



Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PETRÓLEOS MEXICANOS

GERENCIA DE SERVICIOS MÉDICOS

HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD

**EFFECTO DEL USO DE TOXINA BOTULINICA TIPO A EN LA FUERZA TENSIL DE SEPARACIÓN DE
HERIDAS CUTÁNEAS: MODELO ANIMAL**

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO ESPECIALISTA EN CIRUGÍA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA

PRESENTA:

DR. CARLOS ADRIÁN GONZÁLEZ ALVARADO

TUTOR DE TESIS:

DR. RODRIGO DÁVILA DÍAZ

ASESOR DE TESIS

DR. CUAHUTÉMOC MÁRQUEZ ESPRIELLA



Ciudad de México, Junio 2019.



CIRUGÍA PLÁSTICA
PEMEX



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



DR. CÉSAR ALEJANDRO ARCE SALINAS

Director Hospital Central Sur de Alta Especialidad de Petróleos mexicanos

DR. JESÚS REYNA FIGUEROA

Jefe del Depto de Investigación y Enseñanza

H.C.S.A.E. PEMEX

DR. CUAHUTÉMOC MÁRQUEZ ESPRIELLA

Jefe del Servicio Cirugía Plástica y Reconstructiva

Profesor Titular del Curso y Asesor de Tesis

H.C.S.A.E. PEMEX

DR. RODRIGO DÁVILA DÍAZ

Médico Adscrito Servicio de Cirugía Plástica y Reconstructiva

Tutor de Tesis

H.C.S.A.E. PEMEX

DRA. ADRIANA RODRÍGUEZ GÓMEZ

Médico Adscrito al Servicio de Anatomía Patológica

Hospital Angeles Pedregal

ÍNDICE

Agradecimientos	5
Definición del Problema	6
Marco teórico	7
Introducción	7
Fases de cicatrización	8
Proceso de cicatrización y complicaciones	11
Cicatrización anormal	12
Falla en la cicatrización	14
Factores de riesgo	14
Justificación	18
Hipótesis	20
Objetivos	21
Tipo de estudio	22
Definición del universo.....	22
Criterios.....	22
Definición de variables	22
Selección de la muestra	23
Diseño de estudio	24
Material y métodos	25
Procedimiento quirúrgico	25
Postoperatorio	26
Toma de muestras	27
Procesamiento de datos.....	28
Recursos y Logística	28
Consideraciones Éticas	29
Resultados	31
Discusión.....	37
Conclusiones.....	40
Referencias.....	41

AGRADECIMIENTOS

Primero, a Dios. Por todo y por tanto.

A mis padres, Roberto y Lulú. Mis logros han sido suyos desde el día 1, sin su amor y su apoyo, no sería quien soy ni quien seré. Gracias por tanto, siempre gracias.

A mis hermanos, Roberto y David. Gracias por ser mis amigos, mis rivales, mis cómplices, mis hermanos, gracias por estar, siempre.

A mi esposa, Kievka. Esta etapa ha sido un caminar difícil física y emocionalmente, gracias eternamente por que sin tu apoyo jamás habría logrado esto. Roberta y tu, son mi motor y mi mas grande motivación, por ustedes, MIL veces.

A mis maestros, Dr. Cuahutémoc Márquez Espriella, Dr. Jorge Eduardo Gutiérrez Salgado, Dr. Marco Antonio Cuervo Vergara, Dr. Rodrigo Dávila Díaz, Dr. Benjamín Ortíz López, Dra. Blanca Arámbula Sánchez. La docencia es una gran virtud que un médico puede tener. Sin embargo, el compartir no solo conocimientos, si no historias personales, crecimiento, enseñanzas, preocupaciones, tiempo, y sobre todo, sus pacientes, es algo invaluable. Gracias eternamente por que no solo son mis profesores, son excelentes maestros y amigos, sin ustedes, no podría ser. Estoy convencido que salgo de la mejor escuela de Cirugía Plástica.

A mis compañeros Gabriel y Olin. Grandes amigos que perdurarán para siempre. Dicen que la vida no se mide por logros sino por momentos y experiencias. Gracias por compartir conmigo esta experiencia y tantos momentos.

A mis residentes de mayor y menor jerarquía. De todos he aprendido grandes cosas y me llevo grandes momentos.

Es difícil mencionar a todos mis maestros que de alguna forma han intervenido en mi formación, sin embargo es importante reconocer a los principales. Gracias infinitamente Dr. Alberto Cahuana, Dr. Ricardo Cienfuegos, Dr. Eduardo Sierra, Dra. Aida Cruz, Dr. Gerardo Fernández Sobrino, Dr. Alfonso Vallarta, Dr. Miguel de la Parra, Dr. Francisco Said Lemus y en especial, al Dr. Octavio González Galindo, que sin saberlo y a la par de mis maestros de la residencia se ha convertido en un pilar fundamental en mi formación, gracias por la amistad y tantas enseñanzas.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Tanto la dehiscencia de heridas por cualquier índole (quirúrgicas o traumáticas), como la cicatrización anormal (cicatrices hipertróficas o queloides) representan un problema de salud importante, con repercusiones tanto económicas como psico-sociales.

En los últimos años se ha investigado sobre los posibles efectos de el uso de toxina botulinica tipo A en heridas, describiendo mejorías estéticas en heridas faciales, así como regulación del proceso de cicatrización al modificar factores de crecimiento y neuropeptidos que favorecen la proliferación celular y angiogenesis, posiblemente previniendo la formación de cicatrices hipertroficas. El efecto de la toxina botulinica tipo A en la fuerza tensil de separación de heridas en agudo no ha sido estudiado.

MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN

A pesar de que la mayoría de las heridas pueden cicatrizar sin complicaciones, las infecciones, dehiscencia y retraso en la cicatrización continua representando un problema de salud, que genera una morbi-mortalidad importante, así como un impacto económico significativo. ⁽¹⁾

La cicatrización empieza justo en el momento en el que se produce la lesión inicial y una vez sanado siempre resultará en una cicatriz, por lo que es de suma importancia tanto para el paciente como el médico conocer la calidad y el aspecto final de esta.

Una herida puede ser cerrada utilizando distintos métodos, que pueden ser desde suturas quirúrgicas, grapas quirúrgicas o algún tipo de adhesivo cutáneo, independientemente del método utilizado, es indispensable la aproximación de los bordes de cutáneos libres de tensión, para asegurar una cicatrización primaria con mínima cicatrización. ⁽²⁾

La cicatrización representa un complejo proceso a través del cual se inicia una serie de eventos destinados a recuperar la función de cada tejido. Se considera a la piel como el órgano mas grande del cuerpo (aproximadamente el 16% del peso corporal total) con diversas funciones como protección (rayos UV, agentes químicos, térmicos, barrera contra microorganismos) termorregulación, control de humedad, metabólica, etc. La

habilidad para reparar y regenerar, resulta clave para el mantenimiento de estas funciones. ^(3,4)

En cuanto al proceso de cicatrización, tradicionalmente se divide en tres fases no excluyentes entre si:

FASES DE CICATRIZACIÓN

Hemostasia / Inflamación

La respuesta inmediata a una lesión, es vasoconstricción, ocasionado por la liberación de tromboxano y prostaglandinas. El evento inicial será la formación de un tapón plaquetario que activará la cascada de coagulación y promoverá la amplificación de señales y el reclutamiento celular para la desbridación de tejido no viable. Las plaquetas formaran el tapón en respuesta a la exposición de colágeno, el cual liberará adenosindifosfato (ADP), promoviendo una agregación plaquetaria continua, que se acompaña de liberación de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés) y factor de crecimiento transformador beta (TGF-b), entre otras citocinas, las cuales ejercen un efecto quimiotáctico para neutrófilos en sangre, quedando estos atrapados en el tapón plaquetario. ⁽⁵⁾

