



La toxina botulínica tipo A se asocia con un incremento en la angiogénesis de las heridas en un modelo murino experimental

Botulinum toxin type A is associated with an increase in angiogenesis of wounds in an experimental murine model

Dr. Jorge Raúl Carrillo-Córdova,* Dr. Rogelio Martínez-Wagner,**

Dra. Alicia Maybi Trolle-Silva,* Dra. Hazel Bracho-Olvera,******

Dra. Dulce María Carrillo-Córdova,*** Dr. Luis Daniel Carrillo-Córdova*******

Palabras clave:

Toxina botulínica,
angiogénesis,
cicatrización.

Key words:

Botulinum toxin,
angiogenesis, wound
healing.

* Médico residente.
Servicio de Cirugía
Plástica, Estética y
Reconstructiva, Hospital
General «Dr. Manuel
Gea González».

** Médico adscrito.
Servicio de Cirugía
Plástica, Estética y
Reconstructiva, Hospital
General «Dr. Manuel
Gea González».

*** Médico adscrito.
Servicio de Patología,
Hospital General Tacuba,
ISSSTE.

**** Médico residente.
Servicio de Medicina
Interna, Hospital Ángeles
Pedregal.

***** Médico pasante.
Instituto Nacional de
Ciencias Médicas y
Nutrición Salvador
Zubirán.

***** Médico
residente. Servicio
de Urología, Hospital
General de México.

Recibido:
23 mayo 2017
Aceptado para
publicar:
12 septiembre 2017

RESUMEN

La cicatrización es un proceso natural que restaura la integridad tisular después de una lesión. La toxina botulínica tipo A (TBT-A) ha demostrado aumentar la angiogénesis en modelos de colgajos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la TBT-A durante la cicatrización. Se estudiaron 19 ratones distribuidos en cuatro grupos dependiendo el día de sacrificio (seis en el día 3, cuatro en el día 6, cinco en el día 9 y cuatro en el día 12). Se realizaron dos heridas en el dorso de los ratones. En una herida se infiltró TBT-A (2.5 UI) mientras que en la otra herida se infiltró solución salina al 0.9%, ambas infiltraciones fueron en el tejido celular subcutáneo. Se realizó evaluación de la angiogénesis en los días de sacrificio. El análisis estadístico fue realizado con prueba t de Student y se estableció como significativo los resultados con $p \leq 0.05$. La angiogénesis fue mayor en el área experimental. En el día 3 la herida con toxina botulínica presentó menor angiogénesis (5.1 versus 13.5 [CI: 4.7-11.9] $p = 0.001$), en el día 6 y 9 no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos; finalmente en el día 12, en la herida con toxina botulínica se identificó mayor angiogénesis (8.6 versus 4.9 [CI: -5.3 - -2.09] $p = 0.002$). La toxina botulínica tipo A modula el proceso de cicatrización de las heridas al aumentar la formación de vasos sanguíneos durante la totalidad del proceso.

ABSTRACT

Healing is a natural process that restores tissue integrity after injury. Botulinum toxin type A (BTT-A) has shown to increase angiogenesis in flap models. The aim of this research was to study the effect of BTT-A during wound healing. We studied 19 mice distributed in four groups depending on the day they were sacrificed (six on day 3, four on day 6, five on day 9, and four on day 12). Two wounds were made on the back of the mice. In one wound BTT-A (2.5 IU) was infiltrated while 0.9% saline solution was infiltrated the other wound; both infiltrations were in the subcutaneous cellular tissue. An evaluation of angiogenesis was performed on each group. Statistical analysis was performed using Student's t-test and the results were established as significant with $p \leq 0.05$. Angiogenesis was greater in the experimental area. On day 3 the wound with botulinum toxin had less angiogenesis (5.1 versus 13.5 [CI: 4.7-11.9] $p = 0.001$), on day 6 and 9, no significant differences were found between both groups; finally, on day 12, in the wound with botulinum toxin a greater amount of angiogenesis was identified (8.6 versus 4.9 [CI: -5.3 - -2.09] $p = 0.002$). Botulinum toxin type A modulates the healing process of wounds by increasing the formation of blood vessels throughout the process.

