

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Michel Pavelecini

**Expressão imuno-histoquímica das
ciclooxigenases em cicatrizes
hipertróficas e queloides.**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2017**

Catálogo na Publicação

Pavelecini, Michel

Expressão imunohistoquímica das ciclooxigenases em
cicatrices hipertróficas e queloides / Michel Pavelecini.
-- 2017.

87 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências
da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em
Patologia, 2017.

Orientador(a): Prof. Dr. Cláudio Galleano Zettler ;
coorientador(a): Prof. Dr. Pedro Bins Ely, Profa. Dra.
Marilda da Cruz Fernandes.

1. Cicatrização. 2. Queloides. 3. Cicatrizes
hipertróficas. 4. Ciclooxigenases. 5. Imunohistoquímica.
I. Título.

Michel Pavelecini

Expressão imuno-histoquímica das ciclooxigenases em cicatrizes hipertróficas e queloides.

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal de Ciências da
Saúde de Porto Alegre como
requisito para a obtenção do grau de
Doutor

Orientador: Dr. Cláudio Galeano Zettler
Co-orientador: Dr. Pedro Bins Ely
Co-orientadora: Dra. Marilda da Cruz Fernandes

**Porto Alegre
2017**

Agradecimentos

À minha família, base de tudo e fonte contínua de inspiração:

À minha esposa, Nilsea, por sempre estar ao meu lado;

Aos filhos, Valentina e Theodoro, simplesmente por existirem;

Ao meu irmão, Maiquel, pela parceria ao longo da vida;

À minha mãe, Iracema, pela simplicidade e humildade que ensinou aos filhos;

Ao meu pai, Antônio (*in memorian*), por ter me mostrado a humildade e dedicação ao trabalho.

Aos meus mestres:

Dr. Cláudio Zettler, por me orientar neste trabalho;

Ao Dr. Pedro Bins Ely, pelo seu contínuo estímulo à pesquisa em nossa instituição;

À Dra. Marilda Cruz Fernandes, por me auxiliar na orientação desta tese e disponibilizar o laboratório de Pesquisa em Patologia desta pós-graduação;

Ao Dr. Roberto Chem (*in memorian*), pelo seu incansável esforço em estimular o desenvolvimento e crescimento intelectual dos seus alunos;

À Maristela, secretária da Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA, pela sua calma, agilidade e presteza;

Às técnicas do laboratório de Pesquisa em Patologia da Pós-graduação em Patologia da UFCSPA, Teresinha Stein e Rosalva Meurer, pelo empenho em me auxiliarem nos exames imuno-histoquímicos.

Sumário

1. Introdução	8
1.1. Revisão da fisiopatologia da reparação tecidual	16
1.1.1. Regeneração	17
1.1.2. Cicatrização	18
1.2. Fisiopatologia da cicatrização	19
1.2.1. Fases da cicatrização	19
1.2.1.1. Fase de hemostasia	19
1.2.1.2. Fase inflamatória	20
1.2.1.3. Fase proliferativa	20
1.2.1.4. Fase de remodelação	20
1.2.2. Fisiologia da inflamação	20
1.2.2.1. Metabolismo do ácido araquidônico	21
1.2.2.2. As cicloxigenases	24
1.2.3. Desfechos da inflamação aguda	27
1.2.3.1. Cicatrização primária	28
1.2.3.2. Cicatrização secundária	29
1.2.4. Síntese e degradação do colágeno	30
1.2.4.1. Síntese do colágeno	30
1.2.4.2. Degradação do colágeno	32
1.2.5. Resistência da cicatriz	33
1.2.6. Fatores que influenciam a cicatrização	34
1.3. Cicatrização patológica: cicatrizes hipertróficas e queloides	37
1.3.1. Quadro clínico	39
1.3.2. Diferenciação entre queloides e cicatrizes hipertróficas	42
1.3.3. Terapêutica dos queloides e das cicatrizes hipertróficas	44
1.4. Cicloxigenases e sua relação com a cicatrização	44
1.5. Referências bibliográficas	50
2. Objetivos	54

3. Artigo redigido em inglês	55
4. Considerações finais	82
5. Anexos	84

Lista de abreviaturas utilizadas

AA: ácido araquidônico

COX: cicloxigenase

COXs: cicloxigenases

COX1: cicloxigenase 1

COX2: cicloxigenase 2

HE: hematoxilina-eosina

PG: prostaglandina

PGs: prostaglandinas

PGE2 : prostaglandina E2

AINE: anti-inflamatório não esteroide

AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais

Resumo da Dissertação

Introdução:

Queloides e cicatrizes hipertróficas caracterizam-se pelo acúmulo excessivo de matriz extracelular. Alguns estudos demonstraram a expressão aumentada das cicloxigenases (COXs) nestas cicatrizes, sugerindo que o bloqueio farmacológico poderia ser utilizado no seu tratamento.

Objetivos:

Determinar a expressão imuno-histoquímica das COXs em cicatrizes normais, hipertróficas e queloides.

Material e Métodos:

Estudo prospectivo, tipo caso-controle, incluindo 54 pacientes (idade entre 18 e 60 anos), submetidos à exérese de cicatrizes: 18 normais (grupo 1), 18 hipertróficas (grupo 2) e 18 queloides (grupo 3). Fragmentos das cicatrizes foram coletados. Realizou-se exame anatomopatológico [hematoxilina-eosina(HE)] e imuno-histoquímico para avaliar a expressão das COX1 e COX2 na epiderme e derme. Comparou-se os resultados entre todos os grupos e entre o grupo 1 *versus* o 2 e o 3 agrupados (cicatrizes anormais).

Resultados:

O enquadramento dos casos nos grupos através de critérios clínicos foi confirmado pela coloração HE em todos os casos.

Quanto à avaliação da COX1 na epiderme, não houve diferença na expressão imuno-histoquímica entre os 3 grupos. Na derme, os grupos 2 e 3 apresentaram maior expressão imuno-histoquímica do que o grupo 1, havendo

diferença na comparação entre todos os grupos ($p=0,014$), e entre cicatrizes normais *versus* anormais ($p=0,004$).

Por outro lado, em relação à avaliação da COX2, não houve diferença estatisticamente significativa na sua expressão em qualquer comparação, tanto na epiderme quanto na derme. Na comparação entre o grupo 1 *versus* os grupos 2 e 3 (cicatrizes anormais) houve uma tendência à maior positividade na expressão da COX2 na derme dos grupos 2 e 3 ($p=0,081$).

Conclusões: a expressão imuno-histoquímica da COX1 foi significativamente maior na derme de cicatrizes anormais em comparação com cicatrizes normais. Comparando-se com resultados da literatura, os dados não são uniformes e ainda não se pode estabelecer uma relação precisa entre as COXs e os distúrbios da cicatrização.

1. Introdução

Os queloides e cicatrizes hipertróficas são distúrbios da reparação da pele que se caracterizam por acúmulo excessivo de matriz extracelular produzida pelos fibroblastos (Louw, 2007; Huang e cols., 2014). Em conjunto, são doenças fibroproliferativas da derme, que ocorrem como um desarranjo do processo normal de cicatrização em indivíduos suscetíveis (Yu e cols., 2006; Louw, 2007). Apresentam relevo e espessamento, muitas vezes com formações tumorais. Assumem importância considerando-se os sintomas de dor, prurido e limitações funcionais. Alterações estéticas com frequência causam constrangimento social e problemas psicológicos. Além disso, são significativos os custos financeiros associados ao seu tratamento (Al-Attar e cols., 2006; Furtado e cols., 2009; Monstrey e cols., 2014; Rabello e cols., 2014).

Os queloides ocorrem exclusivamente em humanos e com frequência são confundidos com cicatrizes hipertróficas. Estas não ultrapassam os limites iniciais da lesão, têm tendência à regressão e melhor prognóstico do que os queloides (Hochman e cols., 2012). Diversas hipóteses sobre sua etiologia têm sido descritas, como alterações da regulação dos fatores de crescimento, falha na remodelação do colágeno, fatores genéticos e disfunções imunológicas, entre outras (Al-Attar e cols., 2006). Estudos sugerem que tais cicatrizes podem se formar por uma interação entre fatores endócrinos, imunológicos e neuronais. Até mesmo alterações psíquicas poderiam contribuir para sua gênese, o que poderia explicar o surgimento de cicatrizes de forma espontânea, sem lesões mecânicas à pele, em alguns pacientes (Figura 1) (Hochman e cols., 2008; Furtado e cols., 2012; Hochman e cols., 2015).



Figura 1. Queloides de surgimento espontâneo (fotografia do autor).

Os queloides e cicatrizes hipertróficas podem surgir após quaisquer lesões à pele, incluindo traumatismos, processos inflamatórios e incisões cirúrgicas. Em algumas áreas da medicina, especialmente nas cirúrgicas, as cicatrizes anormais são complicações relativamente frequentes após intervenções diagnósticas ou terapêuticas. Nas cirurgias torácicas, os queloides são comuns, visto que as vias de acesso utilizadas nestes procedimentos coincidem com locais de alta incidência desta doença (Figura 2) (Furtado e cols., 2009).

As cirurgias coronarianas com via de acesso pré-esternal são causa comum de cicatrizes anormais (Sakuraba e cols., 2010). Em cirurgia de cabeça e pescoço, o potencial para cicatrizes ocorre em função de traumatismos e retirada de tumores. Os queloides de orelhas decorrentes da colocação de brincos e *piercings* contribuem significativamente para as estatísticas (Figuras

3 e 4) (Freuschle e cols., 2014; Young e cols., 2014). Na cirurgia geral, estas cicatrizes podem surgir em decorrência de laparotomias (Figura 5). Em ginecologia e obstetrícia as cicatrizes hipertróficas e queloides são relativamente comuns após cirurgias mamárias e abdominais (incisões tipo Pfanestiel), com repercussões importantes, inclusive na esfera sexual (Furtado e cols., 2009). Na dermatologia os queloides estão na lista das doenças mais prevalentes da especialidade. Casos graves decorrentes de acne são de tratamento extremamente difícil, com altos índices de recidiva (Figura 6) (Abdel Hay e cols., 2016).



Figura 2. Cicatriz quelóide pós esternotomia (fotografia do autor).

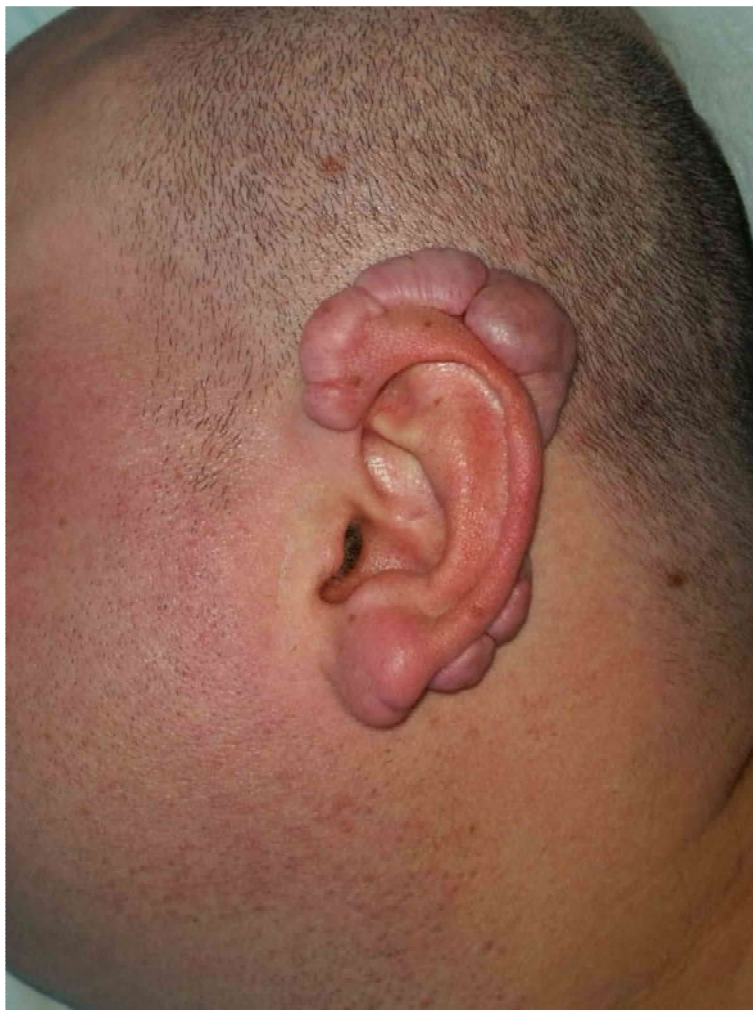


Figura 3. Queloides na orelha por uso de *piercings* (fotografia do autor).



Figura 4. Queloide no lóbulo da orelha causado por colocação de brinco
(fotografia do autor).



Figura 5. Queloide pós laparotomia com incisão mediana supraumbilical
(fotografia do autor).



Figura 6. Queloides múltiplos causados por acne (fotografia do autor).

Contudo, a cirurgia plástica é, provavelmente, a área que apresenta os maiores problemas decorrentes dos distúrbios da cicatrização. Nesta especialidade, as cicatrizes são parte do resultado dos tratamentos realizados. Portanto, além dos transtornos estéticos e funcionais sofridos pelo paciente, estas complicações são causa frequente de demandas judiciais por insatisfação com os resultados obtidos (Figuras 7 e 8). Ainda na cirurgia plástica, os pacientes com queimaduras representam um grupo com alta incidência de cicatrizes anormais, já que apresentam lesões de pele com alta atividade inflamatória (Figura 9) (Bombaro e cols., 2003).



Figura 7. Cicatriz quelóide, pós-abdominoplastia, que se estende além dos limites da incisão cirúrgica, mostrando significativo prejuízo estético (fotografia do autor).



Figura 8. Cicatrizes hipertróficas pós mamoplastia (fotografia do autor).



Figura 9. Queloides pós-queimaduras, com limitação de movimentos, dor, prurido e fissuras na pele (fotografia do autor).

1.1. Revisão da fisiopatologia da reparação tecidual

A habilidade de reparação de tecidos lesados é fundamental para a sobrevivência dos organismos. A resposta inflamatória a danos teciduais não só serve para eliminar agentes perigosos, como micro-organismos, mas também para o processo de reparação. O reparo refere-se à restauração da arquitetura e função das estruturas lesadas, podendo ocorrer através de duas maneiras: regeneração, ou formação de cicatriz pela deposição de tecido conjuntivo (Figura 10) (Kumar e cols., 2013).

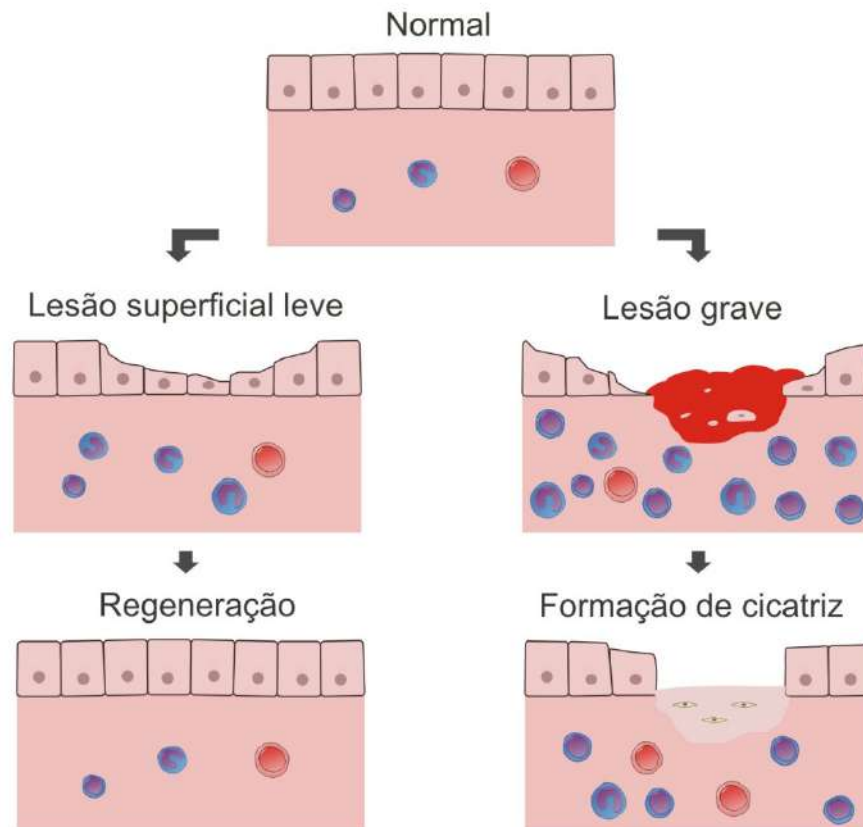


Figura 10. Reparação tecidual por regeneração ou formação de cicatriz
(modificado de Kumar e cols., 2013).

1.1.1. Regeneração

Denomina-se regeneração ao processo de reposição de células danificadas por outras iguais, com o reestabelecimento dos tecidos lesados ao estado normal. Tal processo ocorre pela proliferação de células residuais (não danificadas), que ainda mantém sua capacidade de divisão, e pela reposição com células-tronco. Exemplo deste tipo de reparo é a reposição de células em epitélios de divisão rápida da pele e intestinos e em alguns órgãos parenquimatosos, como o fígado (Kumar e cols., 2013; Zhou e cols., 2017).

1.1.2. Cicatrização

Quando os tecidos lesados não podem ser reparados por regeneração, ou as estruturas de suporte forem severamente traumatizadas, o reparo ocorre pela substituição por tecido conjuntivo, com formação da cicatriz (Figura 11). Ainda que não possa exercer a função das células do parênquima celular perdido, a cicatriz é capaz de oferecer uma estabilidade estrutural, permitindo o funcionamento dos tecidos adjacentes próximo do normal. O termo fibrose é comumente usado para descrever a extensa deposição de colágeno após dano tecidual (Kumar e cols., 2013).

