



## **EFEITO DO ÁCIDO CARBOXIETIL GAMA AMINOBURÍTICO (CEGABA) EM FIBROBLASTOS CULTIVADOS**

Vani S Laranjeira

Mestre em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – ULBRA

Laura B. R. de Freitas

Acadêmica do Curso de Medicina - ULBRA, Bolsista PROBIC/Fapergs

Lucimar F. S. Brum

Professora PPG Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde - ULBRA

Jaqueline N. Picada

Professora PPG Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde - ULBRA

Ivana Grivicich

Professora PPG Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde - ULBRA

### **Resumo**

**Introdução:** O envelhecimento cutâneo é caracterizado por flacidez, manchas e rugas, decorrente de alterações estruturais tecidual, em especial devido a diminuição de fibroblastos ativos e conseqüente diminuição da elasticidade e síntese de colágeno. Estudos têm demonstrado que fatores que promovem o envelhecimento cutâneo afetam queratinócitos, promovem diminuição de fibroblastos, da espessura dérmica e uma atrofia generalizada de colágenos da derme, proteoglicanos e componentes de fibra elástica. Nesse cenário, é elevada a demanda por compostos ativos que possam ser incorporados aos cosméticos para prevenir e retardar os sinais do envelhecimento cutâneo. Os fatores de crescimento ou análogos dessas substâncias, como por exemplo, o Ácido Carboxietil Gama Aminobutírico (CEGABA), um neuromodulador derivado das poliaminas, parece ser uma substância promissora nas estratégias de rejuvenescimento. Porém não existem estudos que comprovem a sua eficácia e segurança. **Objetivos:** o presente estudo teve por objetivo

avaliar o efeito do CEGABA na proliferação e migração dos fibroblastos in vitro. **Material e Métodos:** Foi utilizada a linhagem celular de fibroblastos NIH-3T3, exposta ao composto CEGABA. A análise da proliferação celular foi realizada por inoculação das células em placas, para avaliação da migração celular foi utilizado o ensaio scratch wound. A citotoxicidade foi verificada através do ensaio colorimétrico MTT e a avaliação da genotoxicidade foi realizada através da versão alcalina do teste cometa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a análise estatística das três repetições foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de múltipla comparação de Dunnett ( $\alpha=0,05$ ), considerando como significativa  $p \leq 0,05$ . **Resultados:** Os resultados indicaram que o composto CEGABA estimulou a proliferação e migração celular na linhagem NIH-3T3 e não demonstrou efeitos citotóxicos e genotóxicos. **Conclusões:** Os resultados do presente estudo sugerem que o uso de CEGABA em cosmecêuticos é seguro e pode ser utilizado como coadjuvante em terapêuticas contra o envelhecimento.

Palavras-chave: Envelhecimento cutâneo. Fatores de crescimento de fibroblastos. Ácido Carboxietil Gama Aminobutírico (CEGABA).

## Introdução

O envelhecimento cutâneo representa um insidioso, multifatorial e progressivo processo degenerativo, de curso inevitável e praticamente irreversível. Caracteriza-se por alterações celulares e moleculares, com diminuição progressiva da capacidade de homeostase do organismo, levando a senescência e morte celular programada (apoptose) (Montagner e Costa, 2009; Sgonc e Gruber, 2013; Kahan et al., 2014).

Embora os mecanismos fundamentais na patogênese do envelhecimento cutâneo sejam ainda pouco compreendidos, um crescente corpo de evidências aponta para o envolvimento de múltiplas vias, que inclui alterações na reparação e a estabilidade do DNA, da função mitocondrial, do ciclo celular e apoptose, matriz extracelular, síntese de lipídios, proteólise induzida por ubiquitina e metabolismo celular (Zouboulis e Makrantonaki, 2011; Farwick et al., 2014). O envelhecimento cutâneo é caracterizado pelo achatamento da junção dermo-epidérmica, atrofia e a perda da elasticidade do tecido conectivo dermal, associada com uma redução e desorganização de seus principais componentes da matriz extracelular, tais como colágeno e

outras fibras elásticas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos (Kierszenbaum, 2008; Leblanc e Baranoski, 2011; Sgonc e Gruber, 2013; Kahan et al., 2014; Suh et al., 2014). Estudos têm demonstrado que fatores que promovem o envelhecimento cutâneo afetam queratinócitos, promovem diminuição de fibroblastos, da espessura dérmica e uma atrofia generalizada de colágenos da derme, proteoglicanos e componentes de fibra elástica (Farris, 2011; Vieira et al., 2011; Thurstan et al., 2012; Treber et al., 2012; Sgonc e Gruber, 2013; Kahan et al., 2014; Proksch et al., 2014).