INTRODUCCIÓN

La cicatrización es un proceso biológico complejo que se divide en tres fases. La fase inflamatoria tiene como objetivo detener el sangrado y producir quimiocinas atrayentes a células regeneradoras. Durante la segunda fase (proliferativa), existe gran aumento de células mediadoras de la cicatrización, en-

tre ellas fibroblastos, células endoteliales y neutrófilos. En este momento la angiogénesis comienza a tener un crecimiento acelerado debido a la liberación de quimiocinas y factores de crecimiento angiogénico. En la última fase (de remodelación), la herida se vuelve menos densa y se encuentra gran cantidad de miofibroblastos bien diferenciados, colágena tipo I y vasos sanguíneos maduros. Cualquiera

Los autores de este artículo no tienen conflicto de intereses que declarar.

alteración a este proceso desencadena cicatrización patológica.¹

La tensión de una herida es un factor importante que determina el grado de fibrosis y angiogénesis. A partir de este concepto las incisiones en la piel se deben diseñar de acuerdo con las líneas de tensión relajada. Esta tensión dinámica tiene su efecto sobre las heridas al producir isquemia en los tejidos. Esta isquemia se ha propuesto como promotora de la migración de fibroblastos por no ser un ambiente aceptable para la cicatrización.² Al haber una mayor proliferación de fibroblastos se sintetiza más colágena en forma desorganizada, misma que desarrolla cicatrices patológicas. Se basa en el concepto de tensión de las heridas, por lo que se han propuesto múltiples opciones de tratamiento para disminuir la cicatrización patológica de las heridas, destacando la ferulización e inmovilización del sitio de la cirugía. La quimioembolización de las heridas con toxina botulínica ha demostrado su utilidad en el campo clínico con reportes de casos en distintas áreas del cuerpo, destacando la cara. Estos estudios efectuados en primates y seres humanos no muestran la fisiopatología de cómo mejora la cicatrización, sólo evalúan el resultado estético.³⁻⁵

El estudio de la forma en que la toxina botulínica tipo A (TBT-A) afecta el proceso de cicatrización no se ha confirmado. Estudios experimentales proponen que la TBT-A mantiene a los fibroblastos en fases G0-G1 y disminuye el proceso de mitosis y del desarrollo de vasos sanguíneos.⁶ Esta hipótesis se ha confirmado en modelos experimentales⁷ y se ha demostrado que la expresión de genes modificadores de fibroblastos de cicatrices hipertróficas disminuye en cultivos de fibroblastos *in vivo*.⁸

Con estos antecedentes diseñamos este estudio, que tiene como objetivo evaluar el efecto que tiene la TBT-A dentro del microambiente de una herida, identificando la angiogénesis en un modelo murino experimental.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio prospectivo, aleatorizado, doble ciego que incluyó un total de 20 ratones BALB/c de una misma cepa. El número de animales de experimentación fue decidido por conveniencia de los autores, el 50% eran

hembras. Los ratones se distribuyeron en cuatro grupos: el grupo 1 con seis, el grupo 2 con cuatro, el grupo 3 con cinco y en el grupo 4 con cuatro. Los resultados histopatológicos de 19 ratones se incluyeron y hubo una defunción en el grupo 4. Cada grupo fue sometido al mismo procedimiento experimental. El grupo 1 se sacrificó al tercer día, el grupo 2 al sexto día, el grupo 3 al noveno día y el grupo 4 al décimo segundo día.

Los animales se mantuvieron en cajas de cuidado cada grupo, con alimento convencional y cuidados generales (agua, iluminación, ventilación y cambio de aserrín). Los animales de experimentación fueron tratados mediante las guías de Helsinki para experimentación en animales y la Norma Oficial Mexicana. Fueron sacrificados después de la evaluación final mediante método de intoxicación.^{9,10}

