

## Cicatrización de heridas cutáneas y papel de los miofibroblastos

MARITZA GONZÁLEZ BRAVO<sup>1</sup>, NELSON ACOSTA RIVERO<sup>2</sup>, SIRENIA GONZÁLEZ POZOS<sup>3</sup>, JUAN KOURÍ FLORES<sup>3</sup>,  
JOSÉ TAPIA RAMÍREZ<sup>3</sup>, JORGE BERLANGA ACOSTA<sup>4</sup>, VIVIANA FALCÓN CAMA<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Escuela Latinoamericana de Medicina, Vicerrectoría Académica, La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Facultad de Biología, Universidad de la Habana, La Habana, Cuba.

<sup>3</sup>Unidad de Microscopía Electrónica, Cinvestav-IPN, México DF, México.

<sup>4</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.

### RESUMEN

**Objetivo:** realizar una revisión de las características fundamentales de la respuesta de cicatrización de heridas (RCH) cutáneas agudas y crónicas.

**Materiales y Métodos:** la información se obtuvo de la base de datos pubmed y de los trabajos de investigación de los autores.

**Resultados:** la RCH cutáneas se desarrolla en cuatro fases secuenciales: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación. Primero ocurre la activación de fibroblastos, acumulación de un infiltrado celular inflamatorio que incluye a los miofibroblastos y la alteración de la matriz extracelular local (MEC). Después ocurre proliferación de los miofibroblastos, angiogénesis y proliferación de las células epiteliales. Finalmente tiene lugar el cierre de la herida y el restablecimiento de la arquitectura normal. Las heridas crónicas no siguen el patrón normal de reparación y no ocurre la cicatrización. Esto conduce a condiciones patológicas como las úlceras del pie diabético. Los miofibroblastos desempeñan un papel clave y su evolución coincide con los eventos de la RCH. Primero ocurre la trans-diferenciación que involucra la conversión de los fibroblastos en reposo a miofibroblastos que proliferan, son fibrogénicos y contráctiles. Posteriormente ocurre la perpetuación del fenotipo activado que incluye respuestas de fibrogénesis, proliferación, contractibilidad, liberación de citoquinas proinflamatorias, quimotaxis y degradación de la MEC. La resolución involucra la remoción del exceso de MEC y de los miofibroblastos. La eliminación de estos ocurre por tres mecanismos fundamentales: apoptosis, senescencia y reversión al fenotipo de fibroblastos. Esto constituye un paso fundamental en la restitución de la integridad del tejido.

**Conclusiones:** se presentó una revisión actualizada de la RCH fisiológica y patológica.

**Palabras clave:** cicatrización; miofibroblastos; heridas cutáneas; úlcera del pie diabético.

### INTRODUCCIÓN

En respuesta a una lesión cutánea se activa un proceso complejo destinado a reparar los tejidos dañados. Este proceso de curación involucra varias fases que se solapan en el tiempo e involucra numerosas células, procesos celulares y moléculas. En casos de heridas cutáneas crónicas, especialmente en individuos diabéticos con úlceras del pie diabético (UPD), el proceso de cicatrización no progresa, lo que contribuye a esta patología. Los miofibroblastos desempeñan un papel clave durante la cicatrización y su función está afectada en las UPD. En condiciones normales, la restitución del tejido dañado depende de una disminución considerable en el número de estas células que participan en la respuesta de curación. El presente trabajo de revisión presenta de forma resumida los principales eventos que suceden en el proceso cicatrizal, así como el papel de los miofibroblastos en este mecanismo.

#### DESARROLLO

#### Cicatrización de heridas cutáneas Heridas cutáneas agudas

La cicatrización de heridas cutáneas es un proceso muy bien organizado que consta de cuatro fases que se superponen en el tiempo: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación. En la dinámica de una lesión aguda, en un paciente sano, participan de forma coordinada diferentes tipos celulares, la función de numerosas moléculas y de la matriz extracelular (MEC) (Figura 1) (1).