Estos neutrófilos representan la primer célula en la herida e inicialmente fagocitaran tejido no viable y partículas bacterianas, así como generarán un ambiente hostil para

bacterias utilizando especies reactivas de oxígeno. Además proveen una citocina pro-inflamatoria clave, la interleucina 1 (IL-1), la cual tiene un efecto dual, como citocina pro-inflamatoria y como estímulo para la proliferación de queratinocitos. El ambiente local en el sitio de la herida también cambia, inicialmente hay una vasoconstricción severa secundaria a la liberación de catecolaminas, sin embargo posteriormente existe vasodilatación en respuesta a la liberación de histamina a través de células mastoides circulantes. ^(5,6,7) (figura 1)

Conforme progresa la fase inflamatoria, los macrófagos se convierten en la célula dominante dentro de las primeras 24-72 horas. Es ampliamente aceptado que los macrófagos juegan un rol primordial en el proceso de cicatrización y su respuesta es clave para establecer la hemostasia dentro de la herida y regular la fase inflamatoria para evitar una inflamación patológica. ^(8,9) (figura 2)

Proliferativa

La fase proliferativa ocurre entre los días 4 a 21. Es una fase representativa de angiogénesis, formación de matriz extracelular y epitelización. A pesar de que existe un traslape considerable entre las distintas fases, la habilidad para realizar esta transición puede determinar si una herida cicatriza apropiadamente o no. ⁽¹⁰⁾

La formación de matriz extracelular inicia con la degranulación plaquetaria. Debido a que el PDGF es un activador de proteoglicanos y formación de colágeno, los fibroblastos locales responden al estímulo de PDGF mediante la producción de colágeno, así como

la transformación a miofibroblastos para promover la contracción de la herida, además, estos fibroblastos secretan factor de crecimiento derivado de queratinocitos (KGF), los cuales estimulan la epitelización a partir de los queratinocitos. Existe también producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a partir de células endoteliales y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) para promover el crecimiento de vasos sanguíneos.

Una característica importante de una cicatrización normal, es la habilidad para detener la producción de colágena, con un máximo depósito de este aproximadamente a los 21 días.^(10,11)

Maduración / Remodelación

Clínicamente, la fase de maduración y remodelación es quizá la más importante. Durante esta fase existe un proceso de depósito de colágeno de manera organizada, así como degradación del mismo a partir de colagenasas y metaloproteinasas de la matriz extracelular, además comienza la contracción de la herida. La fibronectina comienza a desaparecer gradualmente y el ácido hialurónico y glucosaminoglicanos son reemplazados por proteoglicanos. Esta fase ocurre aproximadamente desde 3 semanas hasta 1 año posterior a una herida. Los fibroblastos representan la célula principal en la remodelación. El proceso principal, es el de conversión de colágeno tipo III a tipo I, en donde se llega a un equilibrio entre estos aproximadamente a los 30 días posteriores, si existe un exceso en la síntesis de colágeno, puede resultar en una cicatriz hipertrófica o queloide. Existe además reabsorción de agua de la cicatriz, estos eventos permiten que

las fibras de colágeno se encuentran mas próximas entre si, facilitando enlaces cruzados y disminuyendo el grosor de la cicatriz, así como confiriéndole mayor fuerza a esta.

La fuerza tensil de una cicatriz es una medida de su capacidad de carga por unidad de área. La fuerza de ruptura de una cicatriz es la fuerza necesaria para romper esta sin importar su dimensión, esta se alcanza aproximadamente entre los 42-60 días posteriores.

En general, se ha visto que las heridas alcanzan un 15-20% de su fuerza normal a las dos semanas, 40% al mes, 50% a los 2 meses, 65% a los 4 meses y entre 60-90% al año. ⁽¹⁰⁻¹²⁾

PROCESO DE CICATRIZACIÓN Y COMPLICACIONES CON LA CICATRIZACIÓN

De manera general, las heridas pueden cicatrizar sin complicaciones y progresar a través de una de 3 vías ⁽⁴⁾, las cuales se van a determinar dependiendo de las características propias de cada herida y resulta fundamental seleccionar el método adecuado para cicatrización de cada herida minimizando complicaciones.

1.- Cicatrización Primaria

Las heridas quirúrgicas representan un ejemplo claro de un cierre o cicatrización primaria, en donde los bordes de las heridas se aproximan, con una epitelización subsecuente, reconstituyendo su función de barrera a las 48-72 horas. El elemento principal para el éxito de una cicatrización primaria es el afrontar la herida limitando la

tensión en el sitio de la incisión, lo cual puede obtenerse de diferentes maneras como el realizar un socavamiento de los bordes, mediante suturas de tensión progresiva o reacomodación del tejido local.

2.- Cicatrización Secundaria

Al proceso para restaurar la barrera epitelial mediante la contracción y epitelización se le conoce como cicatrización secundaria. El ejemplo mas claro, es cuando una herida se deja abierta, generalmente por mucha tensión o contaminación. En este tipo de heridas abiertas, resulta fundamental el mantener la herida limpia para lograr una migración de queratinocitos adecuada, usualmente con el uso de hidrogeles o apósitos oclusivos.

3.- Cicatrización Terciaria o Retardada

El principio de este tipo de cicatrización es el convertir un ambiente hostil, es decir de una herida contaminada o pobremente delimitada, a una favorable, que permita el cierre quirúrgico posteriormente. Usualmente se utilizan adyuvantes como desbridaciones seriadas, cambios de apósitos y terapia de presión negativa con el fin de limpiar la herida y disminuir la tensión entre ambos extremos de la misma o generar un puente que permita la integración de tejido autólogo. ⁽¹³⁾

CICATRIZACIÓN ANORMAL

Para desarrollar estrategias terapéuticas y preventivas para los distintos tipos de cicatrices resulta indispensable entender la patología detrás de estas. Los tipos comunes de cicatrización anormal, incluyen cicatrices hipertróficas y cicatrices queloides.

Clínicamente la distinción entre una cicatriz queloide e hipertrófica es difícil, ambas se presentan como una cicatriz firme, elevada, pruriginosa y dolorosa, que pueden generar un impacto negativo tanto fisiológico (al limitar el rango de movimiento de una articulación) como psicológico (especialmente en áreas visibles como la cara) en la calidad de vida de los pacientes. La característica clínica que las diferencia, es que las cicatrices hipertróficas, se mantienen confinadas dentro de los bordes originales de la herida y suelen presentarse en sitios de mayor tensión, generalmente a causa de laceraciones importantes y severas, mientras que las cicatrices queloides se pueden presentar ante el mínimo trauma, sobrepasan los bordes de las heridas y comúnmente se desarrollan años después de la herida inicial, rara vez remiten y existe una predisposición mayor en pacientes con una pigmentación más oscura de piel (15 veces más común que en personas de piel blanca), además suelen tener un componente genético. ^(13,15)

Existen además sitios de mayor predilección para ambas cicatrices, en general, aquellos expuestos a una mayor fuerza mecánica o tensión, como el esternón, hombros y rodilla, pero también se han descrito en sitios como la región auricular, el pene, genitales femeninos, córnea y región plantar. La presencia de algún trauma sigue siendo el antecedente más común para el desarrollo de una cicatriz anormal (laceraciones, quemaduras, vacunación, picadura de insectos, etc). ^(16,17)

FALLA EN LA CICATRIZACIÓN

Es importante definir cuando se considera una herida aguda, una herida aguda en fase de cicatrización, así como, cuando se considera falla en cicatrización.