Descripción del procedimiento experimental

La distribución de los ratones en cada grupo se realizó de manera aleatoria por cada día de evaluación. Cada ratón fue rasurado en el dorso para lograr una identificación de la columna espinal; un investigador realizó un par de incisiones que comprometían epidermis, dermis y tejido celular subcutáneo. Las heridas fueron de 2 cm cada una a la misma altura, a 1 cm de la columna del ratón (la distancia entre cada una de las heridas fue de 2 cm). Se proporcionaron dos jeringas al investigador encargado de la infiltración y cierre de las heridas, una jeringa con 2.5 UI de TBT-A y la otra con 2.5 UI de solución salina, cada jeringa rotulada con un color: rojo con solución salina y azul con TBT-A. Se realizó la infiltración de la solución en cada uno de los lados sin conocer el contenido de cada jeringa: el lado derecho se infiltró en la dermis con la jeringa roja y el lado izquierdo con la jeringa azul. A todos los animales se les realizó el procedimiento en forma cegada por el cirujano. Después de la infiltración se cerraron las heridas con dos puntos simples de sutura no absorbible monofilamento (Nylon 5-0) y se lavó con agua y jabón. Se comprobó la sobrevivencia del animal al procedimiento, se administró analgesia y antibiótico y se regresó a su jaula de cuidado.

Valoración histológica de las muestras

Dependiendo del grupo de estudio se realizó la toma de la biopsia, se realizó resección en huso de la lesión en su totalidad con bordes de 5 mm. Una vez tomada la biopsia se sacrificaron los modelos de experimentación mediante intoxicación con opioide (dosis letal de fentanilo). Las muestras fueron colocadas en formol al 10% y se evaluaron en las primeras 48 horas posteriores a la toma de las mismas. Se procesaron con tinción de hematoxilina y eosina y corroboraron con inmunohistoquímica CD 34. La decisión de utilizar este inmunomarcador fue porque ha sido identificado en células endoteliales tanto de la dermis papilar como reticular.¹¹ Se realizaron cortes transversales para su inclusión en procesador automático histocinético para bloques de parafina cortados en secciones de 4-6 μ m.

La valoración de la angiogénesis se realizó mediante el promedio de vasos de neoformación identificados por microscopia de alto poder a seco fuerte (objetivo de 40x) medidos en cinco campos diferentes. Todo el proceso de evaluación histopatológica estuvo cegado para el evaluador.

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 23 (SPSS, Inc., Chicago III). La cuenta de vasos de neoformación se expresó en medias y desviación estándar (DE). Para demostrar diferencia entre los grupos experimental y control, con-

trastados con sexo y día de evaluación, se utilizó la prueba t para muestras independientes. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

RESULTADOS

Evaluación clínica de las heridas

Las heridas fueron evaluadas de manera clínica, se tomaron fotografías clínicas de las heridas y se documentó cada lado. No se encontraron diferencias al momento de realizar la evaluación clínica de las heridas mediante una escala subjetiva.

Efecto de la TBT-A en la formación de nuevos vasos sanguíneos

Se evaluó la angiogénesis por medio de tinción de hematoxilina y eosina y se corroboró con inmunohistoquímica. Se tomaron como positivos todos los vasos rodeados de células endoteliales. El grupo experimental presentó mayor angiogénesis en el primer y último día experimental con diferencia significativa (*Cuadro I*). Durante el día tres y seis de la evaluación no se pudo demostrar diferencia significativa entre ambos grupos, sin embargo, hubo menos proliferación de vasos sanguíneos en el grupo experimental. Se realizó medición por tiempo de evolución de la angiogénesis (*Figura 1*), demostrando una tendencia positiva en la formación de vasos sanguíneos en el grupo experimental y estuvo en descenso en el grupo control (*Figura 2*).

Los resultados de comparación de medias del conteo de formación de nuevos vasos sanguíneos en cada grupo de tratamiento y día de evaluación están agrupados en la *figura 3*. Al momento de evaluar las muestras histopatológicas, los vasos sanguíneos del grupo experimental mostraron una distribución más homogénea.

DISCUSIÓN

Este estudio demuestra el efecto de la TBT-A en la angiogénesis de una herida cerrada por primera intención en las etapas iniciales de la cicatrización, evidenciando un aumento del número de vasos sanguíneos de neoformación.

Cuadro I. Diferencia de conteo de vasos sanguíneos entre el lado control y el lado experimental (TBT-A).

