 na pele.



A) Fotografias representativas do gel de agarose com os produtos do PCR para o RNAm IGF-1. O GAPDH foi utilizado como gene constitutivo. Foram realizados 2 experimentos independentes em triplicata. **B)** Nível da expressão gênica para o IGF-1, na pele. Para a análise de expressão utilizou-se como normalizador o controle endógeno GAPDH; Valor de $p=0,2$ (teste t student); $n=4$ animais.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo evidenciou efeitos positivos do tratamento tópico com GH na fase inflamatória, da cicatrização de feridas cutâneas, em camundongos adultos. A cicatrização é dependente de eventos celulares e moleculares complexos como a proliferação e migração celular, produção de proteínas de MEC, angiogênese e um delicado equilíbrio entre células inflamatórias. Estes eventos, dirigidos em grande parte por citocinas e/ou fatores de crescimento levam as células recrutadas a sofrerem proliferação e a interagirem com outras células da área afetada, resultando na cicatrização tecidual da pele e garantindo a homeostase (KASUYA e TOKURA, 2014; TAKEO et al., 2015; WERNER e GROSE, 2003).

Em estudo anterior realizado em nosso laboratório foi demonstrado que o tratamento tópico com GH, quando administrado por um período de 14 dias, acelerou o processo de fechamento de feridas cutâneas em camundongos. Observou-se também que os animais que receberam GH, a partir do 12º dia de tratamento, apresentavam reparo tecidual completo (MESSIAS DE LIMA, CF et al., 2017b). Esse resultado inédito em camundongos mostrou que o GH quando aplicado de forma tópica modula positivamente o processo de reparo tecidual colocando-o como um forte candidato no grupo das moléculas que apresentam ações pleiotrópicas em células da pele. Além disso, esse resultado nos motivou a investigar *in vivo* e *in vitro* os efeitos do GH nos processos celulares e moleculares envolvidos na fase inflamatória, um período essencial para limpar contaminantes e criar um ambiente compatível para os sucessivos eventos de reparação tecidual.

Inicialmente, foi demonstrado um cenário inflamatório com um infiltrado celular bem característico, uma crosta proeminente, angiogênese e contração da ferida (figura 10). Após o 3º dia de tratamento, neste infiltrado celular, foi observado que o tratamento tópico com GH acelerou o recrutamento de macrófagos (tabela 5; figura 11). Entretanto no grupo controle as células predominantes foram os neutrófilos. Dados da literatura tem mostrado que os neutrófilos servem como uma primeira linha de defesa contra a infecção por bactérias, componentes de MEC

danificados e corpos estranhos (GOLDBERG e DIEGELMANN, 2010). Ao completar seu objetivo, os neutrófilos devem ser eliminados da ferida antes da progressão para a próxima fase de cicatrização. À medida que o número de neutrófilos começa a diminuir, a população de macrófagos aumenta para substituir os neutrófilos, tornando os fagócitos predominantes da ferida (HART, 2002). Além disso, outro estudo mostrou que o tratamento com GH atenuou significativamente a lesão pulmonar em ratos endotoxêmicos, resultado que pode ser atribuído à redução da expressão de ICAM-1 em células polimorfonucleares, a inibição da ativação de NFkB e a regulação de citocinas pró-inflamatórias (Yi C., et al 2006).

Além do número aumentado de macrófagos no recrutamento inflamatório nós observamos que o número de linfócitos também aumentou significativamente. Trabalho anterior utilizando feridas cutâneas mostrou que a migração e o acúmulo dos principais leucócitos em feridas (neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos), são regulados pela mudança de quimiocinas que incluem principalmente IL-8 e a proteína 1 quimioatrante de monócito (MCP-1) (ENGELHARDT et al., 1998). O papel dos linfócitos na fase inflamatória da cicatrização de feridas não é bem definido, no entanto, parece que os linfócitos B e T (auxiliares ou citotóxicos) protegem as feridas de infecções virais e contribuem para a produção de citocinas inflamatórias e/ou reguladoras que atraem outras células do sistema imunológico ou da pele, como fibroblastos, e criam o ambiente de cicatrização de feridas (DOERSCH et al., 2017; POSTLETHWAITE et al., 1976). Ausência de linfócitos CD4+, em modelo animal, atrasou a cicatrização de feridas que foi acompanhado pelo aumento da expressão de IL1 β , IL-6 e IL-17 e expressão diminuída de IL-4 em comparação com camundongo selvagem. Em contraste, quando a deficiência foi em linfócitos CD8+ as feridas mostraram infiltração significativamente reduzida de células CD4+, neutrófilos e macrófagos, juntamente com expressão diminuída de IL1 β , IL-6 e TNF- α e aumento de IL-4 (CHEN et al., 2014).

Os linfócitos apresentam duas populações e diversas subpopulações celulares que desempenham funções pleiotrópicas na resposta imune da cicatrização (BOYCE et al., 2000). Em nosso estudo não foram identificadas as

populações linfocitárias, no entanto, mostramos que o GH aumentou o recrutamento dessas células na injúria quando comparado ao controle. Estudos futuros sobre o efeito de GH no recrutamento de linfócitos serão necessários para melhor compreensão do papel desempenhado por estas células no processo do reparo tecidual.

Os macrófagos, além de sua função imunológica, estão envolvidos centralmente no controle da síntese de novos constituintes de MEC, sendo este papel auxiliado pela liberação de uma variedade de fatores de crescimento/citocinas, que direcionam a atividade de células endoteliais, fibroblastos e queratinócitos (AGAIBY e DYSON, 1999). Os motivos desta sequência de recrutamento ainda não são totalmente conhecidos. No entanto, pode ser explicado em termos da produção sequencial de fatores solúveis quimiotáticos, a abundância relativa dos diferentes leucócitos no sangue ou diferenças nas taxas de migração de diferentes tipos de células (HART, 2002).

