

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

Gustavo de Azambuja Pereira Filho

**Efeito da toxina botulínica tipo A no
controle da contração de lesões
tratadas com enxertos de
espessura total.**

UFCSPA

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

**Porto Alegre
2014**

Gustavo de Azambuja Pereira Filho

Efeito da toxina botulínica tipo A no controle da contração de lesões tratadas com enxertos de espessura total.

Dissertação 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 Mestre.

Orientador: Dr. Cláudio Galleano Zettler

Co-Orientador: Dr. Pedro Bins Ely

**Porto Alegre
2014**

Dedico esta dissertação

À minha esposa Raquel Gruske Moro, pelo seu amor incondicional e seu apoio imprescindível.

À minha família, por ter me fornecido as condições necessárias para chegar a este grau de formação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades e mostrar os caminhos nas horas incertas.

À minha família e esposa, os quais amo muito, pelo afeto, compreensão e incentivo constantes.

Ao meu orientador, Professor Doutor Cláudio Galleano Zettler, e meu Co-orientador, Professor Doutor Pedro Bins Ely, pela confiança e apoio.

Às técnicas do laboratório de imunopatologia do programa de pós-graduação da UFCSPA, Terezinha Stein e Rosalva Thereza Meurer, que foram extremamente prestativas e competentes.

Ao Biomédico Gustavo Alfredo Ochs de Muñoz, pelo auxílio no desenvolvimento do modelo experimental.

À Professora Doutora Norma Possa Marroni, a qual foi responsável direta pelo meu grande interesse na área de pesquisa nos primórdios de minha formação médica.

A todos os colegas e professores do programa de pós-graduação em patologia da UFCSPA pela oportunidade, convívio e aprendizado.

EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e da persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo, fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

LISTA DE ABREVIATURAS

α -SMA – Actina de músculo liso alfa
CTGF - Fator de crescimento do tecido conectivo
EGF – Fator de crescimento epidérmico
eNos - Sintase de óxido nítrico endotelial
FGF-2 – Fator de crescimento básico do fibroblasto tipo 2
G-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
IFN- γ - Interferon gama
IL-1 – Interleucina 1
IL4 - Interleucina 4
IL-8 - Interleucina 8
iNos - Sintase de óxido nítrico induzida
LPS – Lipopolissacarídeo
MCP-1 - Proteína quemoatrativa de monócitos 1
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA.....	II
DEDICATÓRIA.....	III
AGRADECIMENTOS.....	IV
EPÍGRAFE.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	01
1.2 LESÕES DE ESPESSURA TOTAL.....	02
1.3 CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS.....	02
1.4 CICATRIZAÇÃO DE LESÕES DE ESPESSURA TOTAL.....	06
1.5 ENXERTOS DE PELE.....	08
1.6 TOXINA BOTULÍNICA.....	09
1.7 MODELO EXPERIMENTAL.....	10
1.8 REFERÊNCIAS.....	12

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19

3. ARTIGO EM INGLÊS

3.1 ABSTRACT.....	20
3.2 ARTICLE.....	22

4. ARTIGO EM PORTUGUÊS

4.1 RESUMO.....	43
4.2 ARTIGO.....	45

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
6. ANEXOS.....	69

1 Introdução

1.1 Epidemiologia

Diariamente, milhares de pessoas sofrem traumatismos e queimaduras, as quais cursam com destruição da epiderme e derme em diferentes profundidades. O tratamento destes pacientes com queimaduras extensas ou perdas cutâneas traumáticas normalmente envolve grandes áreas de enxertia de pele para cobertura das lesões (Thorne, 2007). Somente para tratamento das queimaduras, mundial e anualmente, seis milhões de pacientes são submetidos a enxertos. No entanto, apesar de ser parte essencial do tratamento, o enxerto apresenta diversas complicações, sendo a contratatura da pele humana gerada pela contração exagerada após a enxertia uma complicação pós-operatória bastante comum, a qual demanda frequentemente cirurgias corretivas (Hettiaratchy e Dziewulski, 2004). Aproximadamente 30% dos enxertos realizados neste contexto de trauma desenvolvem cicatrizes hipertróficas e contraturas do enxerto nos meses subsequentes ao procedimento, causando, com frequência, diminuição da amplitude de movimento de articulações, além de importante limitação funcional e déficit estético em outros locais (Deitch e cols, 1983; McDonald e Deitch, 1987; Leblebici e cols, 2006; Schneider e cols, 2006). Muitas vezes, na tentativa de evitar estas complicações, o cirurgião plástico sobe na escada de reconstrução, utilizando procedimentos mais complexos, tais como retalhos locais, regionais ou livres, os quais, por sua vez, aumentam a morbidade do tratamento e sua dificuldade técnica (Mathes e Nahai, 1997).

1.2 Lesões de espessura total

As lesões de espessura total são ferimentos os quais causaram destruição das camadas da epiderme e da derme por completo, incluindo os anexos cutâneos, expondo as camadas teciduais mais profundas, tais como subcutâneo, fáscia ou músculo (Mélega e cols, 2002). São geralmente causadas por queimaduras de 3º grau ou traumas e expõem o organismo a danos térmicos, físicos e infecciosos. Além disso, a perda de cobertura cutânea gera um aumento na perda hídrica, uma termo-regulação anômala e uma diminuição na imunidade local (Gibran e cols, 2007; Wolff, 2008; Proksch e cols, 2008), o que, por sua vez, dificulta sua cicatrização.

1.3 Cicatrização das lesões cutâneas

O processo de cicatrização cutânea envolve uma cascata bem coordenada de respostas celulares coordenando a interação de diversos tipos celulares ao longo de um período de tempo. Este processo, para efeitos didáticos, divide-se em fases, as quais ocorrem com sobreposição e não de forma estanque. A primeira fase, denominada de inflamatória, é iniciada quando, logo após a lesão, os componentes do tecido lesado agem para ativar a cascata extrínseca de coagulação para prevenir uma hemorragia imediata. Os vasos sanguíneos destruídos permitem a rápida chegada de elementos sanguíneos na ferida, incluindo as plaquetas, as quais formam um coágulo local que interrompe o sangramento. Durante este processo, as plaquetas degranulam liberando fatores de crescimento, tais como o PDGF e o TGF- β . O resultado final das vias intrínsecas e extrínsecas de coagulação é a conversão do fibrinogênio em fibrina e a sua subsequente polimerização em um gel. Esta matriz provisória de fibrina provém uma estrutura para a migração celular requerida durante as próximas fases da cicatrização.

Quase imediatamente, células inflamatórias são recrutadas para o local da ferida. Durante os estágios iniciais da cicatrização, as células inflamatórias são atraídas pela ativação da cascata do complemento (Componente 5a), pelo TGF- β liberado pelas plaquetas e por produtos oriundos da degradação das bactérias (LPS). Nos primeiros 2 dias após a lesão, existe infiltrado inflamatório no tampão de fibrina que preenche a cavidade da lesão. O papel primário destas células é remover o tecido desvitalizado e prevenir a infecção através de mecanismos dependentes e independentes de oxigênio. Eles ainda liberam uma série de proteases para degradar a matriz extracelular remanescente para as próximas etapas da cicatrização (Singer e Clarck, 1999). É interessante notar que embora os neutrófilos apresentem um papel em diminuir a infecção durante a cicatrização, sua ausência não impede o progresso desta. (Simpson e Ross, 1972). No entanto, sua persistência na ferida tem sido implicada na transformação das feridas agudas em crônicas, demonstrando o papel da fase inflamatória no atraso cicatricial. Os monócitos e os macrófagos seguem os neutrófilos, aparecendo de 48 a 72 horas na ferida. Eles são recrutados primariamente pela expressão da proteína quemoatrativa de monócitos 1 (MCP-1). Os monócitos/macrófagos são células chave regulatórias para este e para os demais estágios de cicatrização. Os macrófagos teciduais originam-se da circulação, onde são conhecidos como monócitos, e alteram seus fenótipos quando egressam para o tecido. Por volta do terceiro dia após a lesão, eles são o tipo celular predominante na ferida. Os macrófagos fagocitam debris e bactérias, mas são especialmente importantes para orquestrar a produção dos fatores de crescimento necessários para a produção da matriz extracelular pelos fibroblastos e na neoangiogênese no local. Existem diversas citocinas inflamatórias implicadas na cicatrização (VEGF, FGF-2, PDGF, KGF, EGF, TNF- α , G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1, IL-4, IL-8, eNos, iNos), sobre as quais existe muita controvérsia na literatura acerca de

suas funções exatas e estas fogem ao escopo deste trabalho. No entanto, está bem claro que a ausência de monócitos/macrófagos tem graves consequências na cicatrização (Leibovich e Ross, 1992; Warldorf e Eewkes, 1995). Os linfócitos são as últimas células a chegarem na ferida, o que ocorre entre o quinto e o sétimo dias após a lesão. Seu papel não encontra-se bem definido, mas é sugerido que as populações de CD4 e CD8 podem ser responsáveis por desencadear o início da fase proliferativa da cicatrização. Similarmente, os mastócitos também aparecem ao final da fase inflamatória na ferida, e sua função também ainda é controversa (Park e Barbul, 2004).

A fase proliferativa ocorre, geralmente, do quarto ao vigésimo primeiro dia consequentes à lesão. Entretanto, algumas facetas desta fase, tais como a re-epitelização, iniciam quase imediatamente após o dano. Os queratinócitos adjacentes alteram seus fenótipos horas após a lesão, com consequente regressão das conexões desmossômicas entre estes e com a membrana basal, o que liberta estas células, permitindo a migração lateral. Concomitantemente, ocorre a formação de filamentos de actina no citoplasma dos queratinócitos, os quais provem a locomoção para migrar ativamente para a lesão. Os queratinócitos, então, movem-se através de interações com as proteínas da matriz extracelular (tais como fibronectina, vitronectina e colágeno tipo I), através de mediadores específicos de integrinas enquanto procedem entre a crosta e a matriz de fibrina provisória. A matriz provisória de fibrina é gradualmente substituída por uma nova plataforma de migração: o tecido de granulação, o qual é caracterizado histologicamente por matriz extracelular e vasos sanguíneos neoformados. O tecido de granulação surge a partir do quarto dia de lesão, sendo composto por 3 tipos celulares, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, os quais exercem papéis críticos e independentes em sua formação. Os fibroblastos são os principais efetores durante esta fase, produzindo a matriz extracelular que preenche o sitio de lesão e provem, assim,

uma plataforma para a migração dos queratinócitos. Os macrófagos continuam a produzir fatores de crescimento tais como o PDGF e TGF- β 1, os quais induzem os fibroblastos a proliferarem, migrarem e depositarem matriz extracelular, bem como estimulam as células endoteliais à neovascularização. Com o passar do tempo, a matriz provisória é substituída por colágeno tipo III, o qual será substituído por colágeno tipo I na fase de remodelamento. As células endoteliais são um componente crítico do tecido de granulação e formam novos vasos através da angiogênese. Fatores pró-angiogênese são liberados pelos macrófagos, incluindo VEGF, FGF-2, angioproteína -1, entre outros, sendo que o principal estímulo ativador para a transcrição genética destes parece ser a hipóxia. A função exata destes fatores ainda é fato bastante investigado, mas está clara a importância da neovascularização durante a fase proliferativa para a cicatrização cutânea, uma vez que o bloqueio deste processo com inibidores de angiogênese dificulta a cicatrização. Um fato interessante desta fase é que em determinado ponto todos estes processos devem ser desligados e a formação de tecido de granulação e de matriz extracelular interrompidos. Está claro que este é um evento regulado, pois uma vez que a cavidade da ferida esteja completamente preenchida por matriz colagenosa, os fibroblastos rapidamente desaparecem e os neovasos recém formados regredem, resultando em uma cicatriz relativamente acelular sob condições normais de cicatrização. No entanto, esta sinalização para a suspensão da fase de fibroplasia ainda é desconhecida, porém parece envolver fatores ambientais e moleculares. (Wooley e Martin, 2000; Thorne, 2007).

A fase de remodelamento é a porção mais longa da cicatrização, perdurando em humanos do vigésimo primeiro dia até um ano. Uma vez que a ferida tenha sido “preenchida” com tecido de granulação e após os queratinócitos tenham-na re-epitelizado, o processo de remodelamento ocorre. Apesar de ser o processo mais longo e

intimamente relacionado com o aspecto final da cicatriz, esta é a fase menos compreendida da cicatrização. Em humanos, esta fase é caracterizada pela remodelação do colágeno e pela contração da ferida. A remodelação do colágeno consiste na substituição do colágeno tipo III, depositado na fase proliferativa, por colágeno tipo I, fato que ocorre ao longo de meses. A degradação do colágeno tipo III é mediada por metaloproteinases da matriz secretadas por macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. Ao longo deste processo, a resistência da ferida vai aumentando, refletindo a inversão dos subtipos de colágeno (maior proporção de tipo I e menor de tipo III) e o aumento em seu entrelaçamento (Thorne, 2007). A contração da lesão é fator importante na cicatrização, sendo mediada primariamente por fibroblastos e miofibroblastos.

1.4 Cicatrização das lesões de espessura total

As lesões de espessura total apresentam difícil cicatrização devido a diversos fatores, sendo os principais: a destruição da camada basal e dos anexos cutâneos presentes na derme e a não preservação de uma população de fibroblastos mais superficiais, os quais contribuem fortemente para que a cicatrização se dê às custas de regeneração tecidual (Kwan e cols, 2009). Assim, esse dano profundo impede o processo de cicatrização de cursar de forma habitual. Esta lesão, devido a intensa destruição tecidual, deverá apresentar um processo cicatricial mais intenso e prolongado, orquestrado a partir de uma subpopulação de fibroblastos mais profundos, e que cicatrizará a lesão às custas de reparação, ou seja, com cicatriz residual (Dunkin e cols, 2007). A cicatrização deste tipo de lesão, quando não mediada por cuidados médicos, ocorre com intensa fase inflamatória, com a finalidade de realizar o desbridamento dos tecidos desvitalizados presentes em abundância, além de diminuir a

proliferação bacteriana. Esta fase inflamatória exuberante e prolongada, por si só, é implicada na cronificação deste tipo de lesão (Werner e Grose, 2003). Além disso, a fase proliferativa também necessita ocorrer com maior intensidade, a fim de produzir tecido de granulação suficiente para o preenchimento da área lesada, estabelecendo o meio adequado para a migração dos queratinócitos. Estes migram oriundos somente dos bordos da lesão, devido à destruição da camada basal e dos anexos cutâneos, o que, por sua vez, causa um grande atraso na epitelização. Esta demora em re-epitelizar a lesão, por conseguinte, fomenta ainda mais a fase de fibroplasia, pois sabidamente a epitelização é fator chave na finalização da fase proliferativa e do início da fase de remodelamento (Thorne, 2007). Ainda nesta fase há o início da contração dos bordos em direção ao centro da lesão, com a finalidade de acelerar a cicatrização, diminuindo o diâmetro da mesma. Esta contração, apesar de fundamental para a cicatrização espontânea das lesões de espessura total por segunda intenção (Billingham e Medawar, 1955), ocasiona diversos problemas tardios para a área cicatrizada, quando passa a ser denominada contratura (Mélega e cols, 2002), tais como a diminuição da amplitude de movimento de articulações, além de limitação funcional e prejuízo estético em outros locais. (Deitch e cols, 1983; McDonald e Deitch, 1987; Leblebici e cols, 2006; Schneider e cols, 2006). A contração da ferida aparentemente ocorre devido à migração dos fibroblastos através da matriz extracelular, o que proporciona um melhor alinhamento das fibras de colágeno, gerando força contrátil. Quando existe certa resistência a esta contração, os fibroblastos transformam-se em miofibroblastos, passando a expressar α -SMA e espessas fibras citoplasmáticas de estresse, o que aparentemente aumenta a força contrátil (Hinz e Gabbiani, 2003). No entanto, os miofibroblastos são também os principais responsáveis pela contratura cicatricial, a qual ocorre predominantemente em áreas de estresse mecânico, tais como as articulações

(Kwan e cols, 2009). Seu mecanismo de ação parece ser pelo encurtamento celular através da α -SMA, com posterior rearranjo do tecido conectivo do entorno devido ao contato célula-célula (Ryan e cols, 1974). Sabe-se que os enxertos inibem em parte esta contratura (Walden e cols, 2000), razão pela qual, o desbridamento de tecidos desvitalizados associado com a enxertia cutânea é um fator chave no sucesso da recuperação do paciente com lesões de espessura total. (Atiyeh e Costagliola, 2007; Brusselaers e cols, 2010; Holavanahalli, 2010).