Una herida aguda se define como una pérdida traumática de la estructura normal y la función de tejido sano posterior a un insulto.

Una herida aguda en fase de cicatrización se refiere al proceso altamente regulado de cambios celulares, humorales y moleculares al momento de una herida aguda, que resulta en un proceso de reparación tisular predecible y ordenado, dependiente de tiempo.

Una falla la cicatrización ocurre cuando hay alguna anomalía en la duración de los componentes secuenciales de la reparación tisular, lo cual puede estar dado por diferentes factores, como una alteración en la hemostasia secundario a disfunción plaquetaria o una respuesta inflamatoria retardada o deficiente.

El tiempo requerido para la recuperación de la fuerza tensil de una herida, determina el riesgo de falla en la cicatrización. ⁽¹⁸⁾

FACTORES DE RIESGO

En general la fuerza tensil de una herida durante la fase inflamatoria de la cicatrización es cero, por lo que cualquier situación que genere una respuesta pro-inflamatoria

prolongada o excesiva, como una infección de herida / sitio quirúrgico o la presencia de cuerpo extraño, predispone a una falla de la herida. ⁽¹⁹⁾

Existen factores de riesgo que promueven el desarrollo de cicatrices patológicas y que pueden ser controlados por el médico, como es el limitar la fuerza mecánica (tensión en la herida), la técnica quirúrgica, el control de la infección y reacciones de cuerpo extraño. Sin embargo hay también factores de riesgo reconocidos para dehiscencia de heridas quirúrgicas, como es el uso de esteroides, tabaquismo, índice de masa corporal elevado, diabetes mellitus, pacientes parapléjicos, etc. ⁽²⁰⁻²¹⁾

Los avances científicos de nuestra época, han llevado a la creación de nuevas terapias, productos o nuevas modalidades de manejo de las heridas, así como al descubrimiento de nuevos mediadores de inflamación e interacciones celulares.

La toxina botulínica es la exotoxina de *Clostridium botulinum*, una bacteria gram + formadora de esporas, sus efectos se llevan a cabo mediante una quimiodenervación a nivel de la neurona presináptica en la unión neuromuscular, generando un bloqueo irreversible de la liberación de acetilcolina, lo que resulta en una denervación de músculo estriado de 2-6 meses posteriores a su aplicación, con la consiguiente atrofia de fibras musculares y parálisis flácida clínica subsecuente. ^(22,23) Clínicamente se usa dentro del campo de cirugía plástica, urología, rehabilitación, oftalmología, ortopedia y neurología, para el manejo de blefaroespasma, torticolis espástica, distonía extrema, disfonía,

espasmo hemifacial, parálisis cerebral, displasia espástica, temblor esencial, cefalea, espasmo pélvico-rectal, nistagmo, hiperhidrosis y en estética facial. ⁽²³⁾

Se han descrito 8 toxinas botulínicas antigénicas (TB A-B-C-D-E-F y G) producidas por distintas cepas de *Clostridium botulinum*. El sistema nervioso humano, es susceptible a 5 de ellas (A-G). Las únicas disponibles como fármacos son la A y la B, sin embargo, la A es la única utilizada medicamente, mientras que la B se ha propuesto solamente en algunos estudios clínicos. ^(22,24)

Recientemente se publicó que la toxina botulínica tipo A (TB-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 crean un estímulo para generar angiogénesis.⁽²⁵⁾ Se ha descrito además que la sustancia P induce un estado agudo inflamatorio necesario para favorecer la cicatrización al promover la progresión de la fase proliferativa de cicatrización y modular la activación de macrófagos hacia un fenotipo M2 que promueve la cicatrización. ⁽²⁶⁾

Se ha propuesto su uso para la prevención y mejoría de cicatrices, al generar una regulación de la proliferación celular y de factores de crecimiento expresados en fibroblastos (factor de crecimiento de tejido conectivo, factor de crecimiento transformador β 1) involucrados en la diferenciación, adhesión y apoptosis de este tipo celular, estos tomados de una cicatriz hipertrófica. ^(27,28) Sin embargo, no se ha estudiado el efecto de la TB-A en la fuerza de tensión de las heridas.

En el presente estudio se pretende describir el efecto generado por la toxina botulínica tipo A sobre la tensión y fuerza de ruptura de heridas cutáneas, esto en un modelo murino.

JUSTIFICACIÓN

Anualmente se realizan aproximadamente 50 millones de cirugías en los Estados Unidos, esto, sin incluir un estimado de 50 millones de heridas traumáticas, lo que genera un costo aproximado de 250 millones de días/paciente en pérdida de productividad y billones de dólares en pérdida de ganancias suplementarias. Las complicaciones en el proceso de cicatrización agrega perdidas a estos números. ⁽¹⁸⁾

A pesar de que el tejido cicatrizal genera una restauración de la barrera epitelial, es estructural y funcionalmente distinto a la piel normal. En algunos casos, una cicatrización disfuncional resulta en una herida abierta de manera crónica o en una proliferación celular desorganizada y excesiva, es decir en una cicatriz hipertrófica (o queloide). La mayoría de los pacientes con algún tipo de cicatrización anormal, presentan complicaciones como deformidades, restricción al rango de movimiento, dolor o prurito. Se han descrito múltiples tratamientos tanto para cicatrización hipertrófica como queloide, como la resección quirúrgica, infiltración con esteroide, radiación, presoterapia o alguna combinación de estas ⁽²⁸⁻³⁰⁾, sin embargo, estos métodos muchas veces no proveen resultados terapéuticos adecuados.

Tanto la dehiscencia de heridas como la cicatrización anormal, generan una alteración funcional importante, así como también incrementan la morbilidad psico-social y el costo asociado al manejo de la salud, tanto para el manejo de heridas complejas como en heridas por procedimientos estéticos, por lo que resulta imprescindible el generar estrategias de prevención que nos permitan favorecer el tiempo/ tensión de las heridas quirúrgicas o traumáticas, como para algún tipo de cicatrización anormal.

Se ha descrito en literatura reciente, que la toxina botulínica tipo A genera una regulación de la proliferación celular y de factores de crecimiento expresados en fibroblastos (factor de crecimiento de tejido conectivo, factor de crecimiento transformador β 1) involucrados en la diferenciación, adhesión y apoptosis de este tipo celular, estos tomados de una cicatriz hipertrófica, además de favorecer al proceso de cicatrización mediante la síntesis de VEGF, sustancia P y gen regulador de calcitonina, lo que generaría una mayor angiogénesis. ^(25,26,28)

En el presente estudio se pretende estudiar el efecto de el uso de toxina botulínica tipo A en heridas agudas en un modelo murino, sobre la fuerza tensil de la herida. En caso de favorecer un incremento en la fuerza tensil, podría ayudar a generar un método preventivo en pacientes con heridas en sitios propensos a cicatrización anormal, así como con factores de riesgo importantes para falla en el proceso de cicatrización, como pacientes malnutridos, tabaquismo, heridas complejas o con antecedente de radioterapia, etc.

HIPÓTESIS

Hipótesis Nula (H_0)

La Toxina Botulínica tipo A en heridas agudas no modifica la fuerza tensil del tejido al momento de la cicatrización.

Hipótesis Alternativa (H_1)

La Toxina Botulínica tipo A en heridas agudas aumenta la fuerza tensil del tejido al momento de la cicatrización.

OBJETIVOS

Objetivo principal

Evaluar en un modelo animal el efecto sobre la fuerza tensil de la aplicación en agudo de Toxina botulínica tipo A en heridas cutáneas.