Ainda sobre os macrófagos, também foi demonstrado o recrutamento precoce dessas células quando comparado ao controle, utilizando o ensaio de imunofluorescência no tecido (figura 12). Além disso, mostramos que IL-10, uma importante citocina anti-inflamatória, estava aumentada em feridas que foram tratadas com GH, enquanto que $TNF\alpha$ diminuiu significativamente quando comparado ao controle (figura 13). In vitro, observou-se apenas um aumento significativo de IL-6 quando macrófagos J774 foram tratados com GH na concentração de $10^{-9}M$, mas esse efeito não foi visto na concentração utilizada neste estudo ($10^{-7}M$) (figura 14) sugerindo que diferentes concentrações de GH podem apresentar diferentes efeitos. Durante o curso do reparo tecidual, os macrófagos desempenham um papel ativo na secreção de citocinas e quimiocinas, direcionando o recrutamento de várias células efetoras (DELAVARY et al., 2011). Em função de seus produtos secretados, quando ativados, os macrófagos podem ser classificados em dois grandes fenótipos que podem ser amplamente definidos como: M1, pró-inflamatórios e M2, pró-cicatrização (MOSSER e EDWARDS, 2008). Daley et al (2010) mostraram, em um modelo de cicatrização, que cerca de 85% dos macrófagos presentes no primeiro dia de injúria eram macrófagos do tipo M1

que produzem citocinas de ativação clássica, como $TNF\alpha$, IL-6 e poucas quantidades de $TGF\beta$ (DALEY et al., 2010). Posteriormente, em um estágio mais avançado da cicatrização, esses macrófagos são substituídos por um perfil menos inflamado, produzindo altas concentrações de IL-10 e $TGF\beta$, por exemplo (MOSSER e EDWARDS, 2008). Entretanto, tem sido mostrado que o tratamento com GH sobre macrófagos aumenta a produção de citocinas inflamatórias, óxido nítrico e ativa vias de sinalização envolvidas em respostas pró inflamatórias (TRIPATHI e SODHI, 2009). Baseado na literatura e em nossos resultados, podemos sugerir que o tratamento com GH atua na cicatrização de feridas, acelerando a resposta inflamatória e antecipando o recrutamento de macrófagos M2. Essa hipótese é apoiada por outro trabalho da literatura, onde foi demonstrado que o GH atua sobre macrófago, suprimindo a atividade de NF-kB e fatores inflamatórios relacionados como, $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-4 e MIP-1 α (KUMAR et al., 2014). Estudos futuros deverão ser realizados para fundamentar melhor nossa hipótese.

Uma característica notável que surge com o reparo do tecido é a formação de novos vasos sanguíneos. Desde os momentos iniciais após a injúria, até o processo de reparo final, a nova rede vascular desempenha um papel relevante na entrega de substâncias endócrinas, células imunológicas, oxigênio e nutrientes. No presente estudo foi demonstrado, *in vivo*, que o tratamento tópico com GH aumenta a vascularização após 3 dias de tratamento. Além disso, dados anteriores demonstraram que o tratamento tópico com GH aumentou a angiogênese após o 7º e 14º dia de tratamento (MESSIAS DE LIMA, CF et al., 2017b), colocando o GH como um peptídeo pró-angiogênico (STRUMAN et al., 1999) e sugerindo que este poderia ser um dos meios pelo qual o GH age na aceleração da cicatrização de feridas cutâneas. Estudo anterior, mostrou que feridas de animais que possuem aumentado os níveis de GH circulante (transgênicos) apresentaram um maior número de vasos sanguíneos neoformados e, além disso, os vasos apresentaram maior calibre quando comparado ao controle. Em contraste, eles observaram uma diminuição do número de vasos na pele normal de animais transgênicos, demonstrando que o GH sozinho não aumenta a vascularização da derme, mas é necessário a presença de outros fatores adicionais para estimular este processo

(THOREY et al., 2004).

In vitro, foi observado que células endoteliais que receberam o meio condicionado de macrófagos tratados com GH, foram mais estimuladas a formarem estruturas semelhantes a capilares quando comparadas as células que receberam o meio condicionado sem tratamento (figura 16). Adicionalmente, mostramos *in vivo* que o GH aumentou a angiogênese na fase inflamatória (figura 17). Recentemente, foi demonstrado que o GH atua sobre células endoteliais, estimulando a proliferação celular, a migração, a deposição de proteínas multi-adesivas, como laminina e fibronectina e, além disso, foi mostrado que células endoteliais expostas ao GH aumentam em até 2 vezes o número de estruturas semelhantes a capilares sobre o revestimento de matrigel (MESSIAS DE LIMA, CF et al., 2017a). Para formar novos vasos sanguíneos, as células endoteliais da extremidade de dois vasos preexistentes migram sobre de um gradiente de VEGF e se juntam pelo processo de anastomose. Nos últimos anos, foi detalhado a participação dos macrófagos nesse processo e, estas células, parecem fornecer uma ponte de comunicação e união entre as células endoteliais (SCHMIDT e CARMELIET, 2010; RISAU, 1997). Na literatura, foram fornecidas evidências de que altos níveis de GH circulante é correlacionado com níveis aumentados de fatores de crescimento vascular, incluindo o VEGF (SILHA et al., 2005). Além disso, estudo anterior demonstrou que macrófagos polarizados para um perfil M2 possuem maior potencial angiogênico em comparação com outras subpopulações (JETTEN et al., 2014). Aqui, sugerimos que o tratamento com GH atuou sobre macrófagos, modulando essas células para um perfil M2, contribuindo para estimular a angiogênese.

O significado do GH no controle da imunidade ficou evidente a partir da observação de que os animais hipofisectomizados são mais vulneráveis a infecções bacterianas. Estes dados estabelecem que a glândula pituitária é essencial para a homeostase durante um episódio infeccioso e que o GH desempenha um papel importante na resistência do hospedeiro, aumentando a atividade de macrófagos, como a fagocitose, para matar *Sallmonela typhimurium* (EDWARDS et al., 1991; EDWARDS 3RD et al., 1992). Além disso, o GH modula a biologia de órgãos

linfoides, estimulando a granulocitopoiese, a reversão da involução tímica e aumento e função de linfócitos T (KELLEY, 1989). Em contraste, mais uma vez, nosso estudo mostrou que o GH altera o perfil de macrófagos M2 mais rapidamente na ferida levando a aceleração do reparo tecidual, diminuindo o estado inflamatório. De acordo com essa observação, outro estudo revelou que pacientes deficientes em GH, apresentaram níveis elevados de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α), e o tratamento desses indivíduos, com GH durante 3 meses, mostrou diminuição da ativação de monócitos/macrófagos no sangue e conseqüentemente redução dos níveis séricos dessas citocinas (SERRI et al., 1999), revelando um papel anti-inflamatório do GH em desordens endócrinas.

No presente estudo, avaliou também a deposição de proteínas de MEC na pele que sofreu a injúria. A análise dos espécimes mostrou que o tratamento tópico com GH estimulou de forma significativa a deposição da proteína estrutural colágeno III (figura 21), e das glicoproteínas laminina (figura 22) e fibronectina (figura 23).

