

PROCESSO CICATRICIAL CUTÂNEO – HISTÓRIA NATURAL E PERFIL DE CITOCINAS

CUTANEOUS HEALING PROCESS – NATURAL HISTORY AND CYTOKINE PROFILE

Laetitia Cinsa*, Ana Cristina Moura Gualberto** e Karine Helena de Souza Lopes***

RESUMO

A história natural da cicatrização ocorre em uma sequência de eventos que envolve a hemostasia, a inflamação, a proliferação celular e a maturação da matriz extracelular. Além de o processo ser direta e indiretamente influenciado por fatores locais e sistêmicos, uma rede complexa de mediadores químicos determina aspectos fundamentais de sua evolução, afetando o comportamento celular do parênquima e do estroma cicatricial. O presente estudo aborda a cicatrização cutânea sob o ponto de vista imunológico, com o objetivo de fornecer subsídios para a compreensão deste processo patológico.

PALAVRAS-CHAVE

Cicatrização cutânea. Inflamação. Citocinas.

ABSTRACT

The natural history of healing occurs in a sequence of events involving hemostasis, inflammation, cell proliferation and maturation of the extracellular matrix. Besides the process be directly and indirectly influenced by local and systemic factors, a complex network of chemical mediators determines key aspects of its evolution, affecting cell behavior parenchymal and stromal scarring. This study addresses the skin heals from the point of view immune, with the goal of providing subsidies for understanding this disease process.

KEYWORDS

Wound Healing. Inflammation. Cytokine.

A pele é um órgão diretamente exposto a alterações do meio e sujeito a agressões físicas, químicas e mecânicas, que levam à interrupção da continuidade dos tecidos que a compõem. Com o objetivo de restaurar a integridade morfológica e funcional perdida, ocorre a cicatrização. Dadas as implicações clínicas e biológicas que envolvem o tempo de fechamento das feridas cutâneas, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de se minimizar o período de reparo por meio da modulação de seus componentes. Para que a modulação dos eventos cicatriciais seja efetiva, a compreensão da história natural do reparo se torna necessária. A evolução do processo abrange cinco fases, com limites não distintos, sobrepostos temporalmente: hemostasia, inflamação, demolição, proliferação e maturação (AARESTRUP, 2012)

A fase da hemostasia é imediata à lesão e depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação (EMING et al., 2007). A dissolução de continuidade cutânea envolve lesão vascular na derme; células endoteliais do revestimento vascular lesadas desencadeiam eventos sequenciais que começam com a agregação plaquetária frouxa, seguida por ativação, degranulação e recrutamento de novas plaquetas. Na degranulação, as plaquetas ativadas liberam mediadores como o fator de crescimento transformador- β (TGF- β), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), tromboxanos e o fator ativador plaquetário (PAF), resultando em formação de tampão plaquetário estável; este tampão rico em plaquetas é estabilizado, no final da cascata de coagulação, pela conversão do fibrinogênio em fibrina formando o coágulo – responsável pelo vedamento da lesão vascular e estabilidade dos cotos rompidos. Ainda, o coágulo fibrinoso fornece alicerce aos leucócitos circulantes que desencadearão a inflamação, que representa a próxima fase do reparo (DIEGELMANN, EVANS, 2004).

Os produtos da degranulação plaquetária se difundem para o meio extravascular formando gradiente quimiotático de orientação para diapedese leucocitária; inicialmente, os leucócitos polimorfonucleares – predominantemente neutrófilos – são responsáveis por uma resposta

Correspondence author: Karine Helena de Souza Lopes. karineslopes@yahoo.com.br. Faculdade de Ciências Médicas e da saúde – SUPREMA.

* Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Juiz de Fora/MG. Estagiária do Laboratório de Imunopatologia e Imunologia Clínica, Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora/MG.