Objetivos secundarios

- 1.- Valorar las características macroscópicas de la cicatriz usando toxina botulínica tipo A (longitud, anchura, elevación).
- 2.- Describir las complicaciones como dehiscencia o infección en dichas heridas usando toxina botulínica tipo A y en el grupo control.
- 3.- Valorar histológicamente el proceso de cicatrización en cuanto a fibroblastos, remodelación de fibras de colágeno y angiogénesis.

TIPO DE ESTUDIO

Estudio experimental animal.

Definición del Universo

Se utilizaron ratas del Departamento de Cirugía Experimental del Centro Médico ABC

Muestra:

20 Ratas Wistar, aleatorizadas en 2 grupos de 10 (random.org).

Criterios:

Inclusión: Ratas, clínicamente sanas, no utilizadas en algún otro proyecto de investigación, sin antecedente de lesiones o heridas en el dorso.

Exclusión: Animales clínicamente enfermos, con antecedentes de lesiones o incluidas en otro proyecto de investigación.

Eliminación: Animales fallecidos durante el evento quirúrgico o el seguimiento.

Definición De Variables

Fuerza Tensil: Fuerza máxima de resistencia previo a la dehiscencia o ruptura de la piel.

Se expresa en Newtons (N)

Longitud de herida: longitud de herida expresada en milímetros (mm).

Grosor: Anchura de herida expresada en milímetros (mm).

Infección: Presencia de datos que indiquen infección de herida franca como aumento de temperatura local, eritema y presencia de pus. Se expresara en Si o No.

Dehiscencia de herida: separación de la herida durante el seguimiento. Se expresara en Si o No.

Selección De La Muestra:

Se seleccionaron 20 Ratas cepa Wistar para experimentación del Departamento de Bioterio y Cirugía Experimental del Centro Médico ABC, con los criterios ya antes mencionados, las cuales se colocaron en jaulas individuales a temperatura ambiente, con adecuada alimentación. Todos los animales fueron tratados de acuerdo a las normas para el uso de los animales de laboratorio de México y los protocolos de manejo del Servicio de Bioterio y Cirugía Experimental del Hospital Central Sur de Alta Especialidad de Petróleos Mexicanos y la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos de América.

Este protocolo fue aprobado para su realización por el comité para el cuidado y uso de animales de laboratorio CICUAE del Hospital Central Sur de Alta Especialidad, para preservar el cuidado ético de los animales conforme a las normas mencionadas.

Grupos De Estudio:

Se formaron 2 grupos de 10 Ratas Wistar, con los criterios ya mencionados, seleccionadas aleatoriamente. Los sujetos de estudio son ratas Wistar proporcionados

por el Departamento de Cirugía Experimental; clínicamente sanos con pesos de 250-350g, de aproximadamente 6 meses de edad.

Se realizaron heridas de espesor total, las cuales fueron suturadas de forma inmediata por medio de suturas no absorbible de monofilamento 4-0.

DISEÑO DE ESTUDIO

Es un estudio experimental, controlado, aleatorizado y comparativo en un modelo animal.

Se aleatorizó mediante la aplicación en línea random.org

MATERIAL Y MÉTODOS

Procedimiento Quirúrgico

Las ratas se anestesiaron previamente a la cirugía. Para ello, se les administró de forma intramuscular una combinación de 20 mg/kg de ketamina al 10% y 2 mg/kg xilacina al 2%. Como anestésico local se aplicó 0.5 ml de lidocaína subcutánea en la zona donde se realizó la herida. Una vez anestesiadas, se rasuró un área de 3x3 cm en el dorso y se desinfectó la piel con betadina al 10%.

Se realizó una incisión lineal con bisturí 15, de 2 cm, de espesor total (piel y tejido celular subcutáneo). Al grupo control, se le administró solución fisiológica de manera subcutánea, mientras que al grupo experimental, se le administró toxina botulínica tipo A en la periferia de la herida (cuatro cuadrantes) a una dosis de 5 U/ kg.

Se realizó cierre primario con 3 puntos simples de material no absorbible monofilamento 4-0. Posteriormente se colocaron en camas precalentadas a 37°C hasta su recuperación y pasaron a sus jaulas con agua con analgésico y dieta normal a libre demanda hasta el día de su biopsia.

Se muestra el esquema en las siguientes figuras (Fig. 1 y 2):

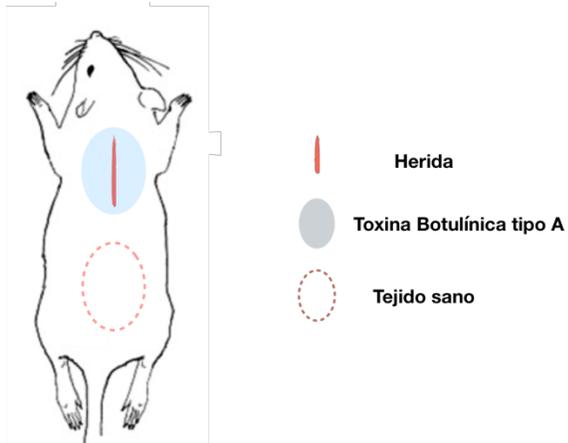


Figura 1. Cuadro esquemático herida en dorso con aplicación de TB-A y muestra de tejido sano.

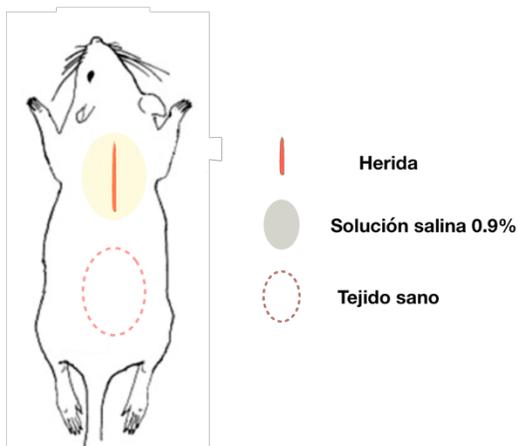


Figura. 2. Cuadro esquemático herida en dorso con aplicación de Solución salina 0.9% y muestra de tejido sano.

Postoperatorio:

Analgésico Intraperitoneal (Ketorolaco) inmediatamente al término del procedimiento

Analgésico Oral (Tramadol, Metamizol) por 3 días posteriores al procedimiento en agua de bebida.

Se realizaron 2 aseos con antiséptico (hipoclorito de sodio al 55 PPM) durante los primeros 5 días posteriores al evento quirúrgico

El material de sutura se retiró a los 5 días.

Toma De Muestras

Se obtuvieron biopsias de espesor total de tejido sano y de las cicatrices con un margen de 3 cm a cada lado, a los 7 días e inmediatamente después se eutanizaron mediante una sobredosis de anestésico. Posteriormente se midió la fuerza tensil necesaria para la ruptura del tejido sano utilizando un dinamómetro con escala de 1 a 44 Lb marca Davis-Geck® (Figura 3 y 4). En el caso del tejido cicatrizal, se registró las fuerza alcanzada hasta que se abrió la línea de sutura, o bien, hasta que se rompió el tejido en algún otro punto. En los casos en los que no existió solución completa de continuidad, se busco el desgarro del tejido a nivel de los puntos de sutura.



Figura 3.– Dinamómetro



Figura 4.– Mecanismo de sujeción y medición de fuerza tensil

Previo a la toma de biopsias y y de manera postoperatoria, para la valoración de las características macroscópicas, se realizó una medición de la longitud y grosor de la herida con un calibrador vernier, así como si existió o no elevación de la cicatriz. Se

tomaron fotografías de las mismas.