A cicatrização normal de feridas é caracterizada por uma série de eventos coordenados e progressivos, com objetivo de restaurar a função de barreira envolvendo interações entre células e seu microambiente, dos quais a MEC é o principal componente (ROUSSELLE et al., 2018; SINGER AJ; e CLARK, 1999). No tecido em cicatrização, tanto queratinócitos quanto fibroblastos sintetizam componentes de MEC que são essenciais para garantir a homeostase e funções celulares durante o reparo tecidual (SHAW e MARTIN, 2009). Dentre os componentes que são produzidos na cicatrização, destacam-se a fibronectina e a laminina que são sintetizadas por diversas células no microambiente, como neutrófilos, linfócitos, fibroblastos e células endoteliais (KASUYA e TOKURA, 2014; SCHULTZ et al., 2012). Em nossos resultados, mostramos que o GH aumenta o infiltrado de células recrutadas (tabela 5; figura 11), o que poderia ser possível devido ao aumento de fibronectina depositada (figura 23). Sabe-se, que no decorrer do reparo tecidual, esta glicoproteína é depositada sobre o coágulo de fibrina e nas fibras do colágeno tipo III, servindo com um ambiente adequado para a migração

de leucócitos (GRINNELL et al., 1981). Outro estudo também mostrou que células endoteliais expostas ao GH aumentaram a deposição de laminina e fibronectina e, conseqüentemente, a migração celular e angiogênese (MESSIAS DE LIMA, CF et al., 2017a). Dados do nosso grupo mostraram que animais, tratados ou transgênicos para o GH, aumentaram a deposição de laminina em comparação com os controles e, além disso, a migração de timócitos sobre um revestimento de laminina estava aumentada após o tratamento com GH (SMANIOTTO et al., 2005) contribuindo com a hipótese de que o GH aumenta a deposição de MEC estimulando a migração de células.

A derme intacta é composta predominantemente por colágeno tipo I (80 - 90%) e por colágeno tipo III (10 - 20%). No tecido de granulação, o colágeno tipo III é aumentado 30%, enquanto que no tecido de cicatrização maduro ele é reduzido a 10% (figura 7) (WITTE e BARBUL, 1997). Dados da literatura tem mostrado que a produção de colágeno, na área da ferida, representa um dos fatores mais significativos para a recuperação da derme (MARTIN, 1997). Durante o reparo tecidual, a deposição de colágeno tem início por volta do 3º dia, atinge o máximo de deposição na segunda semana e entra em fase de remodelação. O colágeno tipo III é inicialmente depositado, sendo substituído por colágeno tipo I à medida que ocorre maturação do tecido cicatricial (WITTE e BARBUL, 1997). Em trabalho anterior, foi observado que o GH aumentou a deposição de colágeno tipo I (MESSIAS DE LIMA, CF et al., 2017b). No presente estudo, observamos que o tratamento com GH aumenta a deposição de colágeno III após três dias de tratamento. No entanto, um estudo anterior demonstrou que em porcos feridas tratadas com GH não aumentaram a deposição de colágeno III, sendo este efeito observado apenas em relação ao colágeno I (KIM, Suk Hwa et al., 2009). Acreditamos que, no referido estudo, o tempo de observação em relação a deposição de colágeno III tenha sido tardio para verificar uma ação do GH nessa proteína que é depositada logo após a injúria. Aqui, nossos dados sustentam a hipótese de que o GH estimula a produção e deposição de componentes da MEC no reparo tecidual contribuindo para o estabelecimento estrutural da pele.

Os fibroblastos são células produtoras de componentes de MEC, principalmente colágeno, e são atraídos para a ferida por meio de uma série de fatores solúveis onde se destaca o PDGF, que induz a sua proliferação e consequente função fisiológica (DE MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009). Além disso, na presença de TGF- β , que se origina a partir de macrófagos no local da ferida como parte da resposta inflamatória, os fibroblastos sofrem uma mudança no fenótipo, por meio de adesões contendo integrinas e proteínas de MEC. Assim, essa ligação faz com que os fibroblastos comecem a expressar fibras de estresse ou filamentos de actina no citoplasma diferenciando-se em miofibroblastos (BAINBRIDGE, 2013). Embora, no presente estudo, não tenha sido observado alterações no número de fibroblastos em feridas de animais tratados com GH (figura 18) foi demonstrado *in vitro* que o GH estimulou a migração dessas células em sistema de transwell (figura 19) e *in vivo* observou-se um aumento na deposição de proteínas de MEC (figura 21-23). De fato, a migração de fibroblastos e a sua diferenciação em miofibroblastos são fenômenos importantes para a contração da ferida. A nossa hipótese é de que a migração de fibroblastos na presença de moléculas de MEC seja suficiente para atuar na contração da ferida, já que o número dessas células não foi alterado em resposta ao GH, após o 3º dia de tratamento (figura 18). Dados da literatura, tem mostrado que os fibroblastos produzem uma força contrátil quando tentam se mover dentro da matriz de colágeno contraindo as bordas da ferida (BAINBRIDGE, 2013; EHRLICH e RAJARATNAM, 1990). Além disso, experimento *in vitro* mostrou que o tratamento com GH estimulou a proliferação de fibroblastos (KIM, Suk Hwa et al., 2009), no entanto, em nosso estudo *in vivo* não foi notado o aumento dessas células no tecido de cicatrização.

Embora o GH tenha apresentado efeitos positivos na cicatrização de feridas, como demonstrado neste estudo e em outras publicações (KIM, Suk Hwa et al., 2009; LAL et al., 2000; MONAFO et al., 2000) têm sido relatados que altos níveis de GH na circulação podem provocar alterações em vários órgãos do corpo, como visto em indivíduos acromegálicos. A acromegalia é uma doença crônica rara causada pela hipersecreção do GH, que é devida em mais de 95% dos casos à um adenoma pituitário secretor de GH. Esta hipersecreção de GH associado a níveis