1.5 Enxertos de pele

O enxerto de pele tem sido o padrão ouro no tratamento de lesões de espessura total, principalmente as queimaduras de terceiro grau e os grandes traumas com avulsão cutânea. No entanto, o enxerto de pele, por si mesmo, também desenvolve contração, a qual ocorre em dois estágios (Davis et al, 1931). Quando a pele é retirada de seu sítio doador, ela imediatamente sofre redução em tamanho, denominada de contração primária. Esta varia de 9 a 22% de seu tamanho, na dependência da espessura do enxerto, sendo atribuída ao encolhimento das fibras de elastina na derme. Quando coletados da mesma área corporal, os enxertos de espessura total demonstram maior índice de contratura primária quando comparados aos de espessura parcial, provavelmente por conter um menor volume de derme em sua composição. Quando o enxerto é colocado em seu leito receptor, ele sofre a contração secundária, a qual reduz tanto o tamanho do enxerto, quanto a circunferência do leito receptor, com os bordos sendo aproximados em direção ao centro (Hinshaw e Miller, 1965). Segundo Corps (1969), a espessura do enxerto também influencia o grau de contratura secundária, sendo o enxerto de espessura parcial o que exhibe este fenômeno com maior exuberância.

Esta diferença deve-se, provavelmente, as diferentes camadas de derme contidas nos enxertos. Além disso, a hiperplasia epidérmica e a fibrose dérmica são menos proeminentes nos enxertos de espessura total (Rudolph, 1976). O leito receptor também exerce influência sobre a contração, sendo que os enxertos realizados sobre as fâscias contraem em menor grau do que os realizados sobre tecidos mais móveis (Corps, 1969). Além disso, os realizados sobre tecido de granulação, contraem mais quando comparados com os realizados em queimaduras com excisões tangenciais (Jones, 1988), e quanto maior a área a ser enxertada, maior a contração (Schneider e cols., 2006; Thorne, 2007). Assim, quando desejamos cobrir uma área de articulação ou uma área que demanda um melhor resultado estético, com menor contração tecidual, opta-se pelo enxerto de espessura total. Quando, no entanto, temos uma extensa área que necessita de cobertura, ou temos uma restrição de sítios doadores, opta-se pela pele de espessura parcial (Thorne, 2007).

1.6 Toxina Botulínica

A toxina botulínica, uma potente neurotoxina derivada do *Clostridium botulinum*, existe em vários sorotipos (A a G). A toxina do tipo A está disponível para uso clínico em muitos países (O’Leary e Dierich, 2010 ; Yosipovitch, 2010). Por mais de 20 anos, a aplicação desta se mostrou segura e efetiva no tratamento de diversas desordens, tais como o blefaroespasma e rítmicas faciais dinâmicas (Ahmed e cols., 2010; Branford e cols, 2010), inclusive para uso pediátrico (Scheffer e cols., 2010). Segundo Zhibo e Zhang (2008,2009), este agente exerce seu efeito na exostose da acetilcolina, bloqueando a transmissão neuromuscular, resultando em flacidez muscular. Recentemente foi demonstrado que o uso da toxina botulínica tipo A pode diminuir

cicatrizes hipertróficas (Zhibo e cols., 2009), provavelmente através da diminuição da proliferação celular dos fibroblastos e da diminuição da expressão de TGF β 1 nestes (Zhibo e cols., 2009, 2011), a qual gera uma diminuição no CTGF, diminuindo, consequentemente, a deposição de colágeno (Lee e cols., 2009). Além disso, Wong e cols. (2009) demonstraram que a toxina botulínica tipo A reduz a contração em feridas com fechamento por segunda intenção, reduzindo a infiltração de células inflamatórias, bem como a fibrose local. Neste contexto, hipotetizou-se que a toxina botulínica tipo A poderia apresentar um efeito na diminuição da contração das feridas de espessura total tratadas com enxerto de espessura total, levando a uma cicatrização com menos contração local.

1.7 Modelo Experimental

O processo biológico de cicatrização é extremamente complexo e difícil de ser analisado em todas suas etapas. Neste contexto, os modelos experimentais em seres humanos apresentam amplas restrições técnicas e éticas, ao passo que os estudos “*in vitro*” são muito restritos quanto as informações fornecidas. Uma terceira via que surge para este estudo são os modelos experimentais animais, os quais, apesar de apresentarem certas restrições de extrapolação, mimetizam bem o processo humano.

O estudo do comportamento celular em discos bidimensionais de cultura oferecem a habilidade de se investigar alvos específicos com mínima interferência de fatores externos. No entanto, parâmetros fundamentais, somente disponíveis nos estudos “*in vivo*” são perdidos, tais como sinalização parácrina e envolvimento celulares tridimensionais, o que limita a aplicabilidade translacional dos estudos “*in vitro*”. Estudos “*in vitro*” de co-cultura somente demonstram a relação entre dois tipos

celulares, não contribuindo de forma significativa no entendimento do processo de cicatrização. (Cross, 1995).

O modelo experimental em animais proposto encontra-se amplamente difundido na literatura mundial, sendo utilizado há décadas para avaliação das etapas de cicatrização. O mesmo apresenta diversas variações, entre elas o tamanho, a distância, a localização e o tipo de lesão infligida, todos para melhor mimetizar o ambiente de cicatrização encontrado em seres humanos. (Catty, 1965; Pories e cols., 1966; Ramirez e cols., 1969; Deitch e cols., 1983; Hien e cols., 1988; Porter e cols., 2003) No entanto, como bem salientou Paus (1999), sabe-se das restrições quanto à extrapolação para o homem dos resultados obtidos nestes estudos com animais, uma vez que existem diferenças anatômicas e no processo de cicatrização destes. Assim, embora a pele do rato seja composta por 3 camadas, como a dos seres humanos (epiderme, derme e hipoderme), existem diferenças na anatomia e na fisiologia de cada uma destas camadas. A pele do rato é coberta por pelos densos, os quais passam por um ciclo capilar bem definido, assim como o dos humanos: fase anágena (crescimento), catágena (regressão) e telógena (repouso). O ciclo dos pelos no dorso do rato progride de cranial para caudal e dura 3 semanas, o que difere das várias regiões do corpo humano (no couro cabeludo o ciclo dura anos) (Azzi, 2005). Outra diferença observa-se na não sensibilidade dos pelos do rato a androgênios, bem como na ausência de glândulas sudoríparas apócrinas e nas pontes de Rete/papilas dérmicas, todas estas presentes nos humanos. Outra diferença que deve ser mencionada é a presença do panículo carnoso nos ratos, a qual é uma camada muscular situada abaixo da pele e somente encontrada nos humanos na região cervical (platisma). Esta favorece a contração da ferida após uma lesão. Apesar destas diferenças, o modelo com ratos tem contribuindo há muito tempo em nossa compreensão do processo cicatricial, devido a sua replicabilidade,

acessibilidade e adaptabilidade (Deitch e cols., 1983; Hien e cols., 1988; Porter e cols., 2003).

1.8 Referências:

Alster T. Laser scar revision: comparison study of 585-nm pulsed dye laser with and without intralesional corticosteroids. *Dermatol Surg.* 2003;29(1):25-9.

Ahmed K, Oas KH, Mack KJ, Garza I. Experience with botulinum toxin type A in medically intractable pediatric chronic daily headache. *Pediatr Neurol.* 2010;43:316-19.

Atiyeh BS, Costagliola M. Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: three decades later. *Burns.* 2007;33:405-413.

Azzi, L. Gender differences in mouse skin morphology and specific effects of sex steroids and dehydroepiandrosterone. *J Invest Dermatol.* 2005;124(1):22-27.

Billingham RE, Medawar PB. Contracture and intussusceptive growth in the healing of extensive wounds in mammalian skin. *J Anat.* 1955;89:114-115.

Branford OA, Dann SC, Grobbelaar AO. The quantitative assessment of wrinkle depth: turning the microscope on botulinum toxin type A. *Ann Plast Surg.* 2010;65:285–293.

Brusselaers N, Pirayesh A, Hoeksema H, *et al.* Skin replacement in burn wounds. *J Trauma.* 2010;68:490-501.

Catty RHC. Healing and contraction of experimental fullthickness wounds in the human. *Br J Surg.* 1965; 52: 542-8.

Chowdri NA, Masarat M, Mattoo *et al.* Keloids and hypertrophic scars: results with intraoperative and serial postoperative corticosteroid injection therapy. *Aust N Z J Surg.* 1999;69(9):655-9.

Clark RA, Folkvord JM, Hart CE *et al.* Platelet isoforms of platelet-derived growth

factor stimulate fibroblasts to contract collagen matrices. *J Clin Invest* 1989;84(3):1036–40

Corps BV. The effect of graft thickness, donor site and graft bed on graft shrinkage in the hooded rat. *Br J Plast Surg*. 1969;22:125–33.

Crooke ST, Bradner WT. Mitomycin C: a review. *Cancer Treat Rev*. 1976;3(3):121-39.

Cross, SE. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. *Br J Plast Surg*. 1995;48(4):189-97.

Davis JS, Kitlowski EA. The immediate contraction of cutaneous grafts and its cause. *Arch Surg*. 1931;23:954-65.

Deitch EA, Wheelahan TM, Rose MP, Clothier J, Cotter J. Hypertrophic burn scars: analysis of variables. *J Trauma*. 1983;23:895-8.

Dunkin CSJ, Pleat JM, et al. Scarring occurs at a critical depth of skin injury: precise measurement in a graduated dermal scratch in human volunteers. *Plast Reconstr Surg* 2007;119(6):1722-32.

Erdag G, Sheridan RL. Fibroblasts improve performance of cultured composite skin substitutes on athymic mice. *Burns* 2004;30:322–8.

Fitzpatrick RE. Treatment of inflamed hypertrophic scars using intralesional 5-FU. *Dermatol Surg*. 1999;25(3):224-32.

Ferguson MW, O’Kane S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Phil. Trans. R. Soc. Lond*. 2004;59:839–850

Gassner HG, Sherris DA, Friedman O. Botulinum toxin-induced immobilization of lower facial wounds. *Arch Facial Plast Surg*. 2009;11:140–142

Gibran NS, Boyce S, Greenhalgh DG. Cutaneous wound healing. *J Burn Care Res*. 2007;28:577-579.

Harrison CA, Gossiel F, Layton CM et al. Use of an in vitro model of tissue-engineered

- skin to investigate the mechanism of skin graft contraction. *Tissue Eng.* 2006;3119–33
- Hettiaratchy S, Dziewulski P. ABC of burns: an Introduction. *BMJ.* 2004;328:1366-8.
- Hien NT, Prawer SE, Katz HI. Facilitated wound healing using transparent film dressing following Mohs micrographic surgery. *Arch Dermatol.* 1988;124:9036-37.
- Hinshaw JR, Miller ER. Histology of healing split-thickness, full-thickness autogenous skin grafts and donor sites. *Arch Surg.* 1965;91:658-70.
- Hinz B, Gabbiani G. Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost* 2003;90(6):993-1002.
- Holavanahalli RK, Helm PA, Kowalske KJ. Long-term outcomes in patients surviving large burns: the skin. *J Burn Care Res.* 2010;31:631-639.
- James M, Stevenson H. Reduction of open wound contraction in humans with a synthetic dressing. *Eur J Plas Surg.* 1990;5:189-191
- Jones T, McDonald S, Deitch EA. Effect of graft bed on long-term functional results of extremity skin grafts. *J Burn Care Rehabil.* 1988;9:72-4.
- Junker JP, Kratz C, Tollback A et al. Mechanical tension stimulates the transdifferentiation of fibroblasts into myofibroblasts in human burn scars. *Burns* 2008;34(7):942–6.
- Kamram A, et al. A comparison of survival and secondary contraction in expanded vs conventional full thickness skin grafts. *Eplasty*; 2012:12
- Kwan P, Hori K. Et al. Scar and contracture: biological Principles. *Hand Clin.* 2009;25:511-528.
- Leblebici B, Adam M, Bagis S, Tarim AM, Noyan T, Akman MN, *et al.* Quality of life after burn injury: the impact of joint contracture. *J Burn Care Res.* 2006;27:864-8.
- Lee BJ, Jeong JH, Wang SG et al. Effect of Botulinum Toxin Type A on a Rat Surgical Wound Model. *Clin Exp Otorh.* 2009;2:20-27

- Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair: a study with hydrocortisone and anti-macrophage sérum. *Am J Patol.* 1992;78:71-100.
- McDonald WS, Deitch EA. Hypertrophic skin grafts in burned patients: a prospective analysis of variables. *J Trauma.* 1987;27:147-50.
- Mathes SJ, Nahai F. *Reconstructive surgery. Principles, Anatomy and Techniques.* Churchill Livingstone Medical Publishing. 1997. 617-642 p.
- Miyamura S, Shigeno N, Matsui M et al. The biological studies on mitomycin I: antibacterial activities of mitomycin derivatives. *J Antibiot.* 1967;20(2):72-6.
- Melega JM et al. *Cirurgia Plástica – Fundamentos e arte: Princípios gerais.* Guanabara Koogan, 2002. 387-409 p.
- Nedelec B, Dodd CM, Scott PG et al. Effect of interferon-alpha2b on guinea pig wound closure and the expression of cytoskeletal proteins in vivo. *Wound Repair Regen* 1998;6(3):202–12
- O’Leary M, Dierich M. Botulinum toxin type A for the treatment of urinary tract dysfunction in neurological disorders. *Urol Nurs.* 2010;30:228-234.
- Paus S. A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol.* 1999;113:523-532.
- Park JE, Barbul A. Understanding the role of the immune regulation in wound healing. *Am J Surg.* 2004;187:11-16.
- Pories WJ, Schear EW, Jordan DR *et al.* The measurement of human wound healing. *Surgery.* 1966;59:8214-15.
- Porter, R. M. Mouse models for human hair loss disorders. *Journal of Anatomy.* 2003;202:125–131.
- Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 2008;17:1063-1072.

- Ramirez AT, Soroff HS, Schwartz MS, Mooty J, Pearson E, Raben MS. Experimental wound healing in man. *Surg Gynecol Obstet*. 1969;128:283-93.
- Raymundo MM, Goldim JR. Ética em pesquisa em modelos animais. *Bioética*. 2002;10(1):31-44.
- Rudolph R. The effect of skin graft preparation on wound contraction. *Surg Gynecol Obstet*. 1976;142:49-56.
- Ryan GB, Cliff WJ et al. Myofibroblasts in human granulation tissue. *Hum Pathol* 1974;5(1):55-67.
- Rohrbach S, Olthoff A, Laskawi R et al. Botulinum toxin type A induces apoptosis in nasal glands of guinea pigs. *Ann. Oto. Rhinol. Laryn*. 2001;110:1045–1050.
- Scheffer AR, Erasmus C, van Hulst K, van Limbeek J, Jongerius PH. Efficacy and duration of botulinum toxin treatment for drooling in 131 children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010;136:873–877.
- Schneider JC, Holavanahalli R, Helm P, Goldstein R, Kowalske K. Contractures in burn injury: defining the problem. *J Burn Care Res*. 2006;27:508-14.
- Simpson DM, Ross R. The neutrophilic leukocyte in wound repair: a study with anti-neutrophil serum. *J Clin Invest*. 1972;51:2009-2023.
- Singer AJ, Clarck RAF. Mechanisms of disease: cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341(10):738-746.
- Stern PJ, Law EJ, Benedict FE, MacMillan BG. Surgical treatment of elbow contractures in postburn children. *Plast Reconstr Surg*. 1985;76:441-6.
- Thorne, CH. Grabb & Smith's Plastic Surgery. 6th edition. Lippincot Williams & Williams; 2007. 7-8 p.