Os fibroblastos exercem importantes funções na regulação da estrutura tecidual e produção de proteínas da matriz extracelular, citocinas, fatores de crescimento e metaloproteinases da matriz (Mine et al., 2008; Vieira et al., 2011). Durante o processo de envelhecimento ocorre a diminuição da integridade estrutural, perda da rede de fibras elásticas e colágeno relacionada a fibroblastos disfuncionais (Fischer et al., 2008; Treber et al., 2012). Outro fator importante implicado no envelhecimento cutâneo é a presença dos fatores de crescimento, que desempenham papel fundamental no processo de cicatrização de feridas e regeneração celular (Nakamizo et al., 2013). Estes têm sido utilizados nos tratamentos de rejuvenescimento como alternativa para atenuar os sinais do envelhecimento cutâneo (Gold et al., 2007; Metha et al., 2008; Sundaram et al., 2009).

Kede e Andrade (2009) apontam que o conhecimento do papel dos fatores de crescimento na reparação de feridas cutâneas conduziu à realização de pesquisas onde a aplicação de fatores de crescimento no tratamento do fotoenvelhecimento demonstraram resultados positivos no tratamento cosmético e clínico. Nesse sentido, existe uma demanda crescente da indústria de cosméticos por produtos com princípios ativos com potencial de retardar, reverter ou controlar os sinais do envelhecimento na pele (Dieamant et al., 2012; Farwick et al., 2014; Heinrich et al., 2014; Kottner et al., 2014; Marini et al., 2014; Naumann et al., 2014; Sorg e Saurat, 2014).

Geralmente, recursos disponíveis para revitalização cutânea incluem a aplicação de substâncias que estimulam a produção de colágeno e o aumento da elasticidade. As intervenções tópicas desenvolvidas demonstram capacidade de regeneração do sistema de fibras elásticas da pele envelhecida,

enquanto que os tratamentos sistêmicos podem potencialmente impedir os eventos de remodelação de tecidos patológicos que ocorrem em resposta à degradação de fibras elásticas (Naylor et al., 2011). No entanto, muitos produtos lançados no mercado não oferecem estudos clínicos que sustentem a eficácia e segurança destes produtos e as possíveis interações no organismo. Neste contexto, a busca por novos compostos para prevenir ou atenuar este processo é prioridade de investigação no desenvolvimento de novos ativos cosméticos (Ruiz et al., 2010). Muitas substâncias, de origem botânica, animal ou produtos de síntese química, são testadas ou investigadas como compostos ativos em cosmeceuticos (Draelos, 2009), entre estes, fatores de crescimento, devido ao papel que desempenham na divisão, proliferação, migração, diferenciação celular e síntese proteica (Fitzpatrick, 2007; Metha e Fitzpatrick, 2007; Diemant et al., 2012; Pastar et al., 2014).

Os fatores de crescimento ou análogos dessas substâncias, como por exemplo, o Ácido Carboxietil Gama Aminobutírico (CEGABA), um neuromodulador derivado das poliaminas, parece ser uma substância promissora nas estratégias de rejuvenescimento. Porém não existem estudos que comprovem a sua eficácia e segurança. Nesse contexto o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito do CEGABA na proliferação e migração dos fibroblastos *in vitro*.

## **Material e Métodos**

Foi utilizada a linhagem celular de fibroblastos de camundongos NIH-3T3 (Mus musculus; ATCC® CRL-1658™). A análise da proliferação celular foi realizada por inoculação das células em placas de 24 poços em uma densidade de  $2 \times 10^4$  células/poço. Após, foram tratadas por 24 h, 48 h e 72 h com CEGABA nas concentrações de 50, 100 e 500  $\mu\text{M}$ . A determinação do tempo de duplicação celular foi realizada após 72 h de cultivo utilizando o *Doubling-Time Calculator* (Roth, 2006). A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide onde as culturas em triplicata foram expostas ao CEGABA em doses de 50, 100 e 500  $\mu\text{M}$  por 24 h, 48 h e 72 h. e a leitura do ensaio foi realizada em um leitor de microplacas em densidade ótica de 540 nm. Para

avaliação da migração celular *in vitro*, foi utilizado o ensaio *scratch wound*. As células da linhagem celular NHI-3T3 foram inoculadas, em triplicata, em uma concentração de  $10^5$  células/poço em uma placa de 24 poços durante 24 h. e a migração celular foi analisada por fotografia após 0 h, 4 h, 24 h e 48 h. Para a avaliação da genotoxicidade foi utilizada a versão alcalina do teste cometa, descrito em Tice et al., 2000.