Durante la primera fase, la exposición de las plaquetas circulantes al colágeno del tejido dañado ocasiona su activación, agregación y adhesión al endotelio (3). Esto activa el proceso de coagulación donde el fibrinógeno se convierte en fibrina, se forma el trombo y una MEC provisional (4). Las plaquetas activadas liberan quimoquinas (que inducen la migración y adhesión de los neutrófilos y monocitos) y de varios factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) que promueven la cicatrización (5).

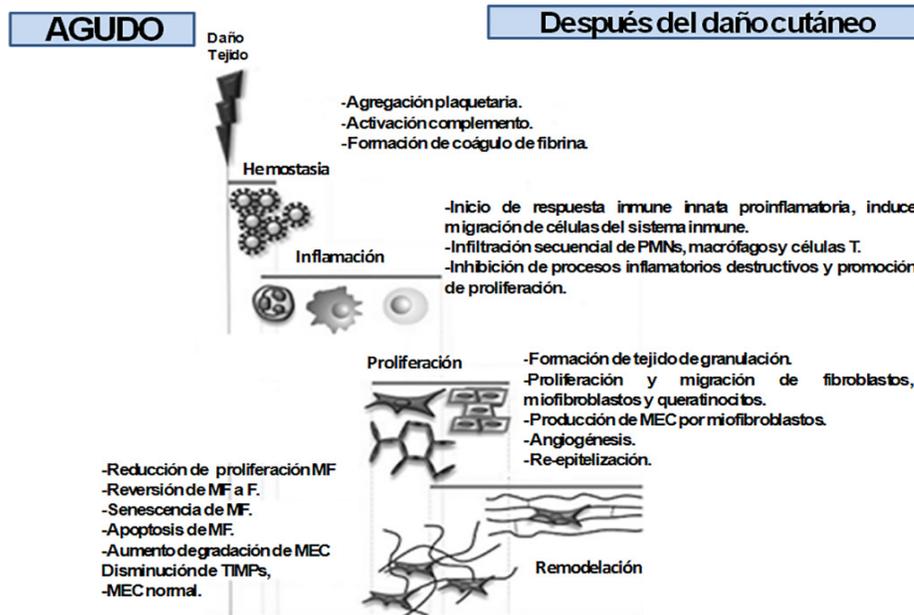
La fase inflamatoria se inicia una vez ocurrido el daño y son los neutrófilos las primeras células que infiltran el tejido dañado. En ellos ocurre la activación de moléculas de adhesión que garantizan su adhesión al endotelio

vascular para luego moverse a través de los capilares rotos o de los espacios entre las células endoteliales para llegar al espacio del tejido (6). Estas células secretan varios factores de crecimiento, que promueven la proliferación celular, y proteasas que degradan la MEC (7). Además, los neutrófilos tienen un papel importante en el control de la infección y el desbridamiento del tejido. Los macrófagos constituyen otro tipo celular que participa en esta etapa. Estos se forman de los monocitos circulantes cuando entran a los tejidos. Los macrófagos activados o proinflamatorios (macrófagos M1) eliminan bacterias, cuerpos extraños, neutrófilos apoptóticos y componentes del tejido dañado. Ellos también expresan mediadores proinflamatorios y citoquinas (8). Otros tipos celulares que actúan en el sitio de la herida son los mastocitos residentes y los linfocitos T. Los mastocitos se degranulan y liberan citoquinas que inducen el reclutamiento de neutrófilos y proteasas que degradan la MEC (9). Los linfocitos T, hacia el final de esta fase, exponen una actividad moduladora sobre la remodelación del tejido.