Procesamiento de Datos

Los datos serán capturados en una hoja de datos (Microsoft Excel). Se compararán estadísticamente los grupos mediante una prueba de T de student. El procesamiento estadístico se hará mediante SPSS 24 (IBM).

Se agregara además un reporte descriptivo de los hallazgos del estudio patológico.

RECURSOS Y LOGÍSTICA

- Recursos Humanos
 - Residentes CPR
- Recursos Materiales
 - 12 ratas tipo Wistar
 - 10 suturas de Polipropileno 4-0.
 - Toxina Botulínica tipo A (Botox ®)
- Recursos Financieros
 - El estudio fue financiado por el investigador

- Toxina Botulínica tipo A (Botox ®) - \$3,800.00 (aprox.)
- Convenios
 - Departamento de Cirugía Experimental del Centro Médico ABC
- Apoyo
 - Análisis histopatológico por Dra. Adriana Rodríguez Gómez (Hospital Angeles Pedregal)
 - Suturas de Polipropileno 4-0 donadas por medico externo al servicio.

CONSIDERACIONES ÉTICAS Y/O CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN

En el presente protocolo se evaluó el proceso de cicatrización de heridas agudas, es por ello que es necesario realizar experimentos in vivo. Las normas bioéticas del uso de animales en experimentación sugieren el uso de animales que se encuentren en la parte baja de la escala filogenética, principalmente con roedores. Los artículos que comparan proceso de cicatrización y cierre de heridas crónicas utilizan ratas como modelo animal. Para poder comparar nuestros resultados con la información previamente reportada es necesario contar con el mismo modelo animal.

Los animales se obtuvieron del Departamento de Cirugía Experimental del Centro Médico ABC. donde solo se utilizaron los animales que fueron aprobados por el médico

Veterinario del mismo. En el protocolo se consideraron las 3 R de la bioética: Reemplazo, Reducción y Refinamiento. El número de animales a utilizados son los mínimos necesarios para lograr datos estadísticamente significativos. Las intervenciones quirúrgicas se fueron realizadas bajo condiciones asépticas, los animales contaron con cuidados pre y postoperatorios. En los cuidados preoperatorios los animales recibieron anestesia. Una vez terminado en proceso quirúrgico, los animales se mantuvieron en el área de recuperación, donde se encontraran aislados del resto de los animales. A los animales se les preparó una caja con una cama de papel y cerca de una fuente de calor. El alimento y el agua se introdujo de manera accesible para el animal. Para evitar dolor se administraron analgésicos de forma postquirúrgica.

RESULTADOS

Se realizó el protocolo quirúrgico (Figs. 5 y 6). A los 7 días postoperatorios, se prepararon las biopsias de piel para continuar la medición de fuerza tensil y posteriormente se incluyeron y se tiñeron con hematoxilina y eosina y tricrómico de Masson. La visualización de las muestras se realizó por medio de microscopia óptica con aumentos de 40x y 10x. Se reportan los datos recolectados de las biopsias tomadas a los 7 días del procedimiento en la siguiente tabla (Tabla 1):

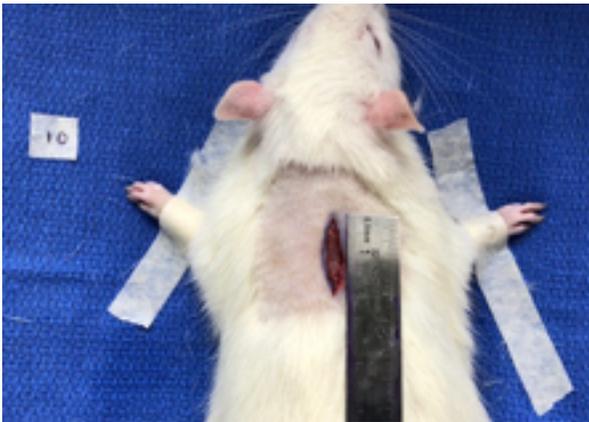


Figura 5 – Incisión en piel dorsal

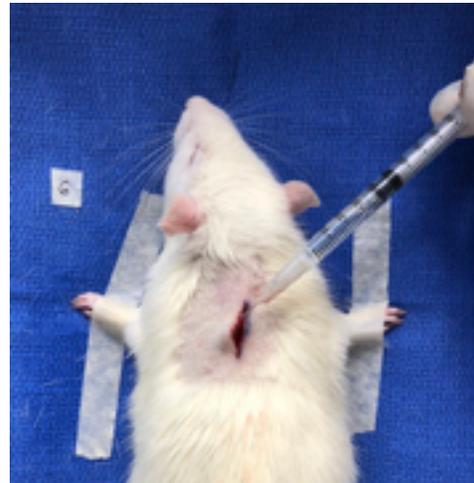


Figura 6 – Aplicación de TB-A en herida Tricotomizada

Tabla 1. – Biopsias de espesor total tomadas a los 7 días.

ID animal	TB-A (Si/No)	Longitud cicatriz (mm)	Anchura cicatriz (mm)	Fuerza tensil de separación (N)	Infección de herida	Dehiscencia de herida
1	No	20	No valorable	13.34	No	No
2	Si	20	No valorable	35.58	No	No
3	No	20	No valorable	8.89	No	No
4	Si	20	No valorable	22.24	No	No
5	No	20	No valorable	13.34	No	No
6	Si	20	No valorable	20.90	No	No
7	No	20	No valorable	8.89	No	No
8	Si	20	No valorable	21.35	No	No
9	No	20	No valorable	8.00	No	No

10	Si	20	No valorable	23.13	No	No
11	No	20	No valorable	8.89	No	No
12	Si	20	No valorable	20.01	No	No

De manera macroscópica, en ningún grupo hubo diferencia en cuanto a longitud, grosor o elevación de la cicatriz. Sin embargo, la apariencia cosmética de esta fue mejor en el grupo tratado con TB-A (figura 7).