Walden JL, Garcia H, Hawkins H, Crouchet JR, Traber L, Gore DC. Both dermal matrix and epidermis contribute to an inhibition of wound contraction. *Ann Plast Surg.* 2000;45:162-6.

Warldorf H, Eewkes J.. Wound Healing. *Adv Dermatol.* 1995;1:77-78.

Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003;83:835-870.

Wolff K, Goldsmith L A, Gilcherst BA, *et al.* Overview of biology, development, and structure of skin. *Fitz-patrick's Dermatology in General Medicine.* 7th Edition. McGraw-Hill; 2008. 57–73p.

Wooley K, Martin P. Conserved Mechanisms of repair: from damaged single cells to wounds in multicelular tissues. *Bioessays.* 2000;22(10):911-919.

Wong, V, Sorkin M, Glotzbach JP, *et al.* Surgical Approaches to Create Murine Models of Human Wound Healing. *J Biomed Biotechnol.* 2011;1:2-3.

Zhibo X, Zhang F, Cui Z. Treatment of hypertrophic scars with intralesional botulinum toxin type A injections: a preliminary report. *Aesthetic Plast Surg.* 2010;33:409-412.

Zhibo X, Zhang F, Lin W, Zhang M, Liu Y. Effect of botulinum toxin type A on transforming growth factor beta1 in fibroblasts derived from hypertrophic scar: a preliminary report. *Aesthetic Plast Surg.* 2010;34:424-427.

Zhibo X, Zhang MB. Botulinum toxin type A affects cell cycle distribution of fibroblasts derived from hypertrophic scar. *Plast Reconstr Aesth Surg.* 2010;61:1128-29.

Zhibo X, Zhang M, Liu Y, Ren L. Botulinum Toxin Type A Inhibits Connective Tissue Growth Factor Expression in Fibroblasts Derived From Hypertrophic Scar. *Aesth Plast Surg.* 2011;35:802-807.

Yosipovitch G. Notalgia paresthetica treated with botulinum toxin type A. Arch Dermatol. 2010;146:1299-1300.

2 Objetivos:

2.1 Objetivo Geral:

O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da toxina botulínica tipo A sobre a contração das feridas de espessura total tratadas com enxertos de espessura total em um modelo experimental com ratos Wistar.

2.2 Objetivos Específicos:

- a) Quantificar a redução na contração das feridas operatórias tratadas com as diferentes doses de toxina botulínica por fotografia digital
- b) Avaliar o grau de epitelização nas lesões dos grupos tratados com as diferentes doses de toxina botulínica
- c) Avaliar o grau de neovascularização nas lesões dos grupos tratados com as diferentes doses de toxina botulínica
- d) Avaliar o grau de inflamação nas lesões dos grupos tratados com as diferentes doses de toxina botulínica
- e) Avaliar a densidade de fibroblastos nas lesões dos grupos tratados com as diferentes doses de toxina botulínica
- f) Avaliar a densidade das fibras colágenas nas lesões dos grupos tratados com as diferentes doses de toxina botulínica

Effect of botulinum toxin type A in the control of contraction of lesions treated with full-thickness grafts

Gustavo de A. Pereira Filho, Pedro Bins Ely, Cláudio Galleano Zettler
Pathology post graduation program – UFCSPA

Corresponding author: gustavopereirafilho@gmail.com

Introduction: The treatment of traumatic injuries and burns with tissue loss, called full thickness wound, is accomplished primarily with skin grafts. This, however, remains an ongoing challenge because the grafts have a number of limitations, being the principal the secondary contraction determining restriction of movement associated with graft contracture. In this context, currently available treatments are, in many cases, insufficient and the search for new alternatives is necessary.

Objective: The objective is to evaluate the effect of botulinum toxin type A, in different doses, on the contraction of full thickness wounds treated with full-thickness grafts.

Materials and Methods: 18 male Wistar rats were used, with an average weight of 350g, divided into 3 groups: 1) Graft + Toxin 1Ui/cm²; 2) Graft + Toxin 2Ui/cm²; 3) Graft + Toxin 1Ui/cm² and 2Ui/cm². In group 1, two full thickness wounds were produced on the back. The first wound have been subjected to graft + 1Ui/cm² and the second, only to graft. In group 2 was done the same routine, only with a dose of 2Ui/cm². In group 3, aiming in an 14 day histological analisys, three full thickness wounds were produced. On the first, were used a graft + toxin 1Ui/cm², in the second were used graft + toxin 2Ui/cm² and on the third, only the graft was done. The areas of injury were analyzed by a digital photography at 7, 14 and 28 days, as well as by histology at 14 and 28 days.

Results: We observed decreased contraction of the graft at 28 days in the lesions treated with toxin 1Ui/cm² ($p<0.05$) and 2Ui/cm² ($p<0.01$). The epithelialization and neovascularization were not altered by the toxin, both at 14 as at 28 days ($p>0.05$). The degree of inflammation was reduced after 14 days in toxin-treated groups ($p<0.05$), equaling up to controls after 28 days. The density of fibroblasts was reduced after 28 days in both treated groups ($p<0.05$) as well as the collagen density ($p<0.05$).

Conclusion: According to the data obtained, Botulinum toxin appears to reduce secondary contraction of the graft, thus reducing local inflammation, reducing the density of fibroblasts and collagen deposition .

Keywords: Graft ; Botulinum Toxin ; contraction; full thickness wound

1 . Introduction

The treatment of traumatic injuries and burns with tissue loss, called Full thickness wound, is accomplished primarily with skin grafts. This, however, remains a constant challenge, because the grafts have several limitations, mainly by limiting the movement of joints and causing important aesthetic distortions. Among the most limiting complications, we found the secondary graft contraction and local contracture^{1,2}. There are many proposed treatments to alleviate these complications, but surely the results would be better if we could avoid them³⁻⁷. The full thickness wounds are injuries that caused full destruction of the epidermis and dermis, including skin appendices⁸ and is generally caused by 3rd degree burns or trauma and coursing with a second intention healing at the expense of an intense tissue contraction⁹.

According to Kwan et al. (2008), fibroblasts are the cells predominantly responsible for tissue contraction, which occurs by traction forces generated by the movement of these cells through connective tissue by filopodia with the actin filaments. This movement and subsequent contraction is synchronized and mediated by environmental cytokines such as TGF β , which increases the contraction without increasing cell proliferation and can be regulated by the amount of PDGF present¹⁰. On the other hand, the shrinkage is reduced with IFN α 2b possibly by decreasing the cytoplasmic actin filaments or enhancing cell apoptosis¹¹. The contracture of the scars, which is more common in mobile areas and joints, is primarily mediated by myofibroblasts, which are transdifferentiated from fibroblast by stimulation the mechanical stress and TGF β ¹².

Botulinum toxin type A is available for clinical use in many countries^{13,14}. For over 20 years, the application of this has proved to be safe and effective in the treatment of several disorders, such as blepharospasm and dynamic facial rhytids^{15,16},

even for pediatric use¹⁷. According Zhibo et al., 2008 and 2009, botulinum toxin type A may reduce hypertrophic scars probably by decreasing cell proliferation of fibroblasts and decreasing expression of TGF β 1 (transforming growth factor) in these²⁰, which generates a decrease in CTGF (connective tissue growth Factor) thus reducing collagen deposition²¹. In addition, Lee et al. (2009) showed that botulinum toxin type A reduces the contraction in wounds healing by second intention, reducing the infiltration of inflammatory cells, as well as local fibrosis. In this context, it is proposed that botulinum toxin type A may have an effect in reducing the contraction of full thickness wounds treated with full-thickness grafts, leading to a healing with reduced contraction. The aim of the present study was to evaluate the effect of botulinum toxin type A on the contraction of full thickness wounds treated with full-thickness grafts on the dorsum of Wistar rats, analyzing the reduction in the contraction of surgical wounds treated with different doses of botulinum toxin by digital photography, as well as histological tissue changes.

2 . Materials and Methods

Animals and Groups

The experimental study was performed in male Wistar rats with an average weight of 350g, divided into 3 groups (n = 18).

Group 1: 6 Wistar rats with two total thickness incisions on the back, each measuring 2x2 cm, and being 2 cm distant from each another. In the first wound a full-thickness skin graft was performed and botulinum toxin type A was injected under it at a concentration of 1 unit per cm². In the second wound, the graft was

performed the same way as above, and the same amount of saline solution was injected under the graft.

Group 2: 6 Wistar rats with two total thickness incisions on the back, each measuring 2x2 cm, and being 2 cm distantly from each another. In the first wound a full-thickness skin graft was performed and botulinum toxin type A was injected under it at a concentration of 2 unit per cm². In the second wound, the graft was performed the same way as above, and the same amount of saline solution was injected under the graft.

Group 3: 6 Wistar rats with three total thickness incisions on the back, each measuring 1x1 cm, and being 1 cm distantly from each another. In the first wound a full-thickness skin graft was performed and botulinum toxin type A was injected under it at a concentration of 1 unit per cm². In the second wound a full-thickness skin graft was performed and botulinum toxin type A was injected under it at a concentration of 2 unit per cm². In the third wound, the graft was performed the same way as above, and the same amount of saline solution was injected under the graft. This group was designed so that we could obtain the histological analisys of the wounds in an early stage of cicatrization (14 days).

The animals were housed individually in boxes to avoid additional injury on the surgery sites, as well as the premature removal of the dressing. They were kept in 12-hour dark/light cycles, with temperature control, as well as water and food "*ad libitum*". The experiments were all done at UFCSPA pathology laboratories.

All experiments were performed following the principles of research ethics, according to Raymundo and Goldim , 2002, and the experiment was approved by the animals ethics committee under the protocol number 12098 (2012).

Doses of toxin

Botulinum toxin type A from Allergan (Botox ®) were used, diluted in 5 ml of 0.9% saline solution. The doses of botulinum toxin type A used in the lesions were 1.0 and UI/cm² and 2UI/cm².

Procedures

The animals were anesthetized using ketamine (90mg/kg) and Xylazine (10mg/kg) by intra-peritoneal technique. We proceeded then removing the fur from the areas to be incised on the back of the animals with adequate machinery for this purpose. Following this, a full thickness incision was performed aseptically (until reaching the panniculus carnosus) in a square shape with the proper size for each group, with total removal of the skin fragment (characterizing the total skin graft) . Then, the fragment was placed in its place of origin, without further manipulation, and sutured with 5.0 nylon continuously and , before the final point was attached, the given dose of botulinum toxin type A (or saline in the control group) as applied in the depth of the area using a 1 ml syringe and 30G needle. After, a dressing with non-adherent gauze and sponge (Brown's dressing) was built and attached to the back of the animal with 4.0 nylon, which remained in place for 7 days in order to immobilize the graft during the soaking nutrition fase. The wounds were made 2 cm far from each other (groups 1 and 2) and 1 cm (group 3), area more than enough to prevent the spread of botulinum toxin used. Buprenorphine 0.10 mg/kg was used subcutaneously every 6 hours during the first 48 hours for post operative analgesia.

Animals in groups 1 and 2 underwent anesthesia on days 7 and 14 of the experiment in order to perform the standardized digital photographs.

The animals were sacrificed by intra-peritoneal overdose of anesthetic {ketamine (270mg/kg) and Xylazine (30mg/Kg)}, with groups 1 and 2 being sacrificed on the 28th day of the experiment . The animals in groups 3, in turn, were sacrificed on the 14th day of the experiment, so that we could perform the histological analysis in an early period of healing.

Analysis

Digital Photography

The animals in groups 1 and 2 underwent standardized digital photographs, under anesthesia, with the Canon T4i camera, 18-55mm lens and tripod 20 cm distant, on the 7th, 14th and 28th days of the experiment, for visual assessment of the wound contraction process. The analysis of the photographs were performed with "Image J Basics" program, which convert pixels into measuring language.

Histology

Hematoxylin & eosin and Masson Trichrome stains were used for histological analyze. The samples from group 3 (14th experimental day), as well as the samples collected on the 28th experimental day from groups 1 and 2, were analyzed to quantify the degree of epithelialization, neovascularization and inflammation, as well as the density of collagen fibers and fibroblasts. The samples were preserved in 10% formaldehyde and, after standard laboratory preparation, included in paraffin blocks. The following were analyzed by a pathologist blinded to the groups under light microscopy and, after the selection of 10 random fields, were classified according to the following classification: 0 - Little ; 1 - Moderate ; 2 - Good ; 3 – A lot

Sample calculation

The sample was calculated according to the formula $n = 1 + [2(z_a + z_b)^2 (s/d)^2]$, using as $\alpha = 0.05$ ($p < 0.05$), $s = 0.2$ (maximum standard deviation of 20 %), $d = 0.4$ (expected difference between groups of 40%). Thus, the result was $N = 6$.

Statistical analysis

Data analysis was performed using SPSS 21 program, using the "t" student test and Mann Whitney test. Significant differences were considered with $P < 0.05$. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation when appropriate.

3. Results

All animals survived to the experiment. In 2 animals, occurred displacement of the Brown dressing before the seventh day of the experiment, which led to a partial loss of the graft in the control and the treated areas

Wound contraction

Homogeneity was observed among all groups in the starting area of inflicted injuries, as well as after 7 days of experiment, no significant differences being observed between them. The average area of the wounds after 7 days of experiment was $4,989 \text{ cm}^2$ ($\pm 0,735$) in the control group (CO), $5,001 \text{ cm}^2$ ($\pm 0,955$) in the 1 Un. Botox group (Botox 1Ui) and $5,224 \text{ cm}^2$ ($\pm 0,120$) in the 2 Un. Botox group (Botox 2Ui) - (CO vs Botox 1Ui vs Botox 2Ui $p > 0.05$). By analyzing the areas at 14 days of experiment, it was observed that the averages were $3,769 \text{ cm}^2$ (± 0.668) in the control group, $4,175 \text{ cm}^2$ ($\pm 0,642$) in the Botox 1Ui and $4,389 \text{ cm}^2$ (± 0.430) in botox 2Ui. (CO vs Botox 1Ui vs Botox 2Ui $p > 0.05$). By analyzing the areas after 28 days of

experiment, it was observed that the averages were 2,717 cm² ($\pm 0,293$) in the control group, 3,364 cm² (± 0.560) in the Botox 1Ui and 3,724 cm² (± 0.587) in Botox 2Ui (CO vs Botox 1Ui $p < 0.05$ / CO vs Botox 2Ui $p < 0.01$) [Figure 2A].

It was observed, thus, in relation to the initial wound, in the control group an average contraction of 5.87 % at 7 days , 28.9 % at 14 days and 48.8 % at 28 days . In the group treated with 1Ui/cm² , there was an average shrinkage of the wounds, in relation to the initial injury, of 5.65 % at 7 days , 21.3 % at 14 days and 36.6 % at 28 days. In botox 2Ui treated group, there was an average wound contraction, in relation to the initial injury, of 4.83 % at 7 days , 17.2 % at 14 days and 28.8 % at 28 days (Figure 2B).

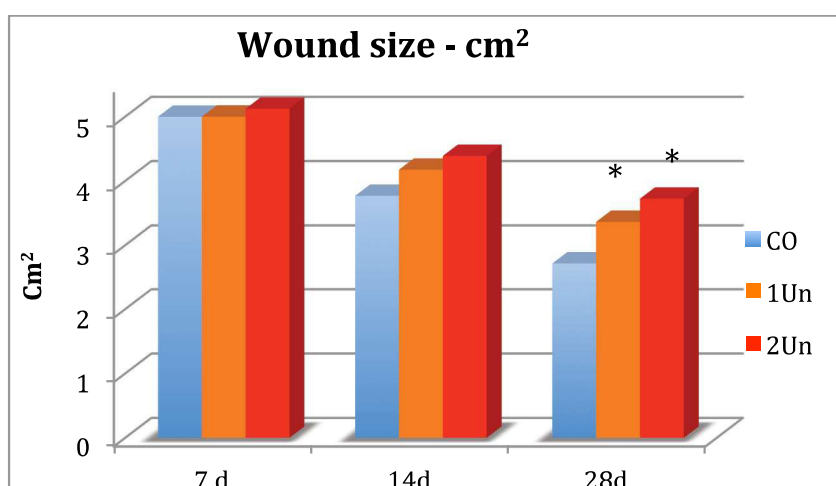


Figure 2A: Average area of wounds in cm² at 7, 14 and 28 days, calculated by Image J Basics program, of the control group (Co), treated with 1Ui/cm² (1UN) and treated with 2Ui/cm² (2Un). * Co vs 1Un $p < 0.05$ / Co vs 2Un $p < 0.01$.