** Bióloga. Universidade Federal de Juiz de Fora/MG.

*** Fisioterapeuta. Mestre em Saúde. Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde – SUPREMA.

Received: 02/2012

Accepted: 05/2012

aguda, com duração de aproximadamente 72h, com o objetivo de remover partículas inertes pequenas, bactérias e restos celulares (BALBINO et al., 2005; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; RIBEIRO et al., 2009).

O processo inflamatório é diretamente responsável pela demolição – na qual é observada intensa atividade fagocitária com produção de enzimas digestivas, radicais livres de oxigênio e ácidos – e pela proliferação – desencadeada pela liberação de fatores de crescimento proporcionalmente à atividade fagocitária. Os fatores de crescimento são glicoproteínas que estimulam a mitose em células saudáveis remanescentes, bem como sua posterior diferenciação. A ação dos fatores de crescimento estimula o surgimento de miofibroblastos – células com características morfológicas e ultraestruturais mistas de fibra muscular lisa e fibroblasto, possuindo, assim, a capacidade de se contraírem, realizando movimento centrípeto das bordas da ferida (HINZ, 2007; LI, WANG, 2009). Além do preenchimento e fechamento da área lesada, a atividade metabólica destas células resultam em deposição de uma nova matriz extracelular que, inicialmente jovem, compõe o tecido de granulação, rico em novos vasos sanguíneos, essenciais para o fornecimento de oxigênio e maior disponibilidade de nutrientes dado o alto metabolismo celular necessário para o desenvolvimento do processo cicatricial (MANDELBAUM et al., 2003; WERNER, GROSE, 2003).

O principal fator de crescimento regulador da angiogênese durante o desenvolvimento do tecido cicatricial é o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF); sua expressão genética é maior em macrófagos residentes da derme em cicatrização e em queratinócitos circunjacentes à lesão (BALBINO, et al., 2005). Estudo utilizando suínos (n=15) submetidos à lesão cirúrgica na parede abdominal demonstrou que a neutralização de VEGF por anticorpos reduz a angiogênese, a formação de tecido de granulação e o acúmulo de fluidos intersticiais em regiões que sofreram lesão (HOWDIESHELL et al., 2001). Além do VEGF, as angiopoetinas – uma segunda família de fatores de crescimento vascular – atuam sobre o endotélio. Ao contrário do VEGF, as angiopoetinas, especialmente a angiopoietina-1, não regulam a proliferação das células endoteliais, mas sim a diferenciação e amadurecimento destas células (WERNER, GROSE, 2003). Outros importantes fatores de crescimento relacionados à angiogênese são o fator de crescimento fibroblástico (FGF – com ação mitótica, é sintetizado por fibroblastos e por células endoteliais remanescentes, e o fator de crescimento transformador-beta (TGF- β) – citocina pró-inflamatória envolvida no remodelamento vascular em situações de estresse oxidativo (WERNER, GROSE, 2003; RANGANATHAN et al., 2007).

Além da neoformação dérmica, o restabelecimento funcional da pele depende também da reconstituição da epiderme. Na reepitelização,

os queratinócitos não danificados migram das bordas da ferida, por influência quimiotática de fatores de crescimento, integrinas e metaloproteases, estimulando o aumento da atividade mitótica que resulta em hiperplasia compensatória do epitélio (MANDELBAUM et al., 2003; MENDONÇA, COUTINHO-NETTO, 2009).

Finalmente o amadurecimento funcional é atingido com liberação de proteases que degradam o excesso de colágeno depositado (HUNT, et al., 2000; HENEMYRE-HARRIS et al., 2008). Ao final da reepitelização, da angiogênese e da síntese de matriz extracelular dérmica por fibroblastos, os tecidos sofrem maturação, com reorganização citoarquitetural dos queratinócitos e restituição da camada de queratina e da interface dermo-epidérmica, organização das fibras conjuntivas em meio à substância fundamental amorfa e às células residentes da derme, o restabelecimento da vascularização; a maturação envolve, também, a apoptose de miofibroblastos e de leucócitos que participaram do processo inflamatório (MANDELBAUM et al., 2003; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

A evolução destas diversas fases do reparo é direta ou indiretamente influenciada por componentes inflamatórios celulares. O conhecimento das células e citocinas que participam do processo é fundamental para que tal modulação seja eficaz (LI, WANG, 2009).