## Resultados

Com relação a todos os resultados foram realizadas análises estatísticas das três repetições por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de múltipla comparação de Dunnett ( $\alpha=0,05$ ), com auxílio do programa Graphpad Prism® (Graphpad Software Inc; versão 5.01). Em todos os grupos estudados, foram considerados estatisticamente significativos aqueles cujos valores de “p” foram menores ou iguais a 0,05.

### ***Efeito do CEGABA na proliferação celular***

Nossos resultados mostraram que ocorreu um crescimento nas células não tratadas desde o tempo 0 (adição na placa de cultura) até o tempo de 72 h (Tabela 1; Figura 1). Mais ainda, a avaliação do tempo de duplicação celular mostrou que a linhagem NIH-3T3 não tratada, nas nossas condições de cultivo, duplica sua população a cada 21 horas.

Tabela 1. Efeito do CEGABA na indução da proliferação da linhagem celular de fibroblasto NIH-3T3, após 24 h, 48 h e 72 h. Os resultados estão expressos como número de células  $\times 10^4$  (média  $\pm$  desvio padrão; n = 6).

	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>
<b>Controle</b>	22,67 $\pm$ 8,9	51,90 $\pm$ 9,5	114,88 $\pm$ 18,9
<b>50 <math>\mu</math>M CEGABA</b>	18,00 $\pm$ 5,2	49,18 $\pm$ 8,5	185,93 $\pm$ 15,0*
<b>100 <math>\mu</math>M CEGABA</b>	21,30 $\pm$ 2,8	50,45 $\pm$ 7,3	190,06 $\pm$ 10,4*
<b>500 <math>\mu</math>M CEGABA</b>	20,60 $\pm$ 3,4	51,02 $\pm$ 6,6	189,67 $\pm$ 14,6*

\*Estatisticamente diferente do controle não tratado ( $p < 0,05$ ).

O tempo de duplicação celular após tratamento com CEGABA, independente de dose, foi reduzido para 17 horas. Mostrando que o CEGABA está acelerando o processo de divisão celular.

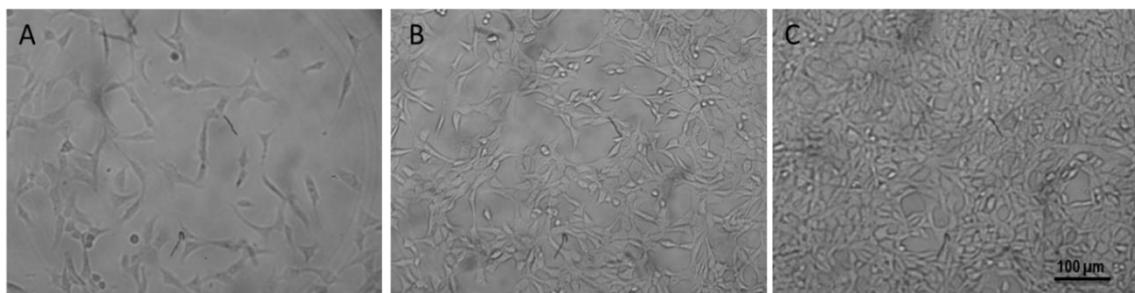


Figura 1. Fotomicrografias representativas das culturas da linhagem celular NIH-3T3. A) Culturas no primeiro dia do experimento. B) Culturas não expostas ao CEGABA após 72 h de cultivo. C) Culturas expostas a 500 µM de CEGABA após 72 h de cultivo. Aumento de 100 X.