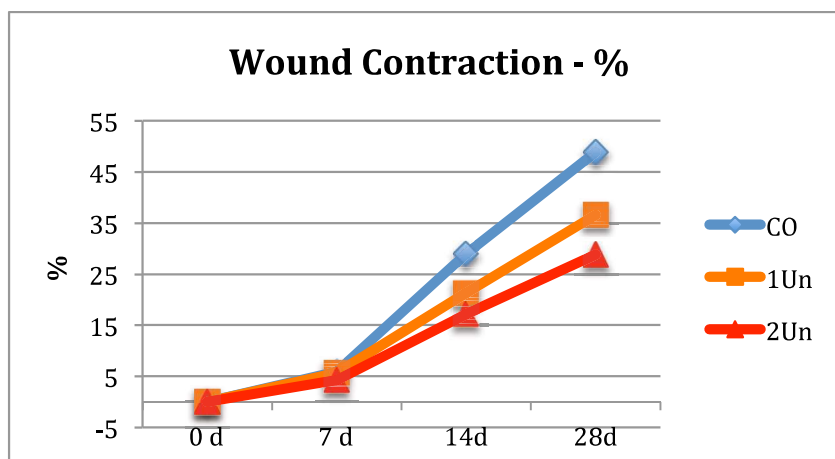


Figure 2B: Comparison between the wound contraction average in cm^2 at 7, 14 and 28 days, calculated by Image J Basics program, of the control group (Co), group treated with $1\text{UI}/\text{cm}^2$ (1UN) and group treated with $2\text{UI}/\text{cm}^2$ (2Un). * Co vs 1Un $p < 0.05$ / Co vs 2Un $p < 0.01$.

Histological Analysis

Histological analysis by direct microscopy revealed no significant differences in the scores of epithelialization between the control groups and both groups treated with different doses of botulinum toxin, at fourteenth day, as well as in the twenty-eighth days ($P > 0.05$, Figure 3A, 3B and 3C).

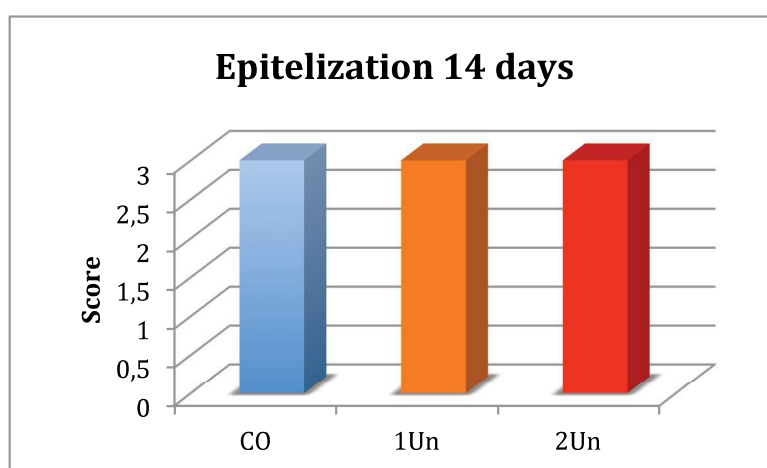


Figure 3A: Histological score of epithelialization at day 14 of the control groups (Co), treated with $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1UN) and treated with $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). Co vs 1UN vs 2UN $p > 0.05$.

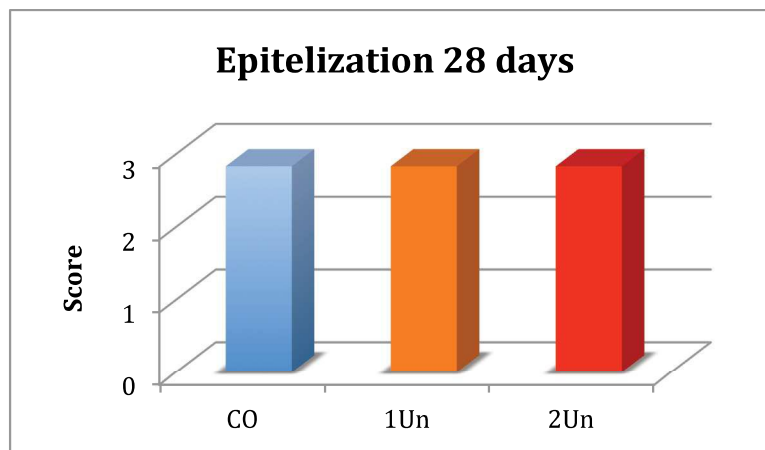


Figure 3B: Histological score of epithelialization at day 28 of the control groups (Co), treated with $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1UN) and treated with $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). Co vs 1UN vs 2UN $p > 0.05$.

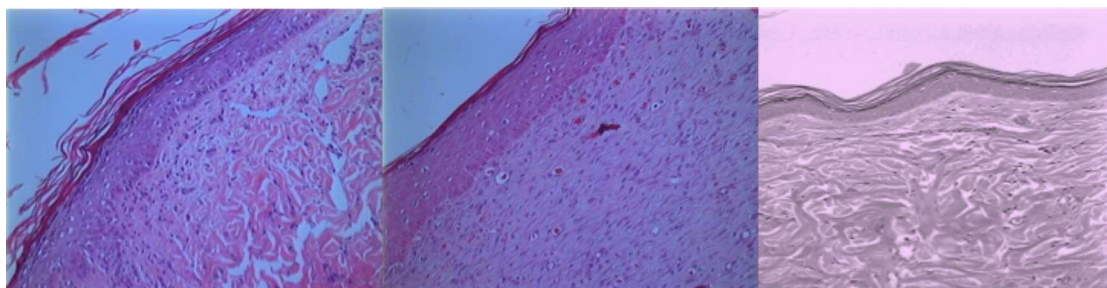


Figure 3C: Histological samples (H&E 100x) at 28 days of control group, treated with $1\text{un}/\text{cm}^2$ and treated with $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). No differences observed among groups in epithelialization.

Similarly, no statistical differences were observed regarding the scoring of neovascularization between groups in the examined periods ($p > 0.05$, Figure 4A, 4B and 4C).

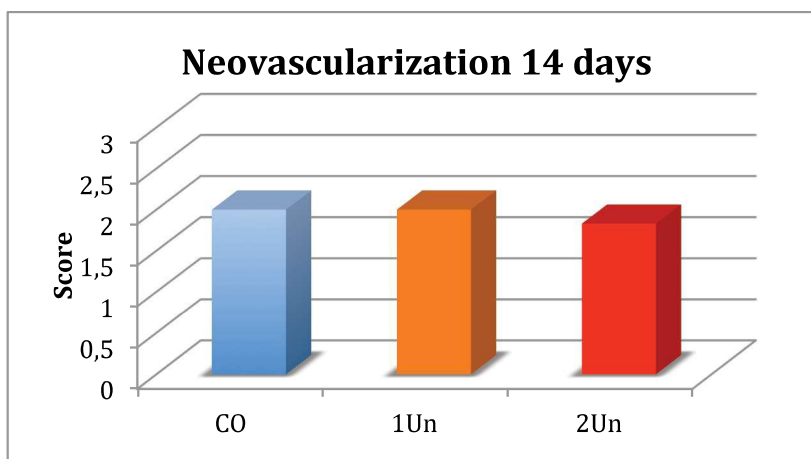


Figure 4A: Histological score of Neovascularization at day 14 of the control groups (Co), treated with $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1UN) and treated with $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). Co vs 1UN vs 2UN $p > 0.05$.

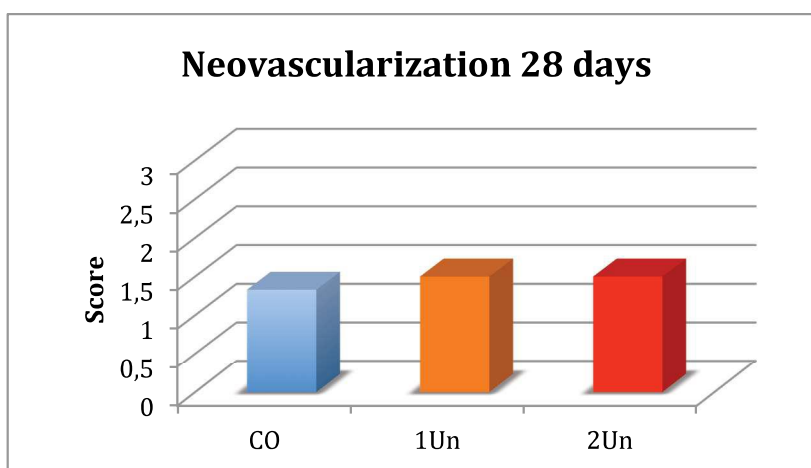


Figure 4B: Histological score of Neovascularization at day 28 of the control groups (Co), treated with $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1UN) and treated with $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). Co vs 1UN vs 2UN $p > 0.05$.

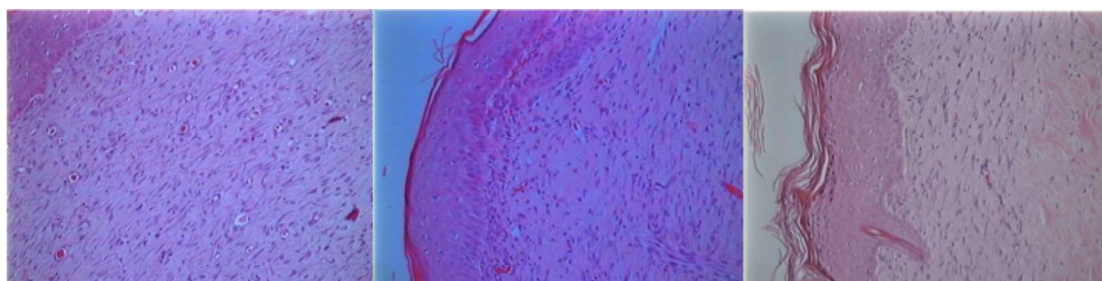


Figure 4C: Histological samples (H&E 100x) at 28 days of control group, treated with $1\text{un}/\text{cm}^2$ and treated with $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). No differences observed among groups in neovascularization.

However, there was significant difference when analyzing the scores of inflammation in a recent period of healing (fourteen days), with a higher score in the control group than in the groups treated with botulinum toxin, both with 1 Un/cm² as 2 Un/cm² ($p < 0.05$, Figure 5A and 5C). This difference, however, did not remain when we analyzed the samples at twenty-eight days, when groups had similar scores ($p > 0.05$, Figure 5B and 5C).

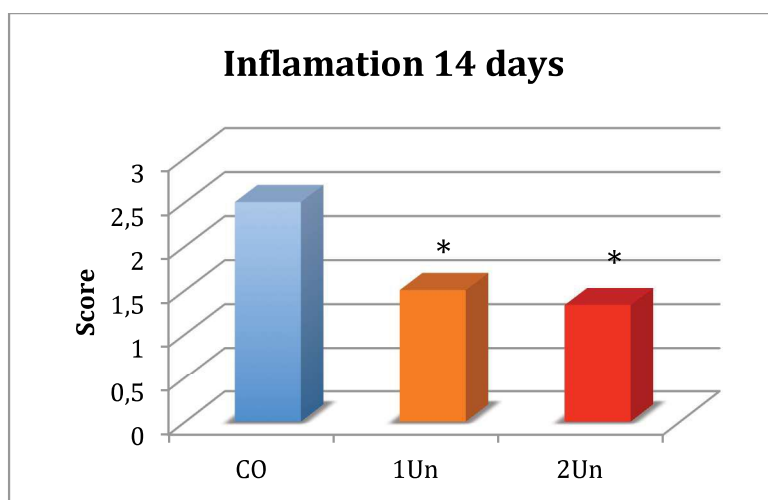


Figure 5A: Histological score of Inflammation at day 14 of the control groups (Co), treated with 1un/cm² (1UN) and treated with 2Un/cm² (2Un). * Co vs 1Un vs 2Un $p < 0,05$

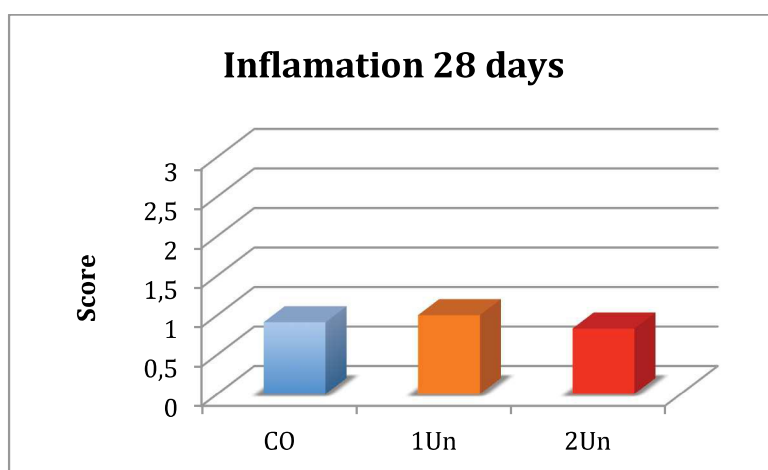


Figure 5B: Histological score of Inflammation at day 28 of the control groups (Co), treated with 1un/cm² (1UN) and treated with 2Un/cm² (2Un). Co vs 1UN vs 2UN $p > 0.05$.

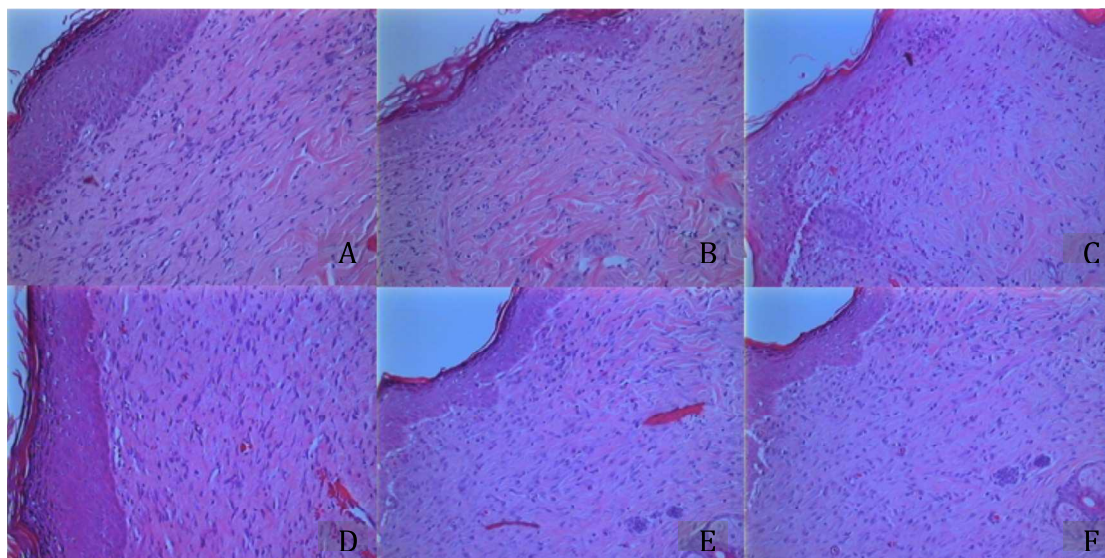


Figure 5C: Histological samples (H&E 200x) at 14 days of control group (A), treated with $1\text{un}/\text{cm}^2$ (B) and treated with $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (C). Samples at 28 days of control group (D), treated with $1\text{un}/\text{cm}^2$ (E) and treated with $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (F).

About the fibroblasts density, we observed a reduction at day twenty-eight in the groups treated with botulinum toxin, both with $1\text{Un}/\text{cm}^2$ as $2\text{Un}/\text{cm}^2$ when compared to the control group ($p < 0.05$, Figure 6A and 6C). This Difference was not present at day fourteen ($p > 0.05$, Figure 6B and 6C).