Por otra parte, la fase proliferativa comienza con la disminución de la inflamación. Los macrófagos se modifican hacia un fenotipo antiinflamatorio (macrófagos M2) que expresan proteasas y sus inhibidores, factores de crecimiento como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el TGF- $\beta$ 1, que promueven la proliferación celular y la síntesis de proteínas (8). También, la matriz provisional comienza a reemplazarse por el tejido de granulación. Los fibroblastos y miofibroblastos se activan y migran hacia la herida utilizando la matriz provisional como armazón. Estos comienzan a proliferar y a producir colágeno y otras moléculas de la matriz en un proceso conocido como fibroplasia que da lugar al tejido de granulación. Para que el proceso de cicatrización sea efectivo resulta indispensable la formación de nuevos vasos

sanguíneos. Esto es posible a través de la angiogénesis, mecanismo que depende de factores proangiogénicos como el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) y el VEGF, y de factores antiangiogénicos que actúan sobre las células endoteliales (6). La vascularización del tejido formado garantiza el oxígeno y los nutrientes necesarios para los elementos celulares que actúan y proliferan en el sitio de la herida. El tejido de granulación es un tejido conjuntivo vascular formado sobre la superficie de la herida, úlcera o tejido inflamado que cicatriza. El mismo constituye un agregado temporal de células y proteínas que actúan como material de fusión, es blando y granuloso de color rosado. Este se compone de fibroblastos, células endoteliales, células inflamatorias, elementos de la MEC y nuevos vasos sanguíneos. En paralelo a la formación del tejido de granulación, los queratinocitos migran desde los bordes de la herida sobre la nueva matriz y comienzan a reepitelizar. De esta forma se reviste el tejido de granulación y se cierra la lesión. Factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de queratinocitos y el FGF2 se liberan de la epidermis dañada y estimulan la proliferación epitelial (5).

La fase de remodelación comienza después de dos o tres semanas del daño inicial, cuando ocurre una disminución de la proliferación de los miofibroblastos. El tejido de granulación evoluciona gradualmente en un tejido maduro que cicatriza, disminuyen los vasos sanguíneos y ocurre la síntesis y degradación continua del colágeno mediante las metaloproteasas de la matriz (MMPs) (4). Las fibras colágenas recién sintetizadas, fundamentalmente de tipo I, se remodelan y organizan garantizando la fuerza de tensión de la herida. Esto unido a la actividad contráctil de los miofibroblastos, genera aproximación de los bordes de la lesión y su posterior cierre (10).



**Figura 1.** Esquema que representa los principales procesos del mecanismo de cicatrización que suceden después del daño cutáneo agudo en un paciente aparentemente sano (Adaptación a partir de (2)). MF: Miofibroblastos; F: Fibroblastos; PMNs: Células polimorfonucleares; MEC: Matriz extracelular.

## Heridas cutáneas crónicas

En individuos con heridas cutáneas crónicas, como en los pacientes diabéticos con UPD, el mecanismo de cicatrización falla (2). En estos casos se detecta una reducción tisular de las concentraciones de factores de crecimiento, incluyendo el EGF, que afecta la cicatrización de las heridas (2). Esto conduce a heridas crónicas que no cicatrizan, lo que trae como consecuencia que no se sucedan todos los eventos, y que el proceso de curación no progrese de la fase de inflamación (Figura 2).