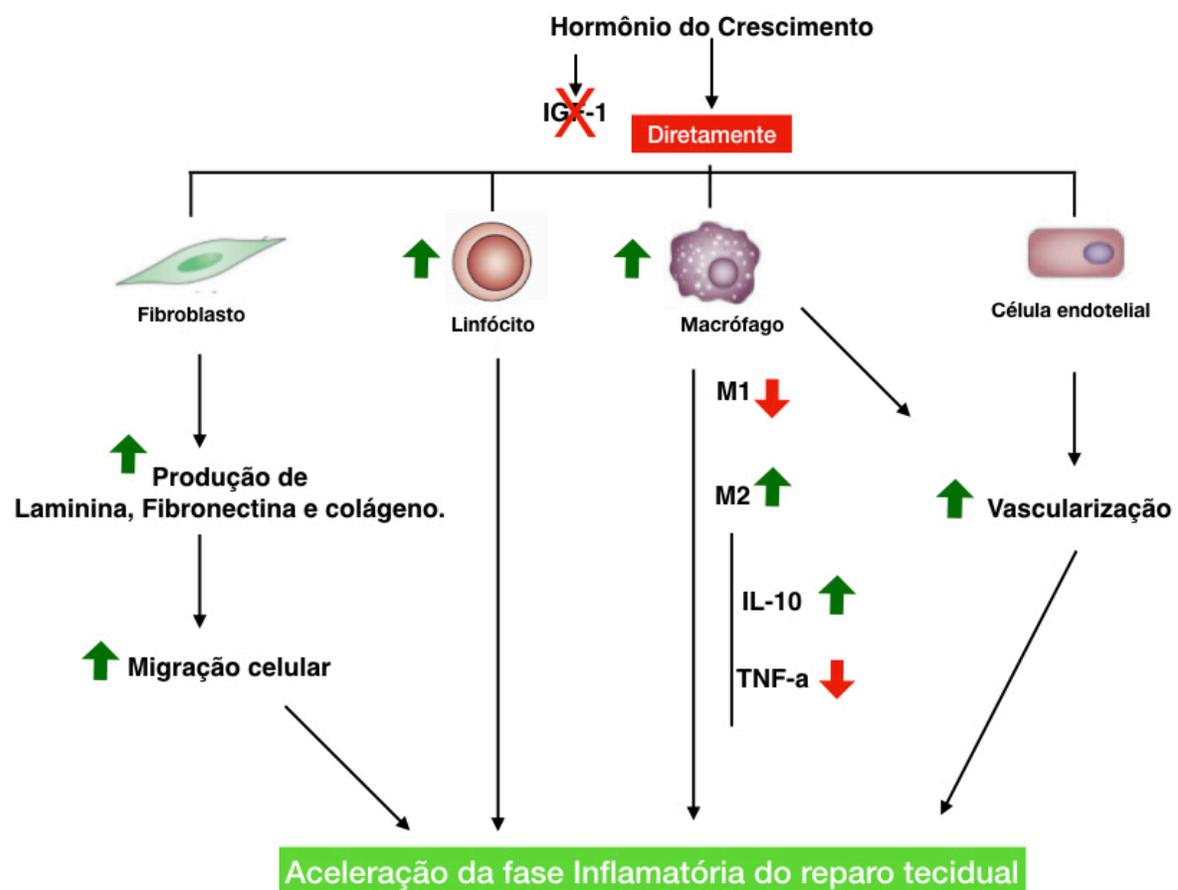
elevados de IGF-I resultam em aumento da morbidade e mortalidade (RADETTI et al., 2017). Estudo mostrou uma associação direta entre níveis elevados de IGF-1 e câncer de próstata (CAO et al., 2015) e outras implicações em diversas neoplasias aumentando a agressividade e a proliferação de células tumorais (MUREKATETE et al., 2018). Interessantemente, o acompanhamento por 22 anos mostraram que indivíduos portadores de mutações no receptor do GH não desenvolveram malignidade ou diabetes enquanto que os indivíduos controles (sem deficiência no rGH) desenvolveram câncer em taxas semelhantes às da população em geral (GUEVARA-AGUIRRE et al., 2011), demonstrando uma relação dos níveis elevados de GH e/ou IGF-1 com neoplasias. Em nosso estudo, não foi observado alterações nos níveis da expressão gênica para o IGF-1 no fígado dos animais que receberam o tratamento tópico com GH (figura 24). Esse resultado sugere que o uso tópico do GH não é capaz de alterar os níveis sistêmicos de seu mediador, o IGF-1.

O GH exerce efeitos diversos, diretamente ou por meio do IGF-1, que é produzido principalmente no fígado em resposta ao GH (GREEN et al., 1985). O IGF-1 é mitógeno para os queratinócitos da epiderme (EMING, S A et al., 1996), e além disso, este peptídeo é um importante estimulador da síntese de proteínas de MEC por fibroblastos da derme (KURODA et al., 2001) além de estimular a proliferação destas células (TAVAKKOL et al., 1992). Estudos tem mostrado que o IGF-1 é produzido por células imunes (XU et al., 1995), que são recrutadas nas fases da cicatrização de feridas. Foi visto também que o tratamento com GH aumenta a deposição de IGF-1 na pele de porcos, após três semanas de tratamento (KIM, Suk Hwa et al., 2009). Em condições patológicas, como a diabetes, este peptídeo parece estar envolvido na produção de proteínas que regulam a re-epitelização e a produção de novo tecido de granulação (YU et al., 2007). Este compilado de informações poderia indicar um efeito indireto do GH no reparo tecidual na pele. Para tentar elucidar essa questão, nós analisamos a expressão gênica para o IGF-1 na pele injuriada. Em nossos resultados, foi mostrado que o tratamento tópico com GH não alterou os níveis da expressão gênica de IGF-1 na pele (figura 25), sugerindo que os efeitos apresentados *in vivo*, podem ser um mecanismo da ação

direta do GH sobre as células recrutadas.

Um esquema do modelo hipotético da ação de GH apresentado neste estudo está representado na figura 26, permitindo sugerir que o GH atua nos processos celulares e moleculares da fase inflamatória do reparo tecidual.

Figura 26. Representação esquemática dos efeitos do GH na fase inflamatória do reparo tecidual.



Hipótese desenvolvida a partir dos resultados obtidos *in vivo* e *in vitro* dos efeitos do GH sobre células responsáveis pelo reparo tecidual. O GH acelera a fase inflamatória do reparo tecidual, agindo diretamente sobre fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e linfócitos. Sobre macrófagos, observou-se no 3º dia de injúria, a produção de citocinas que caracterizam essas células com perfil anti-inflamatório ou M2. Sugerimos que esse perfil contribuiu para um aumento da angiogênese e permitiu um microambiente para o depósito de proteínas de MEC.

7.0 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho sustentam a hipótese de que o tratamento com GH possui efeitos importantes no reparo tecidual. Foi demonstrado que o tratamento com GH acelerou o recrutamento de linfócitos e macrófagos para a injúria. O aumento destas células contribuiu para uma rápida deposição de proteínas de MEC, aumentando a angiogênese e a contração da ferida. Esses resultados sugerem a ação direta do GH sobre as células recrutadas, uma vez que não foram observadas alterações na expressão gênica para o IGF-1 no fígado e na pele.

8.0 REFERÊNCIAS

AGAIBY, A D e DYSON, M. **Immuno-inflammatory cell dynamics during cutaneous wound healing.** Journal of anatomy, v. 195 (Pt 4, p. 531–42, 1999.

ARTWOHL, M et al. **Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells.** Int J Obes Relat Metab Disord, v. 26, n. 4, p. 577–580, 2002.

ASHCROFT, Gillian S. et al. **Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response.** American Journal of Pathology, v. 155, n. 4, p. 1137–1146, 1999.

BAINBRIDGE, P. **Wound healing and the role of fibroblasts.** Journal of wound care, v. 22, n. 8, p. 407–12, 2013.

BEANES, Steven R. et al. **Skin repair and scar formation: The central role of TGF-??** Expert Reviews in Molecular Medicine, v. 5, n. 8, p. 1–11, 2003.