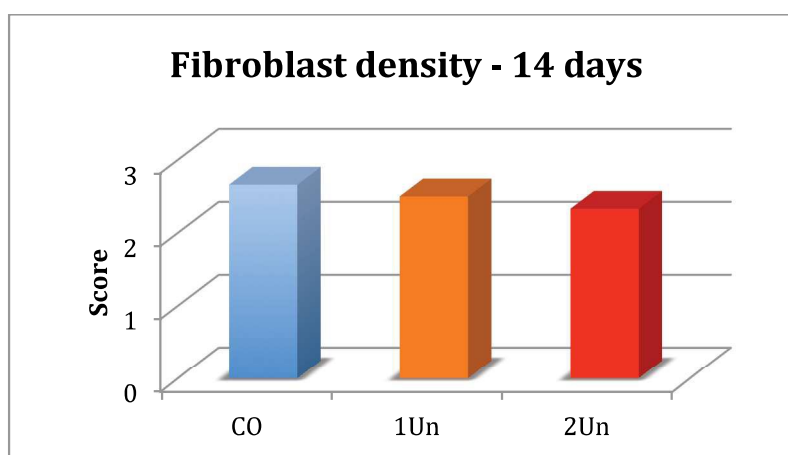


Figure 6A: Histological score of fibroblast density at day 14 of the control groups (Co), treated with $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1UN) and treated with $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). Co vs 1UN vs 2UN $p > 0.05$.

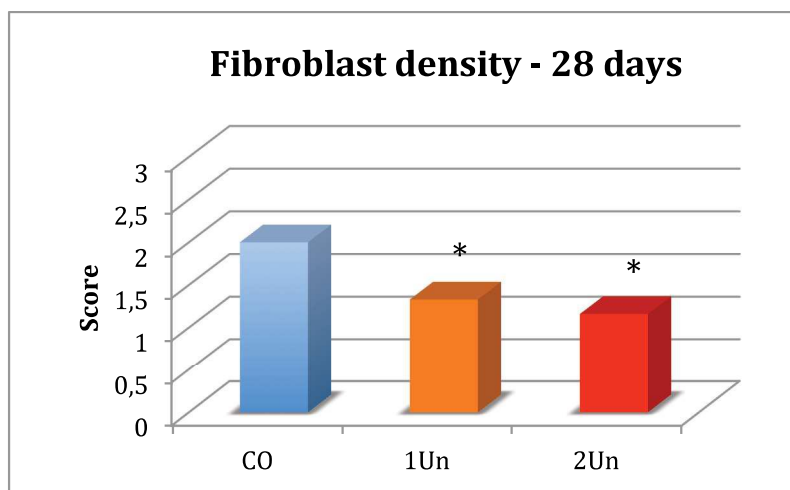


Figure 6B: Histological score of fibroblast density at day 28 of the control groups (Co), treated with $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1UN) and treated with $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). * Co vs 1Un vs 2Un $p < 0,05$

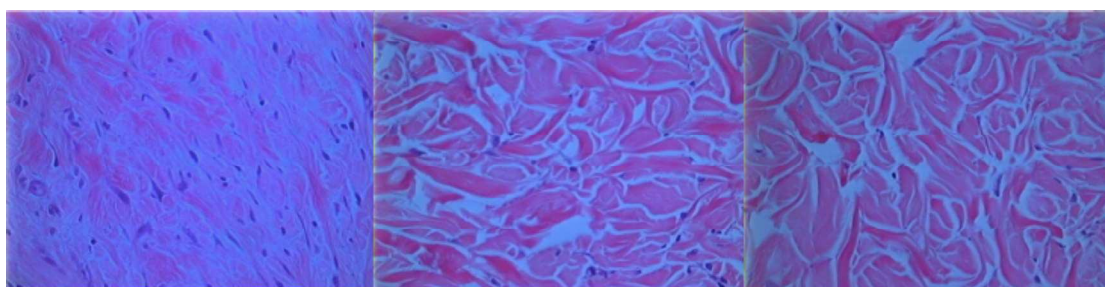


Figure 6C: Histological samples (H&E 400x) at 28 days of control group, treated with $1\text{un}/\text{cm}^2$ and treated with $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un).

For the collagen scores, we could observe a reduction at day twenty-eight in the groups treated with botulinum toxin, both with $1\text{Un}/\text{cm}^2$ as $2\text{Un}/\text{cm}^2$ when compared to the control group ($p < 0.05$, Figure 7A and 7C). Difference is not present at day fourteen ($p > 0.05$, Figure 7B and 7C).

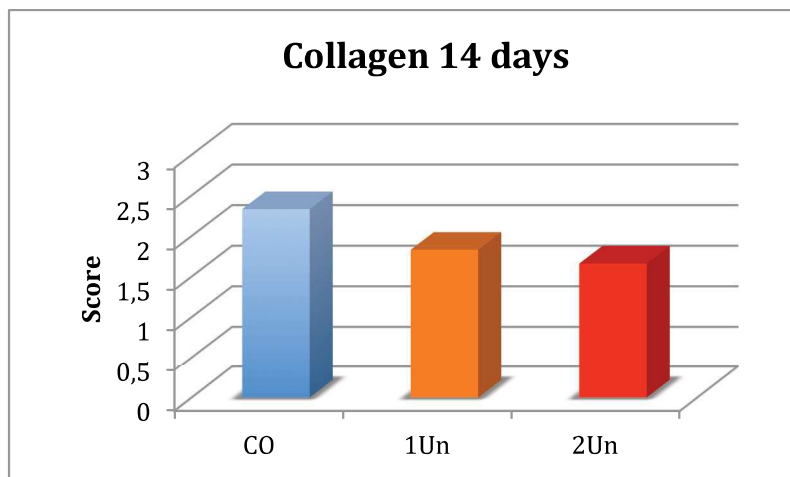


Figure 7A: Histological score of collagen density at day 14 of the control groups (Co), treated with $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1UN) and treated with $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). Co vs 1UN vs 2UN $p > 0.05$.

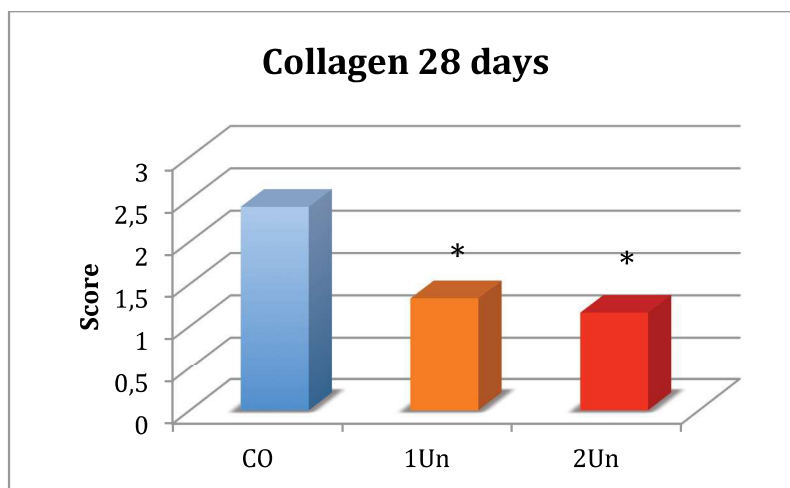


Figure 7B: Histological score of collagen density at day 28 of the control groups (Co), treated with $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1UN) and treated with $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). * Co vs 1Un vs 2Un $p < 0.05$

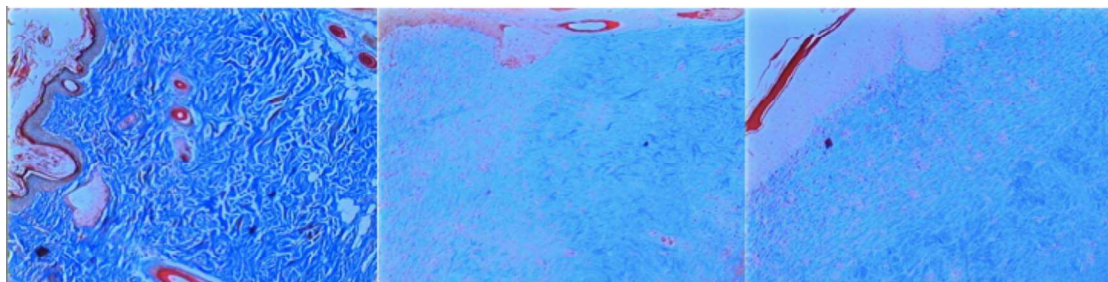


Figure 7C: Histological samples (H&E 100x) at 28 days of control group, treated with $1\text{un}/\text{cm}^2$ and treated with $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un).

4. Discussion

The contraction that occurs in the healing of full-thickness lesions, although a physiological event in human wound healing, cause various disorders, such as functional and aesthetic limitations. We should remember, however, that this biological healing process artifice appeared in the early evolution when the environment in which we lived was indeed hostile. Thus, the sacrifice of repair at the expense of healing, with the consequent loss of quality of the recovered material for the gain in healing speed, was justified. However, with the evolution of the human being, as well as the improvement of the environment we live in, showed up the odds that scar contraction features, such as the restriction of movement when healing occurs on joints and facial distortions due to wound contraction and scar contractures, such as ectropion and labial deviations²⁴. In this context, we started to look for alternatives to control or reduce this scar contraction, without, however, causing damage to the healing process. Thus, there are numerous studies employing different techniques trying to mitigate the contraction of wounds, such as skin grafts, the use of special dressings²⁵, treatment with corticosteroids²⁶, mitomycin C^{27,28}, 5 - fluorouracil²⁹, botulinum toxin²², among others. The grafting of full-thickness skin injuries after debridement has remained the treatment of choice, being the one that more effectively reduces the local contraction and provides a good aesthetic result in most cases. Botulinum toxin, in turn, proved to be effective in some studies in reducing wound contraction in healing by second intention²², and reducing hypertrophic scars^{19,20}. However, the potential use of full thickness skin grafting used in combination with botulinum toxin, in order to further reduce this contraction, had not yet been explored.

In this study, we observed through photography and digital analysis, that the use of full thickness skin grafting associated with 1UI/cm² or 2UI/cm² botulinum toxin

effectively reduces scar contraction in full thickness lesions compared with lesions treated only full-thickness graft. Thus, botulinum toxin seems to increase our control of wound contraction, as demonstrated in other studies²², even when used with adjuvant grafting. This reduction of the contraction started to occur from the 14th day of healing, being evident at 28 days, when there was a mean difference of 1.01 cm² ($p < 0.05$) between the treated and control groups. It's also remarkable that the control group showed similar contraction percentage for full-thickness grafts from the literature³⁰.

It was noted in this context that this reduction in the contraction did not cause any impact on histological scores for epithelialization and neovascularization, both in an early period of healing, 14 days, and in a later period, after 28 days, thus demonstrating that botulinum toxin did not affect the rate or speed of healing. However, it was observed that the toxin reduced the inflammation score after 14 days of experiment, known as one of the key factors for tissue contraction of full-thickness wounds³¹. Has also reduced the density of fibroblasts and collagen present in the wounds at 28 days. Thus, this reduction in early inflammatory process caused by botulinum toxin seems to have reduced the incentive for the local production and migration of fibroblasts, which are implicated as the main effectors of secondary contraction^{32,33}. The botulinum toxin may also have regulated the cell cycle and caused apoptosis of fibroblasts, since it is implied by some in vitro studies with this ability³⁴. In this context, may have occurred yet, similar to the observed by Zhibo et al., 2010, a decrease in the expression of TGF- β 1, the main cytokine that stimulates fibroblast proliferation, and therefore crucial in the contraction of injuries and formation of hypertrophic scars. The TGF- β 1, produced largely by fibroblasts, is also essential in the transformation of these into myofibroblasts, which have the main

function of tissue contraction. Thus, the decreased expression of TGF- β 1 may have further reduced the activation of fibroblasts into myofibroblasts, which may have also contributed to the reduced contraction. There is also another effect caused by botulinum toxin that was also shown to contribute to the reduction of tissue contraction: a chemical immobilization of local muscles and surroundings of the wound. As shown by Gassner et al. (2009), wounds located in mobile areas, such as joints, have a greater tendency to suffer contraction and become hypertrophic scars, and this fact is mitigated by treatment with the toxin for the temporary paralysis of adjacent muscles.

All these biological changes caused by botulinum toxin culminated in our study with a lower collagen deposition in the wounds as well as better alignment of collagen fibers, thus showing less local fibrosis and certainly contributing to less tissue contraction, as observed by Lee et al., in 2009, in wounds healing by second intention. We should, however, be cautious in extrapolating these results to humans, since the contraction occur in a more intense way in mice, probably making this result more exuberant^{36,37}.

5. Conclusion

In conclusion it has been demonstrated that botulinum toxin both in 1UI/cm² concentration, as well as in 2UI/cm², seems to reduce scar contraction when used in conjunction with the total thickness skin graft, without interfering with the epithelialization and neovascularization, reducing inflammation in an early period of the healing process and the density of fibroblasts and collagen deposition in a later period. Thus, it opens the possibility of using this to obtain better functional and

aesthetic results after performing skin grafts to cover critical areas such as joints, eyelid edges, lip commissures, among others. It is evident that further research is needed to uncover the molecular mechanisms involved in this contraction reduction, the changes in cytokines, as well as the density and state of activation of myofibroblasts present in the wounds.

Financing

The student received support from CAPES.

References

1. Mathes SJ, Nahai F. Reconstructive surgery. Principles, Anatomy and Techniques. Churchill Livingstone Medical Publishing. 1997. 617-642 p.
2. Thorne, CH. Grabb & Smith's Plastic Surgery. 6th edition. Lippincot Williams & Williams; 2007. 7-8 p.
3. Deitch EA, Wheelahan TM, Rose MP, Clothier J, Cotter J. Hypertrophic burn scars: analysis of variables. J Trauma. 1983;23:895-8.
4. McDonald WS, Deitch EA. Hypertrophic skin grafts in burned patients: a prospective analysis of variables. J Trauma. 1987;27:147-50.
5. Hettiaratchy S, Dziewulski P. ABC of burns: an Introduction. BMJ. 2004;328:1366-8.
6. Leblebici B, Adam M, Bagis S, Tarim AM, Noyan T, Akman MN, *et al.* Quality of life after burn injury: the impact of joint contracture. J Burn Care Res. 2006;27:864-8.
7. Schneider JC, Holavanahalli R, Helm P, Goldstein R, Kowalske K. Contractures in burn injury: defining the problem. J Burn Care Res. 2006;27:508-14.

8. Melega JM et al. Cirurgia Plástica – Fundamentos e arte: Princípios gerais. Guanabara Koogan, 2002. 387-409 p.
9. Kwan P, Hori K. Et al. Scar and contracture: biological Principles. Hand Clin. 2009;25:511-528.
10. Clark RA, Folkvord JM, Hart CE et al. Platelet isoforms of platelet-derived growth factor stimulate fibroblasts to contract collagen matrices. J Clin Invest 1989;84(3):1036–40
11. Nedelec B, Dodd CM, Scott PG et al. Effect of interferon-alpha2b on guinea pig wound closure and the expression of cytoskeletal proteins in vivo. Wound Repair Regen 1998;6(3):202–12
12. Junker JP, Kratz C, Tollback A et al. Mechanical tension stimulates the transdifferentiation of fibroblasts into myofibroblasts in human burn scars. Burns 2008;34(7):942–6.
13. O’Leary M, Dierich M. Botulinum toxin type A for the treatment of urinary tract dysfunction in neurological disorders. Urol Nurs. 2010;30:228-234.
14. Yosipovitch G. Notalgia paresthetica treated with botulinum toxin type A. Arch Dermatol. 2010;146:1299-1300.
15. Ahmed K, Oas KH, Mack KJ, Garza I. Experience with botulinum toxin type A in medically intractable pediatric chronic daily headache. Pediatr Neurol. 2010;43:316-319
16. Branford OA, Dann SC, Grobbelaar AO. The quantitative assessment of wrinkle depth: turning the microscope on botulinum toxin type A. Ann Plast Surg. 2010;65:285–293.