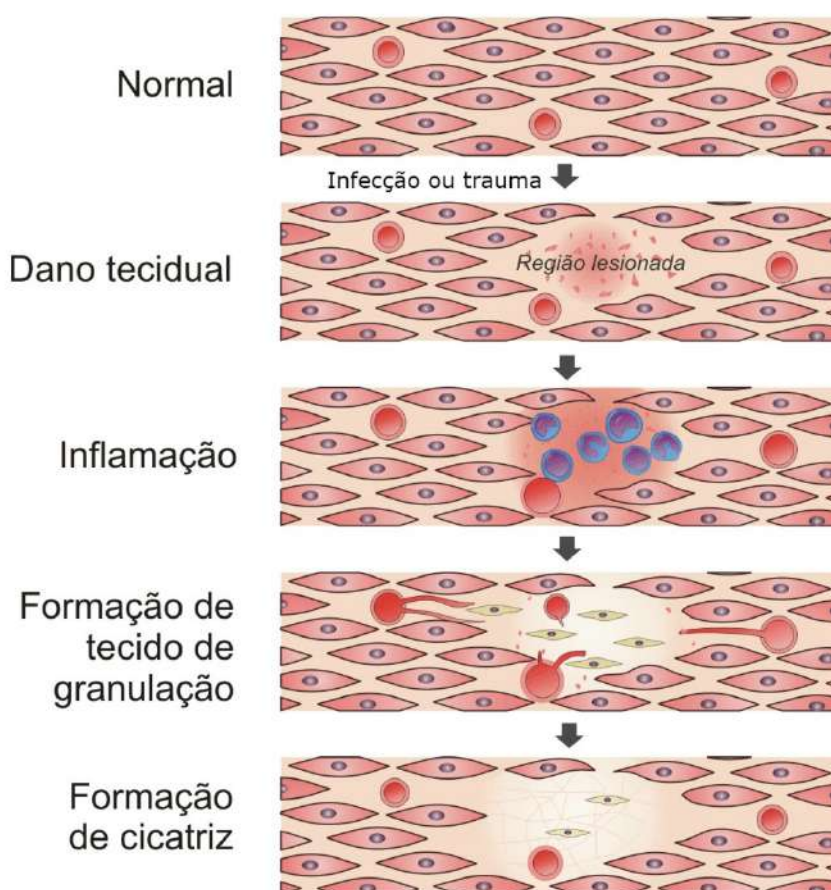


Figura 11. Dano tecidual e formação de cicatriz (modificado de Kumar e cols., 2013).

1.2. Fisiopatologia da cicatrização

1.2.1. Fases da cicatrização

A cicatrização envolve inúmeros e complexos processos interligados. Ainda que muitos deles ocorram simultaneamente, para fins didáticos, divide-se o seu estudo em etapas. Historicamente, a cicatrização é dividida em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação (Kumar e cols., 2013; Gurtner e Wong, 2014). Outros autores dividem em quatro, acrescentando uma fase inicial de hemostasia (Janis e Harrison, 2016). Monaco e Lawrence (2003) publicaram um trabalho de revisão dividindo a cicatrização em cinco fases. O Quadro 1 apresenta as diferenças na divisão didática da cicatrização.

Quadro 1. Diferenças na divisão didática da cicatrização em fases.

Autor	Fases				
Kumar, 2013		Inflamatória	Proliferativa	Remodelação	
Janis e Harrison, 2016	Hemostasia	Inflamatória	Proliferativa	Remodelação	
Monaco e Lawrence, 2003	Hemostasia	Inflamatória	Proliferativa	Contração	Remodelação

1.2.1.1. Fase de hemostasia

A fase de hemostasia compreende a vasoconstrição, a agregação plaquetária e a deposição de fibrina, resultado da cascata da coagulação. O produto final deste processo é a formação do coágulo, inicialmente composto pela rede de fibrina e por plaquetas agregadas com outras células do sangue. Esta etapa é importante, já que contribui para evitar perdas de fluidos e eletrólitos, e reduz a contaminação por isolar o organismo do ambiente externo.

A fibrina também forma uma rede para onde migram fibroblastos e outras células importantes na sequência do processo de cicatrização (Monaco e Lawrence, 2003; Janis e Harrison, 2016).

1.2.1.2. Fase inflamatória: tem o objetivo de remover os tecidos desvitalizados e prevenir a infecção (Kumar e cols., 2013). Esta fase, por ser a mais importante no desenvolvimento desta tese, será tratada detalhadamente em um tópico específico a seguir (tópico 1.2.2. Fisiologia da inflamação).

1.2.1.3. Fase proliferativa: período de 4 a 21 dias da lesão. Ocorre um balanço entre a formação da cicatriz e a regeneração tecidual. Normalmente, predomina a formação da cicatriz, embora na cicatrização fetal uma significativa quantidade de regeneração seja possível (Monaco e Lawrence, 2003; Kumar e cols., 2013).

1.2.1.4. Fase de remodelação: a fase mais longa e menos entendida, cujo propósito é maximizar a força e a integridade estrutural da ferida (Henry e Garner, 2003; Kumar e cols., 2013).

1.2.2. Fisiologia da inflamação

Como base para o estudo do processo da cicatrização, é fundamental que a fisiologia da inflamação seja revisada. Diante de um dano tecidual, a inflamação aguda é uma resposta imediata do organismo, sendo que os fenômenos vasculares fazem o papel principal, facilitando a ação dos anticorpos e dos leucócitos. A inflamação aguda apresenta três componentes principais (Monaco e Lawrence, 2003; Kumar e cols., 2013):

1. Alterações no calibre vascular, com um aumento no fluxo sanguíneo;

2. alterações estruturais na microvasculatura, permitindo que proteínas plasmáticas e leucócitos deixem a circulação e;

3. migração de leucócitos da microcirculação para o interstício e seu acúmulo no foco de lesão tecidual.

O fenômeno vascular caracteriza-se por um aumento no fluxo sanguíneo na área traumatizada, resultante principalmente da dilatação capilar e da abertura dos leitos capilares. O aumento da permeabilidade vascular leva ao acúmulo de fluido extravascular rico em proteínas, formando um exsudato. Proteínas plasmáticas deixam os vasos, muito comumente através de junções endoteliais alargadas das vênulas ou por injúria endotelial direta. Os leucócitos (inicialmente com predominância de neutrófilos) aderem ao endotélio e migram através do mesmo para o sítio da lesão sob a influência de agentes quimiotáticos. Segue-se a fagocitose do agente ofensor, o qual leva à morte de microrganismos. Durante a quimiotaxia e a fagocitose, leucócitos ativados podem liberar metabólitos tóxicos e proteases extracelulares, potencialmente causadores de danos teciduais (Kumar e cols., 2013).

1.2.2.1. Metabolismo do ácido araquidônico

Os metabólitos do ácido araquidônico (AA), também conhecidos como eicosanoides, são representados principalmente pelas prostaglandinas (PGs) e pelos leucotrienos, e têm importância fundamental no processo da inflamação (Henry e Garner, 2003).

A história das PGs data dos anos 1930, quando Goldblatt e Von Euler, de forma independente, descobriram um ácido graxo no fluído seminal humano com potentes propriedades vasoconstritoras em coelhos e porquinhos da índia.

Von Euler nomeou seu composto de prostaglandina (PG), por inicialmente considerar que seria originada na glândula prostática (sabe-se hoje que é produzido na vesícula seminal) e sugeriu que teria papel no transporte do esperma (Claria, 2003).

O AA é um ácido graxo saturado derivado diretamente da dieta ou da conversão do ácido linoleico (ácido graxo essencial). Não ocorre livre nas células, mas é normalmente esterificado nos fosfolipídios da membrana celular, liberado através da ativação de fosfolipases celulares por estímulos mecânicos, químicos, físicos e por outros mediadores, como o C5a. Os produtos do AA afetam diversos processos biológicos, incluindo a inflamação e a hemostasia. Estas substâncias são denominadas autacoides (hormônios de efeito local), os quais são formados rapidamente, exercem seus efeitos localmente e eliminam-se espontaneamente ou através de enzimas (Henry e Garner, 2003). Os derivados do AA podem mediar cada etapa da inflamação aguda (Quadro 2) (Kumar e cols., 2013).

Quadro 2. Derivados do ácido araquidônico mediadores da inflamação.

Vasoconstrição	Tromboxano A ₂ , leucotrienos C ₄ , D ₄ E ₄
Vasodilatação	PGI ₂ , PGE ₂ , PGD ₂
Aumento da permeabilidade vascular	Leucotrienos C ₄ , D ₄ E ₄
Quimiotaxia	Leucotrieno B ₄ , HETE

Baseado em Kumar e cols., 2013.

O metabolismo do AA segue uma das duas vias nomeadas pelas enzimas que iniciam as suas reações (Figura 12).

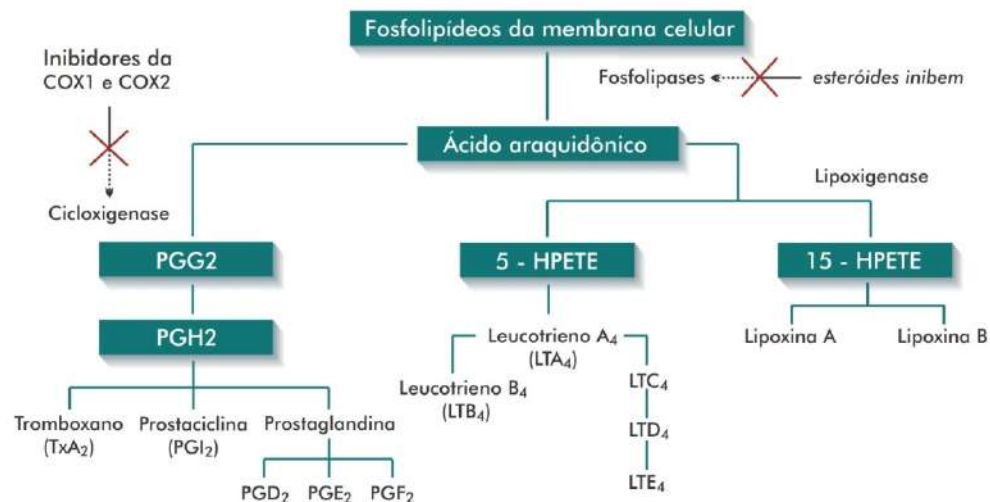


Figura 12. Metabolismo do ácido araquidônico e as vias da lipoxigenase e da ciclooxigenase (baseado em Aid e Bosetti, 2011 e Kumar e cols., 2013).

Via da ciclooxigenase (COX)

A principal enzima reguladora desta via inflamatória é a ciclooxigenase (COX) - também conhecida como prostaglandina-endoperóxido sintase (PGHS), que catalisa a conversão do AA nas PGs G2 e H2 (PGG2 E PGH2). A PGH2 é posteriormente convertida em uma variedade de eicosanóides que incluem a PGE2, a PGD2, a PGF2a, a PGI2, e o tromboxano (TX) A2. A gama de PGs produzidas varia dependendo de enzimas específicas presentes em cada célula em particular. Por exemplo, células endoteliais primariamente produzem PGI, enquanto plaquetas produzem principalmente TXA (Dubois e cols., 1998). Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) inibem a COX e, portanto, a síntese de PGs (Henry e Garner, 2003; Kumar e cols., 2013). Com novas tecnologias, como a reação da cadeia da polimerase quantitativa, a lista

de citocinas e de fatores de crescimento envolvidos no processo de cicatrização continua a crescer de forma significativa (Gurtner e Wong, 2014).

Via da lipoxigenase

A 5-lipoxigenase é a enzima predominante nos neutrófilos. Seu principal produto, o 5-HETE, o qual é quimiotático para neutrófilos, é convertido em uma família de compostos coletivamente chamados de leucotrienos. O LTDB4 é um potente agente quimiotático e causa agregação dos neutrófilos. O LTC4, o LTD4 e o LTE4 causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumentam a permeabilidade vascular (Henry e Garner, 2003; Kumar e cols., 2013)

1.2.2.2. As cicloxigenases

As COXs têm importantes funções, tanto em condições fisiológicas como nas doenças. Em 1992 descobriu-se que as COXs existem em duas isoformas distintas: a COX1 e a COX2 (Holtzman e cols., 1992). Ambas as enzimas catalisam essencialmente a mesma reação e têm estruturas proteicas similares. Porém, quase todos os tecidos normais apresentam expressão da COX1 com baixos ou indetectáveis níveis de COX2 (Fitzpatrick, 2004). Os AINEs diminuem a produção de PGs pró-inflamatórias no local de injúria tecidual (Dubois e cols., 1998).

A COX1 é produzida em resposta a estímulos inflamatórios e também é constituinte de muitos tecidos, atuando fisiologicamente na produção de PGs que servem para função homeostática (como, por exemplo, balanço de fluidos e eletrólitos nos rins e citoproteção no trato gastrointestinal). A COX1, portanto, tem papel de manutenção ou constituição e localiza-se em quase todos os tecidos em condições basais. Da observação deste tipo de padrão de

expressão tissular, seria esperado que a função maior da COX1 é prover PGs precursoras para a regulação homeostática. Um importante local de função da COX1 é nas plaquetas, onde a enzima é responsável por prover precursores para a síntese de tromboxano. Na presença de AINEs como a aspirina, as plaquetas são impedidas de gerar tromboxano durante a ativação e falham para completar com sucesso a agregação plaquetária, inibindo seu potencial trombogênico. A COX1 age em uma variedade de situações para produzir níveis de PGs homeostáticos e de manutenção (Dubois e cols., 1998; Kumar e cols., 2013).

Em contraste, a COX2 é induzida por estímulos inflamatórios, mas é ausente na grande maioria dos tecidos normais. Portanto, inibidores específicos da COX2 têm sido desenvolvidos com a expectativa de que possam inibir os danos da inflamação, mas sem bloquear os efeitos protetores das PGs constituintes. A COX2, portanto, é chamada de indutível (Dubois e cols., 1998).

Tal mecanismo explica, ao menos em parte, ambos os efeitos tóxicos e terapêuticos dos AINEs em humanos. O seu maior efeito colateral (erosão gastroduodenal e alteração da função renal normal), parece ser causado pela inibição da COX1, enquanto a atividade analgésica e anti-inflamatória destas drogas em grande parte reside na sua habilidade de inibição da COX2. Outra diferença entre a COX1 e a COX2 parece ser a sua habilidade de usar diferentes substratos. Por exemplo, em fibroblastos e células do sistema imunológico, a COX2 é capaz de utilizar o AA endógeno, enquanto a COX1 não. Um dos primeiros estudos conduzidos após a descoberta das duas isoformas da COX foi uma investigação dos AINES existentes e sua

capacidade de inibição da COX1 e da COX2. Alguns deles mostraram haver uma seletividade de 20 a 70 vezes de uma COX em comparação com a outra isoforma (DeWitt e cols., 1993; Spangler, 1996).

Algumas pesquisas avaliaram a inibição diferencial da atividade da COX1 ou da COX2 para se determinar a contribuição relativa destas isoformas sob uma variedade de condições experimentais. Enquanto estudos iniciais descobriram que a COX2 é principalmente uma enzima indutível e inflamatória, estudos mais recentes têm revelado funções adicionais. Parece haver uma atividade funcional importante também da COX2 em vários sistemas orgânicos e estados de doença. A COX2 parece também atuar na função renal, no sistema nervoso, na mucosa gastrointestinal, no ovário e na função uterina, nos ossos, nas articulações e na mediação da dor, entre outros (Williams e DuBois, 1996).

A distinção entre a função das duas enzimas, portanto, não é inteiramente exclusiva, já que a COX1 pode ser induzida ou super-regulada sob certas condições e a COX2 pode ser expressa constitutivamente em alguns órgãos como cérebro e rins (Claria, 2003).

Em 2002, demonstrou-se a existência de uma nova COX (a COX3), a qual seria sensível à ação do paracetamol e de compostos relacionados. Esta enzima seria uma variante da COX1 e em tecidos humanos seu mRNA seria expresso e abundante no córtex cerebral e no coração (Chandrasekharan e cols., 2002).

Os trabalhos sobre a distribuição das COXs na pele são escassos (Abd-El-Aleem e cols., 2001). Rossiello e cols. (2009) concluíram que, na pele

normal, a COX1 é expressa tanto na epiderme como na derme, enquanto a COX2 raramente é encontrada.

1.2.3. Desfechos da inflamação aguda

De uma forma geral, a inflamação aguda secundária à injúria tecidual pode ter 4 desfechos (Smith e cols., 2000; Kumar e cols., 2013).

1. Resolução completa: uma vez resolvido o estímulo que causou a lesão, há um reestabelecimento do local da inflamação aguda à situação normal antes da lesão. Isto é chamado de resolução, sendo usual quando o dano é limitado, por curto espaço de tempo ou quando há mínima destruição tecidual. A resolução envolve a neutralização dos mediadores químicos, com subsequente retorno da permeabilidade vascular normal, encerramento do infiltrado leucocitário, e finalmente remoção do fluído de edema e proteínas, leucócitos, corpos estranhos e debris necróticos. As células fagocitárias e os vasos linfáticos são fundamentais nesta etapa.
2. Cicatrização por substituição por tecido conjuntivo (fibrose): ocorre após dano tecidual substancial, quando a injúria inflamatória ocorre em tecidos que não regeneram, ou quando há abundante exsudação de fibrina.
3. Formação de abscesso: ocorre particularmente em infecções com organismos piogênicos.
4. Inflamação crônica: Progressão da resposta tecidual. A transição da fase aguda para crônica ocorre quando a inflamação aguda não pode ser resolvida, devido à persistência da injúria ou por alguma interferência ao processo normal de cicatrização.

A cicatrização de feridas de pele é um processo que envolve a regeneração epitelial e a formação de tecido conjuntivo. Dependendo da natureza e do tamanho da ferida, caracterizamos a cicatrização como primária ou secundária (Kumar e cols., 2013).

1.2.3.1. Cicatrização primária

O exemplo mais simples de reparo de feridas é a cicatrização de uma ferida limpa, não infectada, seguida de incisão cirúrgica, e reparada através de suturas. Tal cicatrização é descrita como união primária ou fechamento por primeira intenção. A incisão causa morte de um número limitado de células epiteliais e de tecido conjuntivo, e a interrupção da continuidade da membrana basal. O espaço da incisão imediatamente é preenchido com coágulo sanguíneo contendo fibrina.