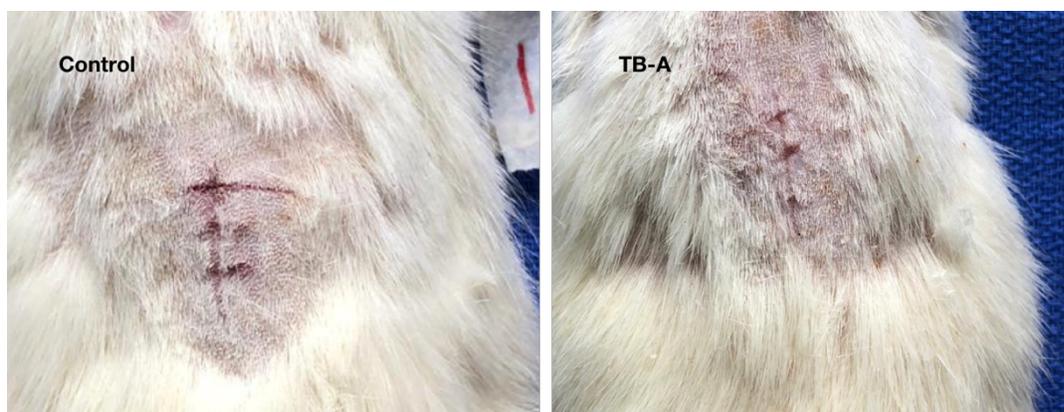
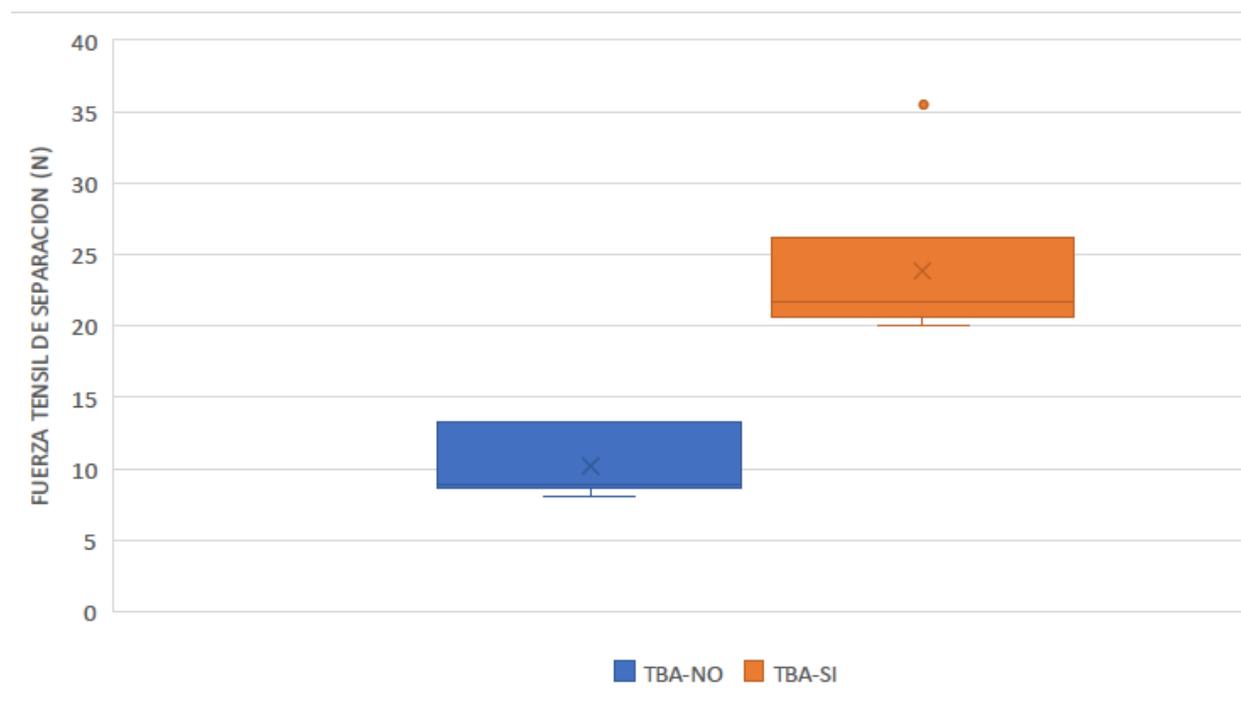


Figura 7.- Apariencia macroscópica en grupo control vs grupo experimental.

Análisis Estadístico

La resistencia tensil comparada entre ambos grupos usando una evaluación no paramétrica con T de student mostró una diferencia significativa con una P de 0.00128, mostrando un incremento en la resistencia tensil en el grupo tratado con TBA. En promedio la fuerza necesaria para lograr la separación de la cicatriz en los sujetos tratados con TB-A fue de 23.83 vs 10.25 newtons para el grupo control (Grafica 1).

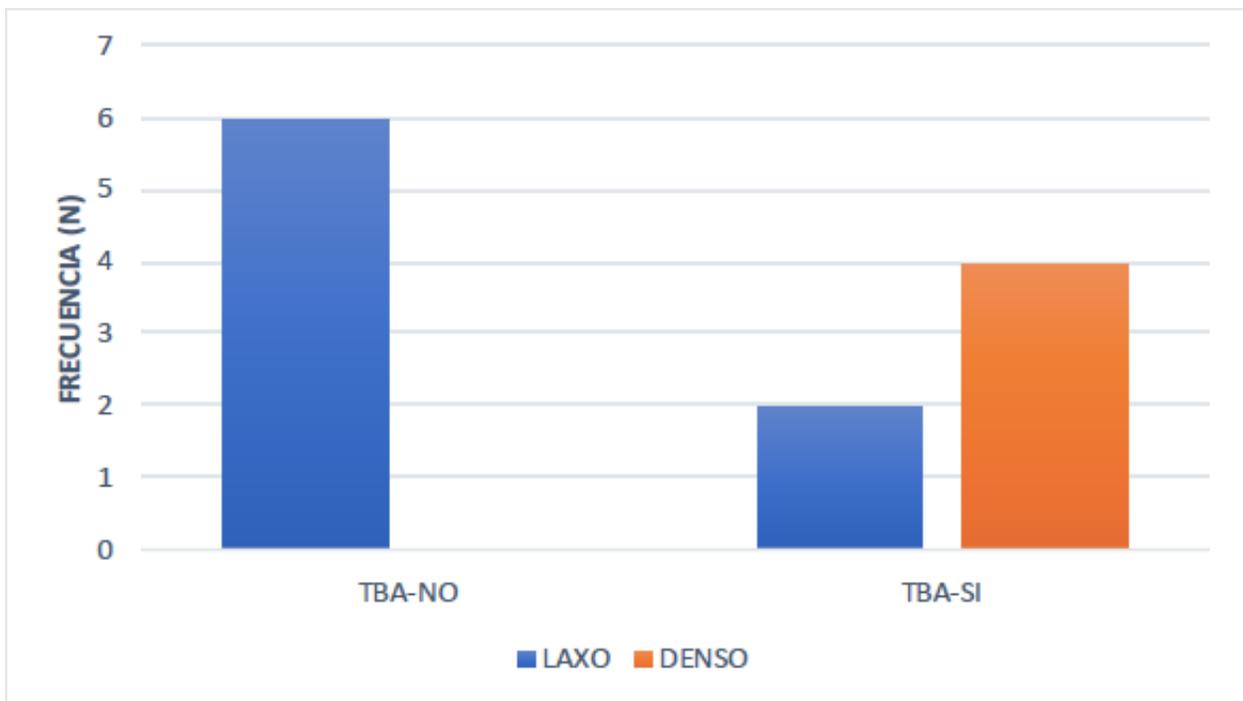


Gráfica 1.- Análisis de fuerza tensil y desviación standard.

Análisis Histológico

Se realizó un análisis histopatológico en el cual se evaluó de manera cualitativa el estroma mostrado en las laminillas con tinción de Tricrómico de Masson y se le otorgó la

calificación de laxo y denso dependiendo del caso (Figura 8). Se observó una predisposición a presentar un estroma denso en el grupo de los sujetos tratados con Toxina Botulínica tipo A comparado con el grupo control, los cuales presentaron un estroma laxo en su mayoría (Gráfica 2). Se realizó del mismo modo la evaluación de fibroblastos en ambos grupos y se otorgó una calificación de una, dos o tres cruces según sea el caso encontrando una predisposición a una mayor cantidad de fibroblastos en los sujetos control (Figura 8, Gráfica 3). En cuanto a angiogénesis, no se encontró diferencia significativa.