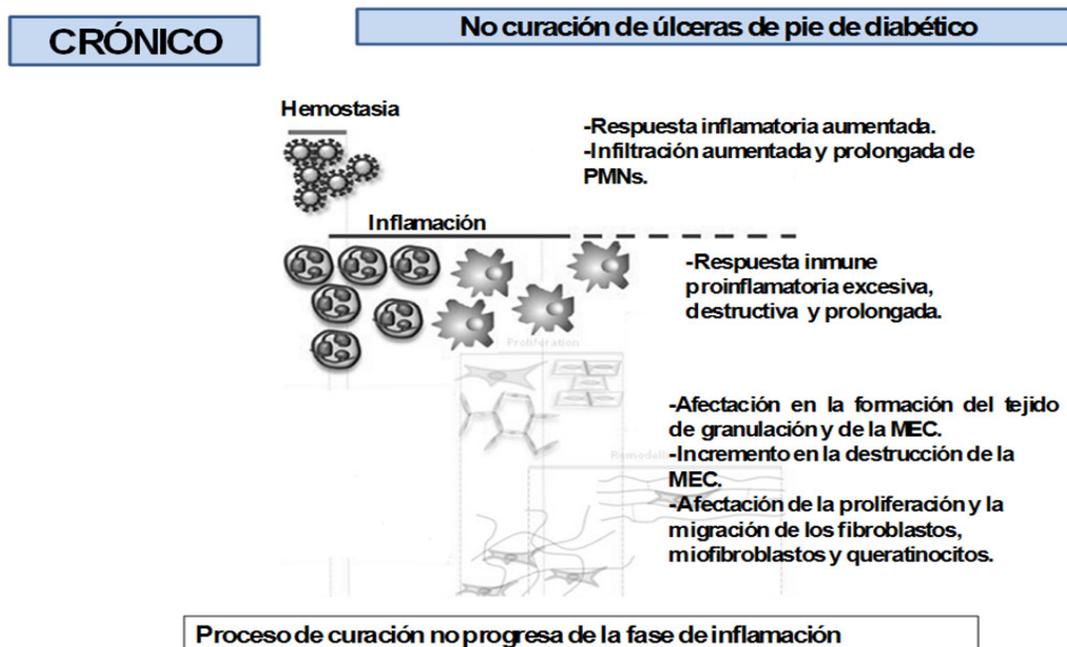
En estos pacientes se produce una respuesta inflamatoria aumentada con infiltración prolongada de neutrófilos en el sitio de la herida, lo cual se relaciona con elevados niveles locales de secreción de elastasa, y de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (11). La fase inflamatoria se prolonga de manera excesiva con una respuesta inmune pro-inflamatoria destructiva y excesiva (12), lo que retrasa la formación y maduración del tejido de granulación (13).

### Papel de los miofibroblastos en la cicatrización

Los fibroblastos son células que forman parte del tejido de granulación, elaboran componentes de la MEC y su actividad es fundamental para el mecanismo de cicatrización, contrayendo y remodelando la matriz. Estas células expresan factores de crecimiento necesarios para la comunicación mesénquima-mesénquima y epitelio-mesénquima, especialmente para el establecimiento de la membrana basal y subsiguiente epitelización. Por tanto, cualquier daño en la función de los fibroblastos altera la fisiología de la cicatrización cronificando la herida (14). Existe una gran heterogeneidad poblacional de los fibroblastos, describiéndose por diferentes autores en múltiples artículos, como células morfológicamente semejantes a fibroblastos cuando se refieren a algunas de

sus subpoblaciones. Una de ellas, los miofibroblastos, son responsables del fenómeno de contracción de la herida y su presencia sostenida en estados patológicos, constituye un marcador de fibrosis y cicatrización (15).

Los miofibroblastos poseen en su citoplasma haces prominentes de microfilamentos llamadas fibras de estrés grandes. Estas permiten cierta contracción así como el pretensado y remodelado de la MEC que lo circunda (16). Estas células completamente diferenciadas expresan la proteína citoesquelética de músculo liso (SM), actina  $\alpha$ -SM ( $\alpha$ -SMA) que se utiliza para detectar este tipo de células (17). Una característica definitoria para su proceso de diferenciación es la presencia de fibronectina EDA en su microambiente (18). Además, los miofibroblastos muestran complejos de unión especializados y uniones de tipo fibronexus con otras células y con la MEC, estos son grandes adhesiones maduras focales que le permiten realizar fuertes alianzas, contraer y remodelar la matriz y proporciona un medio para transducir la fuerza mecánica en el tejido (19, 20). Durante el proceso de curación ante un daño cutáneo en el que participa el miofibroblasto, se describen tres etapas que se suceden: iniciación, perpetuación y resolución (Figura 3). Con la formación del coágulo durante la fase de iniciación se produce una MEC provisional que favorece el aumento de la tensión mecánica, se liberan citoquinas y factores de crecimiento (fundamentalmente el TGF- $\beta$ 1) que propician la transdiferenciación de fibroblastos a miofibroblastos. La transdiferenciación involucra un cambio fenotípico gradual y la conversión a miofibroblastos que proliferan, son fibrogénicos y contráctiles. La iniciación está asociada a la inducción rápida de genes en los fibroblastos producto de la estimulación paracrina y por los cambios tempranos en la composición de la MEC.