Nas primeiras 24 horas, neutrófilos surgem nas margens da incisão, movendo-se em direção ao coágulo de fibrina. A epiderme nos bordos espessa-se como resultado da atividade mitótica das células basais. Ao longo de 24 a 48 horas, prolongamentos de células epiteliais das margens migram e crescem ao longo dos bordos da derme, depositando componentes da membrana basal. Os bordos fundem-se na linha média, produzindo uma camada epitelial contínua e fina (Henry e Garner, 2003; Diegelmann e Evans, 2004; Kumar e cols., 2013).

Os neutrófilos são substituídos por macrófagos a partir do terceiro dia, e o tecido de granulação invade o espaço da incisão. As fibras de colágeno estão agora presentes nas margens da incisão, mas inicialmente estão orientadas verticalmente e não ultrapassam a mesma. A proliferação de células epiteliais

continua, espessando a camada de cobertura epidérmica. No quinto dia, o espaço incisional é preenchido com tecido de granulação. A neovascularização é máxima neste período. As fibrilas de colágeno tornam-se mais abundantes e começam a cruzar a incisão. A epiderme recupera sua espessura e há diferenciação das células da superfície, que produzem uma epiderme com superfície queratinizada (Diegelmann e Evans, 2004; Kumar e cols., 2013).

Durante a segunda semana, há contínuo acúmulo de colágeno e proliferação de fibroblastos. O infiltrado leucocitário, o edema e o aumento da permeabilidade vascular desaparecem. Neste momento, o longo processo de clareamento começa, acompanhado pelo acúmulo aumentado de colágeno ao longo da cicatriz incisional e regressão dos canais vasculares. No final do primeiro mês, a cicatriz tem um tecido conjuntivo celular desprovido de infiltrado inflamatório, coberto por uma epiderme intacta. Os apêndices epidérmicos que foram destruídos na linha da incisão são prementemente perdidos. A força tênsil da ferida aumenta posteriormente, mas leva meses para que a área cicatrizada obtenha a máxima resistência (Kumar e cols., 2013; Gurtner e Wong, 2014; Janis e Harrison, 2016).

1.2.3.2. Cicatrização secundária

Quando há perda de células e de tecidos mais extensa, como ocorre no infarto, nas úlceras inflamatórias, na formação de abscesso, e nas feridas superficiais com defeitos largos, a reparação é mais complicada. O achado comum a estes casos é um grande defeito tecidual que precisa ser preenchido. A regeneração das células parenquimatosas não pode completamente reconstituir a arquitetura original. O tecido de granulação abundante cresce das

margens para completar o reparo. Esta forma de cicatrização é definida como secundária, ou cicatrização por segunda intenção. A cicatrização secundária difere da primária em vários aspectos (Henry e Garner, 2003; Diegelmann e Evans, 2004; Kumar e cols., 2013):

1. Grandes defeitos teciduais inicialmente têm mais fibrina, tecidos necróticos e exsudato para serem removidos. Consequentemente, a reação inflamatória é mais intensa na cicatrização secundária;
2. Quantidades maiores de tecido de granulação são formadas na cicatrização secundária;
3. O achado que mais claramente diferencia a cicatrização primária da secundária é o fenômeno de contração da ferida, o qual ocorre em grandes defeitos de feridas de superfície. Em pesquisas realizadas com coelhos, grandes defeitos na pele são reduzidos a 5 a 10% do seu tamanho original por contração, causada por miofibroblastos - fibroblastos com características ultra estruturais de células musculares lisas (Kumar e cols., 2013).

1.2.4. Síntese e degradação do colágeno

1.2.4.1. Síntese do colágeno

Um traumatismo tecidual causa lesão de um número de células epiteliais e tecido conjuntivo, assim como interrupção da continuidade da membrana epitelial basal. A cicatrização é um fenômeno complexo, que envolve a indução de inflamação aguda, regeneração de células do parênquima, migração e proliferação de células do parênquima e tecido conjuntivo, síntese de proteínas da matriz extracelular, remodelação do tecido conjuntivo e componentes do

parênquima, colagenização e reforço da ferida (Henry e Garner, 2003; Kumar e cols., 2013).

A deposição da matriz do tecido conjuntivo, em especial do colágeno, e sua remodelação em cicatriz, e aquisição de resistência são as últimas etapas da cicatrização. O produto essencial do fibroblasto, o colágeno é a proteína mais comum dos animais, fornecendo estrutura extracelular para todos os organismos multicelulares. O colágeno propicia a força tênsil para as feridas em cicatrização (Kumar e cols., 2013).

Quanto à bioquímica do colágeno, há 14 tipos. Os tipos I, II e III são os colágenos fibrilares ou intersticiais. Os tipos IV, V e VI são amorfos e estão presentes no tecido intersticial e nas membranas basais. Após a síntese nos ribossomos, cadeias alfas são submetidas a modificações enzimáticas, incluindo hidroxilação da prolina na posição alfa, dando ao colágeno sua característica de alta quantidade de hidroxiprolina. Esta hidroxilação, dependente da disponibilidade de ácido ascórbico (vitamina C), é importante para manter as três cadeias alfas juntas. Neste estágio, a molécula de procolágeno é ainda solúvel e contém um comprimento extra de polipeptídeo e C terminal nas extremidades das cadeias. Durante ou logo após a liberação pelas células, peptidases cortam as terminações das cadeias peptídicas, promovendo a formação de verdadeiras fibrilas, que no espaço extracelular propiciam força ao tecido conjuntivo. Uma modificação extracelular crítica é a oxidação lisil-hidroxilisil, já que isso resulta em ligações cruzadas entre cadeias alfa e moléculas adjacentes, sendo a base da estabilidade estrutural do colágeno. As ligações cruzadas são as maiores contribuintes para a força tênsil do colágeno. A síntese de colágeno pelos fibroblastos na cicatrização inicia-se

em torno do terceiro ao quinto dia após o traumatismo, mantendo-se por várias semanas. Isto depende do tamanho da ferida. Sua síntese é estimulada por vários fatores incluindo fatores de crescimento (PDGF, FGF e TGF-beta), e citocinas (IL-1 e IL-4), os quais são secretados por leucócitos e fibroblastos em feridas em cicatrização (Lupulescu, 1975; Matrisian, 1992; Henry e Garner, 2003; Gantwerker e Hom, 2012).

1.2.4.2. Degradação do colágeno

A rede de colágeno, no entanto, depende não somente da síntese, mas também da degradação do colágeno. Sua degradação em outras proteínas extracelulares ocorre através da ação da família de metaloproteinases, as quais são dependentes de íons de zinco para sua atividade. Estas enzimas consistem em collagenases intersticiais, que quebram o colágeno fibrilar dos tipos I, II, III; gelatinases (ou collagenases tipo IV), as quais degradam colágeno amorfo e fibronectina; estromalisinas, as quais atuam em uma variedade de componentes da matriz extracelular, incluindo proteoglicanos, laminina, fibronectina e colágenos amorfos. Estas enzimas são produzidas por vários tipos de células (fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, células sinoviais e algumas células epiteliais) e sua secreção é induzida por diversos estímulos, incluindo fatores de crescimento. Collagenases quebram o colágeno sob condições fisiológicas, quebrando a tripla hélice em dois fragmentos desiguais, os quais são então suscetíveis à degradação por outras proteases. Isto seria potencialmente danoso para o organismo. Contudo, a enzima é elaborada numa forma latente (procolagenase), a qual pode ser ativada por estímulos químicos e proteases (plasmina). Uma vez formada, a collagenase ativada pode rapidamente ser inibida por uma família de inibidores teciduais específicos de

metaloproteinase (TIMP), as quais são produzidas pela maioria das células mesenquimais. Há, portanto, múltiplas verificações contra a ação incontrolada destas proteinases. As colagenases têm um papel na degradação do colágeno no processo inflamatório e na reparação de feridas. A degradação auxilia no desbridamento dos locais traumatizados e também na remodelação do tecido conjuntivo necessário para reparar o defeito (Matrisian, 1992; Smith e cols., 2000; Monaco e Lawrence, 2003).

1.2.5. Resistência da cicatriz

As feridas cuidadosamente suturadas têm aproximadamente 70% da força de uma pele normal. Quando suturas são removidas, usualmente em torno de uma semana, a força da cicatriz é de aproximadamente 10% da mesma pele não lesada, mas aumenta rapidamente ao longo das próximas quatro semanas. Esta taxa de aumento então se torna lenta aproximadamente até os 3 meses após a incisão original e atinge o seu platô de 70 a 80% da força tênsil comparada à pele ao seu redor, e usualmente não aumenta significativamente além disso. A recuperação da força tênsil resulta da síntese de colágeno maior do que a degradação durante os dois primeiros meses e de uma modificação estrutural das fibras de colágenos (ligações cruzadas e aumento do tamanho da fibra), após a síntese de colágeno cessar nos períodos seguintes (Lupulescu, 1975; Gantwerker e Hom, 2012; Kumar e cols., 2013).

A cicatrização e a colagenização de feridas é um processo dinâmico e mutável. A primeira fase é de inflamação, seguida por um estágio de fibroplasia, remodelação tecidual e cicatriz. Diferentes mecanismos ocorrem

em diferentes tempos, acionados por sinais químicos que modulam, de forma ordenada, a migração, a proliferação, e a diferenciação de células, bem como a síntese e degradação de proteínas da matriz extracelular. Estas proteínas, por sua vez, diretamente afetam eventos celulares e modulam células com capacidade de resposta a fatores de crescimento solúveis (Bock e cols., 2005; Kumar e cols., 2013).

1.2.6. Fatores que influenciam a cicatrização

O mecanismo de reparo dos tecidos pode ser influenciado por uma grande variedade de fatores extrínsecos ou intrínsecos, interferindo na qualidade da reparação (Kumar e cols., 2013; Buck e Galiano, 2014).

A infecção é a causa mais importante de atraso na cicatrização, já que prolonga a inflamação e potencializa o aumento de injúria local (Kumar e cols., 2013). A proliferação bacteriana no sítio da lesão altera cada uma das fases da cicatrização. A hemostasia pode ser influenciada por efeito das bactérias nas plaquetas. O período de inflamação é aumentado e a função dos leucócitos alterada. A infecção também modifica a formação de tecido de granulação (Kumar e cols., 2013; Buck e Galiano, 2014).

O diabetes melito é também uma causa importante de atraso na cicatrização. Múltiplos mecanismos têm sido implicados na sua patogênese, sendo o principal a deficiência de fluxo sanguíneo e de liberação de oxigênio por doença micro e macrovascular. A hiperglicemia também modifica a função de enzimas, podendo alterar a permeabilidade e a liberação de nutrientes para o leito da ferida. Os pacientes diabéticos também são mais suscetíveis a infecções devido à disfunção imunológica (Buck e Galiano, 2014).

Entre as alterações nutricionais, a deficiência de proteínas e, especialmente, de vitamina C, cuja carência inibe a síntese de colágeno, são causas nutricionais de atraso na cicatrização (Kumar e cols., 2013).

Qualquer situação que leve a uma deficiência de perfusão interfere negativamente no processo de reparação tecidual. Fatores mecânicos, como o aumento de pressão ou de tração, podem causar abertura (deiscência) da ferida. O déficit de perfusão sanguínea (causado por arteriosclerose, diabetes, obstrução venosa ou arterial, compressão, tração ou lesão de vasos) pode impedir a cicatrização. Corpos estranhos, como, por exemplo, fragmentos de metal, vidro, ou mesmo osso, prejudicam a cicatrização. O tipo e a extensão da injúria tecidual, portanto, afeta o reparo dos tecidos (Kumar e cols., 2013). Qualquer fator que leve a redução de tensão de oxigênio é prejudicial, por causar isquemia tecidual e aumentar riscos de infecção. A vasoconstrição é danosa à cicatrização e pode ser ocasionada por dor, por frio, por medo, por nicotina, por α_1 agonistas, por β antagonistas e por hipovolemia (Buck e Galiano, 2014).

A radiação, utilizada isoladamente, ou em associação com quimioterapia, é comumente usada para tratamento de diversas neoplasias, como de mama, de próstata, de pele, de reto, e de pulmão, entre outros órgãos. Portanto, uma significativa porcentagem da população de pacientes cirúrgicos tem tratamento radioterápico concomitante. O efeito mais importante da radiação é o dano ao DNA, que em nível anatômico se caracteriza por lesão na microvasculatura, fibrose e atrofia tecidual. A radiação reduz a proliferação, a migração e a contração de fibroblastos. Estas anormalidades levam a um reparo inefetivo da ferida, epitelização mais lenta, redução da resistência tênsil,

altas taxas de infecção e deiscências da ferida (Kumar e cols., 2013; Knoetgen III e Lettieri, 2014).

O cigarro contém mais de 4000 substâncias, entre as quais principalmente a nicotina e o monóxido de carbono, que contribuem para alterar a via normal da cicatrização. A nicotina age como um vasoconstritor, resultando em isquemia local. Além disso, a nicotina aumenta a adesividade plaquetária (Janis e Harrison, 2016).

Ainda que em algumas situações os efeitos anti-inflamatórios dos corticoides são aceitos e necessários (por exemplo, em infecções da córnea os glicocorticoides são muitas vezes prescritos para reduzir o risco de opacidade resultante do depósito de colágeno), sua administração pode causar fraqueza da cicatriz, já que a inibição da produção do TGF- β e leva à diminuição da fibrose (Kumar e cols., 2013). Esteroides diminuem a inflamação, inibem a epitelização e reduzem a produção de colágeno, com aumento do risco de deiscências de sutura e de infecção, além de retardo na cicatrização.

Seria esperado que as drogas quimioterápicas afetassem extensamente a cicatrização, já que tem como alvo a produção de DNA ou RNA, a síntese proteica e a divisão celular. Entretanto, a administração de quimioterápicos, pelos trabalhos publicados atualmente, não parece trazer complicações maiores à cicatrização das feridas operatórias (Janis e Harrison, 2016).

Além disso, certas características como idade, desnutrição, uso de álcool, doenças genéticas, neoplasias, uremia e icterícia, podem também influenciar a cicatrização (Buck e Galiano, 2014).

1.3. Cicatrização patológica: cicatrizes hipertróficas e queloides

A excessiva formação de cicatrizes, embora possa ocorrer em diversos órgãos, como pulmão (fibrose pulmonar) e fígado (cirrose), costuma ser relacionada principalmente à pele (Gurtner e Wong, 2014).

O acúmulo excessivo de colágeno pode dar origem a cicatrizes com aspecto tumoral, conhecidas como cicatrizes hipertróficas e queloides (Figuras 13 e 14, respectivamente). Estas doenças fibroproliferativas podem ocorrer mesmo que inicialmente a reparação tenha iniciado de forma normal, sugerindo haver uma predisposição individual na formação dessas cicatrizes. Estes distúrbios da cicatrização cutânea permanecem pouco entendidos e ubíquos (Gurtner e Wong, 2014).



Figura 13. Cicatriz hipertrófica pós abdominoplastia (fotografia do autor).



Figura 14. Quelóide no lóbulo da orelha pós trauma por brinco (fotografia do autor).

Problemas relacionados à cicatrização, como queloides e cicatrizes hipertróficas, afetam 35 milhões de norte-americanos por ano, com um custo de 7 bilhões de dólares (Smith e cols., 2000; Tonnesen e cols., 2000). Dados demonstram que o risco de cicatrizes hipertróficas e queloides é variável dependendo da população a ser estudada. Adolescentes e adultos jovens têm incidência aumentada quando comparados com crianças e idosos (English e Shenefelt, 1999; Monaco e Lawrence, 2003; Robles e Berg, 2007). Por razões pouco conhecidas esta condição é mais comum em indivíduos de etnias afrodescendentes e orientais. Eurodescendentes e albinos têm menor incidência (Al-Attar e cols., 2006; Slemper e Kirschner, 2006; Rossiello e cols., 2009; Rabello e cols., 2014). Como a grande miscigenação dificulta o enquadramento de variadas tonalidades em classificações estáticas, a

utilização da escala de Fitzpatrick seria uma alternativa para o estudo de frequências dessas cicatrizes (Hochman, 2012).

1.3.1. Quadro clínico

Queloides e cicatrizes hipertróficas costumam surgir em torno de 30 a 120 dias após o evento inicial. Iniciam-se com espessamento da pele e vermelhidão e evoluem para a formação de cicatrizes endurecidas, ou até mesmo nódulos. Ao contrário das cicatrizes hipertróficas, os queloides têm a característica de expandir-se além dos limites do traumatismo original. Tais cicatrizes causam alterações funcionais e estéticas. Funcionalmente, podem reduzir a elasticidade da pele, causando limitações de movimentos, retrações em áreas de orifícios naturais (em especial pálpebras, boca e nariz). Retrações em áreas articulares podem causar restrição de movimentos. Outros sintomas são dor, prurido, ressecamento, fissuras, dermatites secundárias, entre outros. Com relação ao aspecto estético, com frequência os pacientes com cicatrizes em áreas expostas causam constrangimento social, com limitação na qualidade de vida (English e Shenefelt, 1999; Brissett e Sherris, 2001; Slemp e Kirschner, 2006; Furtado e cols., 2009). A faixa etária mais acometida é de pacientes entre 10 e 30 anos. Idosos raramente as desenvolvem. Esta observação é em parte atribuída ao fato de que jovens estão mais propensos ao trauma e sua pele geralmente possui mais fibras elásticas, resultando em maior tensão da cicatriz (Figura 15). Além disso, a taxa de síntese de colágeno é maior em indivíduos jovens (Rabello e cols., 2014).



Figura 15. Quelóide no ombro pós-traumatismo (fotografia do autor).

Com relação ao impacto na qualidade de vida, alguns métodos de avaliação têm sido desenvolvidos e aplicados em pacientes com quelóides e cicatrizes hipertróficas (Finlay, 1997; Halioua e cols., 2000; Bock e cols., 2005). Furtado e cols. (2009) publicaram trabalho demonstrando o uso de um questionário denominado QualiFibro com este objetivo. A diversidade de sintomas, físicos e psíquicos, e restrições na esfera social, exemplifica o sofrimento dos pacientes portadores destas cicatrizes (Figura 16) (Furtado e cols., 2009).