Gráfica 2.- Valoración del estroma en cortes histológicos. Predisposición a estroma denso en sujetos experimentales

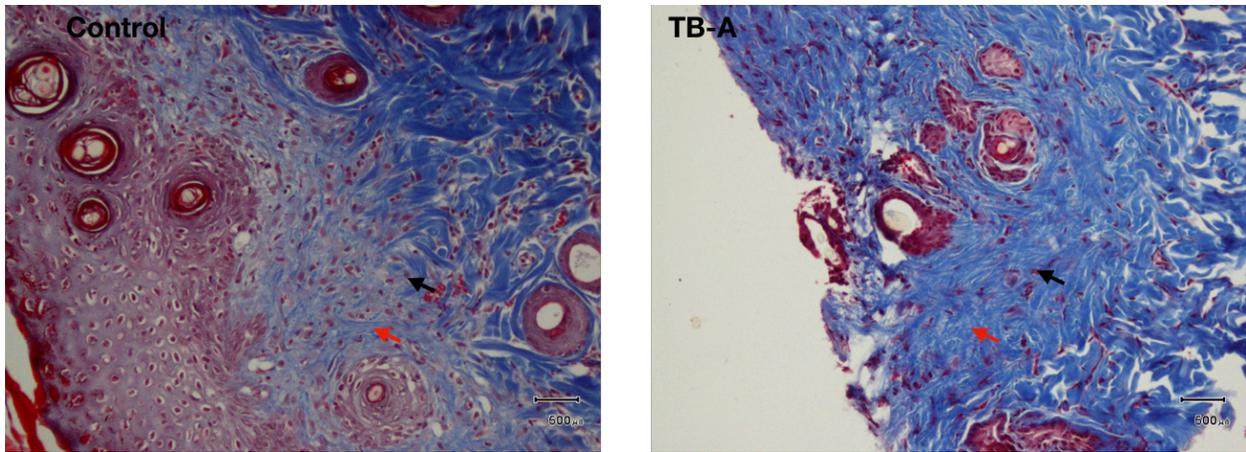
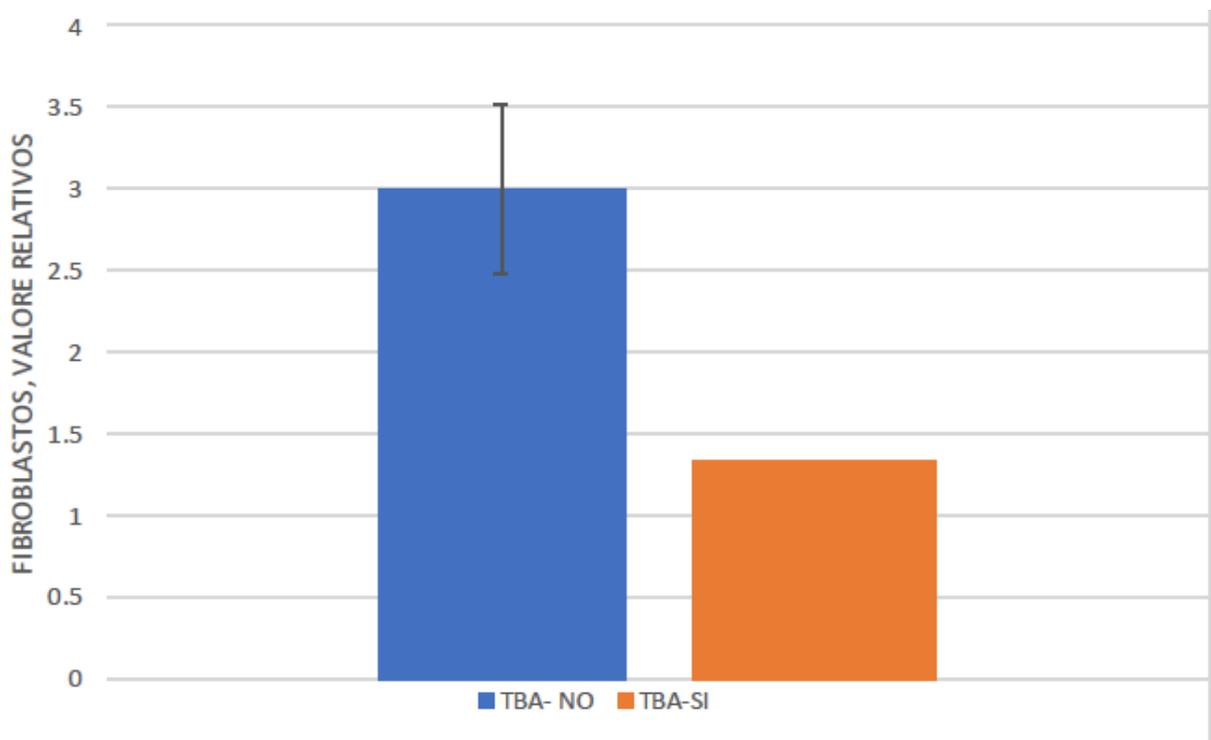


Figura 8.- Comparativa entre grupos, se observa un estroma más denso en el sujeto tratado con TB-A (flecha roja) así como una menor cantidad de fibroblastos (flecha negra)



Gráfica 3.- Fibroblastos cuantificados con valores en cruces. Sujetos control +++, sujetos TB-A +

DISCUSIÓN

Clásicamente se ha utilizado la Toxina Botulínica tipo A para fines tanto médicos como estéticos, en parte, debido a la eficacia de esta, así como a la ausencia de efectos adversos. En años recientes, se ha utilizado colocándola de manera intralesional, como monoterapia o de manera combinada, para prevención y manejo de cicatrices patológicas (hipertróficas / queloides). La teoría del uso de TB-A para el manejo de cicatrices patológicas fue publicada por primera vez en el año 2000, sin embargo hasta este día el mecanismo de acción aún no es completamente entendido. ⁽³¹⁾

Un factor importante que determina la apariencia cosmética final de una cicatriz es la tensión ejercida sobre los bordes de la herida durante el periodo de cicatrización, la cual puede generar una cicatriz no favorable de manera tanto directa (mecánica) como indirecta (química). La tensión ejercida de manera perpendicular en los bordes de la herida, por la acción mecánica de los músculos, tiende a distorsionar el proceso de cicatrización normal, generando una cicatriz hipertrófica o queloide. Sabemos que cuando la TB-A se inyecta de manera local, causa una parálisis temporal de los músculos alrededor de la herida, generando inmovilización y por lo tanto disminuyendo la tensión perpendicular. Por lo tanto la inmovilización, representa un principio terapéutico básico en el proceso de cicatrización, común a cualquier tipo de lesión, en donde se han utilizado distintas herramientas para tratar de minimizar los efectos negativos de la tensión con el movimiento muscular. En el año 2000, Gassner y colaboradores, publicaron por primera vez un estudio prospectivo, aleatorizado, controlado y experimental en primates para

mejorar la tensión de las heridas utilizando TB-A, al grupo experimental se le realizaron heridas faciales y se administró TB-A, visualizando en un seguimiento a 3 meses mejoría cosmética en la apariencia de estas heridas ⁽³²⁾

Sin embargo, el enfoque de la mejoría en la tensión en el estudio de Gassner va orientado a la parálisis muscular generada por la TB-A. En nuestro estudio se midió de manera objetiva el efecto de la TB-A en la herida aplicada de manera aguda, traduciéndolo en la fuerza necesaria para lograr la separación de la herida, esto mediante un dinamómetro, y observando una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el grupo experimental, con una promedio de fuerza de 10.25 vs 23.83 newtons respectivamente.

Con lo anterior, podemos evidenciar que la toxina botulínica tipo A, aplicada de manera aguda en heridas, mejora la fuerza tensil, no solo al generar el efecto de parálisis sobre la musculatura adyacente como lo pensado clásicamente, si no que, incrementa la fuerza necesaria para lograr la separación de la herida a nivel de la dermis. Por lo que podría representar una herramienta más de prevención y de manejo para heridas crónicas y de difícil control.

Como se ha explicado, una de las razones para que una cicatriz se vuelva una cicatriz patológica, es el exceso de tensión en sus bordes. Con este estudio se podrían generar bases para un segundo estudio clínico de prevención de cicatrices patológicas en heridas con tensión excesiva en sus bordes o en sitios queloidogénicos.