Célula estudiada	Día	Grupo		Valor de p
		TBT-A (experimental)	Solución salina (control)	
Angiogénesis	3	5.1 \pm 1.50	13.50 \pm 3.39	0.001
	6	5.30 \pm 0.94	5.25 \pm 2.21	0.969
	9	6.74 \pm 2.93	7.18 \pm 1.52	0.776
	12	4.95 \pm 0.75	8.67 \pm 1.05	0.002

La TBT-A ha demostrado su utilidad como tratamiento en múltiples enfermedades donde destacan el blefaroespasma, tortícolis espasmódico, distonías e hiperhidrosis axilar y palmar, entre otros. Su mayor indicación y uso es para disminuir las líneas de expresión glabellares y frontales en el campo estético.¹²⁻¹⁴ Sin embargo, en los últimos 10 años, el uso de TBT-A para disminuir la apariencia de las cicatrices ha crecido considerablemente. La justificación de esto es la disminución de la tensión superficial de las heridas, que disminuye la isquemia en los bordes y promueve un mejor microambiente (disminuyendo la hipoxia e isquemia). La mejoría de las cicatrices se debe a una inhibición de la contracción de la musculatura por debajo de la herida, lo que mejora el microambiente debido a la disminución de la tensión de la herida y menor hipoxia.^{15,16} Además, la TBT-A aumenta la síntesis de factor de crecimiento de vasos sanguíneos (VEGF), sustancia P, y gen regulador de la liberación de calcitonina (GRLC), los

cuales generan un estímulo para el desarrollo de vasos sanguíneos.¹⁷

Nuestro estudio fue diseñado con características de diseños previos, pero innovando en aspectos metodológicos. La seguridad al administrar dosis de 2.5 UI en cada una de las heridas se basó en estudios experimentales previos en murinos que han demostrado seguridad al administrar dosis incluso mayores.^{18,19}

La mejoría de la expresión de vasos sanguíneos utilizando TBT-A se ha demostrado en modelos experimentales de retardo de colgajos, con mejor sobrevida del colgajo después de la aplicación perivascular de TBT-A.¹⁷ La mejoría en la expresión del VEGF se ha corroborado en otros modelos experimentales.²¹

La TBT-A mejora el microambiente de las heridas creando un aumento en la expresión de RNA mensajero de CD31 y VEGF. La mejoría de la hipoxia es un estímulo directo a la formación de nuevos vasos sanguíneos y es algo que se mantiene a lo largo del tiempo; esto explica el aumento en la angiogénesis que encontramos en nuestro modelo durante nuestro estudio.²²

El efecto de la TBT-A en la angiogénesis es dosis dependiente. Gugerrell y colaboradores²⁰ realizaron un estudio experimental para evaluar la proliferación de vasos sanguíneos *in vitro*; utilizaron un control y tres grupos con TBT-A a distintas concentraciones (1, 10 y 20 UI/mL). La angiogénesis en los grupos con 1 y 10 UI/

Figura 1.

Promedio de angiogénesis por día de seguimiento en cada grupo de estudio.

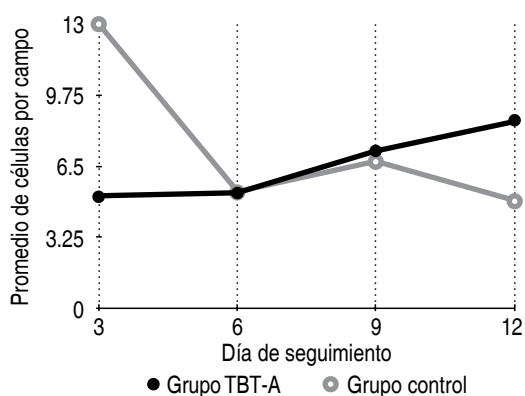


Figura 2.

Diferencias en las medias de la cuenta de angiogénesis por grupo y día. Hubo diferencia significativa los días 3 y 12.