Entre as principais células presentes no sítio da reação inflamatória destacam-se os neutrófilos – na fase aguda, e os macrófagos e os linfócitos – na fase crônica (AARESTRUP, 2012; MCANULTY, 2007).

Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa imunológica inata. Sua migração é desencadeada por fatores quimiotáticos como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), na fase de hemostasia (AARESTRUP, 2012). Após processo de transmigração na diapedese, os neutrófilos fagocitam intensamente pequenas partículas e restos celulares, assim como bactérias que permeiam o ambiente da lesão (HACKAM, FORD, 2002). Posteriormente, e proporcionalmente à fagocitose, há liberação de fatores de crescimento. Se, ao final da vida útil do neutrófilo, persistir a lesão ou a presença de microrganismos complexos, a célula entra em apoptose liberando lipoxina – glicoproteína quimiotática para leucócitos mononucleares, com vida útil mais longa e maior potencial fagocitário. Esta mudança de perfil de infiltrado inflamatório caracteriza a cronificação do processo inflamatório (AARESTRUP, 2012; KUMAR et al., 2005).

A partir da migração de leucócitos mononucleares – monócitos e linfócitos T, os primeiros se diferenciam em macrófagos, aumentando a população residente destas células na derme (EMING et al., 2007). Monocinas sintetizadas por linfócitos, bem como proteínas inflamatórias para macrófagos (MIPs) e proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) são responsáveis por este

aumento da celularidade. Após transmigração, os macrófagos – sempre em ação de reciprocidade com os linfócitos T – são ativados principalmente por estímulo de interferon-gama (IFN- γ) sofrendo hipertrofia e aumento metabólico; o macrófago ativado desempenha as funções imunológicas de fagocitose, apresentação de antígenos e proporcional liberação de fatores de crescimento, como o TGF- β , o TGF- α , o FGF, o PDGF e VEGF, bem como linfocinas que mantêm a população linfocitária (GILLITZER, GOEBELER, 2001).

O macrófago é extremamente relevante na fase inflamatória do reparo por fagocitar partículas inertes grandes, restos celulares maiores do que aqueles processados pelos neutrófilos, e microrganismos igualmente maiores ou mais tóxicos; além da atividade fagocitária, os macrófagos estimulam o desenvolvimento de tecido de granulação via síntese de mediadores lipídicos (eicosanoides), mediadores peptídicos (citocinas e fatores de crescimento) bem como proteínas necessárias ao reparo, como frações do complemento, fatores de coagulação, colagenases e metaloproteinases. lesão (MANDELBAUM et al., 2003; BALBINO, et al., 2005).

Juntamente com os macrófagos, os linfócitos compõem o infiltrado crônico. Além da significativa participação na manutenção da população macrófágica e na ativação destas células via produção de linfocinas e (IFN- γ), os linfócitos participam efetivamente da resposta imunológica local a partir do décimo quarto dia após a lesão (MANDELBAUM et al., 2003; BALBINO et al., 2005).

Os linfócitos são divididos em três subpopulações funcionais: linfócitos T, linfócitos B e células NK, sendo que linfócitos T e B fazem parte da resposta imunológica adquirida. Os linfócitos T coordenam a resposta imunológica celular a partir do reconhecimento antigênico – capacidade conferida a estas células no timo até a puberdade; neste órgão, além destes linfócitos se diferenciarem em células T a partir da expressão do receptor para célula T (TCR), surgem os grupos de diferenciação CD4 (células TCD4+ ou T helpers) e CD8 (células TCD8+ ou linfócitos regulatórios). Na resposta imunológica celular, os linfócitos T controlam – por ativação (TCD4) ou inibição (TCD8) – a funcionalidade de monócitos, macrófagos e linfócitos B (AARESTRUP, 2012).