En el análisis histopatológico, se observó una predisposición a una mayor cantidad de estroma y menor cantidad de fibroblastos en los sujetos tratados con TB-A. Con lo que podríamos inferir que probablemente exista un control en la producción de fibras de colágeno lo que podría regular el proceso de cicatrización anormal. Es importante continuar con la línea de investigación para valorar los cambios específicos en cuanto a fibras de colágeno por tipo y por cantidad, esto realizado por medio de microscopía electrónica.

En cuanto al aspecto estético, una incisión cuidadosamente planeada, generalmente tendrá un buen resultado cosmético. Existen distintas técnicas que se pueden realizar como el colocar las incisiones alineadas con las líneas de tensión en piel relajada, colgajos locales o el socavamiento de los bordes de la herida para reducir la tensión excesiva en esta ⁽³³⁾, sin embargo, en muchas ocasiones vemos heridas traumáticas que además de presentarse como un factor de riesgo inherente para una cicatriz patológica, difícilmente se encuentran alineadas con las líneas de tensión en piel relajada.

Como lo pudimos ver en este estudio, el utilizar la TB-A de manera aguda en heridas, resultará en una mejoría de la apariencia estética de dicha cicatriz. Quizá para un adulto con una herida en una mano no represente un problema, pero tal vez, para un niño o adolescente con una herida en la región frontal o ciliar, represente algo más importante que pudiera afectar incluso su autoestima.

En muchas ocasiones, estas heridas se convierten en heridas crónicas y complejas, de difícil manejo, por lo que es importante conocer y tener más herramientas con las que

podamos prevenir de una manera eficaz y relativamente inocua la formación una cicatriz patológica, a la vez que mejoramos la tensión en la piel.

CONCLUSIÓN

Uno de los principales problemas con el que se enfrenta un cirujano al momento de crear o tratar una herida, es la evolución de esta, con la tensión de la misma como uno de los principales factores predictores en cuanto a la evolución. La aplicación de toxina botulínica tipo A, en heridas en agudo, genera un incremento de la fuerza necesaria para lograr la separación de la misma, a la vez, que mejora la apariencia estética de la cicatriz. A nivel histopatológico existe una diferencia evidente en la cicatriz tratada con Tb-A, las cuales muestran un estroma mas denso y un número menor de fibroblastos, esto en un modelo de experimentación animal.

REFERENCIAS

1. Kirkland KB, Briggs JP, Trivette SL, Wilkinson WE, Sexton DJ. The impact of surgical-site infections in the 1990s: attributable mortality, excess length of hospitalization, and extra costs. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1999;20(11):725–30.
2. Thorne CH. *Grabb and Smith's plastic surgery.* 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
3. Jones AP, Janis JE, Barnard AR. *Essentials of plastic surgery.* 2nd ed. Boca Raton FL: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2014.
4. Childs DS, Murthy AS. Overview of Wound Healing and Management. *Surg Clin North Am.* 2017; 97(1):189-207.
5. Goldman R. Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. *Adv Skin Wound Care.* 2004;17(1):24–35.
6. O'Leary JP, Tabuenca A, Capote LR. *The physiologic basis of surgery.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
7. Raja SK, Garcia MS, Isseroff RR. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci.* 2007;12:2849–68.
8. Lech M, Anders H. Macrophages and fibrosis: how resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(7):989–97.
9. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, et al. Perspective article: growth factors

- and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16:585–601.
10. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117:1e–32e.
 11. Dubay D, Franz M. Acute wound healing: the biology of acute wound failure. *Surg Clin North Am.* 2003; 83(3):463-81.
 12. Simon PE, Moutran HA, Romo T, et al. Skin Wound Healing. *E-medicine specialties.* Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/884594-overview#a1>. Accesado Mayo 12, 2018.
 13. Atiyeh BS, Amm CA, El Musa KA. Improved scar quality following primary and secondary healing of cutaneous wounds. *Aesthetic Plast Surg.* 2003;27(5):411–7.
 14. Ogawa R. The most current algorithms for the treatment and prevention of hypertrophic scars and keloids. *Plast Reconstr Surg.* 2010;125(2):557–68.
 15. Niessen, FB, Spauwen PH, Schalkwijk J. Kon M. On the nature of hypertrophic scars and keloids: A review. *Plast Reconstr Surg.* 1999;104(5): 1435-58.
 16. Copcu E, Sivrioglu N, Oztan Y. Combination of surgery and intralesional verapamil injection in the treatment of the keloid. *J Burn Care Rehabil.* 2004;25(1):1-7.
 17. Ogawa R. The most current algorithms for the treatment and prevention of hypertrophic scars and keloids. *Plast Reconstr Surg.* 2010;125(2):557–68.
 18. Dubay DA, Franz MG. Acute wound healing: the biology of acute wound failure. *Surg Clin North Am.* 2003 Jun;83(3):463-81.
 19. Attinger CE, Janis JE, Steinberg J, et al. Clinical approach to wounds: debridement and wound bed preparation including the use of dressings and

- wound healing adjuvants. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(7S):72S–109S.
20. Karamanos E, Osgood G, Siddiqui A, Rubinfeld I. Wound healing in plastic surgery: does age matter? An American College of Surgeons National Surgical Quality Improvement Program study. *Plast Reconstr Surg.* 2015;Mar;135(3):876-81.
 21. Sandy-Hodgetts K, Carville K, Leslie GD. Determining risk factors for surgical wound dehiscence: a literature review. *Int Wound J.* 2015;12(3):265-75.
 22. 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):1908–11.
 23. De Maio M, Rzany B. *Botulinum Toxin in Aesthetic Medicine.* 1ed. Heidelberg, Germany. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Springer Science. 2007
 24. Kasyanju Carrero LM, Ma WW, Liu HF, Yin XF, Zhou BR. Botulinum toxin type A for the treatment and prevention of hypertrophic scars and keloids : Updated review. *J Cosmet Dermatol.* 2019 Feb;18(1):10-15.
 25. Carrillo-Córdova J, Martínez-Wagner R, Trolle-Silva A, Bracho-Olvera H, Carrillo-Córdova D, Carrillo-Córdova L. La toxina botulínica tipo A se asocia con un incremento en la angiogénesis de las heridas en un modelo murino experimental. *Cirugía Plástica.* 2017; 27 (3): 107-112.
 26. Leal EC, Carvalho E, Tellechea A, et al. Substance P promotes wound healing in diabetes by modulating inflammation and macrophage phenotype. *Am J Pathol.* 2015;185(6):1638-48.
 27. Wilson AM. Use of botulinum toxin type A to prevent widening of facial scars. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(6):1758-1766-1768.

28. Xiao Z, Zhang M, Liu Y, Ren L. Botulinum toxin type a inhibits connective tissue growth factor expression in fibroblasts derived from hypertrophic scar. *Aesthetic Plast Surg.* 2011;35(5):802-7.
29. Bloemen MC, Ulrich MM, Molema G, van Zuijlen PP, Middelkoop E, Niessen FB. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation. *Burns.* 2009; 35:15–29.
30. Zielins ER, Atashroo DA, Maan ZN, et al. Wound healing: an update. *Regen Med.* 2014;9(6):817-30
31. Shaarawy E, Hegazy RA, Abdel Hay RM. Intralesional botulinum toxin type A equally effective and better tolerated than intralesional steroid in the treatment of keloids: a randomized controlled trial. *J Cosmet Dermatol.* 2015;14(2):161–166.
32. 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.
33. Courtiss EH, Longacre JJ, DeStefano GA, Loredana B, Holmstrand K. The placement of elective skin incisions. *Plast Reconstr Surg.* 1963; Jan;31:31-44.