BICKERS, David R. e ATHAR, Mohammad. **Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease.** Journal of Investigative Dermatology, v. 126, n. 12, p. 2565–2575, 2006.

BLALOCK, J. Edwin. **The syntax of immune-neuroendocrine communication.** Immunology Today, v. 15, n. 11, p. 504–511, 1994.

BOGUSZEWSKI, Cesar L. et al. **Mechanisms in endocrinology: Clinical and pharmacogenetic aspects of the growth hormone receptor polymorphism.** European Journal of Endocrinology, v. 177, n. 6, p. R309–R321, 2017.

BOS, Jan D e LUITEN, Rosalie M. **Skin Cancer after Organ Transplantation.** v. 146, p. 3–17, 2009.

BOYCE, D E et al. **The role of lymphocytes in human dermal wound healing.** The British journal of dermatology, v. 143, n. 1, p. 59–65, 2000.

BRIGGAMAN, Robert A. **Epidermal-dermal Interactions in Adult Skin.** Journal

of Investigative Dermatology, v. 79, n. 1, p. 21–24, 1982.

BRINCAT, M. P. e BARON, Y. Muscat e GALEA, R. **Estrogens and the skin.** Climacteric, v. 8, n. 2, p. 110–123, 2005.

BROUGHTON, George e JANIS, Jeffrey E. e ATTINGER, Christopher E. **The basic science of wound healing.** Plastic and Reconstructive Surgery, v. 117, n. 7 SUPPL., p. 12–34, 2006.

BRUNET-DUNAND, Severine E. et al. **Autocrine human growth hormone promotes tumor angiogenesis in mammary carcinoma.** Endocrinology, v. 150, n. 3, p. 1341–1352, 2009.

CAICEDO, Andrés e ROSENFELD, Ron. **Challenges and future for the delivery of growth hormone therapy.** Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society, n. October, p. 1–5, 17 Dec. 2017.

CANTY, E. G. **Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis.** Journal of Cell Science, v. 118, n. 7, p. 1341–1353, 2005.

CAO, Yin et al. **Prediagnostic plasma IGFBP-1, IGF-1 and risk of prostate cancer.** International Journal of Cancer, v. 136, n. 10, p. 2418–2426, 15 May 2015.

CASTILLA, Diego M. e LIU, Zhao-Jun e VELAZQUEZ, Omaidia C. **Oxygen: Implications for Wound Healing.** Advances in Wound Care, v. 1, n. 6, p. 225–230, 2012.

CHEN, Lin et al. **Absence of CD4 or CD8 lymphocytes changes infiltration of inflammatory cells and profiles of cytokine expression in skin wounds, but does not impair healing.** Experimental Dermatology, v. 23, n. 3, p. 189–194, Mar. 2014.

CLARK, B Y Richard A F et al. **To Injury.** v. 156, n. August, p. 646–651, 1982.

COCULESCU, M. **Blood-brain barrier for human growth hormone and insulin-**

like growth factor-I. Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM, v. 12, n. 2, p. 113–24, 1999.

CRUZAT, Vinicius Fernandes et al. **Hormônio do crescimento e exercício físico: considerações atuais.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 44, n. 4, p. 549–562, 2008.

DALEY, J. M. et al. **The phenotype of murine wound macrophages.** Journal of Leukocyte Biology, v. 87, n. 1, p. 59–67, 2010.

DARBY, Ian A. et al. **Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing.** Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology, v. 7, p. 301–311, 2014.

DARLENSKI, R e KAZANDJIEVA, J e TSANKOV, N. **Skin barrier function: morphological basis and regulatory mechanisms.** Journal of Clinical Medicine, v. 4, n. 1, p. 36–45, 2011.

DE MENDONÇA, Ricardo José e COUTINHO-NETTO, Joaquim. **Aspectos celulares da cicatrização.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 84, n. 3, p. 257–262, 2009.

DELAVARY, Babak Mahdavian et al. **Macrophages in skin injury and repair.** Immunobiology, v. 216, n. 7, p. 753–762, 2011.

DEMIDOVA-RICE, Tatiana N e HAMBLIN, Michael R e HERMAN, Ira M. **Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery.** Advances in skin & wound care, v. 25, n. 8, p. 349–70, 2012.

DESMOULIÈRE, A et al. **Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar.** The American journal of pathology, v. 146, n. 1, p. 56–66, 1995.

DIOUFA, N. et al. **Acceleration of wound healing by growth hormone-releasing hormone and its agonists.** Proceedings of the National Academy of

Sciences, v. 107, n. 43, p. 18611–18615, 2010.

DOERSCH, Karen M e DELLOSTRITTO, Daniel J e NEWELL-ROGERS, M Karen. **The contribution of interleukin-2 to effective wound healing.** *Experimental Biology and Medicine*, v. 242, n. 4, p. 384–396, 25 Feb. 2017.

DOS SANTOS REIS, Maria Danielma et al. **Resident murine macrophage migration and phagocytosis are modulated by growth hormone.** *Cell Biology International*, v. 9999, p. 1–9, 2018.

DUNAISKI, V. e BELFORD, D. A. **Contribution of circulating IGF-I to wound repair in GH-treated rats.** *Growth Hormone and IGF Research*, v. 12, n. 6, p. 381–387, 2002.

EDWARDS, C K et al. **The pituitary gland is required for protection against lethal effects of Salmonella typhimurium.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 88, n. 6, p. 2274–7, 15 Mar. 1991.

EDWARDS 3RD, C K et al. **In vivo administration of recombinant growth hormone or gamma interferon activities macrophages: enhanced resistance to experimental Salmonella typhimurium infection is correlated with generation of reactive oxygen intermediates.** *Infect Immun*, v. 60, n. 6, p. 2514–2521, 1992.

EHRlich, H. Paul e RAJARATNAM, Joseph B.M. **Cell locomotion forces versus cell contraction forces for collagen lattice contraction: An in vitro model of wound contraction.** *Tissue and Cell*, v. 22, n. 4, p. 407–417, 1990.

EMING, S a et al. **Targeted expression of insulin-like growth factor to human keratinocytes: modification of the autocrine control of keratinocyte proliferation.** *The Journal of investigative dermatology*, v. 107, n. 1, p. 113–120, 1996.

EMING, Sabine A. e KRIEG, Thomas e DAVIDSON, Jeffrey M. **Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms.** *Journal of Investigative*

Dermatology, v. 127, n. 3, p. 514–525, 2007a.

EMING, Sabine A. e KRIEG, Thomas e DAVIDSON, Jeffrey M. **Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms**. Journal of Investigative Dermatology, v. 127, n. 3, p. 514–525, 2007b.