Anexo 1- Questionário QualiFibro/Cirurgia Plástica – UNIFESP

- Mudanças do clima afetam muito minhas cicatrizes (dor, sensação de tensão).
- Minhas cicatrizes restringem (dificultam) meus movimentos.
- Consigo ignorar o jeito com que as pessoas me olham por causa das minhas cicatrizes.
- A coceira em minhas cicatrizes me incomoda frequentemente.
- Devido às minhas cicatrizes, às vezes tenho vergonha de ser sexualmente ativo.
- Acho difícil aguentar a coceira em minhas cicatrizes.
- Faço o possível para evitar que pessoas próximas a mim saibam que tenho cicatrizes.
- Quando minhas cicatrizes coçam, não consigo ficar sem coçá-las.
- Não me sinto fisicamente atraente ou sexualmente desejável quando penso em minhas cicatrizes.
- Acho difícil aceitar minhas cicatrizes.
- Não vou à piscina ou à praia porque outras pessoas podem sentir nojo de minhas cicatrizes.
- Nunca me sinto embaraçado(a) ou envergonhado(a) por causa das minhas cicatrizes.
- Tenho menos autoconfiança por causa das minhas cicatrizes.
- Não me sinto bem quando me perguntam sobre minhas cicatrizes.
- Já pensei em cometer suicídio por causa das minhas cicatrizes.

Respostas: -5= completamente falso; -3= falso; -1= até certo ponto verdadeiro; 1= quase verdadeiro; 3= verdadeiro; 5= completamente verdadeiro

Figura 16. Questionário de avaliação de qualidade de vida em pacientes com cicatrizes (Furtado e cols., 2009).

Quanto à localização das cicatrizes, sabemos que diferentes regiões anatômicas se comportam de forma peculiar em relação à formação de cicatrizes hipertróficas e queloides. Os locais mais afetados por ordem de frequência são a região pré-esternal, ombros e dorso. A região menos afetada é a palpebral (Slemp e Kirschner, 2006). Queloides visíveis, mais frequentes no lóbulo da orelha, têm se tornado um importante problema de saúde pública (Furtado e cols., 2009).

O mecanismo do trauma que deu origem à ferida tem importante relação com a qualidade da cicatriz: traumatismos limpos, incisões realizadas a bisturi, com técnica asséptica e evolução normal tem menor potencial para formação de queloides quando comparados a ferimentos que evoluem com necroses, infecção e retardo na cicatrização. Conforme revisado previamente, tais casos são justificados por um processo inflamatório mais intenso, maior acúmulo de fibroblastos e tendência à contração da ferida (English e Shenefelt, 1999). Embora haja a descrição de famílias com vários indivíduos acometidos por queloides, sugerindo haver uma predisposição genética, não foram identificados genes específicos responsáveis pelo seu desenvolvimento (Marneros e cols., 2001).

1.3.2. Diferenciação entre cicatrizes hipertróficas e queloides

Embora não haja critérios inequívocos para diferenciação histopatológica entre as diferentes cicatrizes, Lee e cols. (2004) publicaram trabalho propondo critérios de diferenciação (Lee e cols., 2004). Queloides são caracterizados por menor celularidade e feixes de colágenos espessos, arranjados em orientações irregulares. Já as cicatrizes hipertróficas são caracterizadas por maior proliferação celular de fibroblastos, sendo que as fibras de colágenos são organizadas em nódulos que estão paralelos à epiderme. Rabello e cols. (2014) publicaram uma revisão sobre diferenças clínicas entre estas cicatrizes (Rabello e cols., 2014). O Quadro 3 sintetiza as diferenças entre queloides e cicatrizes hipertróficas.

Quadro 3. Diferenças entre queloides e cicatrizes hipertróficas

Tipo de cicatriz	Queloide	Cicatriz hipertrófica
Clínica		
Extensão	Além dos limites da lesão	Nos limites da lesão
Involução	Não regride espontaneamente	Regressão espontânea
Aspecto	Brilhante, nódulos bocelados, teleangiectasias, ulceração, epiderme fina, eventual hiperpigmentação	Vermelho ou róseo, raramente espessura maior do que 4 mm
Sintoma	Dor, prurido	Prurido
Histopatologia		
Celularidade (fibroblastos)	Menor, sem miofibroblastos	Maior celularidade
Colágeno	Feixes espessos, irregulares	Nódulos, paralelos à epiderme
Tipo de colágeno	3	1 e 3
Anexos	Não há glândulas ou folículos pilosos	Pode haver glândulas ou folículos pilosos
Fases da cicatrização	Não entram na fase de remodelação	Podem entrar na fase de remodelação

Baseado em Lee e cols., 2004; Rabello e cols., 2014.

1.3.3. Terapêutica dos queloides e das cicatrizes hipertróficas

É amplo o número de métodos descritos para a prevenção e tratamento de queloides e cicatrizes hipertróficas, na sua maioria com baixa efetividade, o que demonstra que estas doenças são pouco compreendidas. As principais alternativas, aplicadas isoladamente ou combinadas são: excisão cirúrgica, injeções ou aplicação tópica de corticoides, aplicação tópica de gel de silicone, compressões, massagens, radioterapia, crioterapia, laser de CO₂, luz intensa pulsada, 5-fluoracil, mitomicina e bleomicina. A maioria destas terapias apresenta alto índice de recidiva (Al-Attar e cols., 2006; Janis e Harrison, 2016). A excisão simples, terapia mais realizada como primeiro tratamento para os queloides, apresenta taxas de recorrência que variam de 50 a 80% (Darzi e cols., 1992).

Em caráter experimental, um estudo mostrou redução da formação de hiperplasia cicatricial com o uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) (Wilgus e cols., 2003). Corroborando com estes achados, alguns trabalhos demonstraram a influência das COXs na patogênese da cicatrização anormal, sugerindo que o seu bloqueio farmacológico poderia ser um adjuvante no tratamento (Durant e cols., 1989; Wilgus e cols., 2003; Rossiello e cols., 2009; Abdou e cols., 2013).

1.4. Cicloxigenases e sua relação com a cicatrização

Estudos têm demonstrado a expressão aumentada das COXs em cicatrizes hipertróficas e queloides. Observou-se também que alguns pacientes em uso de AINEs ou inibidores da COX2 evoluem com menor formação de cicatrizes anormais. Tais informações inferem que a atividade da COX pode

influenciar no processo destes distúrbios de cicatrização (Wilgus e cols., 2003; Rossiello e cols., 2009; Abdou e cols., 2013).

De acordo com a fisiologia da inflamação, as COXs localizam-se no retículo endoplasmático e na membrana nuclear, e catalisam a síntese de PGs a partir do AA. Estímulos inflamatórios induzem a liberação de AA da membrana celular pela indução da atividade da fosfolipase e também induzem a produção da COX2, ambas contribuindo para um aumento na quantidade da PGE2. Esta, por sua vez, em tecidos traumatizados, promove o recrutamento de células inflamatórias que liberam o fator de crescimento TGF- β (ou fator de crescimento derivado das plaquetas), estimulando a indução da matriz extracelular e ativando os fibroblastos (Talwar e cols., 1996; Henry e Garner, 2003).

Embora o papel das PGs na formação de cicatrizes não tenha sido plenamente compreendido, sabemos que as mesmas podem induzir a proliferação de fibroblastos *in vitro* e a produção de colágeno em feridas *in vivo*. Esta informação, em conjunto com o conhecimento do reparo de feridas nos fetos sem cicatrizes, sugere que as PGs e a resposta inflamatória induzida por estes mediadores controlam, ao menos em parte, a quantidade de fibrose que ocorre após o traumatismo da pele e a reparação (Lupulescu, 1975; Durant e cols., 1989; Talwar e cols., 1996).

Sabemos que lesões cutâneas produzidas no primeiro e segundo semestre de vida fetal podem evoluir sem cicatrizes, ou seja, regenerando a pele normal, incluindo o crescimento de anexos cutâneos. É importante salientar que este fenômeno de cura sem cicatrizes na pele ocorre na ausência

de processo inflamatório. Embora o exato mecanismo pelo qual isso ocorra não seja compreendido, fica claro que a fase inflamatória do reparo de feridas leva à produção de tecido cicatricial e influencia a qualidade da nova pele da área traumatizada. A indução da COX2 é uma das primeiras respostas ao estímulo inflamatório, catalisando a conversão do AA em PG (Lupulescu, 1975; Smith e cols., 2000; Wilgus e cols., 2004).

A identificação das diferenças entre o processo que ocorre no feto e no adulto pode auxiliar no estudo dos fatores que promovem a geração de tecido cicatricial. Considerando-se que a via da COX2 é um componente da inflamação, Wilgus e cols. (2004), investigaram o seu papel no processo de reparo fetal, usando um modelo murino de cicatrização fetal. A expressão da COX2 em feridas fetais com fibrose e sem cicatrizes foi examinada. Também a capacidade da PGE2 exógena de alterar a cicatrização fetal foi avaliada. Os resultados sugerem que a via da COX2 está envolvida na produção de cicatrizes em pele fetal e que tratamentos direcionados ao bloqueio da COX2 poderiam ser úteis para limitar a formação de cicatrizes em pele de adultos.

Estudando a expressão de genes relacionados às COXs, Kossi e cols. (2001) observaram diferentes expressões dos genes para a COX1 e COX2 em cicatrizes normais e anormais.

Wilgus e cols. (2003) demonstraram a redução de cicatrizes com aplicação tópica de celecoxib, um bloqueador da COX2. Em laboratório, estudando ratos (dois grupos com nove cada), realizaram incisões no dorso dos animais, seguido de suturas e aplicação tópica de celecoxib num grupo ou veículo no grupo controle. Agudamente, o celecoxib inibiu vários parâmetros de inflamação no local da ferida. A redução da atividade inflamatória inicial

repercutiu em efeitos significativos tardios no processo de cicatrização, como redução do tecido de cicatrização, sem prejuízo na re-epitelização ou redução na força tênsil. Os autores sugeriram que, na ausência de infecção, feridas de indivíduos adultos podem ter uma redução da fase inflamatória e que drogas anti-inflamatórias podem melhorar o processo de reparo, limitando a formação de cicatrizes.

Rossiello e cols. (2009) estudaram 36 casos de pacientes com queloides, 32 casos de cicatrizes hipertróficas e 25 casos de pele normal, com o objetivo de definir a localização e a expressão da COX1 e da COX2 nestas cicatrizes e na epiderme sobrejacente. Os resultados mostraram que houve uma expressão aumentada da COX1 em cicatrizes hipertróficas e na epiderme sobrejacente, quando comparada à pele normal e a queloides. Também observaram uma expressão aumentada de COX2 em queloides e a epiderme sobrejacente comparada com pele normal e cicatrizes hipertróficas. Os autores concluíram que seus dados suportam a hipótese de que ambas as COXs estão envolvidas na patogênese da cicatrização em diferentes vias. Particularmente a COX1 pode estar envolvida na formação de cicatrizes hipertróficas, e a COX2, na formação de queloides. Ainda, a expressão aumentada da COX1 e da COX2 na epiderme sobrejacente de cicatrizes hipertróficas e queloides, respectivamente, denota a importância da interação entre tecidos de origem epitelial e mesenquimal na patogênese das cicatrizes.

Abdou e cols. (2013) avaliaram o padrão e localização da COX1 e COX2 em cicatrizes. Os autores estudaram 40 pacientes (15 com cicatrizes hipertróficas, 15 com queloides e 10 com cicatrizes normais). O grupo designado controle (de cicatrizes normais) foi composto por 10 casos

recuperados de arquivos do departamento de patologia (casos retrospectivos). O diagnóstico das cicatrizes foi realizado através de critérios clínicos e histopatológicos. A imunorreatividade foi avaliada como positiva ou negativa. Os autores consideraram como positiva quando a expressão em qualquer porcentagem fosse identificada. A expressão foi avaliada na epiderme e na derme (fibroblastos, células endoteliais e inflamatórias). A intensidade da expressão da COX1 e da COX2 foi avaliada subjetivamente como leve, moderada e forte. Foram obtidos os seguintes resultados: em cicatrizes normais, observou-se uma expressão da COX1 em 40% dos casos. Esta expressão foi vista apenas na epiderme, com ausência de expressão na derme. A expressão da COX2 foi observada em 100% dos casos da epiderme e em 30% dos casos na derme. Avaliando cicatrizes hipertróficas, a COX1 se expressou em 53% dos casos, principalmente na epiderme, com esparsa positividade na derme subjacente. Já a COX2 foi expressa em 73,7% dos casos, principalmente na epiderme, com ocasional concomitância em células endoteliais da derme. Em relação aos queloides, a COX1 teve expressão em 100% dos casos, principalmente na epiderme. Já a COX2 se expressou em 86,7% dos casos. Como conclusão, comparando-se as expressões da COX1 nas cicatrizes normais, hipertróficas e queloides (40%, 53,3% e 100%, respectivamente), a diferença observada foi estatisticamente significativa. Agrupando-se as cicatrizes hipertróficas e queloides, e comparando-se com cicatrizes normais, a diferença de expressão da COX1 também foi significativa. Em relação à expressão da COX2, não houve diferença significativa em qualquer comparação realizada.

Apenas um estudo publicado na literatura considera que os AINEs inibidores específicos da COX2 poderiam exacerbar a formação de cicatrizes anormais, já que reduzem a produção da PGE2, especialmente quando usados no período final da fase proliferativa (Su e cols., 2010).

Mesmo havendo uma tendência dos estudos demonstrarem uma relação positiva entre a expressão aumentada das COXs e a formação de cicatrizes hipertróficas e queloides, os dados não são conclusivos. Novas pesquisas são necessárias para uma melhor determinação da influência das COXs no processo de cicatrização anormal.

1.5 Referências bibliográficas

Abd-El-Aleem SA, Ferguson MW, Appleton I, Bhowmick A, McCollum CN, Ireland GW. Expression of cyclooxygenase isoforms in normal human skin and chronic venous ulcers. *J Pathol*. 2001;195(5):616-23.

Abdel Hay R, Shalaby K, Zaher H, Hafez V, Chi CC, Dimitri S, et al. Interventions for acne scars. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;4:CD011946.

Abdou AG, Maraee AH, Saif HF. Immunohistochemical evaluation of COX-1 and COX-2 expression in keloid and hypertrophic scar. *The American Journal of dermatopathology*. 2013;36(4):311-7.

Aid S, Bosetti F. Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: Therapeutic implications. *Biochimie*. 2011;93(1):46-51.

Al-Attar A, Mess S, Thomassen JM, Kauffman CL, Davison SP. Keloid pathogenesis and treatment. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2006;117(1):286-300.

Bock O, Yu H, Zitron S, Bayat A, Ferguson MW, Mrowietz U. Studies of transforming growth factors beta 1-3 and their receptors I and II in fibroblast of keloids and hypertrophic scars. *Acta dermato-venereologica*. 2005;85(3):216-20.

Bombaro KM, Engrav LH, Carrougher GJ, Wiechman SA, Faucher L, Costa BA, et al. What is the prevalence of hypertrophic scarring following burns? *Burns*. 2003;29(4):299-302.

Brissett AE, Sherris DA. Scar contractures, hypertrophic scars, and keloids. *Facial Plast Surg*. 2001;17(4):263-72.

Buck DW, Galiano RD. Wound care. In: Thorne C, editor. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. 7th ed, 2014.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(21):13926-31.

Claria J. Cyclooxygenase-2 biology. *Curr Pharm Des*. 2003;9(27):2177-90.

Darzi MA, Chowdri NA, Kaul SK, Khan M. Evaluation of various methods of treating keloids and hypertrophic scars: a 10-year follow-up study. *Br J Plast Surg*. 1992;45(5):374-9.

DeWitt DL, Meade EA, Smith WL. PGH synthase isoenzyme selectivity: the potential for safer nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am J Med*. 1993;95(2A):40S-4S.

Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*. 2004;9:283-9.

Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*. 1998;12(12):1063-73.

Durant S, Duval D, Homo-Delarche F. Effect of exogenous prostaglandins and nonsteroidal anti-inflammatory agents on prostaglandin secretion and proliferation of mouse embryo fibroblasts in culture. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. 1989;38(1):1-8.

English RS, Shenefelt PD. Keloids and hypertrophic scars. *Dermatol Surg*. 1999;25(8):631-8.

Finlay AY. Quality of life measurement in dermatology: a practical guide. *Br J Dermatol*. 1997;136(3):305-14.

Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. *Curr Pharm Des*. 2004;10(6):577-88.

Freuschle A, Brom J, Hormann K, Schultz JD. [Functional and aesthetic therapy concepts of keloids in the head- and neck area]. *Laryngorhinootologie*. 2014;93(5):309-15.

Furtado F, Hochman B, Ferrara SF, Dini GM, Nunes JM, Juliano Y, et al. What factors affect the quality of life of patients with keloids? *Rev Assoc Med Bras*. 2009;55(6):700-4.

Furtado F, Hochman B, Farber PL, Muller MC, Hayashi LF, Ferreira LM. Psychological stress as a risk factor for postoperative keloid recurrence. *J Psychosom Res*. 2012;72(4):282-7.

Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Clinics in plastic surgery*. 2012;39(1):85-97.

Gurtner GC, Wong VW. Wound healing: normal and abnormal. In: Thorne C, editor. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. 7th ed, 2014.

Halioua B, Beumont MG, Lunel F. Quality of life in dermatology. *Int J Dermatol*. 2000;39(11):801-6.

Henry G, Garner WL. Inflammatory mediators in wound healing. *The Surgical clinics of North America*. 2003;83(3):483-507.

Hochman B, Nahas FX, Sobral CS, Arias V, Locali RF, Juliano Y, et al. Nerve fibres: a possible role in keloid pathogenesis. *Br J Dermatol*. 2008;158(3):651-2.