### ***Efeito citotóxico do CEGABA***

O ensaio de MTT foi usado a fim de avaliar o efeito citotóxico induzido pelo CEGABA, nas doses de 50, 100 e 500 µM, após 24, 48 e 72 h na linhagem celular de fibroblasto NIH-3T3. Utilizando os critérios da ISO 10993-5: 1999, que considera não citotóxico uma viabilidade celular > 90%, verificamos que a exposição ao CEGABA não induziu citotoxicidade significativa com nenhuma das doses utilizadas e em nenhum dos tempos de tratamento (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito do CEGABA na citotoxicidade da linhagem celular de fibroblasto NIH-3T3, após 24 h, 48 h e 72 h. Os resultados estão expressos como viabilidade celular em relação ao controle não tratado (média ± desvio padrão; n = 6).

	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>
<b>Controle</b>	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
<b>50 µM CEGABA</b>	95,6 ± 5,1	92,1 ± 5,6	95,9 ± 5,0
<b>100 µM CEGABA</b>	95,7 ± 2,3	95,5 ± 3,9	90,1 ± 7,2
<b>500 µM CEGABA</b>	94,5 ± 6,0	91,2 ± 6,0	96,0 ± 4,6

### **Efeito do CEGABA na migração celular**

Considerando que não foi observado diferença de resposta em relação a dose utilizada os experimentos seguintes foram realizados somente com a dose de 50  $\mu$ M CEGABA. A avaliação da migração celular *in vitro* mostrou que tanto as células não tratadas quanto as tratadas com CEGABA reduziram a superfície de ferimento já a partir de 4 h após a realização do dano (Figuras 2 e 3).

Quando comparamos o efeito do CEGABA em relação ao controle não tratado, verificamos que após 4 h e 24 h a dose de 50  $\mu$ M de CEGABA reduziu a superfície de ferimento *in vitro* em aproximadamente 20% quando comparado com o controle não tratado (Figuras 2 e 3). Após 48 h a diferença entre controle e células tratadas com CEGABA foi de 10% (Figura 2).

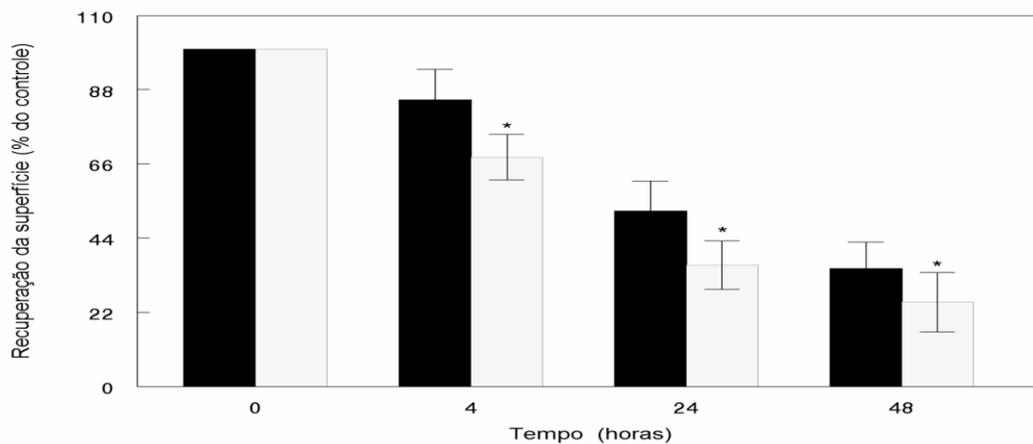


Figura 2. Redução da superfície de ferimento *in vitro*. (■) Controle e (□) CEGABA \*Diferente do controle não tratado (P<0.001).