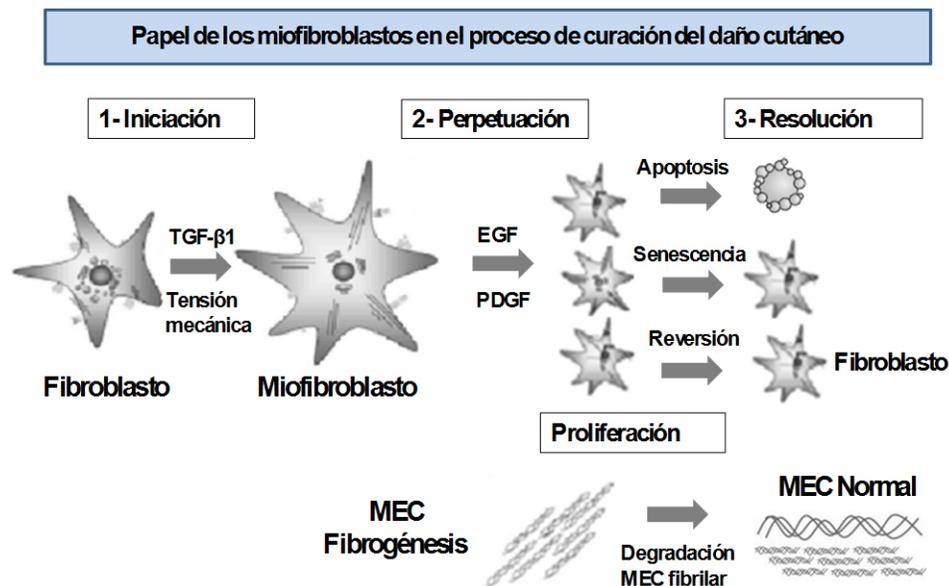
**Figura 2.** Esquema que representa los principales procesos del mecanismo de cicatrización que suceden después del daño cutáneo crónico en pacientes diabéticos (Adaptación a partir de (2)). PMNs: Células polimorfonucleares; MEC: Matriz extracelular.

Posteriormente ocurre una amplificación de la respuesta que se caracteriza por la perpetuación de este proceso y por la proliferación de los miofibroblastos favorecido por diferentes factores. Este componente de la activación tiene lugar por la estimulación autocrina y paracrina, y la aceleración del proceso de reestructuración de la MEC. En la medida que la activación de los miofibroblastos se perpetúa se pueden identificar diferentes respuestas genotípicas que incluyen la fibrogénesis, la proliferación, la contractibilidad, la liberación de citosinas proinflamatorias, la quimotaxis, y la degradación de la MEC.

El EGF y el PDGF promueven las funciones contráctiles de los miofibroblastos. Otros factores que contribuyen son la Endotelina 1, la síntesis de MEC fibrilar con predominio de colágeno tipo I por un proceso conocido como fibrogénesis, en el que participa el TGF- $\beta$ 1. El TGF- $\beta$ 1 es un factor multifuncional con propiedades estimuladoras o inhibitorias sobre la proliferación celular y/o diferenciación. El TGF- $\beta$ 1 y sus receptores específicos de alta afinidad se sintetizan en diferentes tipos celulares. Por esto se considera que el TGF- $\beta$ 1 es una molécula reguladora fundamental que actúa mediante mecanismos autocrinos y paracrinos. Durante la respuesta de cicatrización, el TGF- $\beta$ 1 desempeña un papel fundamental en la iniciación, la promoción y la progresión de la transdiferenciación de los fibroblastos. El efecto más evidente del TGF- $\beta$ 1 sobre los fibroblastos y los miofibroblastos es el incremento de la síntesis y deposición de los componentes de la MEC. Además, el TGF- $\beta$ 1 retarda la degradación de estos componentes. Por otro lado, se inhibe

la degradación de la MEC fibrilar por la acción principal de los inhibidores de las metaloproteinasas tisulares (TIMPs). También, se produce un aumento de la quimotaxis de los miofibroblastos y de células inflamatorias asistida por la acción de varias moléculas, incluyendo el PDGF. Otro aspecto importante es que se favorece la formación de vasos sanguíneos por el proceso de angiogénesis y la acción de factores como el EGF y VEGF (15).