Hochman B, Farkas CB, Isoldi FC, Ferrara SF, Furtado F, Ferreira LM. Keloid and hypertrophic scar distribution according to Fitzpatrick skin phototypes. *Rev Bras Cir Plast*. 2012;27(2):185-9.

Hochman B, Isoldi FC, Furtado F, Ferreira LM. New approach to the understanding of keloid: psychoneuroimmune-endocrine aspects. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2015;8:67-73.

Holtzman MJ, Turk J, Shornick LP. Identification of a pharmacologically distinct prostaglandin H synthase in cultured epithelial cells. *J Biol Chem*. 1992;267(30):21438-45.

Huang C, Akaishi S, Hyakusoku H, Ogawa R. Are keloid and hypertrophic scar different forms of the same disorder? A fibroproliferative skin disorder hypothesis based on keloid findings. *International Wound Journal*. 2014;11(5):517-22.

Janis JE, Harrison B. Wound Healing: Part I. Basic Science. Plastic and reconstructive surgery. 2016;138(3 Suppl):9S-17S.

Knoetgen III J, Lettieri SC. Radiation and radiation injuries. In: Thorne C, editor. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*, 7th ed, 2014.

Kossi J, Peltonen J, Uotila P, Laato M. Differential effects of hexoses and sucrose, and platelet-derived growth factor isoforms on cyclooxygenase-1 and -2 mRNA expression in keloid, hypertrophic scar and granulation tissue fibroblasts. *Arch Dermatol Res*. 2001;293(3):126-32.

Kumar V, Abbas A, Aster J. Inflammation and repair. *Robins Basic Pathology*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013.

Lee JY, Yang CC, Chao SC, Wong TW. Histopathological differential diagnosis of keloid and hypertrophic scar. *The American Journal of dermatopathology*. 2004;26(5):379-84.

Louw L. The keloid phenomenon: progress toward a solution. *Clin Anat*. 2007;20(1):3-14.

Lupulescu A. Effect of prostaglandins on protein, RNA, DNA and collagen synthesis in experimental wounds. *Prostaglandins*. 1975;10(4):573-9.

Marnieros AG, Norris JE, Olsen BR, Reichenberger E. Clinical genetics of familial keloids. *Archives of dermatology*. 2001;137(11):1429-34.

Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays*. 1992;14(7):455-63.

Monaco JL, Lawrence WT. Acute wound healing an overview. *Clinics in plastic surgery*. 2003;30(1):1-12.

Monstrey S, Middelkoop E, Vranckx JJ, Bassetto F, Ziegler UE, Meaume S, et al. Updated scar management practical guidelines: non-invasive and invasive measures. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2014;67(8):1017-25.

Rabello FB, Souza CD, Farina Junior JA. Update on hypertrophic scar treatment. *Clinics (São Paulo)*. 2014;69(8):565-73.

Robles DT, Berg D. Abnormal wound healing: keloids. *Clinics in dermatology*. 2007;25(1):26-32.

Rossiello L, D'Andrea F, Grella R, Signoriello G, Abbondanza C, De Rosa C, et al. Differential expression of cyclooxygenases in hypertrophic scar and keloid tissues. *Wound Repair Regen*. 2009;17(5):750-7.

Sakuraba M, Takahashi N, Akahoshi T, Miyasaka Y, Suzuki K. Experience of silicone gel sheets for patients with keloid scars after median sternotomy. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;58(9):467-70.

Slemp AE, Kirschner RE. Keloids and scars: a review of keloids and scars, their pathogenesis, risk factors, and management. *Curr Opin Pediatr*. 2006;18(4):396-402.

Smith PD, Kuhn MA, Franz MG, Wachtel TL, Wright TE, Robson MC. Initiating the inflammatory phase of incisional healing prior to tissue injury. *The Journal of surgical research*. 2000;92(1):11-7.

Spangler RS. Cyclooxygenase 1 and 2 in rheumatic disease: implications for nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy. *Semin Arthritis Rheum*. 1996;26(1):435-46.

Su WH, Cheng MH, Lee WL, Tsou TS, Chang WH, Chen CS, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for wounds: pain relief or excessive scar formation? *Mediators Inflamm*. 2010;2010:413238.

Talwar M, Moyana TN, Bharadwaj B, Tan LK. The effect of a synthetic analogue of prostaglandin E2 on wound healing in rats. *Annals of clinical and laboratory science*. 1996;26(5):451-7.

Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc*. 2000;5(1):40-6.

Wilgus TA, Vodovotz Y, Vittadini E, Clubbs EA, Oberyszyn TM. Reduction of scar formation in full-thickness wounds with topical celecoxib treatment. *Wound Repair Regen*. 2003;11(1):25-34.

Wilgus TA, Bergdall VK, Tober KL, Hill KJ, Mitra S, Flavahan NA, et al. The impact of cyclooxygenase-2 mediated inflammation on scarless fetal wound healing. *Am J Pathol*. 2004;165(3):753-61.

Williams CS, DuBois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol*. 1996;270(3 Pt 1):G393-400.

Young WG, Worsham MJ, Joseph CL, Divine GW, Jones LR. Incidence of keloid and risk factors following head and neck surgery. *JAMA Facial Plast Surg*. 2014;16(5):379-80.

Yu H, Bock O, Bayat A, Ferguson MW, Mrowietz U. Decreased expression of inhibitory SMAD6 and SMAD7 in keloid scarring. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2006;59(3):221-9.

Zhou H, You C, Wang X, Jin R, Wu P, Li Q, et al. The progress and challenges for dermal regeneration in tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2017;105(4):1208-18.

2. Objetivos

Determinar e comparar a expressão imuno-histoquímica das cicloxigenases 1 e 2 em cicatrizes normais, hipertróficas e queloides.

3. Artigo científico redigido em inglês

**“Immunohistochemical expression of cyclooxygenases in
hypertrophic scars and keloids”**

Michel Pavelecini

Cláudio Galleano Zettler

Pedro Bins Ely

Marilda Cruz Fernandes

Enviado para publicação na Revista Plastic and Reconstructive Surgery

“Immunohistochemical expression of cyclooxygenases in hypertrophic scars and keloids”

Author list: Michel Pavelecini, MD¹; Cláudio G. Zettler, MD²; Marilda da C. Fernandes, MD³; Pedro B. Ely, MD⁴;

1. Michel Pavelecini, MD, MSc. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil;
2. Cláudio G. Zettler, MD, MSc, PhD. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil;
3. Marilda da C. Fernandes, MSc, PhD. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil;
4. Pedro B. Ely, MD, MSc, PhD. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil;

Corresponding author:

Michel Pavelecini, MD. Rua Nicola Mathias Falci, 151/1518, Porto Alegre, RS, Brazil.
michelplastico@yahoo.com.br

ABSTRACT

Background: There are studies demonstrating an increased expression of cyclooxygenase (COX) in keloids and hypertrophic scars (HS), suggesting that antiinflammatory drugs could be used in their treatment. However, a precise relationship between COX and pathological scarring has not been established in the literature yet. This study aims to evaluate the immunohistochemical expression of COXs in these scars.

Methods: Prospective, case-control study, including 54 patients (aged 18 to 60 years) undergoing scar excision: 18 normal scars (group 1), 18 hypertrophic scar (group 2) and 18 keloids (group 3). The groups classification was performed by clinical criteria. Scars samples were collected and anatomopathological examination (through hematoxylin-eosin method) was performed to confirm the scar type. Immunohistochemistry was performed to assess the expression of COX1 and COX2 in epidermis and dermis. Results were compared among all groups and between group I vs. II and III together (abnormal scars).

Results: For COX1, in the epidermis, there was no significant difference in the immunohistochemical expression when comparing the three groups. In the dermis, groups 2 and 3 had greater expression than group 1, with a significant difference being found when comparing all groups ($p=0.014$), and in the comparison between normal versus abnormal scars ($p=0.004$). For COX2 there was no significant difference between the groups in both the epidermis and dermis.

Conclusions: The immunohistochemical expression of COX1 was greater in the dermis of abnormal scars when compared to normal scars. Future studies can be performed involving COX blockade as a perspective of these scars treatment.

Introduction

Keloids and hypertrophic scars (HS) are disorders characterized by excessive accumulation of extracellular matrix produced by fibroblasts (1, 2). These scars cause itching, pain, functional limitations, aesthetic changes, social embarrassment and psychological problems, in addition to significant financial costs (3-6). Keloids and HS occur more often in dark-skinned individuals (4, 7). However, the vast miscegenation hinders the inclusion of the various skin tones into static classifications; therefore the Fitzpatrick scale would be an alternative for the study of the frequency of these scars (8, 9).

Pathologic scars can occur following any cutaneous lesions, including trauma, inflammation, and surgical incisions. In certain medical specialties such as thoracic surgery, general surgery, gynecology, head and neck surgery and dermatology they represent frequent complications as a result of invasive procedures (4, 10-12). However, plastic surgery presents the greatest problems with keloids and HS, as the scar itself is an integral part of the outcome of the performed treatments. In addition to the aesthetic and functional disorders, these complications lead to lawsuits, resulting from dissatisfaction with the outcome obtained.

Keloids are often confused with HS. Clinically, HS do not extend the lesion's border, often regress and have a better prognosis than the keloids (8). Although there is no exact criteria for its histopathological differentiation, keloids have less cellularity and thick collagen bundles with irregular patterns, whereas the HS have more fibroblast proliferation and collagen fibers in nodules parallel to the epidermis (13, 14).

Historically, the healing is divided into three phases: inflammation, proliferation and remodeling (15, 16). Some authors (17) divide it into four (initial phase of hemostasis) and others divide it into five, including a contraction phase before remodeling (18). The inflammatory phase serves to remove devitalized tissue and prevent infection. The immediate response to tissue damage occurs with acute inflammation, while the vascular phenomena facilitate the action of the antibodies and leukocytes. The derivatives of arachidonic acid (AA), mainly prostaglandins (PGs) and leukotrienes, play a fundamental role in this process

(19). The metabolism of the AA follows the pathway indicated by the enzyme that initiates its reaction: cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (20, 21) (Figure 1). COX, also known as prostaglandin-endoperoxide synthase (PGHS), located in the endoplasmic reticulum and nuclear membrane, catalyzes the conversion of AA into prostaglandins G₂ and H₂. The PGH₂ is then converted into eicosanoids, such as PGE₂, PGD₂, PGF_{2a}, PGI₂ and thromboxane A₂. PGE₂ promotes the recruitment of inflammatory cells, which release TGF β , activating the fibroblasts and inducing the production of the extracellular matrix (19, 22). The non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit COX and therefore the synthesis of PGs (19, 20).

There are at least two COX isoforms: COX1 and COX2 (23). Both catalyze the same reaction. However, almost all normal tissues show an expression of COX1, which has a mainly homeostatic function, and low levels of COX2 (24, 25). COX2 is mainly induced by inflammatory stimuli. Therefore, specific inhibitors of COX2 have been developed to inhibit inflammation without blocking the protective effects of the constituent PGs. Studies on the distribution of COXs in skin are scarce. Rossiello et al. (2009) concluded that in normal skin COX1 is expressed both in the epidermis and the dermis, while COX2 is rarely found (7).

Several methods are described as treatment of pathologic scars, such as: compression, massage, excision, topical or injectable corticosteroids, silicone gel, radiotherapy, cryotherapy, CO₂ laser, intense pulsed light, 5-fluorouracil, mitomycin, bleomycin and antihistamines. Most of these therapies have a high recurrence rate (3, 5, 17). Studies have suggested that pharmacological blockade of COX could be an adjuvant in the treatment of pathological scars (7, 26, 27). An experimental study showed a 50% reduction in PGE₂ levels in wound healing with the application of celecoxib, with less scar tissue formation (27). It was also demonstrated that the immunohistochemical (IHC) expression of COXs in HS and keloids is greater than in normal scars. Kossi et al. found different *COX1* and *COX2* gene expressions in normal and abnormal scars (28). Therefore, COX activity may influence scar formation (7, 26, 27).

The objective of this study is to compare the IHC expression of COXs in normal scars, HS and keloids.

Methodology

A prospective case-control study was conducted at the *Universidade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre* (UFCSPA), Rio Grande do Sul, Brazil. Fifty-four (54) consecutive patients (aged 18 to 60 years) were included and underwent excision of scars (18 normal, 18 hypertrophic and 18 keloids) in the period from 03/01/2014 to 12/01/2015. The participants signed an informed consent form, which was approved along with the study, by the Research Ethics Committee UFCSPA, registered under number 24680913.3.0000.5345.

The excision of the scars was performed on an outpatient basis under local anesthesia with 2% lidocaine with epinephrine (1:200,000 - Xylestesin, from the brand Cristália). Fragments of the scars were collected and immediately stored in a 10% buffered formalin solution. Two examinations were performed:

1. Anatomopathological examination: hematoxylin-eosin (HE), to differentiate keloids, HS and normal scars (Figure 2).
2. IHC examination, to assess and quantify the expression of COX1 and COX2 in skin samples.

The examinations were performed in the Research Laboratory of the Postgraduate Program in Pathology at UFCSPA. The inclusion in the groups was performed according to the type of scar, by the clinical criteria (Table 1) confirmed by the anatomopathological examination (3, 6, 13, 14): Group I: normal scars. Group II: HS. Group III: keloids. The clinical data collected were: age, sex, skin type, cause, time and location of the scar. Based on other studies, we opt to subdivide patients according to the Fitzpatrick scale, rather than classifying them by ethnicity or race (8, 9).

Immunohistochemistry technique (IHC)

The IHC technique for COX1 and COX2 was performed according to the standard routines of the Research Laboratory of the Post-Graduate Pathology

Program at UFCSPA (29). Tissue samples were embedded in paraffin. Histological sections 4µm-thick were mounted on silanized glass slides, dried in an oven for 60 minutes at 60°C, then left overnight at room temperature. The following day, they were deparaffinized in xylene and rehydrated in alcohol. The slides were placed in a 0.01M citric acid buffer (pH 6.0), with antigen retrieval being performed in a water bath (94°C, 40 minutes). The endogenous peroxidase was blocked with 95 mL of methanol plus 5 mL of 3% hydrogen peroxide solution. The preparation was washed with distilled water and a PBS solution. Bovine serum albumin was used to block the binding of nonspecific protein. Primary antibodies COX1 and COX2 were incubated overnight at 4°C in a dark humid chamber. During the following day, revelation was performed with the streptavidin-biotin peroxidase method. The reactions developed in a diaminobenzidine solution (DAB) and then counterstained for one minute in hematoxylin. Positive and negative controls were carried out in each round of coloring. Antibodies used: COX1: Clone RPR5866 from Abcam. As a positive control, human skin was used (dilution 1/200). COX2: Clone SP21 from Abcam. Positive Control - Breast carcinoma (dilution 1/50). Secondary and tertiary antibody kit - universal Vectastain - Elite ABC kit.

The slides were analyzed using the Olympus BX51 microscope (Olympus DP72-optical), digitized with Olympus DP2-BSW-Olympus 2.2 software (Figure 3). For each slide at high magnification, 5 fields were randomly chosen for the epidermis and 5 for the dermis, containing images of good quality (Figure 4). The percentage of positive cells was determined by counting 100 cells. It was considered a positive IHC expression when at least 30% of cells presented moderate to strong nuclear immunoreactivity.

Data Analysis

The data was analyzed with the software SPSS-22.0-IBM, by a professional statistician in the department of research support at UFCSPA. Values of $P \leq 0.05$ were considered statistically significant. The analysis consisted of comparison between groups with respect to age, sex, skin type, cause, time and location of the scar. The variables age and time with scar were analyzed using the ANOVA test and the remaining variables by the χ^2 test. For

COX1 and COX2, a comparison of the IHC expression at epidermis and dermis was performed between the groups I, II and III. Another analysis was performed comparing group I with pathological scars (groups II and III together). Statistical analysis was performed using Fisher's exact test.

Results

The distribution of the patients by age, sex, location of the scar, cause of the scar, time of the scar, and Fitzpatrick phototype can be seen in Table 2. The mean age of the patients obtained for group III (keloids), was significantly lower than in the other groups. No difference was obtained between the groups in relation to the time with scar. Group III had the highest concentration of the male gender. Regarding the cause of the scars, cases of inflammatory origin (acne) only occurring in the group of patients with keloids. Normal and HS occurred more in the torso, while keloids more in the face, because this group including a significant number of keloids in the earlobes. Regarding skin phototype, the groups of patients with Fitzpatrick I-II and III-IV presented more normal scars and HS than the V-VI types that had greater number of keloids.

The classification of the cases into the groups, initially based on the clinical criteria, was confirmed by HE staining in all cases (Figures 5 and 6).

The results of the IHC expression of the COXs are seen in Tables 2 and 3 and charts of Figures 7 through 12.

Table 2 shows the results of the comparison of the IHC expression of the COX1 in the epidermis and dermis between all groups and between group 1 (normal scars) and groups 2 and 3 together (pathological scarring). There was no significant difference in the expression of COX1 in the epidermis in any comparison. In the dermis, however, a significant difference was obtained both in the comparison among all the groups ($p = 0.014$) as well as in the comparison between normal and pathological scars ($p = 0.004$): groups 2 and 3 had more cases with a positive expression of COX1 when compared to normal scars. Figures 13 and 14 show IHC reaction with a positive expression of COX1 in the epidermis and dermis respectively.

Table 3 shows the results of the comparison of the IHC expression of the COX2 in the epidermis and dermis among all groups and between group 1 and groups 2 and 3 together. There was no statistical difference in the COX2 expression in any comparison, whether in the epidermis or the dermis. In the comparison between group 1 and groups 2 and 3 together, the data suggest a tendency towards greater positivity in the COX2 expression in the dermis for groups 2 and 3, although with $p=0.081$, not being significant according to the proposed methodology. Figure 15 shows negative IHC expression for COX2 in both epidermis and dermis of keloid scar.

Additional information about the COX1 and COX2 distribution pattern in the dermis and epidermis in the intra-group comparison were also analyzed (Charts in figures 11 and 12). In the epidermis, a positive COX1 expression was greater than that of COX2 in all types of scars. In the dermis, however, there was no significant difference between the COX1 and COX2 expression, in any comparison.

