



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"

**"USO DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO A PARA DISMINUIR LA PROLIFERACIÓN
DE FIBROBLASTOS DURANTE EL PROCESO DE CICATRIZACIÓN; UN MODELO
MURINO EXPERIMENTAL"**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN

CIRUGÍA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA

PRESENTA:

JORGE RAÚL CARRILLO CÓRDOVA

TUTOR DE TESIS

DR. ROGELIO MARTINEZ WAGNER

MÉDICO ADSCRITO

CIUDAD DE MÉXICO JULIO 2017



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.

HOSPITAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ

AUTORIZACIONES

HOSPITAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ

AUTORIZACIONES



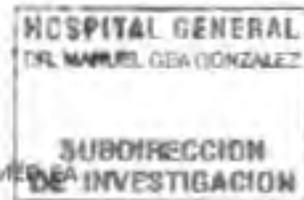
Dr. Héctor Manuel Prado Callejas

DIRECTOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN



Dr. Pablo Muravilla Campillo

SUBDIRECTOR DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA



Dra. Laura Andrade Delgado

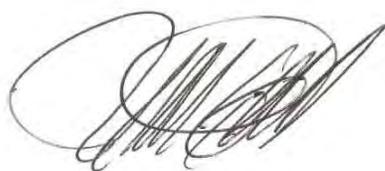
JEFE DE SERVICIO CIRUGÍA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA



Dr. Antonio Puente de Camino

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE CIRUGÍA GENERAL

Este trabajo con número de registro: 05-12-2017 presentado por el alumno Jorge Raúl Carrillo Córdova se presenta en forma con visto bueno por el tutor principal de la tesis Dr. Rogelio Martínez Wagner con fecha Julio 2017

A complex, cursive handwritten signature in black ink, featuring several overlapping loops and a dense, scribbled end.

Dr. Pablo Maravilla Campillo

A stylized handwritten signature in black ink, consisting of a large, sweeping 'R' shape followed by a few smaller, less distinct strokes.

Dr. Rogelio Martínez Wagner

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL SERVICIO DE CIRUGÍA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA DEL HOSPITAL GENERAL “DR MANUEL GEA GONZÁLEZ” BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ROGELIO MARTÍNEZ WAGNER Y CON EL APOYO DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM.

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis no es más que el reflejo de muchos años de trabajo, esfuerzo y dedicación los cuales fructifican en la culminación de mis estudios como cirujano plástico y reconstructivo. Sin duda el alcanzar esta meta no hubiera sido posible sin el apoyo, enseñanza y ayuda de muchas personas que fueron apareciendo durante el proceso. Seguramente no mencionaré a algunos, pero trataré de englobar a todas las personas que hicieron posible este logro.

En primer lugar, a mi madre; mujer quien estuvo siempre para apoyarme y aconsejarme en los momentos más difíciles y siempre mostrarme un camino para solventar mis problemas.

En segundo lugar, a mi padre; un ejemplo a seguir por su tenacidad y hambre de conocimiento.

A mis hermanos, a todos ellos, 3 son médicos. Les agradezco todos los momentos de discusiones, alegrías y motivaciones los cuales fueron gasolina para el motor llamado motivación.

A mis maestros, todos ellos siempre vieron por mi enseñanza y por lograr mejorar el conocimiento que debo de tener para ser un mejor médico y cirujano plástico.

A mis amigos, fueron sin lugar a duda clave para lograr cumplir mis metas, compañeros de armas que estuvieron en los momentos de felicidad y tristeza que acompañan a la carrera de médico cirujano, mencionar solo a algunos sería imprudente, pero destacar mi agradecimiento a todos y cada uno de ellos.

El éxito es fácil de obtener. Lo difícil es merecerlo.

Albert Camus (1913-1960) Escritor francés.

ÍNDICE GENERAL

- 1. RESUMEN**
- 2. INTRODUCCIÓN**
- 3. MATERIALES Y MÉTODOS**
- 4. RESULTADOS**
- 5. DISCUSIÓN**
- 6. CONCLUSIONES**
- 7. REFERENCIAS**
- 8. TABLAS**
- 9. FIGURAS**

**“USO DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO A PARA DISMINUIR LA PROLIFERACIÓN
DE FIBROBLASTOS DURANTE EL PROCESO DE CICATRIZACIÓN; UN MODELO
MURINO EXPERIMENTAL”**

Dr. Jorge Raúl Carrillo-Córdova*

Dr. Rogelio Martínez-Wagner*

* Cirugía Plástica y Reconstructiva Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

1. RESUMEN

Introducción: La cicatrización es un proceso natural que restaura la integridad tisular después de una lesión en cualquier órgano. La toxina botulínica tipo A (TBT-A) es un inhibidor de la liberación de acetilcolina, lo que evita la contracción muscular y con ello disminuye la tensión dinámica de las heridas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la TBT-A durante la cicatrización y su impacto en la proliferación de fibroblastos, angiogénesis y migración de células inflamatorias en un modelo murino experimental.