Destaca-se ainda, que os linfócitos TCD4 se subdividem conforme o padrão de produção de citocinas em Th1 e Th2. A resposta Th1 produz as citocinas IFN- γ , IL-2, TNF- α e está associada à resposta imunológica pró-inflamatória, presente em danos teciduais. Em contrapartida, a resposta Th2, produtora das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, auxilia a síntese de anticorpos por plasmócitos e ativação de eosinófilos, além de participar da resposta cicatricial e processos fibróticos (HACKAM; FORD, 2002; HUNT et al., 2000).

As citocinas presentes no sítio inflamatório são importantes no estímulo e evolução do processo cicatricial, pois participam da

ativação de células endoteliais e da expressão de moléculas de adesão, contribuindo, assim, para o recrutamento e acúmulo de células fagocitárias para a área lesada (KUMAR et al., 2005).

A IL-1, produzida por macrófagos e por queratinócitos além das células Th, modula positivamente moléculas de adesão e ativa metabolicamente os neutrófilos, sendo também responsável pela mitose e diferenciação de queratinócitos e estímulo fibroblástico para a produção de colágeno precocemente no processo de reparo. A IL-6, produzida por neutrófilos, por macrófagos e por fibroblastos, é um potente estimulador mitótico deste último.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina mediadora da resposta inflamatória aguda. É importante na ativação de células endoteliais e na expressão de moléculas de adesão, fato que contribui para o recrutamento e acúmulo de fagócitos na área inflamada (WERNER, GROSE, 2003).

De um modo em geral, estas citocinas estimulam receptores endoteliais que induzem a produção de óxido nítrico (NO) – gás produzido em resposta a diversos estímulos inflamatórios por macrófagos, linfócitos TCD4, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais, células ósseas e condrócitos, a partir da L-Arginina por ação de enzimas denominadas de um modo em geral NO sintases (NOS).³⁹ Em níveis fisiológicos o NO participa da modulação da resposta imunológica, porém, em concentrações elevadas pode agir como uma molécula citotóxica levando a lesões secundárias nas áreas inflamadas (HEMING et al., 2007).

Destacam-se, ainda, como importantes fatores de crescimento no reparo cutâneo o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador- β (TGF- β). (KUMAR et al., 2005).

O PDGF é liberado em grandes quantidades na degranulação plaquetária, imediatamente após a lesão tecidual. Foi o primeiro fator de crescimento cuja propriedade quimiotática sobre macrófagos, neutrófilos e fibroblastos foi demonstrada. Ainda, o PDGF estimula a síntese de elementos da matriz extracelular, incluindo o colágeno, via proliferação fibroblástica e diferenciação de miofibroblastos (HENEMYRE-HARRIS et al., 2008).

O TGF- β , citocina formada por uma cadeia de aminoácidos, possui as isoformas TGF- β_1 , TGF- β_2 e TGF- β_3 . Esta última é considerada por diversos autores antagonista das demais. (RANGANATHAN et al., 2007) Liberado, imediatamente após a lesão, por plaquetas, macrófagos e queratinócitos, o TGF- β participa de todas as etapas do processo cicatricial. É quimiotático para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, induz vários tipos celulares a produzir mais TGF- β_1 – elevando sua concentração no sítio inflamatório, exerce influência sobre a angiogênese, sobre a reconstrução da derme e sobre a reepitelização (HENEMYRE-HARRIS et al., 2008; RANGANATHAN et al., 2007).

Ainda, estudos demonstram que o TGF- β é um potente estimulador da expressão de proteínas da matriz extracelular e de integrinas. Em experimentos com feridas tratadas com anticorpos neutralizantes de TGF- β_1 ou combinações de TGF- β_1 e TGF- β_2 , foi observado que este tratamento leva a uma redução significativa na deposição de matriz extracelular e à subsequente cicatrização (MCANULTY, 2007).