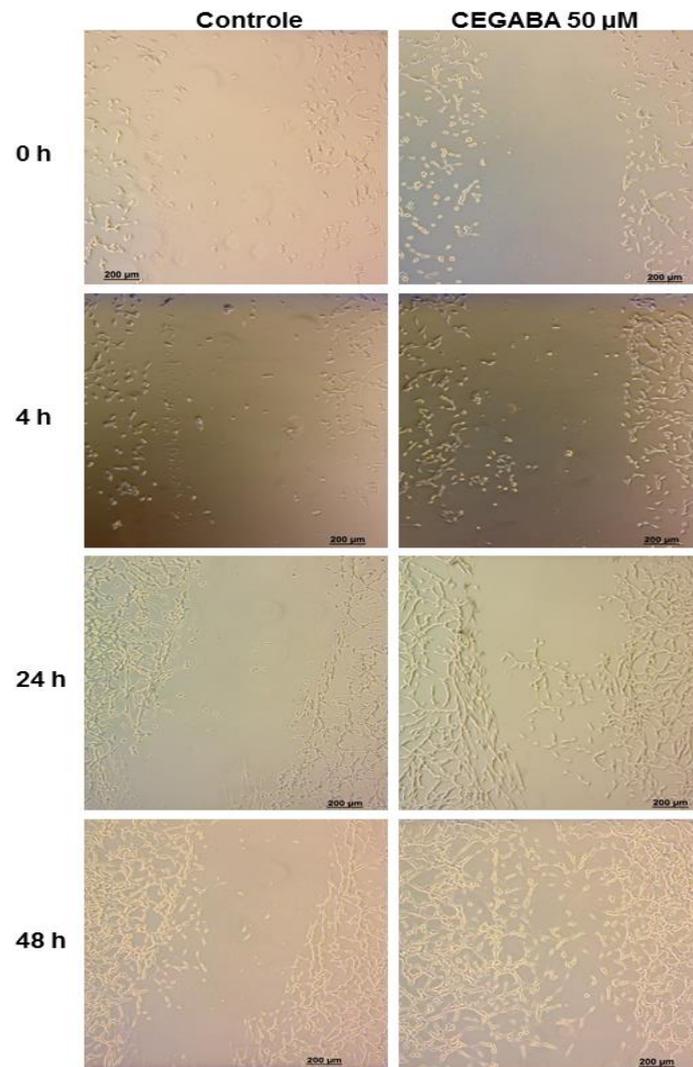


Figura 3. Fotomicrografia representativa do controle não tratado e CEGABA (50 μM) nos tempos: 0, 4, 24 e 48 horas. Aum. 100x.

#### ***Efeito genotóxico do CEGABA***

CEGABA na dose de 50 μM (Tabela 3) não induziu aumento do ID (Índice de danos) e FD (Frequência de danos), após tratamento por 6 h e 24 h.

Desta forma, nossos resultados sugerem que o CEGABA não é genotóxico, pois não foi observado aumento de danos ao DNA em relação ao controle não tratado (CN).

Tabela 3. Avaliação da atividade genotóxica do CEGABA na concentração 50  $\mu$ M na linhagem celular de fibroblasto NHI-3T3, utilizando o teste cometa alcalino.

	6 h		24 h	
	ID <sup>a</sup>	FD <sup>b</sup>	ID	FD
<b>CN<sup>c</sup></b>	123,8 $\pm$ 22,4	77,5 $\pm$ 4,5	132,5 $\pm$ 22,3	54,3 $\pm$ 9,3
<b>CEGABA</b>	124,0 $\pm$ 32,8	81,8 $\pm$ 8,1	149,0 $\pm$ 16,3	64,5 $\pm$ 11,2
<b>CP<sup>d</sup></b>	392,8 $\pm$ 8,5***	98,8 $\pm$ 1,9***	365,8 $\pm$ 31,3***	97,3 $\pm$ 4,3***

<sup>a</sup>ID: Índice de danos: varia de 0 (sem danos, 100 células x 0) a 400 (com máximo de danos, 100 x 4); <sup>b</sup>FD (%): Frequência de danos: percentual de células com danos. <sup>c</sup>CN: controle negativo (células tratadas com meio de cultura); <sup>d</sup>CP: controle positivo (células tratadas *ex vivo* com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,25 mM). Significância estatística: \*\*\*p $\leq$  0.001 (ANOVA, teste de Dunnett) em comparação ao CN.

## Discussão

Recentemente, muita atenção tem sido dada aos fatores de crescimento, devido a sua diversidade de atividades, tais como a proliferação de células da pele e por estimular a formação de colágeno e parece ser um bom agente para a prevenção ou tratamento terapêutico do envelhecimento (An et al., 2013; Schliephake, 2013; Kim et al., 2014). O envelhecimento intrínseco e extrínseco da pele reduz os níveis de fatores de crescimento assim como o número e atividade dos fibroblastos, sendo que Sundaram et al. (2009) relatam que a aplicação de fatores de crescimento na pele pode melhorar os processos naturais de reparação e acelerar a reversão de danos causados pelo envelhecimento intrínseco e extrínseco na pele.