Discussion

The pathogenesis of keloids and HS is not fully understood. Alterations in growth factor regulation, failure in collagen remodeling, genetic disorders and immunological dysfunctions have been implicated (3). Other causes may be endocrine and neural factors. Psychiatric diseases could also be involved (8, 30, 31), which could explain the spontaneous emergence of these scars in some individuals (Figure 16).

Although the role of PGs in healing is not definitely established, it is known that they can induce the *in vitro* proliferation of fibroblasts and collagen production in wounds, *in vivo*. Knowledge of wound healing without scars in fetuses suggests that the PGs and the respective inflammatory response induced control, at least in part, of the amount of fibrosis formed after skin injury and repair (22, 32, 33). Skin lesions produced in the first and second halves of fetal life can evolve without scars, with regeneration of normal skin, including the growth of skin appendages. It is noteworthy that this phenomenon of healing without scars occurs in the absence of inflammation. It is assumed, therefore, that the inflammatory phase of wound repair results in the production of scar

tissue (33-35). Wilgus et al. (2004) assessed fetal healing in mice. The COX2 expression and the ability of exogenous PGE2 to alter the wound healing was examined. The authors concluded that the COX2 pathway is involved in fetal wound healing and treatments targeted at its blockade could limit the formation of skin scars in adults (35). The same authors demonstrated scar reduction in mice with the topical administration of a COX2 blocker. Celecoxib inhibited various parameters of inflammation at the wound site, leading to the reduction of scar tissue. The authors suggested that adult wounds could have a reduction in the inflammatory stage and that NSAIDs could improve the healing process (27). It is important to reiterate that keloids occur exclusively in humans (3, 8) and therefore the results of this study, conducted on mice, could not be safely extrapolated to our species. In our study, the IHC expression of COX2 was not significantly different between the groups and we could infer that the topical application of COX2 blocker may not be beneficial in the treatment of these scars.

Similar to our study, Abdou et al. evaluated the pattern and location of COX1 and COX2 in scars (26). Forty patients were included (15 HS, 15 keloids and 10 normal scars). The immunoreactivity was considered positive when any expression was identified. The intensity of expression was evaluated subjectively as light, moderate or strong. The difference in the COX1 expressions in normal scars, HS and keloids (40%, 53.3% and 100%, respectively) was statistically significant. There was no significant difference in any comparison in the COX2 expression. These data are similar to those obtained in our study. It is relevant to point out that in the research of Abdou et al., the group of normal scars was composed of 10 cases retrieved from the pathology department's files. It is known that IHC reaction is sensitive to a vast number factors, including the solution's buffering method for the preservation of the tissue sample (36). Conversely, in our study all samples of skin were handled and processed by the same methodology, in an effort to minimize errors. Another difference between our study and that of Abdou is that they performed the cell count including fibroblasts, endothelial cells and inflammatory cells (26). We chose to disregard the vascular endothelium cell count as our

goal was to evaluate only the cell responsible for the fibroplasia, the fibroblast (Figure 17).

In our study, although we observed greater IHC expression of COX1 in pathological scars if compared to normal scars, we did not identify significant differences between keloids and HS. In turn, Rossiello et al. found differences in this comparison. They studied 36 cases of patients with keloids, 32 cases of HS and 25 cases of normal skin, aiming to define the location and expression of COX1 and COX2. The results showed an increased expression of COX1 in HS when compared to normal skin and keloids and an increased expression of COX2 in keloids when compared to normal skin and HS. The authors concluded that COX1 is involved in the formation of HS and COX2 in the formation of keloids (7). In this study, the cases of pathological scars were compared to normal skin, rather than normal scars, as carried out in our study.

Only one study published in the literature considers that the NSAIDs, inhibitors of COX2, could, by reducing PGE2 production, exacerbate the formation of excessive scarring, especially when used in the final period of the proliferative phase (37).

We believe that some variables could influence the results of studies. The IHC reaction comprises diverse and complex processes at all stages, and therefore with potential errors. Without standardization, the technique can result in non-reproducible and unreliable data. The methodology used for evaluating the intensity of the IHC expression is critical. In addition to the technical details involved with its execution, the variety of criteria adopted as the cutoff for positivity can make studies incomparable (38). Other factors that could influence the results would be the inherent difficulty to categorize the patients in the groups. In our study, patients were included consecutively, according to the type of scar, disregarding of other variables. The group of patients with keloids had lower mean age and higher concentration of men than other groups, since it included a higher number of post traumatic scars, more prevalent in this population range. The highest concentration of patients with keloids and HS in patients with Fitzpatrick III-VI phototypes is compatible with the frequency described for these diseases. In agreement with our findings, in the study

performed by Abdou (2013), the distribution of the patients in groups was also unequal in relation to the mean age and the cause of the scars. Patients with normal scars had the surgical incisions as their main cause, while HS keloids are predominantly caused by trauma or burns (26). The study of Rossiello (2009) did not describe the characteristics of the groups and therefore did not analyze their possible differences (7).

Even though there is a tendency in the studies to show a positive relationship between the increased expression of the COXs and the HS and keloids, the data are not conclusive. In general, the inducible COX2, is known to be involved in pathological processes, whereas COX1 is in physiological processes. However, in our study, the enzyme that was shown to have the greatest expression in pathological scars was COX1. The number of studies is small with heterogeneous results and difficult to compare. New researches could even use alternative methods for the IHC reaction. Although it is not possible to precisely qualify and quantify the relationship between COX and scarring, their expressions are not the same in the different types of scars, demonstrating that there is certain influence of them in this process.

References

1. Louw, L. The keloid phenomenon: progress toward a solution. *Clinical anatomy (New York, NY)* 2007;20:3-14.
2. Yu, H., Bock, O., Bayat, A., Ferguson, M. W., Mrowietz, U. Decreased expression of inhibitory SMAD6 and SMAD7 in keloid scarring. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2006;59:221-229.
3. Al-Attar, A., Mess, S., Thomassen, J. M., Kauffman, C. L., Davison, S. P. Keloid pathogenesis and treatment. *Plastic and reconstructive surgery* 2006;117:286-300.
4. Furtado, F., Hochman, B., Ferrara, S. F., et al. What factors affect the quality of life of patients with keloids? *Rev Assoc Med Bras* 2009;55:700-704.
5. Monstrey, S., Middelkoop, E., Vranckx, J. J., et al. Updated scar management practical guidelines: non-invasive and invasive measures. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2014;67:1017-1025.
6. Rabello, F. B., Souza, C. D., Farina Junior, J. A. Update on hypertrophic scar treatment. *Clinics (São Paulo)* 2014;69:565-573.
7. Rossiello, L., D'Andrea, F., Grella, R., et al. Differential expression of cyclooxygenases in hypertrophic scar and keloid tissues. *Wound Repair Regen* 2009;17:750-757.
8. Hochman, B., Farkas, C. B., Isoldi, F. C., Ferrara, S. F., Furtado, F., Ferreira, L. M. Keloid and hypertrophic scar distribution according to Fitzpatrick skin phototypes. *Rev Bras Cir Plast* 2012;27:4.
9. van Leeuwen, M. C., van der Wal, M. B., Bulstra, A. E., et al. Intralesional cryotherapy for treatment of keloid scars: a prospective study. *Plastic and reconstructive surgery* 2015;135:580-589.
10. Freuschle, A., Brom, J., Hormann, K., Schultz, J. D. [Functional and aesthetic therapy concepts of keloids in the head- and neck area]. *Laryngorhinootologie* 2014;93:309-315.
11. Sakuraba, M., Takahashi, N., Akahoshi, T., Miyasaka, Y., Suzuki, K. Experience of silicone gel sheets for patients with keloid scars after median sternotomy. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2010;58:467-470.
12. Young, W. G., Worsham, M. J., Joseph, C. L., Divine, G. W., Jones, L. R. Incidence of keloid and risk factors following head and neck surgery. *JAMA Facial Plast Surg* 2014;16:379-380.
13. Lee, J. Y., Yang, C. C., Chao, S. C., Wong, T. W. Histopathological differential diagnosis of keloid and hypertrophic scar. *The American Journal of dermatopathology* 2004;26:379-384.
14. Jumper, N., Paus, R., Bayat, A. Functional histopathology of keloid disease. *Histol Histopathol* 2015;30:1033-1057.
15. Gurtner, G. C., Wong, V. W. Wound healing: normal and abnormal. In C. Thorne ed., *Grabb and Smith's Plastic Surgery*, 7th ed; 2014.
16. Robbins. *Basic Pathology*; 2004.
17. Janis, J. E., Harrison, B. Wound Healing: Part I. Basic Science. *Plastic and reconstructive surgery* 2016;138:9S-17S.
18. Monaco, J. L., Lawrence, W. T. Acute wound healing an overview. *Clinics in plastic surgery* 2003;30:1-12.
19. Henry, G., Garner, W. L. Inflammatory mediators in wound healing. *The Surgical clinics of North America* 2003;83:483-507.
20. Kumar, V., Abbas, A., Aster, J. Inflammation and repair. *Robins Basic Pathology*, 9 th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013.
21. Stitham, J., Midgett, C., Martin, K. A., Hwa, J. Prostacyclin: an inflammatory paradox. *Front Pharmacol* 2011;2:24.

22. Talwar, M., Moyana, T. N., Bharadwaj, B., Tan, L. K. The effect of a synthetic analogue of prostaglandin E2 on wound healing in rats. *Annals of clinical and laboratory science* 1996;26:451-457.
23. Holtzman, M. J., Turk, J., Shornick, L. P. Identification of a pharmacologically distinct prostaglandin H synthase in cultured epithelial cells. *J Biol Chem* 1992;267:21438-21445.
24. Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998;12:1063-1073.
25. Fitzpatrick, F. A. Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. *Curr Pharm Des* 2004;10:577-588.
26. Abdou, A. G., Maraee, A. H., Saif, H. F. Immunohistochemical evaluation of COX-1 and COX-2 expression in keloid and hypertrophic scar. *The American Journal of dermatopathology* 2013;36:311-317.
27. Wilgus, T. A., Vodovotz, Y., Vittadini, E., Clubbs, E. A., Oberyszyn, T. M. Reduction of scar formation in full-thickness wounds with topical celecoxib treatment. *Wound Repair Regen* 2003;11:25-34.
28. Kossi, J., Peltonen, J., Uotila, P., Laato, M. Differential effects of hexoses and sucrose, and platelet-derived growth factor isoforms on cyclooxygenase-1 and -2 mRNA expression in keloid, hypertrophic scar and granulation tissue fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 2001;293:126-132.
29. Alves, V. A. V., Bacchi, C. E., Vassallo, J., *Manual de Imuno-Histoquímica*: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999.
30. Hochman, B., Isoldi, F. C., Furtado, F., Ferreira, L. M. New approach to the understanding of keloid: psychoneuroimmune-endocrine aspects. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2015;8:67-73.
31. Hochman, B., Nahas, F. X., Sobral, C. S., et al. Nerve fibres: a possible role in keloid pathogenesis. *Br J Dermatol* 2008;158:651-652.
32. Durant, S., Duval, D., Homo-Delarche, F. Effect of exogenous prostaglandins and nonsteroidal anti-inflammatory agents on prostaglandin secretion and proliferation of mouse embryo fibroblasts in culture. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 1989;38:1-8.
33. Lupulescu, A. Effect of prostaglandins on protein, RNA, DNA and collagen synthesis in experimental wounds. *Prostaglandins* 1975;10:573-579.
34. Smith, P. D., Kuhn, M. A., Franz, M. G., Wachtel, T. L., Wright, T. E., Robson, M. C. Initiating the inflammatory phase of incisional healing prior to tissue injury. *The Journal of surgical research* 2000;92:11-17.
35. Wilgus, T. A., Bergdall, V. K., Tober, K. L., et al. The impact of cyclooxygenase-2 mediated inflammation on scarless fetal wound healing. *Am J Pathol* 2004;165:753-761.
36. Lin, F., Chen, Z. Standardization of diagnostic immunohistochemistry: literature review and geisinger experience. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138:1564-1577.
37. Su, W. H., Cheng, M. H., Lee, W. L., et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for wounds: pain relief or excessive scar formation? *Mediators Inflamm* 2010;2010:413238.
38. Leong, A. S. Quantitation in immunohistology: fact or fiction? A discussion of variables that influence results. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004;12:1-7.

Table 1. Differences between keloids and hypertrophic scars

Scar	Keloid	Hypertrophic scar
Clínical findings		
Extension	Beyond the limits of injury	Within the limits of the lesion
Involution	Without spontaneous regression	Spontaneous regression
Appearance	Bright, nodules, telangiectasias, thin skin, ulceration and hyperpigmentation possible	Red or pinkish, rarely thicker than 4 mm
Symptom	Pain, itching	Itching
Histopathology		
Cellularity (fibroblasts)	Smaller, without myofibroblasts	Greater
Collagen	Thick, irregular bundles	Arrangements in nodules, parallel to the epidermis
Type of collagen	3	1 and 3
Skin appendages	Without glands or hair follicles	May have glands or hair follicles
Stages of healing	Do not enter in the remodeling phase	Can enter in the remodeling phase

Based on Al-Attar, Mess et al. 2006, Rabello, Souza et al. 2014.

Table 2. Patient characteristics and clinical data

	Group 1 – Normal scars	Group 2 – Hypertrophic scars	Group 3 – Keloids	p
N	18	18	18	
Age (years)				0,00004
Mean	35,2	37,6	22,2	
Standard deviation	9,8	12,0	7,1	
Variation	18-55	18-60	18-44	
Time of scar (months)				0,50333*
Mean	15,06	13,50	12,50	
Standard deviation	6,30	8,44	4,22	
Sex				0,04500
Male	0	16,67	66,67	
Female	100,00	83,33	33,33	
Cause (% of cases)				0,00025
Inflammatory	0	0	22,22	
Surgical	100,00	88,89	38,89	
Burn	0	5,56	0	
Trauma	0	5,56	38,89	
Location of scar				0,00001
Trunk	88,89	77,78	16,67	
Face	5,56	5,56	72,22	
Members	5,56	16,67	11,11	
Skin phototype				0,00632
Fitzpatrick I-II	77,78	66,67	22,22	
Fitzpatrick III-IV	22,22	33,33	66,67	
Fitzpatrick V-VI	0	0	11,11	

Table 3. Immunohistochemical expression of COX1 in skin samples

	Group 1 Normal scars	Group 2 Hypertrophic scars	Group 3 Keloids	p (between all groups)	p (between group 1 x groups 2 and 3)
Epidermis				0,570	0,388
Negative	16,67	11,11	5,56		
Positive	83,33	88,89	94,44		
Dermis				0,014*	0,004*
Negative	83,33	44,44	38,89		
Positive	16,67	55,56	61,11		

Table 4. Immunohistochemical expression of COX2 in skin samples

	Group 1 Normal scars	Group 2 Hypertrophic scars	Group 3 Keloids	p (between all groups)	p (between group 1 x groups 2 and 3)
Epidermis				0,436	0,519
Negative	77,78	77,78	61,11		
Positive	22,22	22,22	38,89		
Dermis				0,207	0,081
Negative	72,22	50,00	44,44		
Positive	27,78	50,00	55,56		

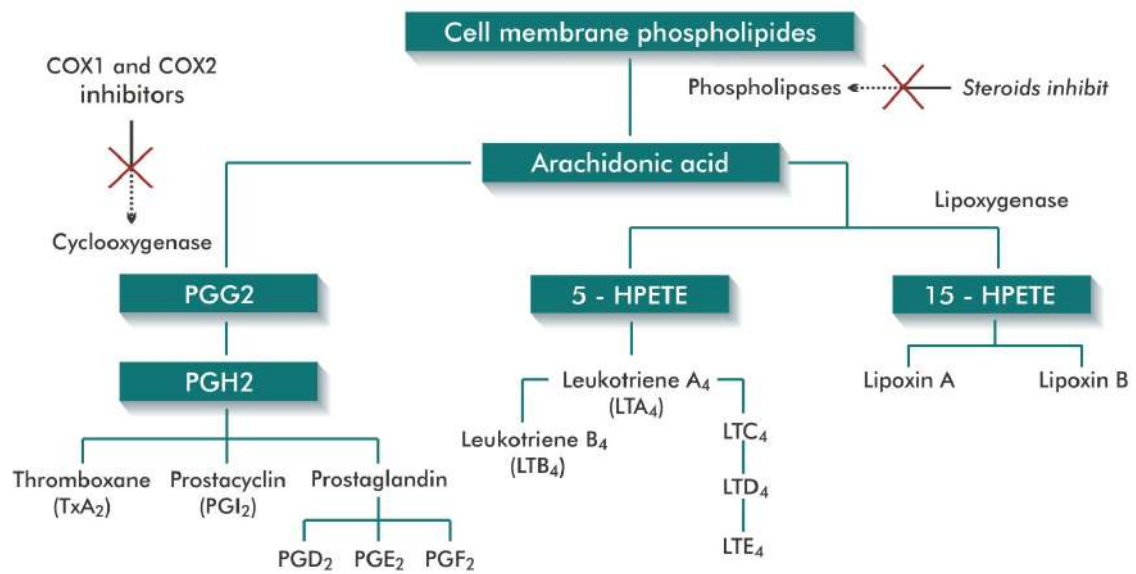


Figure 1. Metabolism of arachidonic acid and lipoxygenase-cyclooxygenase pathways (based on Aid and Bosetti 2011, Kumar, Abbas et al. 2013)

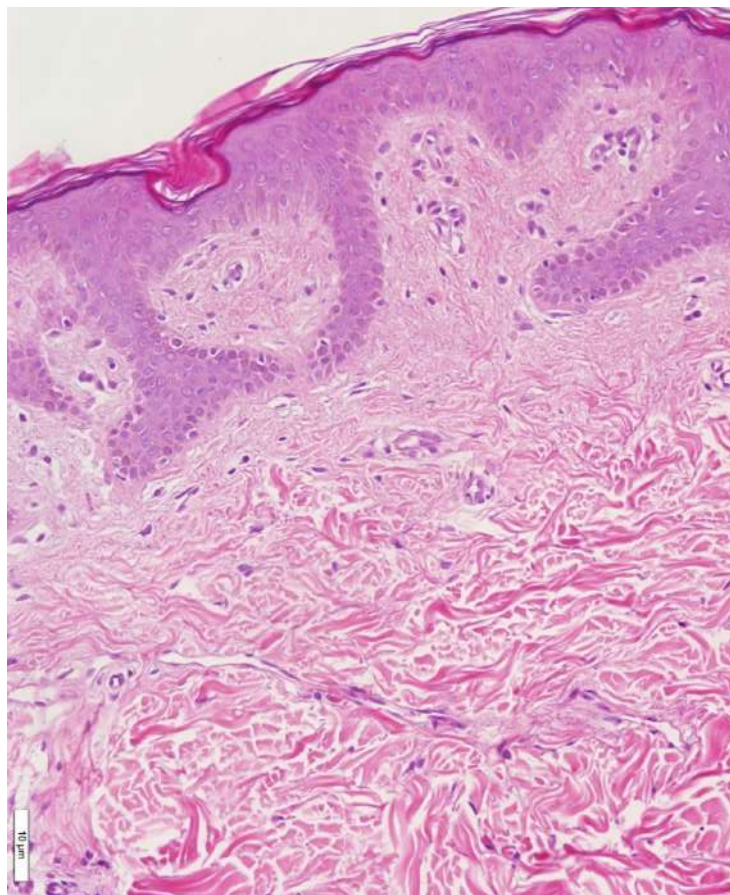


Figure 2. Hypertrophic scar stained by hematoxylin-eosin technique (x200).