O efeito do TGF- β_1 na reepitelização é aparentemente paradoxal. De um lado, tanto *in vivo* como *in vitro*, inibe a proliferação de queratinócitos, o que sugere ser um regulador negativo da reepitelização, e por outro lado induz a expressão da integrina que é fundamental para a migração de queratinócitos sobre a matriz provisória rica em fibronectina. (MCANULTY, 2007; HINZ, 2007).

Estudo realizado utilizando camundongos transgênicos (n=60) que expressam o transgene TGF- β_1 em queratinócitos apresentaram atraso na cicatrização após ferimento de queimadura provocadas com laser de CO₂.⁵⁵ Por outro lado foi idealizado um experimento com camundongos transgênicos expressando o receptor dominante negativo de TGF- β exclusivamente nos queratinócitos e ficou evidenciada uma acelerada reepitelização em feridas de pele (HINZ, 2007).

Ainda, segundo Adzick et al. (1994), moléculas da superfamília TGF- β estão diretamente relacionadas à qualidade do tecido cicatricial formado. Estudos demonstram que a diminuição da expressão desta citocina dificulta o fechamento da lesão, por interferir no aumento da população de células como macrófagos e fibroblastos e, também, na angiogênese. Em contrapartida, o excesso de TGF- β pode levar à formação de fibrose, pois haverá um estímulo excessivo do metabolismo de fibroblastos com produção exagerada de matriz extracelular (HEMING, 2007; GILLITZER e GOEBELER, 2001; HACKAM e FORD, 2002)

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, B. J. V. **Histologia Essencial**. 1ª. ED, Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan, 2012.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**. v. 9, n. 1, p. 283-289, 2004.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins & Cotran **Patologia: bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 91-124.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 127, n. 3, p. 514-525, 2007.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 1, p. 25-51, 2005.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 84, n. 3, p. 257-62, 2009.

RIBEIRO, M. A. G.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C.; BARRETO, A. L. S.; OLIVEIRA, V. G. M.; SANTOS, T. B.; DANTAS, C. D. F. Morphological analysis of second-intention wound healing in rats submitted to 16J/cm² λ 660-nm laser irradiation. **Indian Journal of Dental Research**. v. 20, n. 3, p. 390, 2009.

HINZ, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 127, n. 3, p. 526-537, 2007.

LI, B.; WANG, J. H. C. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement. **Journal of Tissue Viability**. dez 2009.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**. v. 83, p. 835-870, 2003.

HOWDIESHELL, T.R.; CALLAWAY, D.; WEBB, W.L.; GAINES, M.D.; PROCTER, C.D. Jr.; SATHYANARAYANA POLLOCK, J.S.; BROCK, T.L.; McNEIL, P.L. Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. **Journal of Surgical Research**. v. 96, n. 2, p. 173-182, 2001.

RANGANATHAN, P. et al. Expression profiling of genes regulated by TGF- β : differential regulation in normal and tumor cells. **BMC genomics**. v. 8, p. 98, 2007.

HUNT, T. K.; HOPF, H.; HUSSAIN, Z. Physiology of wound healing. **Advances in Skin Wound Care**. v. 13 (S2), p. 6-11, 2000.

HENEMYRE-HARRIS, C.; ADKINS, A. L.; CHUANG, A. H.; GRAHAM, J. S. Addition of epidermal growth factor improves the rate of sulfur mustard wound healing in an in vitro model. **Journal of Plastic Surgery**. v. 8, p. 136-150, 2008.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 69, n. 4, p. 513-521, 2001.

HEMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Gene Therapy and Wound Healing. **Clinics in Dermatology**. v. 25, n. 1, p. 79–92, 2007.

MCANULTY, R. J. Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. v. 39, n. 4, p. 666-671, 2007.

HACKAM, D. J.; FORD, H. R. Cellular, Biochemical, and Clinical Aspects of Wound Healing. **Surgical Infections**. v. 3 (S), p. s23-s35, 2002.

Apoio: Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental, CBR, UFJF; FAPEMIG – Primeiros projetos, APQ 04368-10