No estudo de Gold et al.(2007), a aplicação de creme contendo fatores de crescimento e citocinas reduziu significativamente rugas periorbital e rugas

periorais, bem como demonstrou melhoria da textura da pele do queixo após um mês de tratamento. Nesse sentido, nosso estudo investigou o efeito do CEGABA, composto comumente incorporado em formulações cosmecêuticas, no que se refere a sua capacidade de estimular a proliferação, migração, citotoxicidade e genotoxicidade em culturas de fibroblastos.

Durante a análise da proliferação celular da linhagem de fibroblastos NIH-3T3 tratada com CEGABA, observamos um aumento no crescimento celular, quando comparamos com o controle não tratado. A investigação do perfil de segurança de cosmecêuticos com fatores de crescimento ou seus análogos como princípio ativo, realizada por Dieamant et al. (2012), não demonstrou efeito sobre células malignas, evidenciando incapacidade de promover a progressão de possíveis cânceres, ou seja, os produtos não promoveram mutações celulares, concluindo que os produtos são seguros para uso tópico. Outros estudos demonstram que apesar de estimular a proliferação celular, o uso de fatores de crescimento, como EGF e IGF-1, por exemplo, é seguro (Hong et al., 2006; Xia et al., 2002; Traynor et al., 2006; Sorenson et al., 2008).

O ensaio de MTT foi usado a fim de avaliar o efeito citotóxico induzido pelo CEGABA na linhagem celular de fibroblasto NIH-3T3 e verificamos que a exposição ao CEGABA não induziu citotoxicidade significativa com nenhuma das doses utilizadas conforme An e colaboradores (2013), que informam que ser considerados potenciais cosméticos para o tratamento de danos na pele incluindo rugas e fotoenvelhecimento. Em nosso estudo nossos resultados sugerem que o CEGABA não é genotóxico, pois não foi observado aumento de danos ao DNA em relação ao controle não tratado.

Diversos trabalhos apontam os efeitos benéficos de fatores de crescimento na cicatrização de feridas e que estes dados podem ser extrapolados para o gerenciamento da pele (Bagatin, 2012; Pickart et al., 2012; Pandel et al., 2013) por que demonstram evidências encorajadoras e que representam tratamento promissor, por afetar de forma mais rápida e eficaz os danos cutâneos. Considerando os resultados fornecidos por este estudo, que demonstram que o composto CEGABA promoveu a indução da proliferação e migração de fibroblastos *in vitro* e não forneceu evidências de

efeitos citotóxicos e genotóxicos, esperamos que estes dados possam servir como uma orientação preliminar para prever os efeitos de CEGABA sobre a pele humana contribuindo dessa forma para tratamentos e a prevenção do envelhecimento cutâneo.

## **Conclusão**

Podemos concluir que os dados preliminares deste estudo demonstram que CEGABA como ativo principal, pode ser considerado seguro e eficaz para aplicação, uma vez não demonstrou efeitos citotóxicos e genotóxicos e estimula a proliferação de fibroblastos normais, células cruciais no processo de reparação tecidual.

## **Referências Bibliográficas**

AN JJ, et al. Protective effects of skin permeable epidermal and fibroblast growth factor against ultraviolet-induced skin damage and human skin wrinkles. **J Cosmet Dermatol**. 12(4):287-95, Dec ;2013.

BAGATIN E. Tratamentos orais em cosmiatria. In: **Tratado de cirurgia dermatológica e cosmiatria e Laser**. KADUC et al. Rio de Janeiro, Elsevier; 3(1) 284-9; 2012.

DIEMANT G, et al. In vitro evaluation of the safety profile of cosmeceuticals containing growth factors and their analogues. **Surg Cosmet Dermatol**. 4(3): 229-36; 2012;

FARRIS PK. Innovative cosmeceuticals: sirtuin activators and anti-glycation compounds. **Semin Cutan Med Surg**. 30(3):163-6; sep. 2011.

FARWICK M.et al. Pentacyclic triterpenes from Terminalia arjuna show multiple benefits on aged and dry skin. **Skin Pharmacol Physiol** ; 27: 71-81sep.5.2014

FISHER GJ, VARANI J, VOORHEES JJ, et al. Looking older fibroblast collapse and therapeutic implications. **Archives of dermatology**.144(5): 666-72.May.2008.

GOLD MH, GOLDMANN MP, BIRON J. Human growth factor and cytokine skin cream for facial skin rejuvenation as assessed by 3D in vivo optical skin imaging. **J Drugs Dermatol.** 6(10): 1018-23. Oct.2007.