Finalmente, la etapa de resolución se caracteriza por la disminución de la inflamación. Los macrófagos cambian su fenotipo a M2 y sus propiedades fisiológicas de proinflamatorias a antiinflamatorias. Esto se favorece por el aumento de la expresión de la colagenasa y la degradación de la MEC fibrilar que contribuye a la apoptosis de los miofibroblastos. El control de la fibrogénesis también se favorece por la disminución de moléculas profibrogénicas importantes como la TIMP-1 (inhibe las MMPs de la MEC fibrilar) y el TGF $\beta$ -1. De manera general, la disminución del número miofibroblastos ocurre por tres mecanismos fundamentales: 1-) eliminación de los miofibroblastos mediante apoptosis que se relaciona con un aumento de la molécula proapoptótica (el receptor de superficie celular que puede transmitir señales de apoptosis (FAS)) en los miofibroblastos; y apoptosis inducida por la acción de macrófagos y células asesinas naturales; 2-) senescencia de los miofibroblastos; 3-) reversión de los miofibroblastos a fibroblastos (15). Durante esta fase hay degradación de la MEC fibrilar y se restituye la matriz con sus características normales.



**Figura 3.** Papel de los miofibroblastos en el proceso de curación de las heridas (Ver explicación en texto). EGF: Factor de crecimiento epidérmico; PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas; TGF- $\beta$ 1: Factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1; MEC: Matriz extracelular.

### CONCLUSIONES

El proceso de cicatrización de heridas cutáneas es complejo e involucra la acción coordinada de diferentes tipos celulares, la función de numerosas moléculas y de la MEC en una secuencia de eventos que se superponen

en el tiempo. Cada uno de estos pasos es dinámico y reversible. Cuando el proceso de reparación de la herida es satisfactorio, tiene lugar la resolución que conduce al restablecimiento de la arquitectura normal. No obstante, las heridas crónicas no siguen el patrón normal de

reparación y no ocurre la cicatrización. Esto puede conducir a condiciones patológicas graves como las observadas en las UPD. Los miofibroblastos desempeñan un papel clave durante la cicatrización y su evolución coincide con los eventos descritos durante este proceso. Primero ocurre la activación de fibroblastos en reposo en un proceso que se denomina trans-diferenciación, y se considera el evento dominante en la biología de la fibrogénesis. Los miofibroblastos completamente transformados son capaces de efectuar estimulación autocrina, amplificar el fenotipo