ENGELHARDT, Eva et al. **Chemokines IL-8, GRO α , MCP-1, IP-10, and Mig Are Sequentially and Differentially Expressed During Phase-Specific Infiltration of Leukocyte Subsets in Human Wound Healing**. The American Journal of Pathology, v. 153, n. 6, p. 1849–1860, 1998.

FERRANTE, Christopher J. e LEIBOVICH, Samuel Joseph. **Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing**. Advances in Wound Care, v. 1, n. 1, p. 10–16, 2012.

FORE-PFLIGER, Jane. **The epidermal skin barrier: implications for the wound care practitioner, part I**. Advances in skin & wound care. [S.l.: s.n.], 2004

GAVIN, J R e SALTMAN, Robert J e TOLLEFSEN, Sherida E. **Growth hormone receptors in isolated rat adipocytes**. Endocrinology, v. 110, n. 2, p. 637–43, Feb. 1982.

GOLDBERG, Stephanie R. e DIEGELMANN, Robert F. **Wound Healing Primer**. Surgical Clinics of North America, v. 90, n. 6, p. 1133–1146, 2010.

GOREN, Itamar et al. **Leptin and wound inflammation in diabetic ob/ob mice: differential regulation of neutrophil and macrophage influx and a potential role for the scab as a sink for inflammatory cells and mediators**. Diabetes, v. 52, n. 11, p. 2821–32, Nov. 2003.

GREEN, H e MORIKAWA, M e NIXON, T A. **A dual effector theory of growth hormone action**. Differentiation, v. 29, p. 195–198, 1985.

GRINNELL, F. e BILLINGHAM, R. E. e BURGESS, L. **Distribution of fibronectin during wound healing in vivo**. Journal of Investigative Dermatology, v. 76, n. 3, p. 181–189, 1981.

GUEVARA-AGUIRRE, Jamie et al. **Growth Hormone Receptor Deficiency is Associated With a Major Reduction in Pro-aging Signalling, Cancer and Diabetes in Humans**. *Sci Transl Med.*, v. 3, n. 70, p. 1566–1576, 2011.

HÄNEL, Kai H. et al. **Cytokines and the skin barrier**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 4, p. 6720–6745, 2013.

HART, J. **Inflammation 1: Its role in the healing of acute wounds**. *Journal of wound care*, v. 11, n. 6, p. 205–209, 2002.

HECHT, Stephen S. **Invited Review**. v. 11, n. 6, p. 5–8, 1998.

IMHOF, Beat A. e AURRAND-LIONS, Michel. **Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes**. *Nature Reviews Immunology*, v. 4, n. 6, p. 432–444, 2004.

JETTEN, Nadine et al. **Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo**. *Angiogenesis*, v. 17, n. 1, p. 109–118, 2014.

KAESSMEYER, Sabine et al. **Subcellular Interactions during Vascular Morphogenesis in 3D Cocultures between Endothelial Cells and Fibroblasts**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 12, p. 2590, 2017.

KAPP, Suzanne e SANTAMARIA, Nick. **The financial and quality-of-life cost to patients living with a chronic wound in the community**. *International Wound Journal*, v. 14, n. 6, p. 1108–1119, 2017.

KASUYA, Akira e TOKURA, Yoshiki. **Attempts to accelerate wound healing**. *Journal of Dermatological Science*, v. 76, n. 3, p. 169–172, 2014.

KELLEY, Keith W. **Growth hormone, lymphocytes and macrophages**. *Biochemical Pharmacology*, v. 38, n. 5, p. 705–713, 1989.

KENDALL, Ryan T. e FEGHALI-BOSTWICK, Carol A. **Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators**. *Frontiers in Pharmacology*, v. 5 MAY, n. May, p. 1–

13, 2014.

KIM, Suk Hwa e HEO, Eun Ju e LEE, Sang Woo. **The effect of topically applied recombinant human growth hormone on wound healing in pigs.** Wounds : a compendium of clinical research and practice, v. 21, n. 6, p. 158–63, Jun. 2009.

KIM, Young-Yoon et al. **Laminin peptide YIGSR enhances epidermal development of skin equivalents.** Journal of Tissue Viability, p. 1–5, 2018.

KIRCHNER, Loren M et al. **Effects of vascular endothelial growth factor on wound closure rates in the genetically diabetic mouse model.** Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society, v. 11, n. 2, p. 127–31, 2003.

KUMAR, P. Anil et al. **Growth hormone (GH) differentially regulates NF- κ B activity in preadipocytes and macrophages: Implications for GH's role in adipose tissue homeostasis in obesity.** Journal of Physiology and Biochemistry, v. 70, n. 2, p. 433–440, 2014.

KURODA, K et al. **Up-regulation of putative hyaluronan synthase mRNA by basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor-1 in human skin fibroblasts.** Journal of dermatological science, v. 26, n. 2, p. 156–60, 2001.

LAL, S O e WOLF, S E e HERNDON, D N. **Growth hormone, burns and tissue healing.** Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society, v. 10 Suppl B, p. S39-43, 2000.

LEE, Sang Woo et al. **The effect of growth hormone on fibroblast proliferation and keratinocyte migration.** Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, v. 63, n. 4, p. e364–e369, 2010.

LEUNG, D W et al. **Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression.** Nature, Descreve o receptor do GH, a sua produção e expressão., v. 330, n. 6148, p. 537–543, 1987.

- LINS, Marvin Paulo et al. **Growth hormone in the presence of laminin modulates interaction of human thymic epithelial cells and thymocytes in vitro**. *Biological research*, v. 49, n. 1, p. 37, 2016.
- LOBIE, P. E. et al. **Localization of the growth hormone receptor/binding protein in skin**. *Journal of Endocrinology*, v. 126, n. 3, p. 467–472, 1990.
- LUTZ, Manfred B. e DÖHLER, Anja e AZUKIZAWA, Hiroaki. **Revisiting the tolerogenicity of epidermal Langerhans cells**. *Immunology and Cell Biology*, v. 88, n. 4, p. 381–386, 2010.
- LYON, De e BERNARD, Claude. **Collagen The presence**. *The FASEB Journal*, v. 5, n. 60, p. 2814–2823, 1991.
- MADISON, Kathi C. **Barrier function of the skin: “La Raison d’Être” of the epidermis**. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 121, n. 2, p. 231–241, 2003.
- MARTIN, P. **Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration**. *Science*, v. 276, n. 5309, p. 75–81, 1997. Disponível em:
- MATEJUK, Agata. **Skin Immunity**. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v. 66, n. 1, p. 1–10, 2017.
- MATSUOKA, Lois Y. et al. **Histochemical Characterization of the Cutaneous Involvement of Acromegaly**. *Archives of Internal Medicine*, v. 142, n. 10, p. 1820–1823, 1982.
- MCKAY, I. A. e LEIGH, I. M. **Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing**. *British Journal of Dermatology*, v. 124, n. 6, p. 513–518, 1991.
- MESSIAS DE LIMA, Cicero Fagner et al. **Topical Growth Hormone Accelerates Wound Healing in Mice**. *Wounds : a compendium of clinical research and practice*, v. 29, n. 12, p. 387–392, Dec. 2017b.
- MESSIAS DE LIMA, Cícero Fagner et al. **Growth hormone modulates in vitro endothelial cell migration and formation of capillary-like structures**. *Cell*

biology international, v. 41, n. 5, p. 577–584, May 2017a.