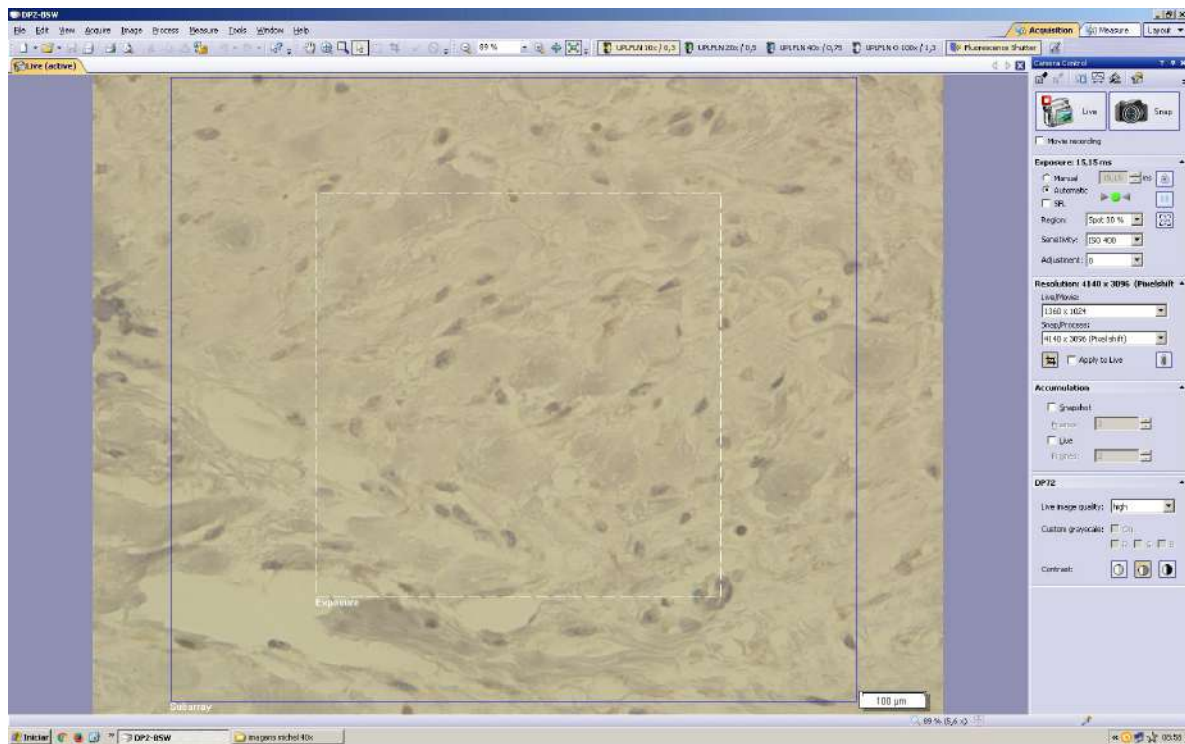


Figure 3. Screen capture during slide scanning (x400).

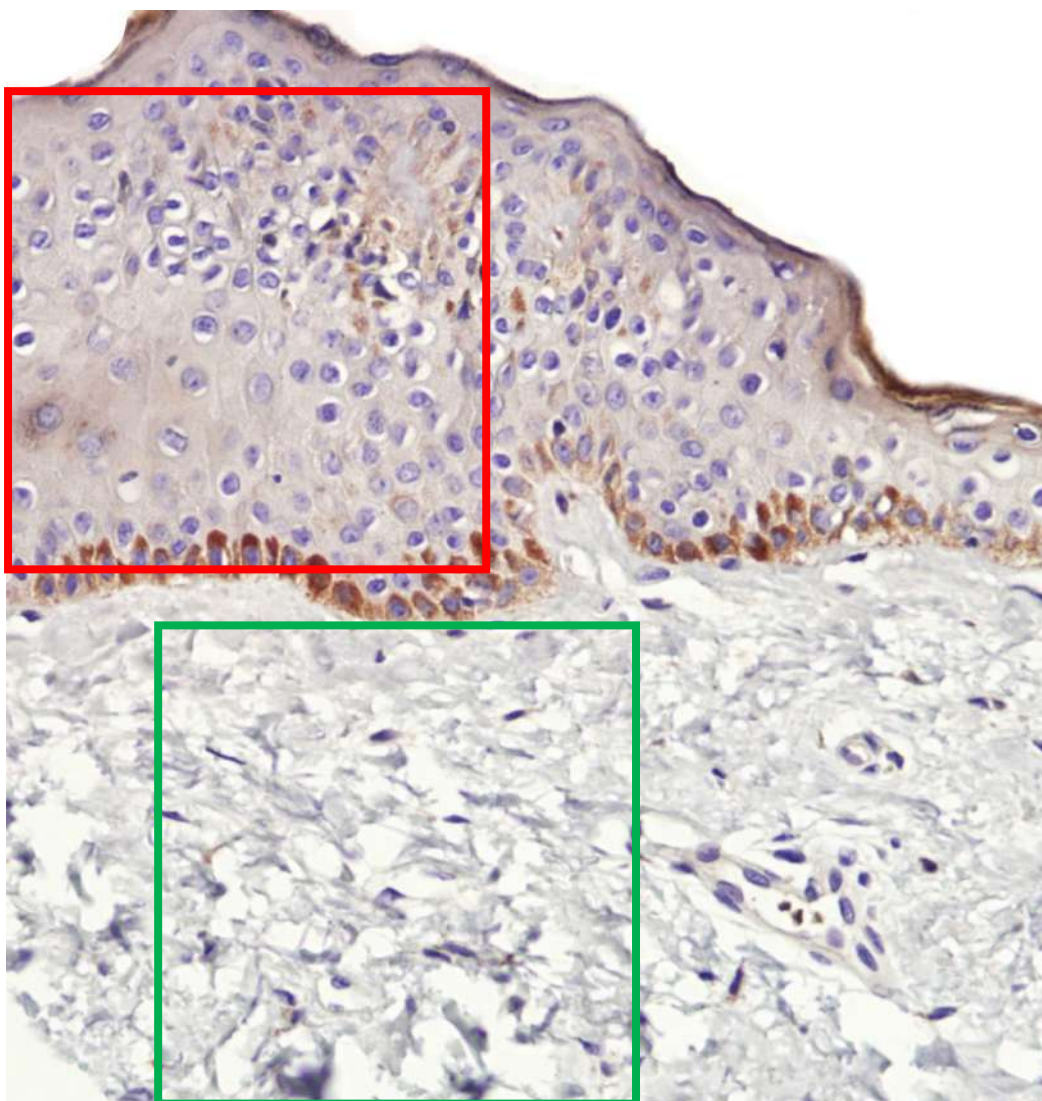


Figure 4. Methodology for delineating fields for cell counting (COX1) (x400).



Figure 5. Keloid scar after-abdominoplasty, which extends beyond the limits of the surgical incision.



Figure 6. Hypertrophic scars (post mammoplasty).

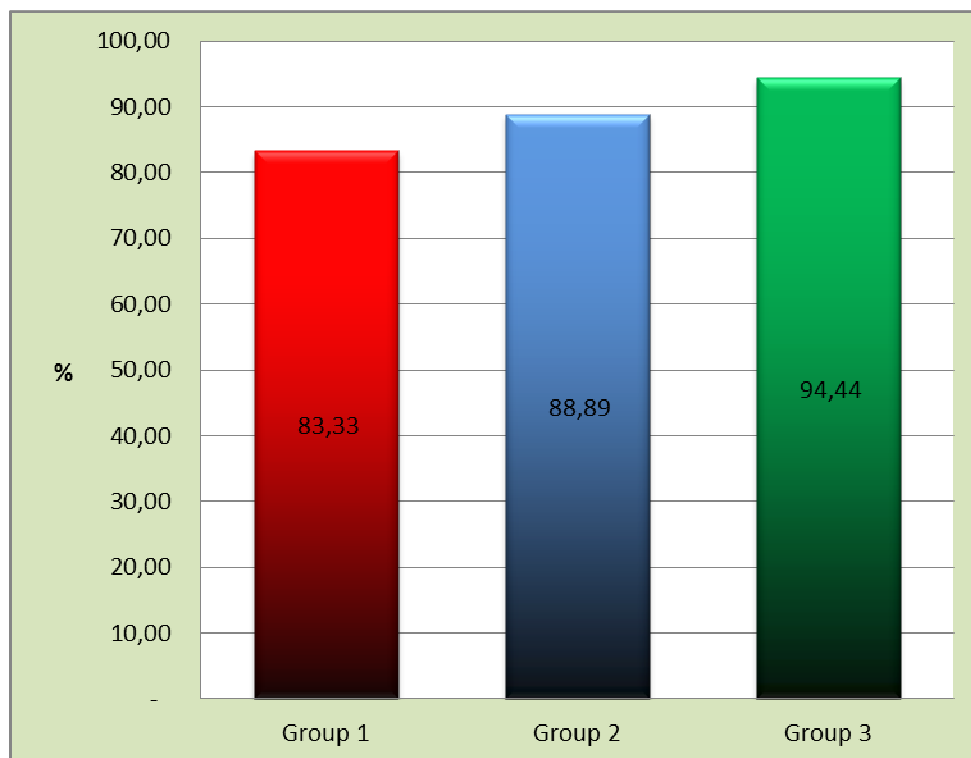


Fig. 7. Graph: positivity of IHC expression of COX1 in the epidermis.

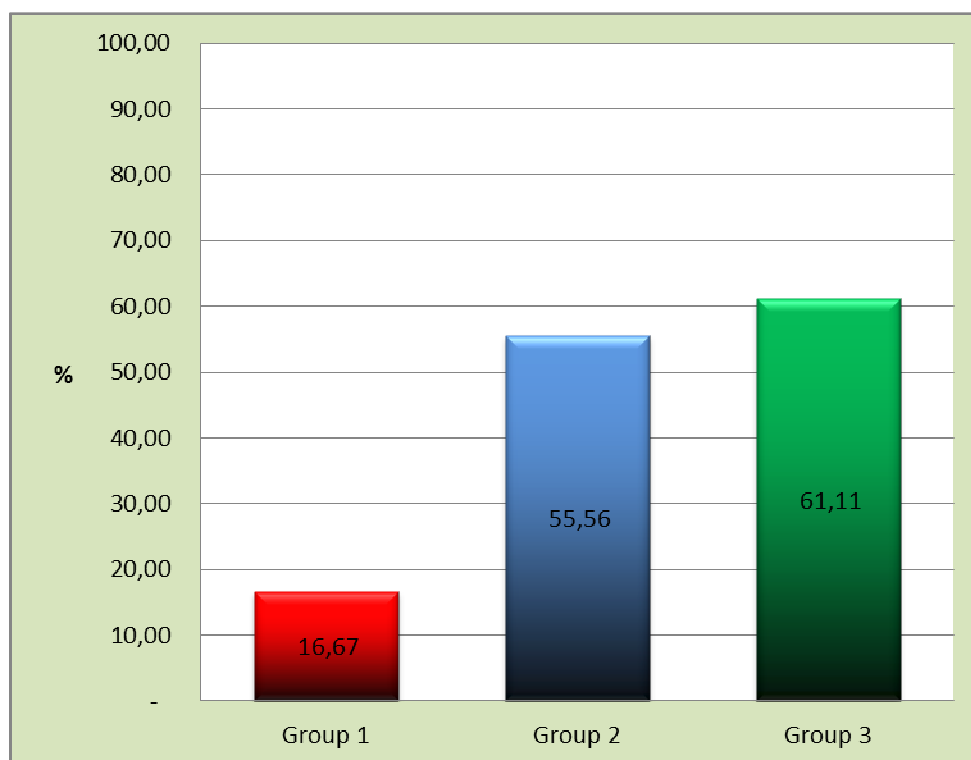


Figure 8. Graph: positivity of immunohistochemical expression of COX1 in the dermis

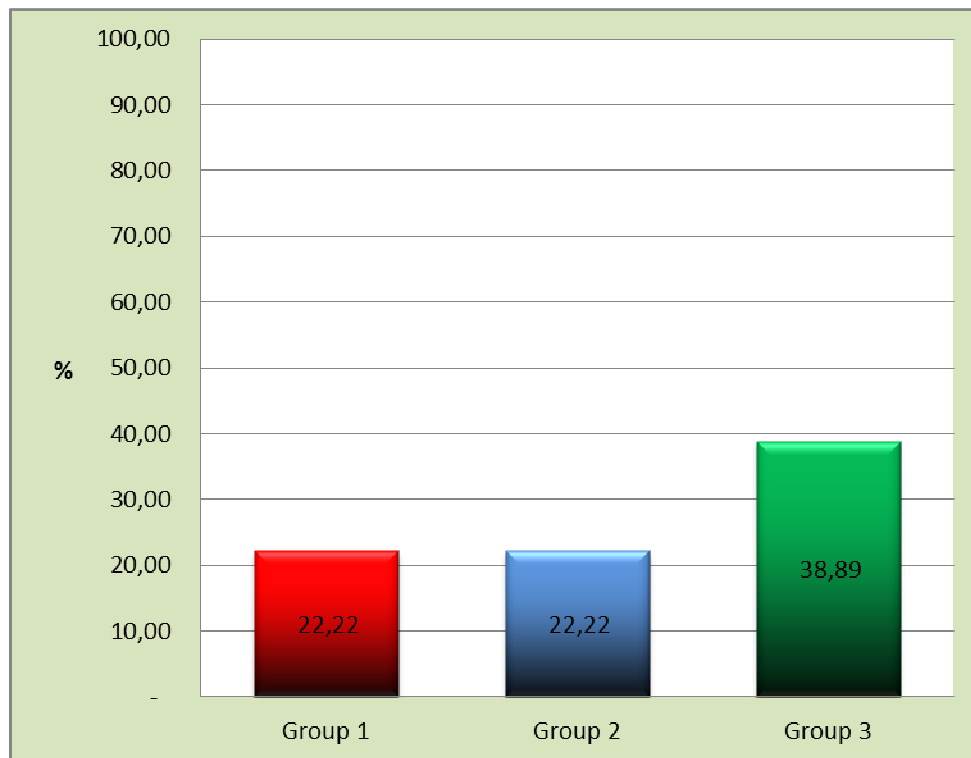


Figure 9. Graph: positivity of IHC expression of COX2 in the epidermis.

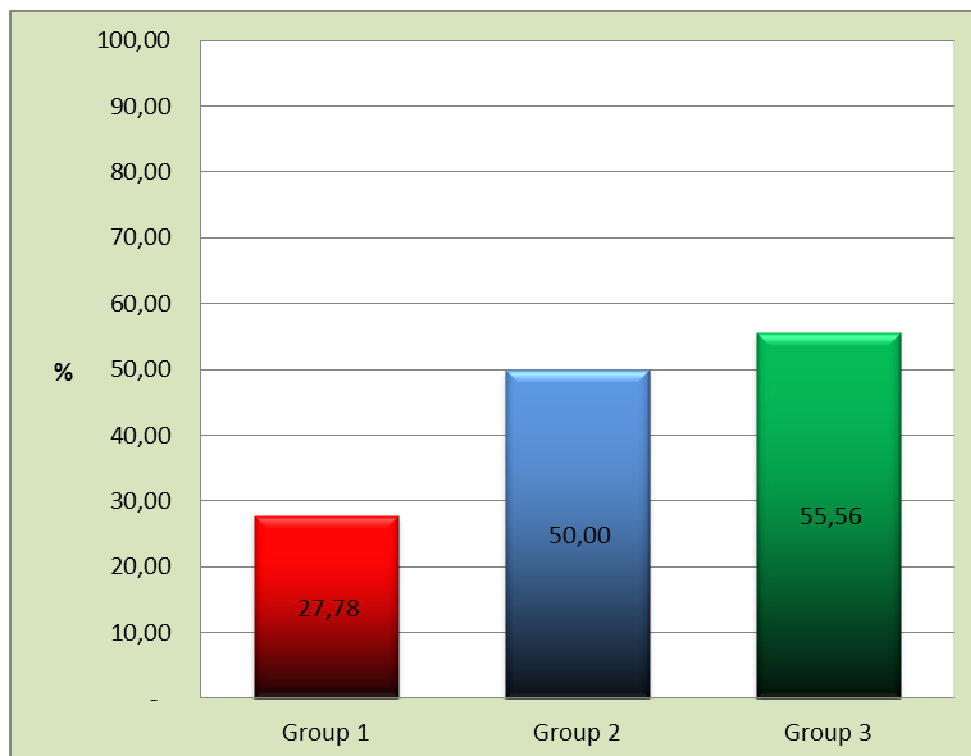


Figure 10. Graph: positivity of IHC expression of COX2 in the dermis.