activado y acelerar el proceso de reestructuración de la MEC. Finalmente, la resolución involucra la remoción del exceso de MEC y de los miofibroblastos. Estudios recientes muestran que la eliminación de estos ocurre por tres mecanismos fundamentales que incluyen la apoptosis, senescencia y reversión al fenotipo de fibroblastos. En resumen, la resolución de la activación de los miofibroblastos constituye un paso fundamental en la restitución la integridad del tejido.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. *Adv Ther* 2014;31:817-836.
2. Portou MJ, Baker D, Abraham D, Tsui J. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: A review, *Vascular Pharmacology Vascular Pharmacol* 2015;doi: 10.1016/j.vph.2015.02.007.
3. Pradhan L, Nabzyk C, Andersen ND, LoGerfo FW, Veves A. Inflammation and neuropeptides: the connection in diabetic wound healing. *Expert Rev Mol Med* 2009;11: e2.
4. Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med* 2006;23:594-608.
5. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 2005;366:1736-1743.
6. Dinh T, Tecilazich F, Kafanas A, Doupis J, Gnardellis C, Leal E, et al. Mechanisms involved in the development and healing of diabetic foot ulceration. *Diabetes* 2012;61:2937-2947.
7. Dovi JV, Szpaderska AM, DiPietro LA. Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? *Thromb Haemost* 2004;92:275-280.
8. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage *Expert Rev Mol Med* 2011;13: e23.
9. Weller K, Foitzik K, Paus R, Syska W, Maurer M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J* 2006;20:2366-2368.
10. Lobmann R, Schultz G, Lehnert H. Proteases and the diabetic foot syndrome: mechanisms and therapeutic implications. *Diabetes Care* 2005;28:461-471.
11. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320(6)::365-376.
12. Mulder GD, Lee DK, Jeppesen NS. Comprehensive review of the clinical application of autologous mesenchymal stem cells in the treatment of chronic wounds and diabetic bone healing. *Int Wound J* 2012;9(6)::595-600.
13. Usui ML, Mansbridge JN, Carter WG, Fujita M, Olerud JE. Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds. *J Histochem Cytochem* 2008;56:687-696.
14. Falcón-Cama V, Fernández-Mayola M, Mendoza-Mari Y, Acosta-Rivero N, García-Ojalvo A, Bringas-Pérez R, et al. Epidermal Growth Factor based Therapy Promotes Intracellular Trafficking and Accumulation of its Receptor in the Nucleus of Fibroblasts from Diabetic Foot Ulcers. *J Diabetic Complications Med* 2016;1:111.
15. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 2014;7:301-331.
16. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 2007;127(3)::526-537.
17. Sandbo N, Dulin N. Actin cytoskeleton in myofibroblast differentiation: ultrastructure defining form and driving function. *Transl Res* 2011;158(4)::181-196.
18. Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz Pea. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol* 1998;142(3)::873-881.
19. Dugina V, Fontao L, Chaponnier C, Vasiliev J, Gabbiani G. Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 18): :3285-3296.
20. Goffin JM, Pittet P, Csucs G, Lussi JW, Meister JJ, Hinz B. Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers. *J Cell Biol* 2006;172:259-268.

## **Cutaneous wound healing and role of myofibroblasts**

### **ABSTRACT**

**Objective:** provide a review on the main features of both acute and chronic cutaneous wound healing (WHR) and their relationship with myofibroblasts' functions.

**Materials and Methods:** information was gathered from the pubmed database as well as from author's publications.

**Results:** cutaneous WHR is a physiological process comprised of four sequential and overlapping stages: hemostasis, inflammation, proliferation and remodelling. Initial stages entail activation of fibroblasts, accumulation of immune cell infiltration including myofibroblasts, and altered local extracellular matrix (ECM). Later stages involve proliferation of myofibroblasts and epithelial cells and angiogenesis. Finally, wound closure and reorganisation of the ECM to an architecture resembling normal tissue occurs. In chronic wounds the normal WHR is stalled leading to static wounds. These are common in pathological conditions such as diabetic foot ulcerations. Myofibroblasts are key players in tissue repair and their evolution is linked to different stages of the wound healing response. Firstly, quiescent fibroblasts transdifferentiate into myofibroblasts that are that proliferating, fibrogenic, and contractile. The following cellular response is called perpetuation of the myofibroblast's activated phenotype. At this stage, myofibroblasts can develop various responses including fibrogenesis, proliferation, contractility, release of proinflammatory cytokines, chemotaxis and matrix degradation. Finally, the resolution process involves the removal of accumulated ECM and myofibroblasts. Clearance of myofibroblasts can happen through three mechanisms: apoptosis, senescence and reversion to fibroblast's phenotype. Resolution of myofi-broblast's activation is an essential step in the restoration of tissue integrity.

**Conclusions:** we reviewed major characteristics and functions of cutaneous wound healing under physiological conditions or disease.

**Keywords:** healing; myofibroblasts; cutaneous wounds; diabetic foot ulceration.