MINER, Jeffrey H. e YURCHENCO, Peter D. **Laminin Functions in Tissue Morphogenesis**. Annual Review of Cell and Developmental Biology, v. 20, n. 1, p. 255–284, 2004.

MONAFO, Virginia et al. **Transient beneficial effect of GH replacement therapy and topical GH application on skin ulcers in a boy with prolidase deficiency**. Pediatric Dermatology, v. 17, n. 3, p. 227–230, 2000.

MOSSER, David M. e EDWARDS, Justin P. **Exploring the full spectrum of macrophage activation**. Nature Reviews Immunology, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.

MOSSER, David M e EDWARDS, Justin P. **NIH Public Access**. Genetics, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2009.

MULLER, Eugenio E. e LOCATELLI, Vittorio e COCCHI, Daniela. **Neuroendocrine Control of Growth Hormone Secretion**. Physiol Rev, v. 79, n. 2, p. 511–607, 1999.

MUREKATETE, Berline et al. **Targeting Insulin-Like Growth Factor-I and Extracellular Matrix Interactions in Melanoma Progression**. Scientific Reports, v. 8, n. 1, p. 583, 2018.

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

NAPOLITANO, Laura a et al. **Growth hormone enhances thymic function in HIV-1-infected adults**. The Journal of clinical investigation, v. 118, n. 3, p. 1085–98, Mar. 2008.

NASS, Ralf. **Growth Hormone Axis and Aging**. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, v. 42, n. 2, p. 187–199, 2013.

NESTLE, Frank O. et al. **Skin immune sentinels in health and disease**. Nature Reviews Immunology, v. 9, n. 10, p. 679–691, 2009.

Nie C, Yang D, Liu N, Dong D, Xu J, Zhang J. Thyrotropin-releasing hormone and its analogs accelerate wound healing. J Surg Res. 189(2):359-65.2014.

OAKES, S R et al. **Demonstration and localization of growth hormone receptor in human skin and skin fibroblasts**. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, v. 75, n. 5, p. 1368–73, Nov. 1992.

PANKOV, R. **Fibronectin at a glance**. Journal of Cell Science, v. 115, n. 20, p. 3861–3863, 2002.

PIERCE, G F et al. **Role of platelet-derived growth factor in wound healing**. Journal of Cellular Biochemistry, v. 45, n. 4, p. 319–326, 1991.

PILKINGTON, Suzanne et al. **Lower levels of IL-1 β gene expression are associated with impaired Langerhans cell migration in aged human skin**. Immunology, p. 60–70, 2017.

POSTLETHWAITE, A E e SNYDERMAN, R e KANG, A H. **The chemotactic attraction of human fibroblasts to a lymphocyte-derived factor**. The Journal of experimental medicine, v. 144, n. 5, p. 1188–203, 2 Nov. 1976.

PROKSCH, Ehrhardt e BRANDNER, Johanna M. e JENSEN, Jens Michael. **The skin: An indispensable barrier**. Experimental Dermatology, v. 17, n. 12, p. 1063–1072, 2008.

PROST-SQUARCIONI, Catherine. **Histology of skin and hair follicle**. Medecine sciences MS, v. 22, n. 2, p. 131–137, 2006.

RADETTI, Giorgio et al. **Pegvisomant-primed growth hormone (GH) stimulation test is useful in identifying true GH deficient children**. v. 16, n. 3, p. 291–296, 2017.

REINKE, J. M. e SORG, H. **Wound repair and regeneration**. European Surgical Research, v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012.

RISAU, Werner. **Mechanisms of angiogenesis**. Nature. [S.l: s.n.].

ROCKEY, Don C. e WEYMOUTH, Nate e SHI, Zengdun. **Smooth Muscle α Actin (Acta2) and Myofibroblast Function during Hepatic Wound Healing**. PLoS ONE, v. 8, n. 10, p. e77166, 2013.

ROSENBLOOM, Arlan L. **A half-century of studies of growth hormone insensitivity/Laron syndrome: A historical perspective**. Growth Hormone & IGF Research, v. 28, p. 46–50, Jun. 2016.

ROUSSELLE, Patricia e MONTMASSON, Marine e GARNIER, Cécile. **Extracellular matrix contribution to skin wounds re-epithelialization**. Matrix Biology, 2018.

RUDMAN, Sarah M. et al. **The Role of IGF-I in Human Skin and its Appendages: Morphogen as Well as Mitogen?** Journal of Investigative Dermatology, v. 109, n. 6, p. 770–777, Dec. 1997.

RUSHTON, I. **Understanding the role of proteases and pH in wound healing**. Nursing standard (Royal College of Nursing (Great Britain) : 1987), v. 21, n. 32, p. 68–74, 2007.

SALMON, J K e ARMSTRONG, C A e ANSEL, J C. **The skin as an immune organ**. Western Journal of Medicine, v. 160, n. 2, p. 146–152, 1994.

SAFER JD, CRAWFORD TM, HOLICK MF. Topical thyroid hormone accelerates wound healing in mice. Endocrinology. 146(10):4425-30, 2005.

SAVINO, W. et al. **The thymus gland: A target organ for growth hormone**. Scandinavian Journal of Immunology, v. 55, n. 5, p. 442–452, 2002.

SCHMIDT, Thomas e CARMELIET, Peter. **Blood-vessel formation: Bridges that**

guide and unite. Nature, v. 465, n. 7299, p. 697–9, 10 Jun. 2010.

SCHREML, Stephan et al. **Wound healing in the 21st century.** Journal of the American Academy of Dermatology, v. 63, n. 5, p. 866–881, 2010.

SCHULTZ, Gregory S et al. **NIH Public Access.** v. 19, n. 2, p. 134–148, 2012.

SEN, Chandan. **NIH Public Access.** Wound Repair Regen., v. 17, n. 1, p. 1–18, 2009.

SEN, Chandan K. et al. **Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy: PERSPECTIVE ARTICLE.** Wound Repair and Regeneration, v. 17, n. 6, p. 763–771, 2009.

SERRI, Omak et al. **Alterations of monocyte function in patients with growth hormone (GH) deficiency: Effect of substitutive GH therapy.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 84, n. 1, p. 58–63, 1999.