HEINRICH K, HEINRICH U, TRONNIER H. Influence of different cosmetic formulations on the human skin barrier. **Skin Pharmacol Physiol.** 27: 141-7. Jan.2014.

HONG JP. et al. The effect of various concentrations of human recombinant epidermal growth factor on split-thickness skin wounds. **Int Wound J.** 3(2): 123-30. Jun. 2006

KHAN MI. et al. YB-1 expression promotes epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer that is inhibited by a small molecule fisetin. **Oncotarget.** 5(9): 2462-74. May.2014.

KEDE MPV, SABATOVITCH O. **Dermatologia estética.** São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

KIM MS. et al. Comparative study of various growth factors and cytokines on type I collagen and hyaluronan production in human dermal fibroblasts. **J Cosmet Dermatol.** 13(1): 44-51. Mar. 2014.

KIM WS, PARQUE BS, SUNG JH. Protective role of adipose-derived stem cells and their soluble factors in photoaging. **Archives of dermatology Res.** 301(5):329-36. Jun. 2009

KOTTNER J. et al. Do repeated skin barrier measurements influence each other's results? an explorative study. **Skin Pharmacol Physiol.** 27(2): 90-6. Jan.2014.

MARINI A. et al. Ectoine-containing cream in the treatment of mild to moderate atopic dermatitis: a randomised, comparator-controlled, intra-individual double-blind, multi-center trial. **Skin Pharmacol Physiol.** 27: 57-65. Jan.2014.

MINE S. et al. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. **PLoS ON.** 3(12): e4066. Dec. 2008.

MONTAGNER S; COSTA A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **An. Bras. Dermatol.** vol.84 no.3 Rio de Janeiro July 2009.

NAUMANN S. et al. Penetration studies of an extremely lipophilic active model substance from an oil-in-water emulsion: influence of the lipophilicity of the formulation in human skin - part 2. **Skin Pharmacol Physiol.** 27(2): 97-105.Jan.2014.

PANDEL R. et al. Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. **ISRN Dermatol.** 12(2013): 930164.Sep.2013.

PICKART L, VASQUEZ-SOLTERO JM, MARGOLINA A. The human tripeptide GHK-Cu in prevention of oxidative stress and degenerative conditions of aging: implications for cognitive health. **Oxid Med Cell Longev.** 2012: 324832.May.2012.

Proksch E. et al. Oral intake of specific bioactive collagen peptides reduces skin wrinkles and increases dermal matrix synthesis. **Skin Pharmacol Physiol.** 27(3): 113-9.Dec.2014.

ROTH V. 2006. **Doubling-time.** Disponível em: <<http://www.doubling-time.com/compute.php>>

SCHLIEPHAKE H. Clinical efficacy of growth factors to enhance tissue repair in oral and maxillofacial reconstruction: a systematic review. **Clin Implant Dent Relat Res.** 17(2):247-73. Apr. 2015.

SGONC R, GRUBER J. Age-related aspects of cutaneous wound healing: a mini-review. **Gerontology.** 59(2): 159-64.Oct.2013.

SORENSEN EJ. et al. Subcutaneous IGF-1 is not beneficial in 2-year ALS trial. **Neurology.** 71(22): 1770-5.Nov. 2008.

SORG O, SAURAT JH. Topical retinoids in skin ageing: a focused update with reference to sun-induced epidermal vitamin a deficiency. **Dermatology.** 228: 314-25.May.2014.

SUNDARAM H. et al. Topically applied physiologically balanced growth factors: a new paradigm of skin rejuvenation. **J Drugs Dermatol.** 8 (5S): 4-13.May.2009

TICE RR. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen.** 35(3): 206-21. Jun 6. 2000.

TRAYNOR BJ. et al. Neuroprotective agents for clinical trials in ALS: a systematic assessment. **Neurology.** 67(1): 20-7. Jul. 2006.

TREBER N. et al. The role of manganese superoxide dismutase in skin aging. **Dermatoendocrinol.** 4(3): 232–5. Jul. 2012.

VIEIRA ACQM. et al. Fatores de crescimento: uma nova abordagem cosmecêutica para o cuidado antienvhecimento. **Rev Bras Farm.** 92(3): 80-9. Oct. 2011.

XIA L. et al. Effects of epidermal growth factor on the growth of human gastric cancer cell and the implanted tumor of nude mice. **World J Gastroenterol.** 8: 455–8. Jun. 2002.