17. Scheffer AR, Erasmus C, van Hulst K, van Limbeek J, Jongerius PH. Efficacy and duration of botulinum toxin treatment for drooling in 131 children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;136:873–877.
18. Zhibo X, Zhang F, Cui Z. Treatment of hypertrophic scars with intralesional botulinum toxin type A injections: a preliminary report. *Aesthetic Plast Surg.* 2010;33:409-412.
19. Zhibo X, Zhang F, Lin W, Zhang M, Liu Y. Effect of botulinum toxin type A on transforming growth factor beta1 in fibroblasts derived from hypertrophic scar: a preliminary report. *Aesthetic Plast Surg.* 2010;34:424-427.
20. Zhibo X, Zhang MB. Botulinum toxin type A affects cell cycle distribution of fibroblasts derived from hypertrophic scar. *Plast Reconstr Aesth Surg.* 2010;61:1128-1129.
21. Zhibo X, Zhang M, Liu Y, Ren L. Botulinum Toxin Type A Inhibits Connective Tissue Growth Factor Expression in Fibroblasts Derived From Hypertrophic Scar. *Aesth Plast Surg.* 2011;35:802-807.
22. Lee BJ, Jeong JH, Wang SG et al. Effect of Botulinum Toxin Type A on a Rat Surgical Wound Model. *Clin Exp Otorh.* 2009;2:20-27
23. Raymundo MM, Goldim JR. Ética em pesquisa em modelos animais. *Bioética.* 2002;10(1):31-44.
24. Ferguson MW, O’Kane S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 2004;59:839–850
25. James M, Stevenson H. Reduction of open wound contraction in humans with a synthetic dressing. *Eur J Plas Surg.* 1990;5:189-191
26. Chowdri NA, Masarat M, Mattoo et al. Keloids and hypertrophic scars: results with intraoperative and serial postoperative corticosteroid injection therapy. *Aust N Z*

J Surg. 1999;69(9):655-9.

27. Miyamura S, Shigeno N, Matsui M et al. The biological studies on mitomycin I: antibacterial activities of mitomycin derivatives. J Antibiot. 1967;20(2):72-6.

28. Crooke ST, Bradner WT. Mitomycin C: a review. Cancer Treat Rev. 1976;3(3):121-39.

29. Fitzpatrick RE. Treatment of inflamed hypertrophic scars using intralesional 5-FU. Dermatol Surg. 1999;25(3):224-32.

30. Kamram A, et al. A comparison of survival and secondary contraction in expanded vs conventional full thickness skin grafts. Eplasty; 2012:12

31. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiol Rev. 2003;83:835-870.

32. Harrison CA, Gossiel F, Layton CM et al. Use of an in vitro model of tissue-engineered skin to investigate the mechanism of skin graft contraction. Tissue Eng. 2006;3119–33

33. Erdag G, Sheridan RL. Fibroblasts improve performance of cultured composite skin substitutes on athymic mice. Burns 2004;30:322–8.

34. Rohrbach S, Olthoff A, Laskawi R et al. Botulinum toxin type A induces apoptosis in nasal glands of guinea pigs. Ann. Oto. Rhinol. Laryn. 2001;110:1045–1050.

35. Gassner HG, Sherris DA, Friedman O. Botulinum toxin-induced immobilization of lower facial wounds. Arch Facial Plast Surg. 2009;11:140–142

36. Catty RHC. Healing and contraction of experimental fullthickness wounds in the human. Br J Surg. 1965; 52: 542-8.

37. Ramirez AT, Soroff HS, Schwartz MS, Mooty J, Pearson E, Raben MS. Experimental wound healing in man. Surg Gynecol Obstet. 1969;128:283-93.

Efeito da toxina botulínica tipo A no controle da contração de lesões tratadas com enxertos de espessura total.

Gustavo de A. Pereira Filho, Pedro Bins Ely, Cláudio Galleano Zettler

Departamento de Pós-Graduação em Patologia – UFCSPA

Endereço para Correspondência: gustavopereirafilho@gmail.com

Resumo

Introdução: O tratamento de lesões traumáticas e queimaduras com perda tecidual, chamadas de lesão de espessura total, é realizado primordialmente com enxertos de pele. Este, no entanto, permanece sendo um constante desafio, pois os enxertos apresentam diversas limitações, sendo a contração secundária do enxerto determinando restrição de movimento com contratura associada uma das principais. Neste contexto, os tratamentos disponíveis atualmente são, em muitos casos, insuficientes e a busca por novas alternativas torna-se necessária.

Objetivo: O objetivo é avaliar o efeito da toxina botulínica tipo A, em diferentes doses, sobre a contração das feridas de espessura total tratadas com enxertos de espessura total.

Materiais e Métodos: Foram utilizados 18 ratos Wistar, machos com peso médio de 350g, divididos em 3 grupos: 1) Enxerto + Toxina 1Ui/cm² 2) Enxerto + Toxina 2Ui/cm², 3) Enxerto + Toxina 1Ui/cm² e 2Ui/cm². No grupo 1, duas lesões de espessura total foram causadas no dorso, tendo a primeira sido submetida a enxerto + 1Ui/cm² e a segunda somente a enxerto. O grupo 2 foi igual, somente com uma dose

de 2Ui/cm². O grupo 3, com objetivo de se realizar a análise histológica aos 14 dias. apresentava 3 lesões, sendo na primeira utilizado enxerto + toxina 1Ui/cm², na segunda enxerto + toxina 2Ui/cm² e na terceira somente o enxerto.

Foram analisadas as áreas das lesões por fotografia digital aos 7, 14 e 28 dias, bem como a histologia.

Resultados: Observou-se diminuição da contração do enxerto aos 28 dias nas lesões tratadas com toxina 1Ui/cm² ($p<0,05$) e 2Ui/cm² ($p<0,01$). A epitelização e a neovascularização não foram alteradas pela toxina, tanto aos 14 quanto aos 28 dias ($p>0,05$). O grau de inflamação estava reduzido aos 14 dias nos grupos tratados com toxina ($p<0,05$), equalizando-se aos controles aos 28 dias. A densidade de fibroblastos apresentou-se reduzida aos 28 dias em ambos grupos tratados ($p<0,05$), bem como a densidade de colágeno ($p<0,05$).

Conclusão: De acordo com os dados obtidos, A toxina botulínica parece reduzir a contração secundária dos enxertos, diminuindo a inflamação local, reduzindo a densidade de fibroblastos e a deposição de colágeno.

Palavras-chave: Enxerto; Toxina Botulínica; Contração; Lesão de espessura total

1. Introdução

O tratamento de lesões traumáticas e queimaduras com perda tecidual, chamadas de lesão de espessura total, é realizado primordialmente com enxertos de pele. Este, no entanto, permanece sendo um constante desafio, pois os enxertos apresentam diversas limitações, principalmente ao limitar a movimentação de articulações e causarem distorções estéticas importantes. Entre as complicações mais limitantes, encontramos a contração secundária do enxerto e a contratura local ^{1,2}. Existem diversos tratamentos propostos para amenizar estas complicações, mas seguramente os resultados seriam melhores se pudéssemos evitá-las ³⁻⁷. As lesões de espessura total são ferimentos que causaram destruição das camadas da epiderme e da derme por completo, incluindo os anexos cutâneos ⁸, sendo geralmente causadas por queimaduras de 3º grau ou traumas e cursando com uma cicatrização por segunda intenção às custas de uma contração tecidual intensa ⁹.

Segundo Kwan e cols. (2008), os fibroblastos são as células predominantemente responsáveis pela contração tecidual, a qual se dá às custas das forças de tração geradas com a movimentação destas células pelo tecido conjuntivo através da filopodia com os filamentos de actina. Esta movimentação e consequente contração ocorre orquestrada e mediada por citocinas ambientais, tais como o TGF β , o qual aumenta a contração sem aumentar a proliferação celular, e que pode ser regulada pela quantidade de PDGF presente¹⁰. Em contraste, a contração é reduzida pela administração de IFN α 2b possivelmente por diminuir os filamentos de actina citoplasmáticos ou por aumentar a apoptose celular¹¹. A contratura das cicatrizes, a qual é mais frequente em áreas móveis e articulações, é mediada primariamente pelos miofibroblastos, os quais são transdiferenciados a partir de fibroblastos tendo como estímulo o estresse mecânico e o TGF β ¹².

A toxina botulínica do tipo A está disponível para uso clínico em muitos países^{13,14}. Por mais de 20 anos, a aplicação desta se mostrou segura e efetiva no tratamento de diversas desordens, tais como o blefaroespasm e ríides faciais dinâmicas^{15,16}. inclusive para uso pediátrico¹⁷. Segundo Zhibo e cols., 2008 e 2009, a toxina botulínica tipo A pode diminuir cicatrizes hipertróficas provavelmente através da diminuição da proliferação celular dos fibroblastos e da diminuição da expressão de TGF β 1 (fator de transformação de crescimento) nestes²¹, a qual gera uma diminuição no CTGF (fator de crescimento do tecido conectivo), diminuindo, conseqüentemente, a deposição de colágeno²². Além disso, Lee e cols. (2009) demonstraram que a toxina botulínica tipo A reduz a contração em feridas com fechamento por segunda intenção, reduzindo a infiltração de células inflamatórias, bem como a fibrose local. Neste contexto, propõe-se que a toxina botulínica tipo A pode apresentar um efeito na diminuição da contração das feridas de espessura total tratadas com enxerto de espessura total, levando a uma cicatrização com menos contração local. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da toxina botulínica tipo A sobre a contração das feridas de espessura total tratadas com enxertos de espessura total no dorso de ratos Wistar, analisando a redução na contração das feridas operatórias tratadas com as diferentes doses de toxina botulínica por fotografia digital, bem como as modificações histológicas dos tecidos.

2. Materiais e métodos

Animais e Grupos

O estudo experimental foi realizado em ratos Wistar, machos, com peso médio de 350g, divididos em 3 grupos (n=18).

Grupo 1: 6 Ratos Wistar com 2 incisões de espessura total no dorso, cada uma medindo 2x2 cm, distando 2 cm uma da outra, sendo na primeira enxertada pele de espessura total com aplicação de toxina botulínica tipo A sob o enxerto na concentração de 1,0

unidade por cm^2 . Na segunda lesão, foi realizado o enxerto com aplicação de igual quantidade de soro fisiológico sob o enxerto.

Grupo 2: 6 ratos Wistar, com 2 incisões de espessura total no dorso, distando 2 cm uma da outra, cada uma medindo 2x2 cm, sendo na primeira enxertada pele de espessura total com aplicação de toxina botulínica tipo A sob o enxerto na concentração de 2 unidades por cm^2 . Na segunda lesão, foi realizado o enxerto com aplicação de igual quantidade de soro fisiológico sob o enxerto.

Grupo 3: 6 ratos Wistar, com 3 incisões de espessura total no dorso, cada uma medindo 1x1 cm, distando 1 cm uma da outra, sendo na primeira enxertada pele de espessura total com aplicação de toxina botulínica tipo A sob o enxerto na concentração de 1,0 unidade por cm^2 . Na segunda lesão, foi realizado o enxerto de pele de espessura total com aplicação de toxina botulínica tipo A sob o enxerto na concentração de 2 unidades por cm^2 . Na terceira lesão, foi realizado o enxerto com aplicação de igual quantidade de soro fisiológico sob o enxerto. Este grupo foi necessário para que se obtivesse amostras para a análise histológica em um período precoce da cicatrização (14 dias).

Os animais foram obtidos no biotério da UFCSPA e foram acondicionados individualmente em caixas a fim de evitar lesão adicional nas áreas operadas, bem como remoção precoce do curativo. Os mesmos foram mantidos em ciclos claro/escuro de 12 horas, com controle de temperatura, bem como com água e ração “ad libitum”. Os experimentos foram realizados nos laboratórios do PPG patologia - UFCSPA.

Todos os experimentos foram realizados seguindo os Princípios de ética em pesquisa, segundo Raymundo e Goldim, 2002 e o trabalho foi aprovado previamente no comitê de ética e pesquisa em animais UFCSPA sob o protocolo 12098 (2012).

Doses de toxina

Utilizou-se a toxina botulínica tipo A da marca Allergan (Botox®), diluída em 5ml de Soro fisiológico 0,9%. As doses de toxina botulínica tipo A utilizadas nas lesões foram de 1,0 UI/cm² e 2UI/cm².

Procedimentos

Os animais foram anestesiados utilizando-se Ketamina (90mg/kg) e Xilasina (10mg/Kg) de forma intra-peritoneal. Procedeu-se, então, a depilação das áreas a serem incisadas no dorso dos animais com máquina adequada para este fim. A seguir, realizou-se, de forma asséptica, incisão de espessura total (até atingir o panículo carnoso) em forma de quadrado, com a dimensão adequada a cada grupo, com remoção total do fragmento de pele (caracterizando o enxerto de pele total). A seguir, o fragmento foi recolocado em seu sitio de origem, sem manipulação adicional, suturado com náilon 5.0 de forma continua e, antes do ponto final, aplicou-se a dose determinada de toxina botulínica tipo A (ou soro fisiológico nos grupos controle) na profundidade da área com uso de uma seringa de 1mL e agulha 30G. A seguir, um curativo com gaze não aderente e esponja (curativo de Brown) foi confeccionado e fixado ao dorso do animal com fio de náilon 4.0, o qual permaneceu no local por 7 dias afim de imobilizar o enxerto durante a fase de nutrição por embebição do mesmo. As lesões distavam entre si 2 cm (nos grupos 1 e 2) e 1 cm (grupo 3), área estimada como suficiente para evitar a dispersão da toxina botulínica na dosagem utilizada. Utilizou-se Buprenorfina 0,10 mg/kg, de forma subcutânea, a cada 6h, durante 48 horas como analgesia pós operatória.

Os animais dos grupos 1 e 2 foram submetidos a anestesia nos dias 7 e 14 do experimento, a fim de se realizar as fotografias digitais padronizadas.

Os animais foram submetidos à eutanásia por meio de sobre-dose anestésica intra-peritonal {Ketamina (270mg/kg) e Xilasina (30mg/Kg)}, sendo os grupos 1 e 2 sacrificados no 28º dia de experimento. Os animais dos grupos 3, por sua vez, foram sacrificados no 14º dia de experimento, para a realização das análises histológicas em um período precoce da cicatrização.

Análises

Fotografia Digital

Os animais dos grupos 1 e 2 foram submetidos a fotografias digitais padronizadas, sob anestesia, com a câmera Canon T4i, lente 18-55mm e tripé a 20 cm, nos dias 7, 14 e 28 do experimento para aferição visual do processo de contração da lesão de espessura total. A análise das fotografias foi realizada com auxílio do programa “Image J Basics”, com o qual converte-se pixels em linguagem métrica.

Histologia

Foram utilizadas as colorações de Hematoxilina e Eosina e Tricrômio de Masson para análises histológicas. As amostras coletadas do grupo 3 no 14º dia, bem como as coletadas no 28º dia dos demais grupos, foram analisadas para quantificação da densidade de fibras colágenas e de fibroblastos, do grau de epitelização, neovascularização e de inflamação. As amostras foram preservadas em formaldeído 10% e, após preparo padrão laboratorial, inclusas em blocos de parafina. A seguir foram analisadas, por patologista cego para os grupos, sob microscopia de luz e, após selecionados 10 campos randômicos, foram classificadas de acordo com o seguinte classificação: 0- Pouco; 1- Moderado; 2- Bom; 3- Muito.

Cálculo amostral

A amostra foi calculada segundo a fórmula $n = 1 + [2(z_a + z_b)^2 (s/d)^2]$, utilizando-se como $a = 0,05$ ($p < 0,05$), $s = 0,2$ (desvio padrão máximo de 20%), $d = 0,4$ (diferença esperada entre os grupos de 40%). Dessa forma, chegou-se ao $N=6$ dos grupos.

Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do programa IBM SPSS 21, utilizando-se o teste “t” de student e Mann Whitney. Foram consideradas significativas diferenças com $P < 0,05$. Os resultados estão expressos em média $\pm$ Desvio padrão quando pertinentes.

3. Resultados

Todos os animais sobreviveram ao experimento. Em 2 animais, ocorreu o deslocamento do curativo de Brown antes do sétimo dia de experimento, o que levou a uma perda parcial do enxerto, tanto da área controle quanto da tratada nestes.