SHAW, T. J. e MARTIN, P. **Wound repair at a glance.** Journal of Cell Science, v. 122, n. 18, p. 3209–3213, 2009.

SILHA, Josef V. et al. **The effects of growth hormone status on circulating levels of vascular growth factors.** Clinical Endocrinology, v. 63, n. 1, p. 79–86, 2005.

SINGER AJ; e CLARK, Ra. **Cutaneous Wound Healing.** The New England Journal of Medicina, v. 341, n. 10, p. 738–746, 1999.

SLOMINSKI, A et al. **Characterization of corticotropin-releasing hormone (CRH) in human skin.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 83, n. 3, p. 1020–1024, 1998.

SLOMINSKI, Andrzej et al. **Human skin expresses growth hormone but not the prolactin gene.** Journal of Laboratory and Clinical Medicine, v. 136, n. 6, p. 476–481, 2000.

SMANIOTTO, Salete et al. **Growth hormone is a modulator of lymphocyte**

migration. NeuroImmunoModulation, v. 18, n. 5, p. 309–313, 2011.

SMANIOTTO, Salete et al. **Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12.** Endocrinology, v. 146, n. 7, p. 3005–3017, 2005.

SMITH, J R et al. **The effects of growth hormone and insulin-like growth factor on the proliferation rate and morphology of RAW 264.7 macrophages.**

Biomedical sciences instrumentation, v. 36, n. 2, p. 111–6, 2000.

SPECTOR, N H. **Neuroimmunomodulation: a brief review. Can conditioning of natural killer cell activity reverse cancer and/or aging?** Regulatory toxicology and pharmacology : RTP, v. 24, n. 1 Pt 2, p. S32-8, 1996.

STEYN, Frederik J. et al. **Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion.** Comprehensive Physiology, Picos de GH; secreção de GH., v. 6, n. 2, p. 687–735, 2016.

STREILEIN, J. Wayne. **Lymphocyte Traffic, T-Cell malignancies and the Skin.** The Journal of Investigative Dermatology, v. 71, n. 3, p. 167–171, 1978.

STRUMAN, I et al. **Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 96, n. 4, p. 1246–51, 1999.

TAKEO, Makoto e LEE, Wendy e ITO, Mayumi. **Wound Healing and Skin Regeneration.** p. 1–12, 2015.

TAVAKKOL, Amir. et al. **Expression of Growth Hormone Receptor, Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) and IGF-1 Receptor mRNA and Proteins in Human Skin.** Journal of Investigative Dermatology, v. 99, n. 3, p. 343–349, 1992.

THIBOUTOT, D M. **Clinical review 74: Dermatological manifestations of endocrine disorders.** The Journal of clinical endocrinology and metabolism, v. 80,

n. 10, p. 3082–7, Oct. 1995.

THIRUVOTH, FrijjiMeethale et al. **Current concepts in the physiology of adult wound healing**. Plastic and Aesthetic Research, v. 2, n. 5, p. 250, 2015.

THOREY, Irmgard S. et al. **Transgenic mice reveal novel activities of growth hormone in wound repair, angiogenesis, and myofibroblast differentiation**. Journal of Biological Chemistry, v. 279, n. 25, p. 26674–26684, 2004.

TONNESEN, Marcia G. e FENG, Xiaodong e CLARK, Richard A.F. **Angiogenesis in wound healing**. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, v. 5, n. 1, p. 40–46, 2000.

TORISEVA, M. e KÄHÄRI, V. M. **Proteinases in cutaneous wound healing**. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 66, n. 2, p. 203–224, 2009.

TOUW, Ivo P. et al. **Signaling mechanisms of cytokine receptors and their perturbances in disease**. Molecular and Cellular Endocrinology, v. 160, n. 1–2, p. 1–9, 2000.

TRIPATHI, Anurag e SODHI, Ajit. **Growth hormone-induced production of cytokines in murine peritoneal macrophages in vitro: Role of JAK/STAT, PI3K, PKC and MAP kinases**. Immunobiology, v. 214, n. 6, p. 430–440, 2009.

TRIPATHI, Anurag e SODHI, Ajit. **Production of nitric oxide by murine peritoneal macrophages in vitro on treatment with prolactin and growth hormone: Involvement of protein tyrosine kinases, Ca⁺⁺, and MAP kinase signal transduction pathways**. Molecular Immunology, v. 44, n. 12, p. 3185–3194, 2007.

WAHL, Sharon. **Cytokines in Wound Healing**. v. 2013, n. 0, p. 5, 2013.

WALLÄN, Ivan B. et al. **Force generation and protease gene expression in organotypic co-cultures of fibroblasts and keratinocytes**. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, v. 3, n. 8, p. 647–650, Dec. 2009.

- WANG, Nan e LIANG, Hongwei e ZEN, Ke. **Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance.** *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. NOV, p. 1–9, 2014.
- WEIGENT, D A e BAXTER, J B e BLALOCK, J E. **The production of growth hormone and insulin-like growth factor-I by the same subpopulation of rat mononuclear leukocytes.** *Brain, behavior, and immunity*, v. 6, n. 4, p. 365–376, 1992.
- WERNER, Sabine e GROSE, Richard. **Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines.** *Physiological Review*, v. 83, p. 835–870, 2003.
- WITTE, Maria B. e BARBUL, Adrian. **General Principles of Wound Healing.** *Surgical Clinics of North America*, v. 77, n. 3, p. 509–528, 1997.
- WU, H e DEVI, R e MALARKEY, W B. **Localization of growth hormone messenger ribonucleic acid in the human immune system--a Clinical Research Center study.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v. 81, n. 3, p. 1278–82, Mar. 1996.
- XU, X et al. **Expression of functional insulin-like growth factor-1 receptor on lymphoid cell subsets of rats.** *Immunology*, v. 85, n. 3, p. 394–9, 1995.
- YU, Diana H. et al. **Effects of decreased insulin-like growth factor-1 stimulation on hypoxia inducible factor 1- α protein synthesis and function during cutaneous repair in diabetic mice.** *Wound Repair and Regeneration*, v. 15, n. 5, p. 628–635, 2007.
- Yi C, Wang SR, Zhang SY, Yu SJ, Jiang CX, Zhi MH, Huang Y. **Effects of recombinant human growth hormone on acute lung injury in endotoxemic rats.** *Inflamm. Res.* 2006 55(11):491-7.
- ZAKHARI, Joseph S et al. **Vasculogenic and angiogenic potential of adipose stromal vascular fraction cell populations in vitro.** p. 32–40, 2018.
- ZOUBOULIS, Christos C et al. **Corticotropin-releasing hormone: an autocrine**

hormone that promotes lipogenesis in human sebocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 99, n. 10, p. 7148–53, 2002.