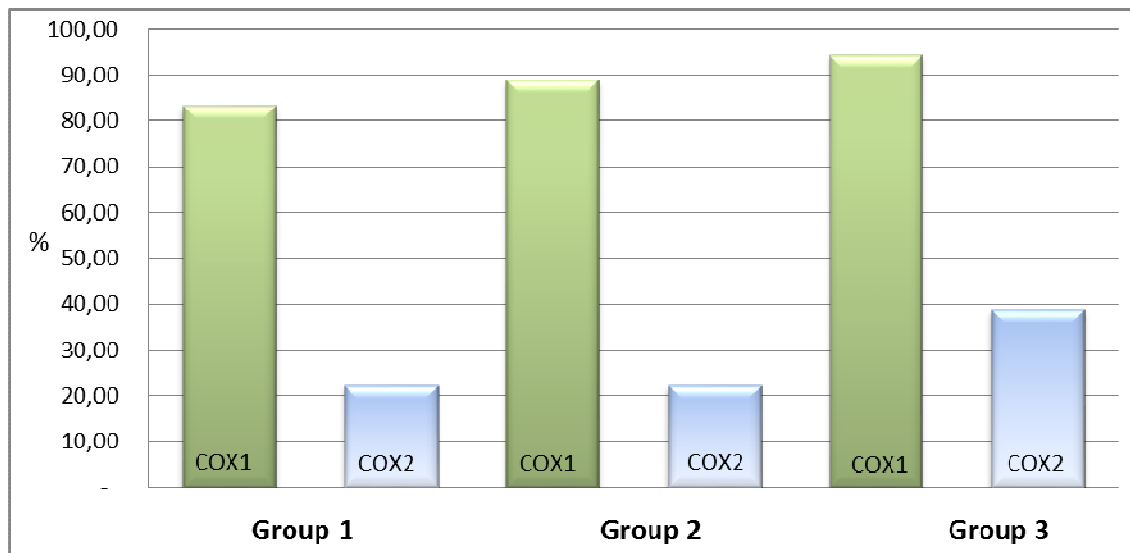


Figure 11. Graph: positivity of the immunohistochemical expression of COX1 and COX2 in the epidermis.

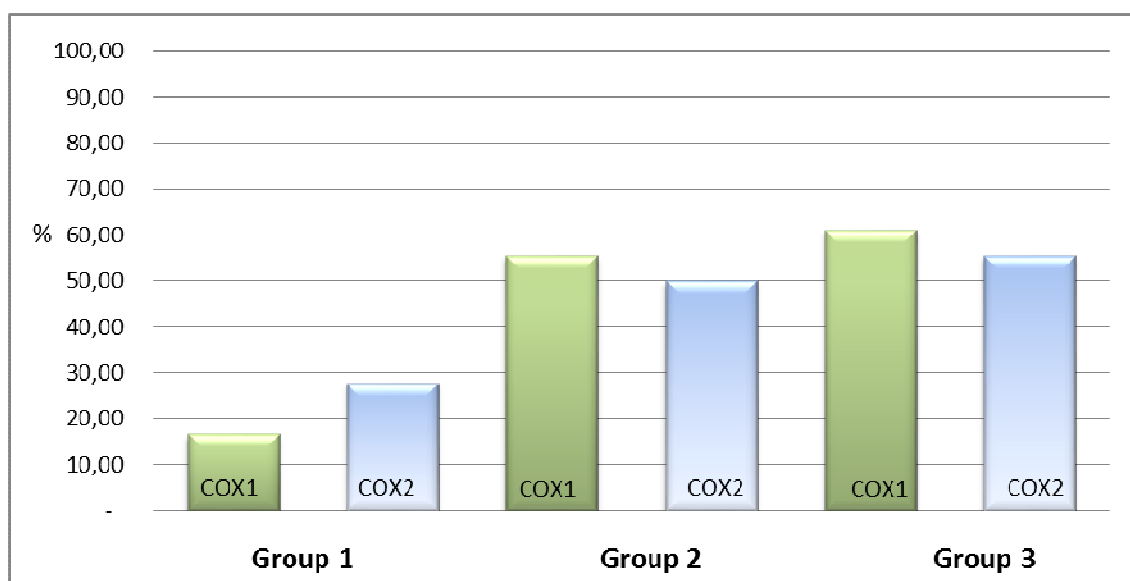


Figure 12. Graph: positivity of IHC expression of COX1 and COX2 in the dermis.

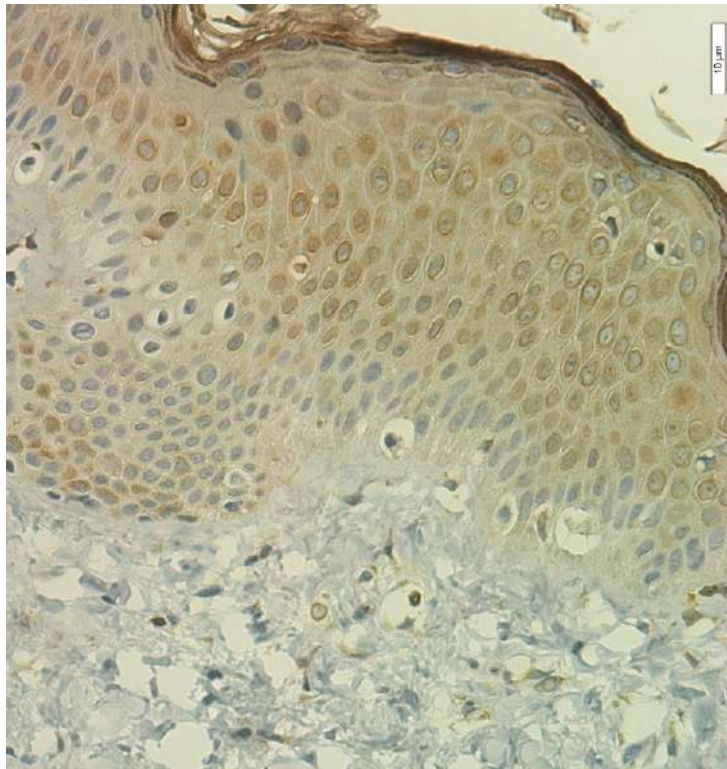


Figure 13. Hypertrophic scar. Positivity for COX1 in the epidermis (x400).

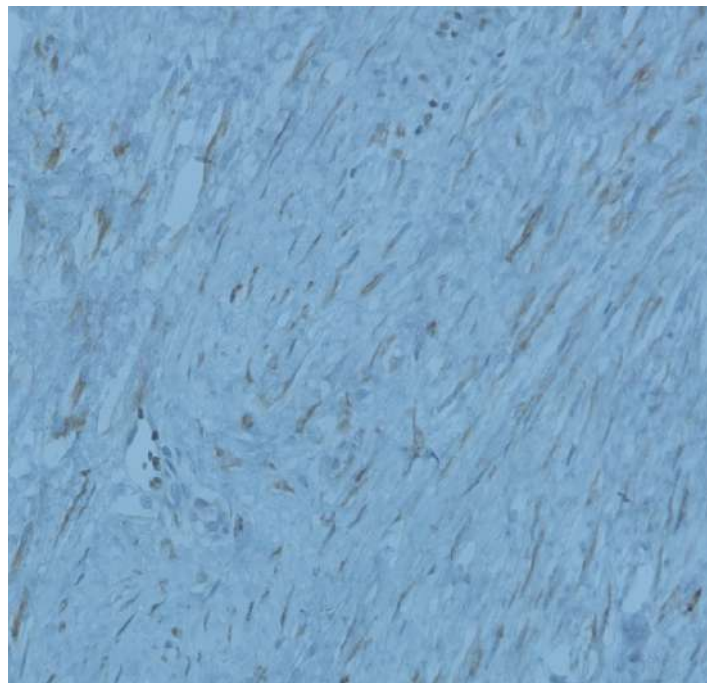


Figure 14. Positive IHC expression of COX1 in the dermis of hypertrophic scar (x400).

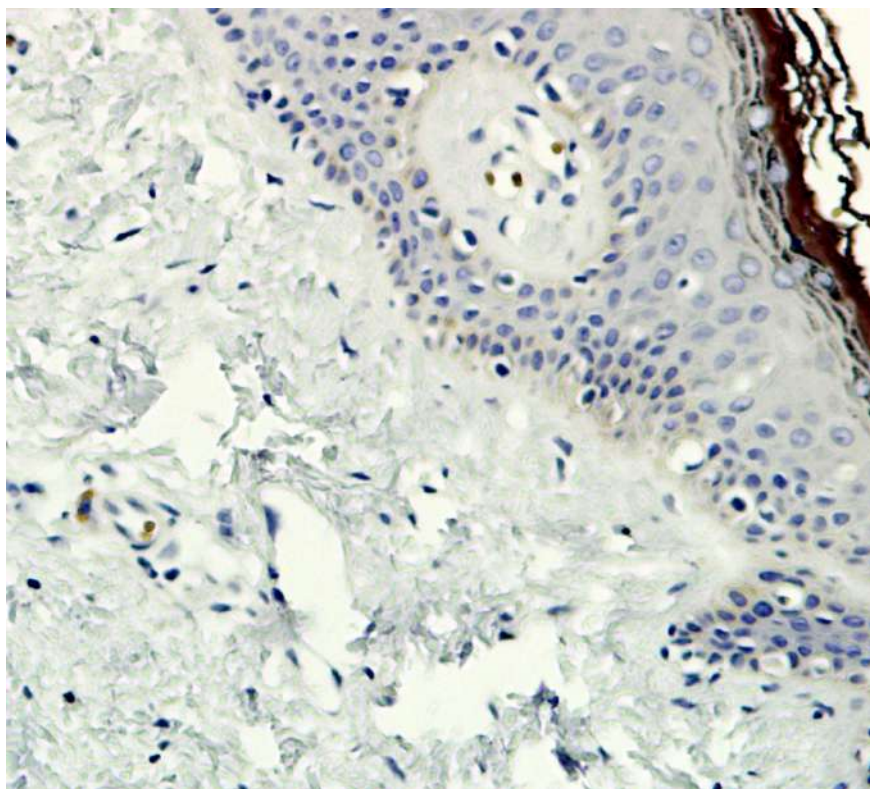


Figure 15. Negative IHC expression for COX2 in both epidermis and dermis of keloid scar (x400).



Figure 16. Spontaneous keloids.

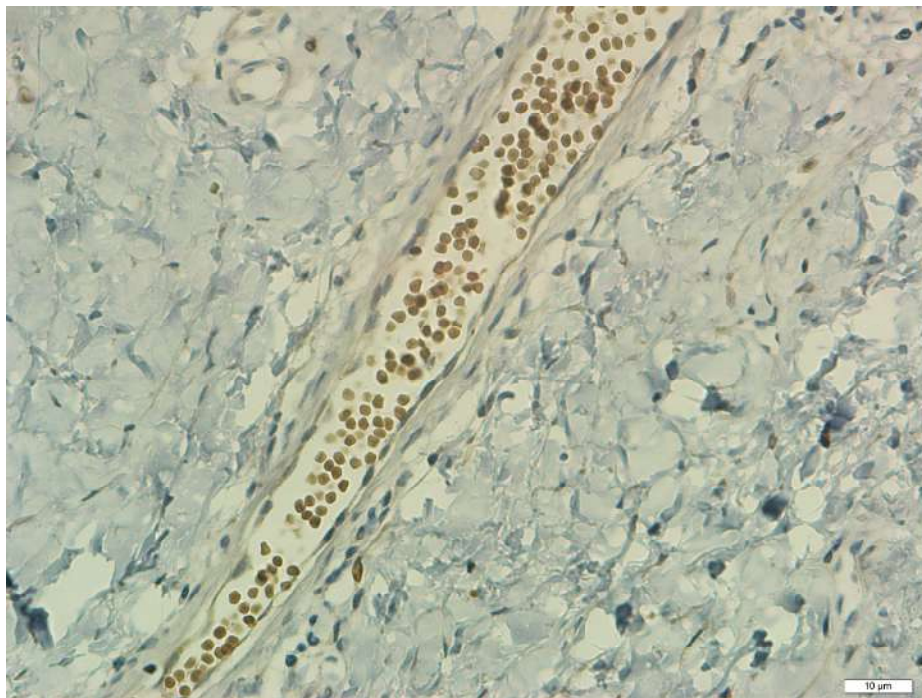


Figure 17. Blood vessel (not considered in the evaluation of IHC expression), surrounded by connective tissue (COX2, x400).

4. Considerações finais

Justifica-se o estudo pela prevalência de queloides e cicatrizes hipertróficas na população, pelo seu impacto na qualidade de vida dos pacientes e na dificuldade de tratamento. Por se tratar de doença multifatorial, cuja etiologia e tratamentos ainda não foram adequadamente determinados, com frequência profissionais médicos, em especial das áreas cirúrgicas, têm dificuldades no manejo destes casos. A maioria dos tratamentos apresenta alto índice de recidiva e, portanto, novas terapias estão continuamente sendo estudadas.

Há poucos trabalhos na literatura avaliando a influência das COXs na cicatrização. Nossos resultados mostraram que a expressão da COX1 mostrou-se maior na derme de cicatrizes anormais em comparação com cicatrizes normais. A expressão da COX2 observada não foi diferente entre todos os grupos.

Os resultados que obtivemos são apenas em parte semelhantes aos dos trabalhos publicados previamente. Mesmo havendo uma tendência dos estudos demonstrarem uma relação positiva entre a expressão aumentada das COXs e as cicatrizes hipertróficas e queloides, os dados não são conclusivos. Curiosamente, a COX2, indutível, supostamente estaria envolvida em processos patológicos, enquanto a COX1 em processos fisiológicos. No entanto, em nosso trabalho, a enzima que se mostrou com maior expressão em cicatrizes anormais, foi a COX1.

Analisando os trabalhos, consideramos haver algumas variáveis que poderiam influenciar os resultados. A reação de IHQ compreende diversos e complexos processos em todas as fases. Qualquer erro potencial ocorrendo

em qualquer uma das etapas resulta em resultados não reprodutíveis e não confiáveis. Portanto, a IHQ seria um ponto crítico para reprodutibilidade e comparação entre os trabalhos. Além disso, os diferentes critérios adotados como ponto de corte para positividade ou negatividade obviamente influenciam os resultados das pesquisas.

O número de trabalhos é relativamente pequeno, com resultados obtidos não uniformes e de difícil comparação. Embora não se possa qualificar e quantificar precisamente a relação entre as COXs e as cicatrizes, o que se pode concluir até o momento é que as expressões das COX1 e COX2 não são iguais nos diferentes tipos de cicatrizes, demonstrando haver alguma influência. Novos estudos são necessários para melhor conclusão sobre a influência das COXs no processo de cicatrização, os quais poderiam inclusive incluir métodos alternativos à reação IHQ. Estes estudos poderiam abrir possibilidades de pesquisa envolvendo o uso de AINES ou bloqueadores específicos da COX2 na profilaxia e tratamento de cicatrizes hipertróficas e queloides.

5. Anexos

Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS CICLOXIGENASES EM CICATRIZES HIPERTRÓFICAS E QUELÓIDES

Pesquisador: Claudio Galleano Zettler

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 24680913.3.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 562.493

Data da Relatoria: 20/03/2014

Apresentação do Projeto:

Desenho do estudo: observacional, prospectivo, tipo caso-controle. Amostra: 45 pacientes, submetidos à exérese de cicatrizes hipertróficas, quelóides ou cicatrizes normais, decorrentes de procedimentos de cirurgia plástica, cujas peças teciduais seriam normalmente desprezadas. Grupos: I - Quelóide, II - Cicatrizes hipertróficas, III - Pele com cicatrizes normais (controle). Método: serão coletados fragmentos de pele de cada espécime ressecado e acondicionados em soluções para exame anátomo-patológico com coloração hematoxilina-eosina (para confirmação da diferenciação entre quelóides, cicatrizes hipertróficas e cicatrizes normais e enquadramento nos grupos I, II, III) e exame imuno-histoquímico para avaliação da expressão das cicloxigenases (presença ou ausência de expressão e, quando presente, quantificação da expressão).

Objetivo da Pesquisa:

Determinar a expressão imuno-histoquímica das cicloxigenases em cicatrizes hipertróficas, quelóides e cicatrizes normais.

Comparar a expressão imuno-histoquímica das cicloxigenases em cicatrizes hipertróficas e quelóides com aquela obtida em cicatrizes normais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O presente estudo poderá trazer benefícios, quando corroborado por pesquisas futuras, que

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)303-8804

E-mail: cep@ufcsa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 562.493

confirmem o papel das COXs na patologia da cicatrização. Abre-se também possibilidades de linhas de pesquisa envolvendo uso de AINES ou bloqueadores específicos da COX-2 na profilaxia e tratamento de cicatrizes hiperplásicas

Riscos: não há risco para o voluntário em relação à pesquisa, uma vez que as análises serão realizadas em retalhos retirados no procedimento cirúrgico prévio, os riscos em relação com o procedimento cirúrgico que são independentes da pesquisa

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto muito bem escrito e com fundamentação teórica ampla e atualizada.

desenho do estudo bem determinado.

Nesta nova versão ficam claros os locais onde os procedimentos serão realizados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados

Recomendações:

Tendo em vista que o CEP UFCSPA não teve reunião ordinária no mês de fevereiro, o cronograma de atividades ficou desatualizado, desta forma lembramos que o início da coleta de dados deve acontecer apenas após a aprovação por este CEP. Utilizando o TCLE por ele aprovado. Sugiro que o relatório parcial tal informação (sobre o início das coletas) seja destacado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Relatório parcial deverá ser apresentado em junho de 2015 e o final em dezembro de 2015 quando o projeto será finalizado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Término do projeto 06/2015.

De acordo com o Parecer do Relator.

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)303 -8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 562.493

PORTO ALEGRE, 20 de Março de 2014

Assinador por:
José Geraldo Vernet Taborda
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)303 -8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br