Materiales y métodos: Se realizó un ensayo clínico doble ciego en un modelo murino experimental de herida quirúrgica. El modelo quirúrgico fue propuesta del autor y consistía en lo siguiente: se realizaron dos heridas a cada lado de la columna vertebral en el dorso de 20 ratones BALB/c de una misma cepa (10 machos y 10 hembras), de 2-3 meses con un peso de 27.1 gramos (\pm 2.29). En una herida se infiltró toxina botulínica tipo A (2 UI) mientras que en la otra herida se infiltró solución salina al 0.9% como control (2 UI), ambas infiltraciones fueron en el tejido celular subcutáneo. Las variables a evaluar fueron; la proliferación de fibroblastos (PF) mediante inmunohistoquímica (CD34), angiogénesis (AG) y migración de células inflamatorias (MCI) en los días postoperatorios 3, 6, 9 y 15 mediante microscopía de alto poder y conteo de 5 campos. El análisis histopatológico fue realizado en los primeros 5 días posterior a la toma de la muestra por un patólogo experimentado, el cual recibió las muestras de manera cegada. El análisis estadístico fue realizado con prueba T de Student para muestras de distribución normal y U de Mann-Whitney

para aquellas con distribución anormal, para las variables cualitativas se utilizó la prueba de X^2 , y se estableció como significativo los resultados con $p < 0.05$.

Resultados: Se estudiaron 20 ratones distribuidos en 4 grupos (6 en el día tres, 4 en el día seis, 5 en el día nueve y 4 en el día 15). Los ratones fueron sacrificados a los 3, 6, 9 y 15 días y se tomaron muestras de cada herida para ser evaluadas histológicamente de forma cegada. Se incluyeron los resultados histopatológicos de 19 ratones (se presentó una defunción en el grupo del día 6). Posterior al análisis histopatológico e inmunohistoquímico se obtuvieron los siguientes resultados; en el día 3 la herida con toxina botulínica presentó menor PF (49.33 vs 27 [CI: 5.6-39] $p=0.017$) y AG (5.1 vs 13.5 [CI: 4.7-11.9] $p=0.001$), en el día 6 la herida con toxina botulínica presentó menor PF (17.5 vs 33.5 [CI: 4.1-27.8] $p=0.017$) en el día 9 no existieron diferencias entre el grupo control y el experimental; finalmente en el día 12, en la herida con toxina botulínica se identificó mayor PF (14.8 vs 34.2 [CI:8.6-30.2] $p=0.009$) y MCI (8.5 vs 24.2 [CI:1.6-29.8] $p=0.037$). La angiogénesis fue mayor en el grupo de toxina botulínica. AG (4.9 vs 8.6 [CI:-5.3--2.09] $p=0.002$)

Conclusiones: La toxina botulínica tipo A modula el proceso de cicatrización de las heridas al disminuir la proliferación de fibroblastos y aumenta la formación de vasos sanguíneos durante la totalidad del proceso. Con estos resultados se demuestra que en nuestro estudio la TBT-A disminuye la celularidad del proceso de cicatrización.

Palabras clave: Toxina botulínica, fibroblastos, cicatrización.

2. INTRODUCCIÓN

La cicatrización es un proceso biológico complejo el cual se divide en tres fases. La fase inflamatoria tiene como objetivo detener el sangrado y producir quimocinas atrayentes a células regeneradoras; durante la segunda fase, la proliferativa, existe un gran aumento de células mediadoras de la cicatrización entre ellas, fibroblastos, células endoteliales y neutrófilos. Se ha propuesto que los fibroblastos son el pilar fundamental de la cicatrización teniendo funciones de regeneración tisular, deposición de colágena y remodelación de una herida. En la última fase, la fase de remodelación, la herida se vuelve menos densa, encontrando un gran número de mio-fibroblastos bien diferenciados y colágena tipo III a tipo I. Una proliferación descontrolada o anormal de fibroblastos desencadenar algún tipo de cicatrización patológica.¹