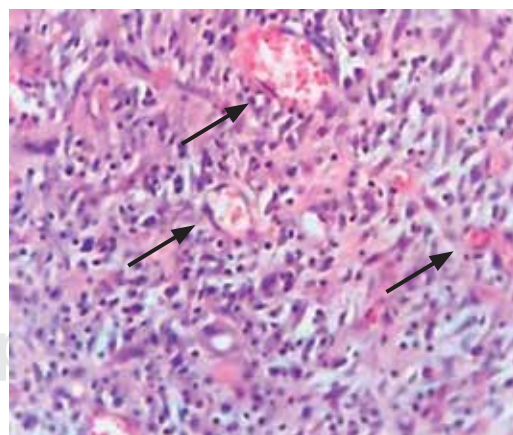
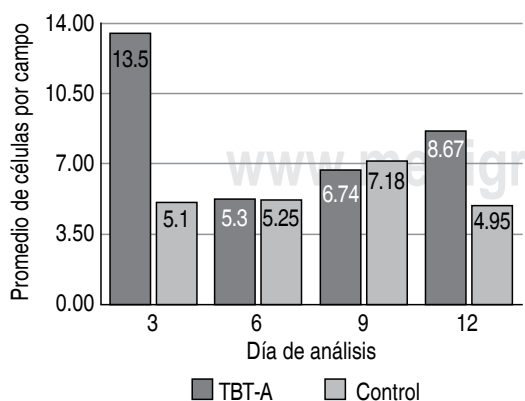


Figura 3. Identificación de vasos sanguíneos. Las flechas muestran los vasos sanguíneos de neoformación rodeados de un importante infiltrado inflamatorio y algunos fibroblastos.

mL mostraron mejoría de la angiogénesis, pero a dosis mayores (20 UI/mL) la angiogénesis disminuyó de manera significativa. Esto comprueba que el efecto positivo en la angiogénesis utilizando la TBT-A es dosis-respuesta.²⁰ La concentración que utilizamos en nuestro estudio fue de 5 UI/mL, corroborando la congruencia con este modelo. La dosis respuesta se ha comprobado incluso en forma molecular, mostrando una mayor expresión de genes favorecedores de angiogénesis con dosis tope de 10 UI/mL.²³

Estos hallazgos son importantes no sólo al momento de evaluar la angiogénesis. Una mejor angiogénesis implica mejoría en la integración de distintos tejidos como la grasa y los injertos cutáneos.²¹

Además de su efecto positivo sobre la angiogénesis, la TBT-A ha demostrado tener un efecto protector en modelos de isquemia-reperfusión, disminuyendo el efecto de daño a los vasos en estos modelos. Con esto se podría justificar el uso de la TBT-A incluso de manera profiláctica en situaciones donde la vascularidad se encuentre comprometida, como en colgajos o injertos.²⁴

CONCLUSIONES

La toxina botulínica tipo A modula las etapas iniciales del proceso de cicatrización de las heridas al disminuir la proliferación de fibroblastos y migración de células inflamatorias, aumentando al mismo tiempo la angiogénesis. Los resultados de este estudio abren una línea de investigación para demostrar el beneficio con el uso de toxina botulínica tipo A en procesos patológicos durante la cicatrización.

Limitaciones del estudio

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones: primero, el número de animales sometidos a la aplicación de TBT-A es pequeño; esta muestra fue calculada a conveniencia porque no se tienen estudios similares para permitir el análisis de muestra estadístico. En segundo lugar, la dilución de la TBT-A utilizada en este trabajo fue obtenida de estudios previos, sin embargo, no podemos asegurar que otras diluciones no tengan efecto en la angiogénesis; esto se deberá valorar en estudios posteriores.