Contração da lesão

Observou-se homogeneidade entre todos os grupos na área inicial das lesões infligidas, bem como aos 7 dias de experimento, não observando-se diferenças significativas entre as mesmas. A área média das lesões aos 7 dias de experimento foi 4,989 cm² ($\pm 0,735$) no grupo Controle, 5,001 cm² ($\pm 0,955$) no grupo Botox 1 Un. e 5,224 cm² ($\pm 0,120$) no grupo Botox 2 Un. (Grupo CO vs Botox 1un vs Botox 2un $p > 0,05$). Ao analisarmos as áreas aos 14 dias de experimento, observou-se que as médias foram 3,769cm² ($\pm 0,668$) no grupo controle, 4,175 cm² ($\pm 0,642$) no grupo

Botox 1 un. e 4,389 cm² ($\pm 0,430$) no grupo botox 2un. (Grupo CO vs Botox 1un vs Botox 2un $p > 0,05$). Ao analisarmos as áreas aos 28 dias de experimento, observou-se que as médias foram 2,717cm² ($\pm 0,293$) no grupo controle, 3,364cm² ($\pm 0,560$) no grupo Botox 1un e 3,724cm² ($\pm 0,587$) no Grupo Botox 2un (Grupo CO vs Botox 1un $p < 0,05$ / Grupo CO vs Botox 2un $p < 0,01$). (Figuras 2A)

Observou-se, dessa forma, no grupo controle uma contração média das lesões em relação à lesão inicial de 5,87% aos 7 dias, 28,9% aos 14 dias e 48,8% aos 28 dias. No grupo tratado com 1un/cm², observou-se uma contração média das lesões em relação à lesão inicial de 5,65% aos 7 dias, 21,3% aos 14 dias e 36,6% aos 28 dias. Já no grupo tratado com 2un/cm², observou-se uma contração média das lesões em relação à lesão inicial de 4,83% aos 7 dias, 17,2% aos 14 dias e 28,8% aos 28 dias (Figura 2B).

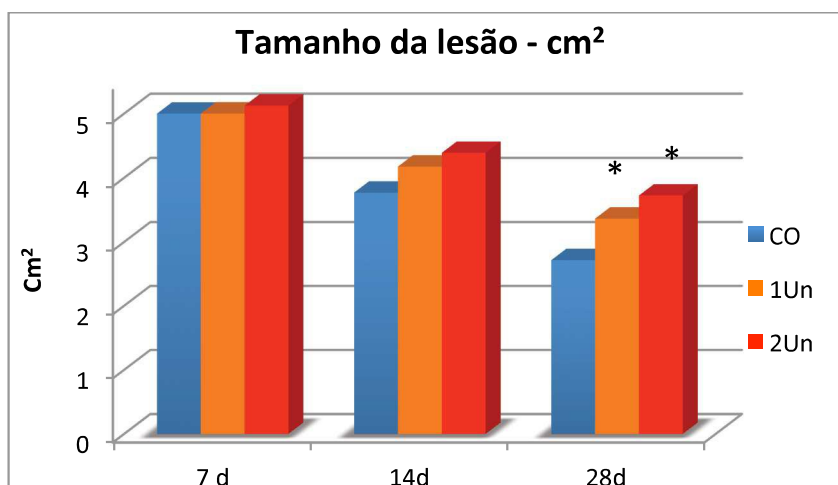


Figura 2A: Área média das lesões em cm² aos 7, 14 e 28 dias calculadas pelo programa Image J Basics dos grupos Controle (Co), tratados com 1un/cm² (1Un) e tratados com 2Un/cm² (2Un). * Co vs 1Un $p < 0,05$ / Co vs 2Un $p < 0,01$.

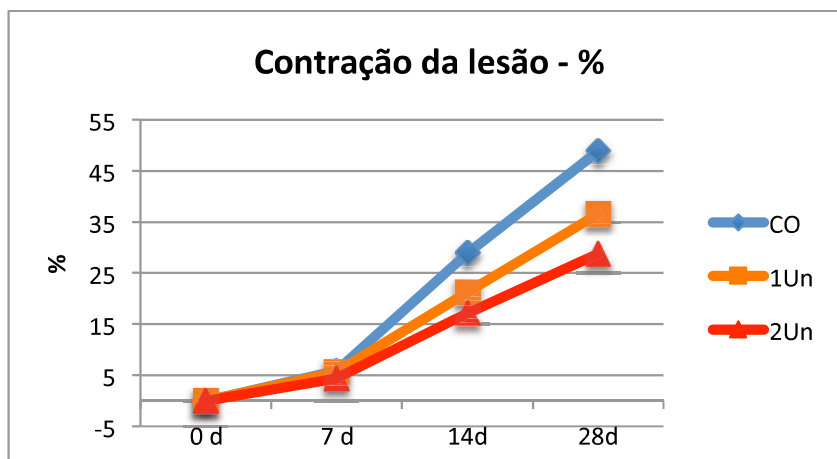


Figura 2B: Comparação entre a contração média das lesões em porcentagem aos 7, 14 e 28 dias calculadas pelo programa Image J Basics dos grupos Controle (Co), tratados com $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1Un) e tratados com $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). Co vs 1Un $p < 0,05$ / Co vs 2Un $p < 0,01$.

Análise histológica

A análise histológica, realizada por microscopia direta, revelou não haver diferenças significativas quanto aos escores de epiteliação entre os grupos controle e tratados com ambas as doses de toxina botulínica, tanto aos quatorze, quanto aos vinte e oito dias ($P > 0,05$, Figura 3A, 3B e 3C).

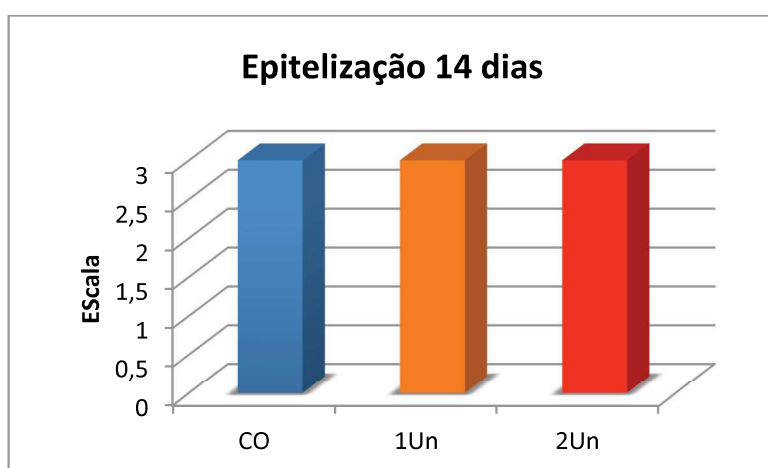


Figura 3A: Escore histológico de epiteliação aos 14 dias dos grupos Controle (Co), tratados com $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1Un) e tratados com $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). Co vs 1Un vs 2Un $p > 0,05$

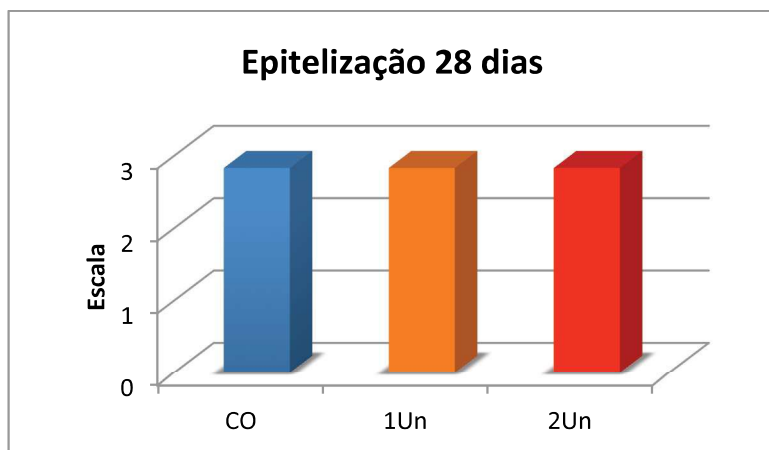


Figura 3B: Escore histológico de epitelização aos 28 dias dos grupos Controle (Co), tratados com $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1Un) e tratados com $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). Co vs 1Un vs 2Un $p>0,05$

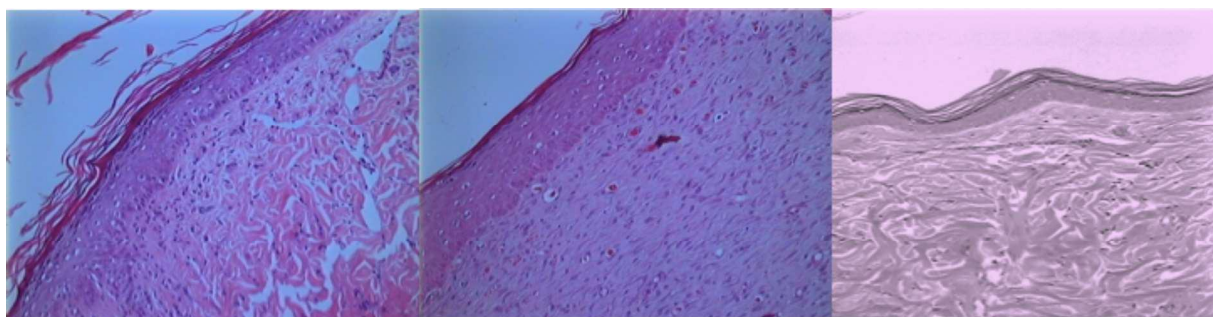


Figura 3C: Cortes histológicos corados com Hematoxilina & Eosina 100x aos 28 dias dos grupos Controle (Co), tratados com $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1Un) e tratados com $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). Sem diferenças na epitelização entre os grupos.

Da mesma forma, não foram evidenciadas diferenças estatísticas quanto ao escore de neovascularização entre os grupos nos períodos examinados ($p>0,05$, Figura 4A, 4B e 4C).

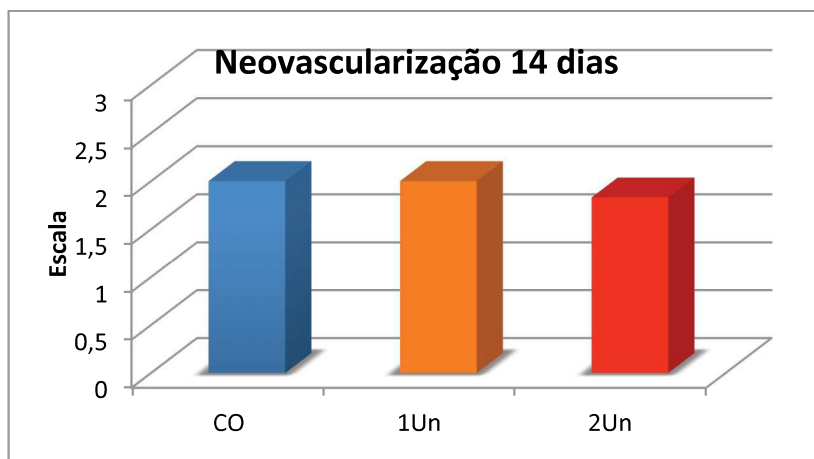


Figura 4A: Escore histológico de neovascularização aos 14 dias dos grupos Controle (Co), tratados com $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1Un) e tratados com $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). Co vs 1Un vs 2Un $p>0,05$

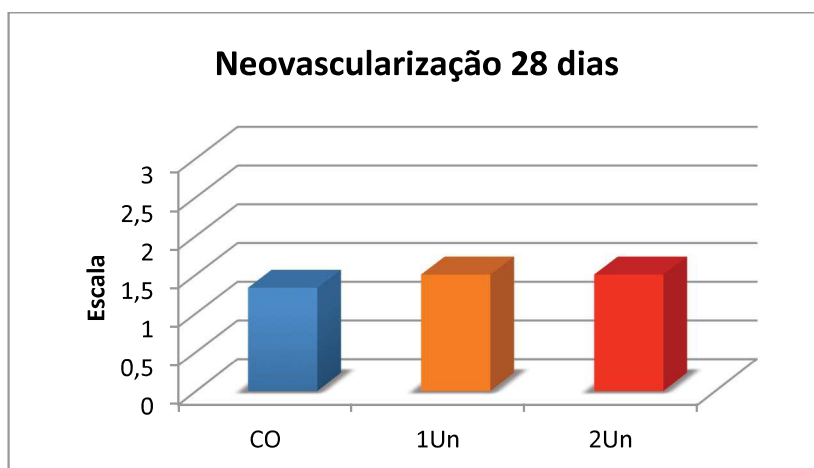


Figura 4B: Escore histológico de neovascularização aos 28 dias dos grupos Controle (Co), tratados com $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1Un) e tratados com $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). Co vs 1Un vs 2Un $p>0,05$

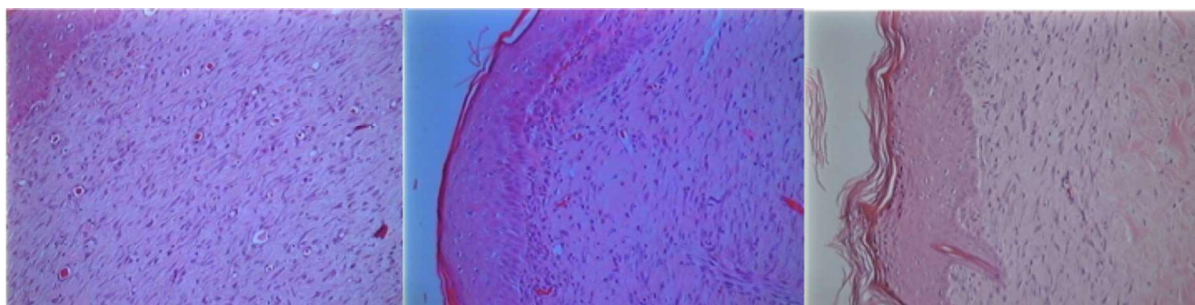


Figura 4C: Cortes histológicos corados com Hematoxilina & Eosina 100x aos 28 dias dos grupos Controle (Co), tratados com $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1Un) e tratados com $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). Sem diferenças na neovascularização entre os grupos.

No entanto, observou-se diferença significativa ao analisarmos os escores de inflamação em um período recente da cicatrização (quatorze dias), havendo maior escore no grupo controle do que nos grupos tratados com toxina botulínica, tanto com 1 Un/cm² quanto por 2Un/cm² ($p < 0,05$, Figura 5A, 5C). Esta diferença, no entanto, não permaneceu ao analisarmos as amostras aos vinte e oito dias, quando os grupos apresentaram escores semelhantes ($p > 0,05$, Figura 5B, 5C).