REFERENCIAS

1. Childs DR, Murthy AS. Overview of wound healing and management. *Surg Clin North Am* 2017; 97 (1): 189-207.
2. Lebeda FJ, Dembek ZF, Adler M. Kinetic and reaction pathway analysis in the application of botulinum toxin a for wound healing. *J Toxicol* 2012; 2012: 159726.
3. Gassner HG, Sherris DA. Chemoimmobilization: improving predictability in the treatment of facial scars. *Plast Reconstr Surg* 2003; 112 (5): 1464-1466.
4. Wilson AM. Use of botulinum toxin type A to prevent widening of facial scars. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117 (6): 1758-1766; discussion 1767-1768.
5. Gassner HG, Sherris DA, Otley CC. Treatment of facial wounds with botulinum toxin A improves cosmetic outcome in primates. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105 (6): 1948-1953; discussion 1954-1955.
6. Zhibo X, Miaobo Z. Botulinum toxin type A affects cell cycle distribution of fibroblasts derived from hypertrophic scar. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2008; 61 (9): 1128-1129.
7. Jeong HS, Lee BH, Sung HM, Park SY, Ahn DK, Jung MS et al. Effect of botulinum toxin type A on differentiation of fibroblasts derived from scar tissue. *Plast Reconstr Surg* 2015; 136 (2): 171e-178e.
8. Miao YY, Liu J, Zhu J, Tao YL, Zhang JA, Luo D, Zhou BR. The effect of botulinum toxin type a on expression profiling of long noncoding rnas in human dermal fibroblasts. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 2957941.
9. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
10. National Research Council. *Guide for the care and use of laboratory animals*. 8th ed. Washington, DC: The National Academies Press; 2011.
11. Woodley DT. Distinct fibroblasts in the papillary and reticular dermis: implications for wound healing. *Dermatol Clin* 2017; 35 (1): 95-100.
12. Forbat E, Ali FR, Al-Niaimi F. Non-cosmetic dermatological uses of botulinum neurotoxin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016; 30 (12): 2023-2029.
13. Gart MS, Gutowski KA. Overview of botulinum toxins for aesthetic uses. *Clin Plast Surg* 2016; 43 (3): 459-471.
14. Fock J, Galea MP, Stillman BC, Rawicki B, Clark M. Functional outcome following Botulinum toxin A injection to reduce spastic equinus in adults with traumatic brain injury. *Brain Inj* 2004; 18 (1): 57-63.
15. Wilson AM. Use of botulinum toxin type A to prevent widening of facial scars. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117 (6): 1758-1766; discussion 1767-1768.
16. Sherris DA, Gassner HG. Botulinum toxin to minimize facial scarring. *Facial Plast Surg* 2002; 18 (1): 35-39.
17. Akcal A, Sevim KZ, Yesilada A, Kiyak V, Sucu DO, Tatlıdede HS et al. Comparison of perivascular and intramuscular applied botulinum toxin a pretreatment on muscle flap ischemia-reperfusion injury and chemical delay. *J Craniofac Surg* 2013; 24 (1): 278-283.
18. Kim YS, Roh TS, Lee WJ, Yoo WM, Tark KC. The effect of botulinum toxin A on skin flap survival in rats. *Wound Repair Regen* 2009; 17 (3): 411-417.
19. Kucukkaya D, Irkoren S, Ozkan S, Sivrioglu N. The effects of botulinum toxin A on the wound and skin

- graft contraction. *J Craniofac Surg* 2014; 25 (5): 1908-1911.
20. Gugerell A, Kober J, Schmid M, Buchberger E, Kamolz LP, Keck M. Botulinum toxin A: dose-dependent effect on reepithelialization and angiogenesis. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2016; 4 (8): e837.
 21. Jung MK, Song SB, Cheon SY, Park Y, Park H, Kim C et al. Botulinum toxin enhances the implantation effect of adipocytes in C57/BL6 mice. *Aesthetic Plast Surg* 2009; 33 (5): 722-729.
 22. Park TH, Rah DK, Chong Y, Kim JK. The effects of botulinum toxin A on survival of rat TRAM flap with vertical midline scar. *Ann Plast Surg* 2015; 74 (1): 100-106.
 23. Park TH, Park JH, Chang CH, Rah DK. Botulinum toxin A upregulates Rac1, Cdc42, and RhoA gene expression in a dose-dependent manner: *in vivo* and *in vitro* study. *J Craniofac Surg* 2016; 27 (2): 516-520.
 24. Uchiyama A, Yamada K, Perera B, Ogino S, Yokoyama Y, Takeuchi Y et al. Protective effect of botulinum toxin A after cutaneous ischemia-reperfusion injury. *Sci Rep* 2015; 5: 9072.

Correspondencia:

Dr. Jorge Raúl Carrillo-Córdova

Cirugía Plástica y Reconstructiva
Hospital General «Dr. Manuel Gea González»,
División de Cirugía Plástica y Reconstructiva.
Av. Calzada de Tlalpan Núm. 4800,
Col. Sección XVI, 14080,
Tlalpan, Ciudad de México.
Teléfono: 4000 3000, ext. 3721
E-mail: dr.carrillo.plastica@gmail.com

www.medigraphic.org.mx