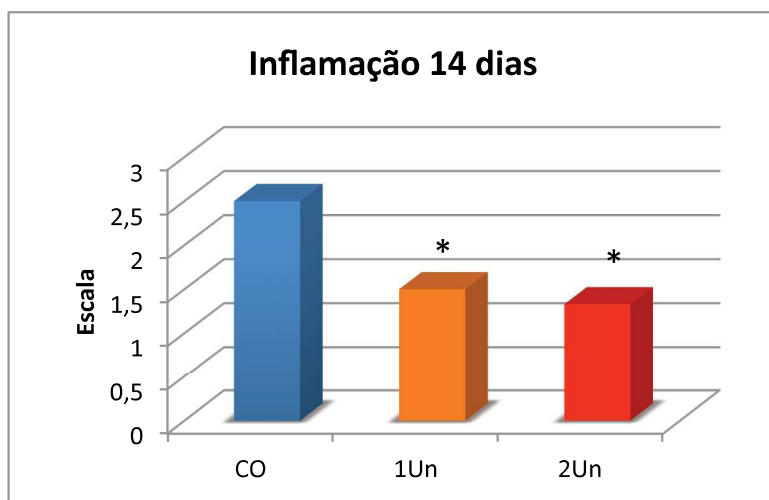


Figura 5A: Escore histológico de Inflamação aos 14 dias dos grupos Controle (Co), tratados com 1un/cm² (1Un) e tratados com 2Un/cm² (2Un). * Co vs 1Un vs 2Un $p < 0,05$

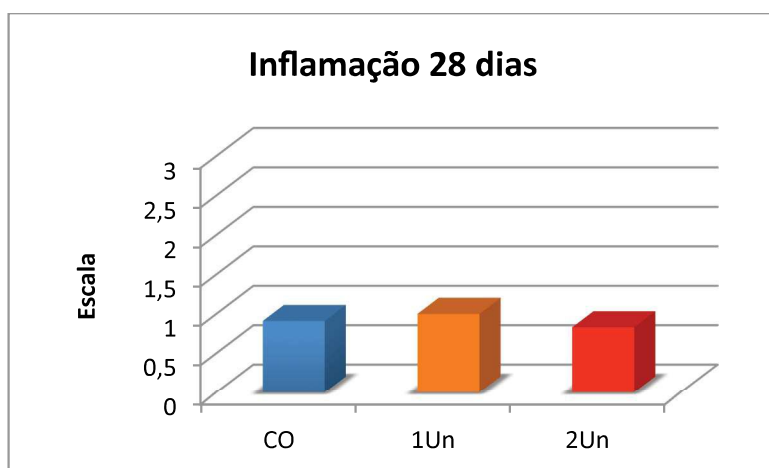


Figura 5B: Escore histológico de Inflamação aos 28 dias dos grupos Controle (Co), tratados com 1un/cm² (1Un) e tratados com 2Un/cm² (2Un). Co vs 1Un vs 2Un $p > 0,05$

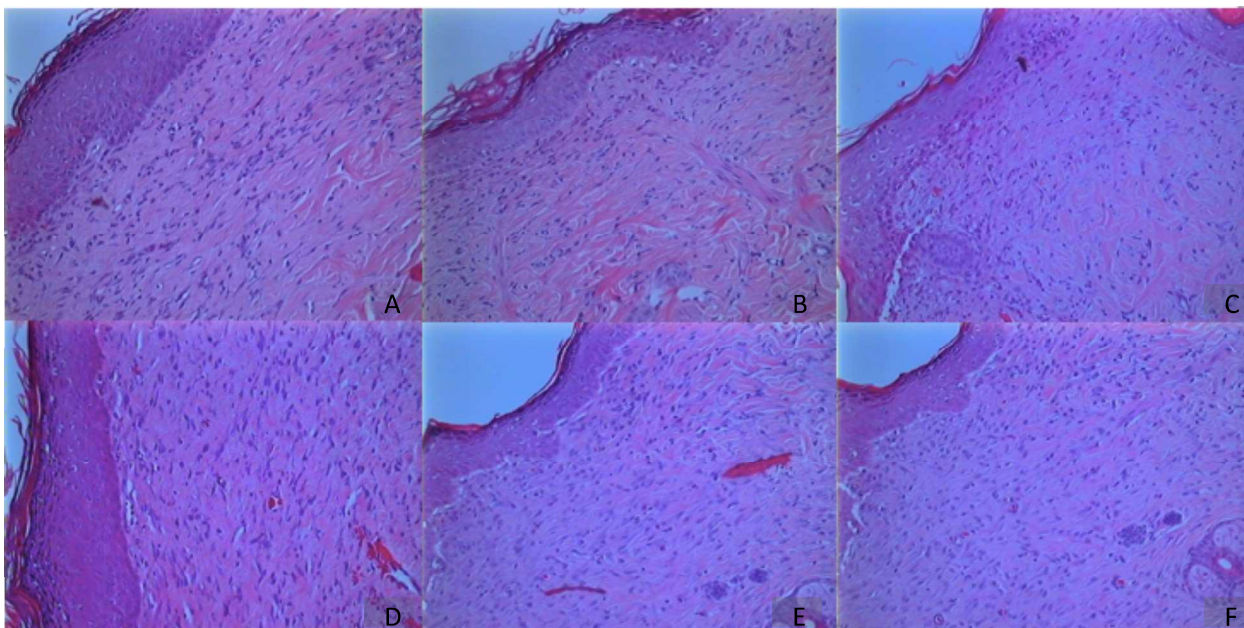


Figura 5C: Cortes histológicos corados com Hematoxilina & Eosina 200x aos 14 dias dos grupos Controle (A), tratados com $1\text{un}/\text{cm}^2$ (B) e tratados com $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (C). Cortes aos 28 dias dos grupos Controle (D), tratados com $1\text{un}/\text{cm}^2$ (E) e tratados com $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (F).

Quanto a densidade de fibroblastos, foi possível observar uma redução na contagem aos vinte e oito dias nos grupos tratados com toxina botulínica, tanto com $1\text{ Un}/\text{cm}^2$ quanto por $2\text{Un}/\text{cm}^2$, em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, Figura 6A e 6C). Diferença esta, não evidente aos quatorze dias ($p > 0,05$, Figura 6B e 6C).

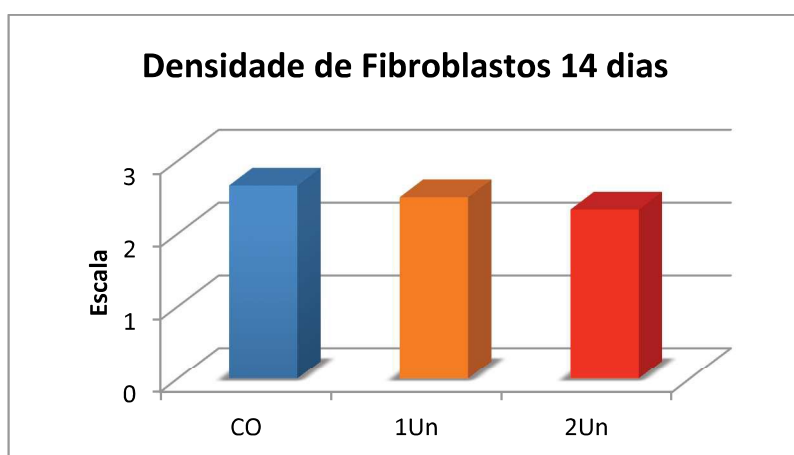


Figura 6A: Escore histológico de densidade de fibroblastos aos 14 dias dos grupos Controle (Co), tratados com $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1Un) e tratados com $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). Co vs 1Un vs 2Un $p > 0,05$

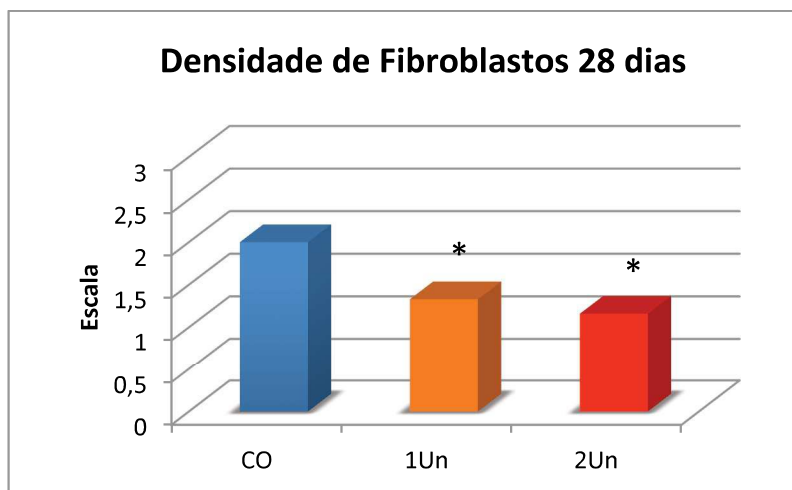


Figura 6B: Escore histológico de densidade de fibroblastos aos 28 dias dos grupos Controle (Co), tratados com $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1Un) e tratados com $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). * Co vs 1Un vs 2Un $p < 0,05$

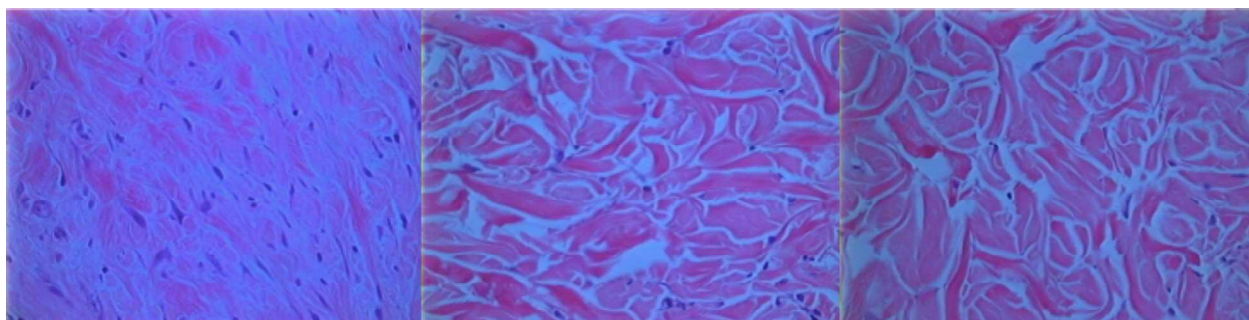


Figura 6C: Cortes histológicos corados com Hematoxilina & Eosina 400x aos 28 dias dos grupos Controle (Co), tratados com $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1Un) e tratados com $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un).

Quanto aos escores de colágeno, pode-se observar uma redução nestes aos vinte e oito dias nos grupos tratados com toxina botulínica, tanto com $1\text{Un}/\text{cm}^2$ quanto por $2\text{Un}/\text{cm}^2$, em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, Figura 7A e 7C). Diferença esta, não evidente aos quatorze dias ($p > 0,05$, Figura 7B e 7C).

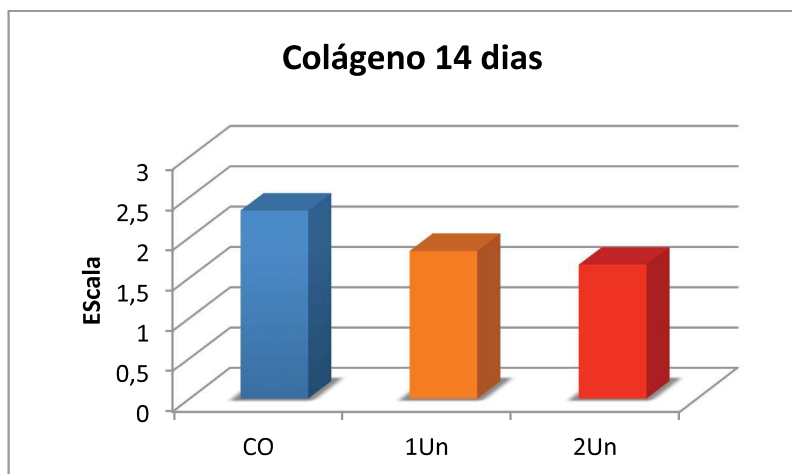


Figura 7A: Escore histológico da quantidade de colágeno aos 14 dias dos grupos Controle (Co), tratados com $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1Un) e tratados com $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). Co vs 1Un vs 2Un $p > 0,05$

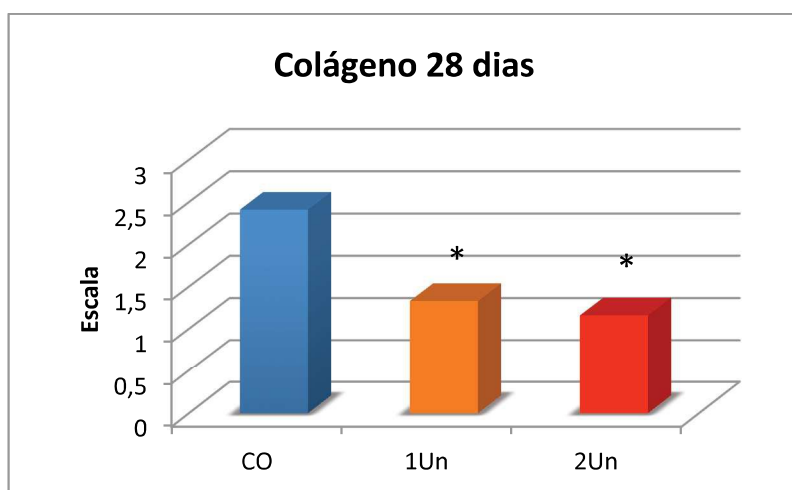


Figura 7B: Escore histológico da quantidade de colágeno aos 28 dias dos grupos Controle (Co), tratados com $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1Un) e tratados com $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un). * Co vs 1Un vs 2Un $p < 0,05$

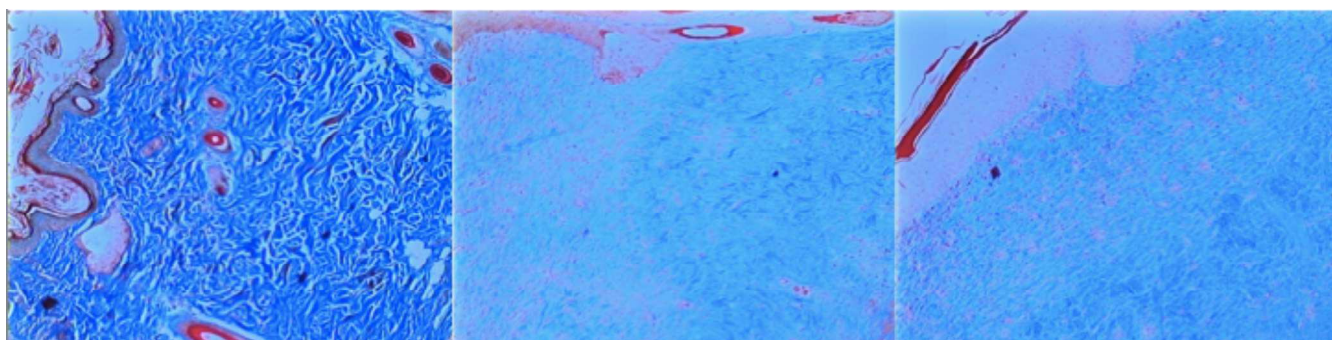


Figura 7C: Cortes histológicos corados com Tricromo de Masson 100x aos 28 dias dos grupos Controle (Co), tratados com $1\text{un}/\text{cm}^2$ (1Un) e tratados com $2\text{Un}/\text{cm}^2$ (2Un).

4. Discussão

A contração que ocorre no processo cicatricial de lesões de espessura total, apesar de ser um evento fisiológico da cicatrização humana, causa diversos transtornos, tais como limitações funcionais e estéticas. Devemos ter em mente, no entanto, que este artifício biológico do processo cicatricial surgiu nos primórdios da evolução, quando o ambiente em que vivíamos era deveras mais hostil. Assim sendo, o sacrifício da reparação em detrimento da cicatrização, com a consequente perda da qualidade do tecido recuperado em troca da velocidade de cicatrização, justificava-se. Entretanto, com a evolução do ser humano, bem como com a melhoria do ambiente em que vivemos, evidenciou-se os malefícios que a contração cicatricial apresenta, tais como a restrição aos movimentos quando a cicatrização dá-se sobre articulações e as distorções faciais decorrentes da contração e das contraturas cicatriciais, tais como ectrópios e desvios de comissura labial²⁴. Neste contexto, passou-se a buscar alternativas para controlar, ou diminuir, esta contração cicatricial, sem, no entanto, acarretar prejuízo para o processo cicatricial. Assim, existem inúmeros trabalhos empregando técnicas distintas com objetivo de atenuar a contração de feridas, tais como os enxertos de pele, o emprego de curativos especiais²⁵, tratamento com corticoides²⁶, mitomicina C^{27,28}, 5-fluoracil²⁹, toxina botulínica²², entre outras. Destes, o enxerto de pele de espessura total após desbridamento das lesões tem-se mantido como tratamento de escolha, sendo o que mais efetivamente reduz a contração local, além de oferecer um bom resultado estético na maioria dos casos. A toxina botulínica, por sua vez, mostrou-se em alguns estudos efetiva em reduzir a contração das feridas em cicatrização por segunda intenção²², além de reduzir as cicatrizes hipertróficas^{18,19,20}. No entanto, o potencial do uso da enxertia de pele de espessura total, usada em associação com a