De manera simultánea a la migración de fibroblastos la herida comienza con un proceso de remodelación. La tensión de una herida es un factor importante el cual determina el grado de fibrosis y la formación de cicatriz. A partir de este concepto las incisiones en la piel deben diseñarse con respecto a 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 existir mayor proliferación de fibroblastos se sintetiza más colágena y de manera desorganizada la cual desarrolla cicatrices patológicas. Es basado en el concepto de tensión de las heridas 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 realizados en primates y seres humanos no muestran la fisiopatología de cómo mejora la cicatrización, solo evalúan el resultado estético.^{3,4,5}

El estudio de cómo la TBT-A afecta el proceso de cicatrización no ha sido confirmado. Estudios experimentales proponen que la TBT-A mantiene a los fibroblastos en fases G0-G1 y disminuye el proceso de mitosis.⁶ Esta hipótesis ha sido confirmada en modelos experimentales⁷ y se ha demostrado que la expresión de genes modificadores de fibroblastos de cicatrices hipertróficas disminuye en cultivos de fibroblastos ex – vivo.⁸

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

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo, aleatorizado, doble ciego. Se incluyeron un total de 20 ratones BALB/c de una misma cepa. 50% correspondían al sexo masculino. Se estudiaron 20 ratones distribuidos en 4 grupos. (6 en el grupo 1, 4 en el grupo 2, 5 en el grupo 3 y 4 en el grupo 4). Se incluyeron los resultados histopatológicos de 19 ratones (se presentó una defunción en el grupo 4). Cada grupo fue sometido al mismo procedimiento experimental el cual se detalla más adelante. 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 doceavo día.

Los animales se mantuvieron en cajas de cuidado por 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 NOM. Fueron sacrificados posterior a 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 distribuyéndolos de la forma previamente mencionada por cada día de evaluación. Cada ratón fue rasurado del dorso para lograr una identificación de la columna

espinal, un investigador (Dr. Luis Daniel Carrillo Córdoba) realizó un par de incisiones de 2 cm cada una a la misma altura a 1 cm de la columna del ratón. Las doctoras Hazel Bracho y Dulce Carrillo, proporcionaron 2 jeringas al investigador encargado de la infiltración y cierre de las heridas (Dr. Jorge Raúl Carrillo Córdoba), una de las jeringas con 5 UI de TBT-A y la otra con 5 UI de solución salina, cada una de las jeringas rotuladas con un color. (Rojo: Solución Salina / Verde: TBT-A). Sin conocer el contenido de cada una de las jeringas se realizó la infiltración de la solución en cada uno de los lados, lado derecho se infiltró en la dermis la jeringa roja mientras que del lado izquierdo se infiltró el contenido de la jeringa verde. Todos los animales se les realizó este procedimiento de manera cegada por el cirujano. Posterior a la infiltración se dio cierre mediante dos puntos simples con sutura no absorbible monofilamento (Nylon 5-0). Posteriormente se realizó lavado con agua y jabón, se comprobó sobrevivencia del animal al procedimiento, se administró analgesia más antibiótico y se regresó a su jaula de cuidado.

Valoración histológica de las muestras

Las muestras fueron colocadas en formol al (10%) y evaluadas las primeras 48 horas posterior a la toma de la misma. Se realizarán cortes transversales para su inclusión en procesador automático histocinético para bloques de parafina cortados en secciones de 4-6 μm .

La valoración de la angiogénesis y células inflamatorias se realizó mediante el promedio de células identificadas por microscopía de alto poder a seco fuerte (objetivo de 40x) medidos en 5 diferentes campos. La identificación de fibroblastos se evaluó empleando inmunotinción con CD34. La decisión de utilizar este inmunomarcador es porque ha sido identificado en fibroblastos tanto de la dermis papilar como reticular.¹¹ Todo el proceso de evaluación histopatológica estuvo cegado para la evaluadora.

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 23. (SPSS, Inc., Chicago, Ill). La cuenta de células (fibroblastos, capilares, células inflamatorias) fueron expresadas en medias con su desviación estándar (DE); para demostrar diferencia entre grupos experimental y control, contrastado con sexo y día de evaluación, se utilizó prueba de t para muestras independientes; valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

4. RESULTADOS

Evaluación clínica de las heridas.

Las heridas fueron evaluadas de manera clínica por parte del Dr. Jorge Carrillo, 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 proliferación de fibroblastos.

Se evaluaron la proporción de núcleos de fibroblastos mediante inmunohistoquímica. Los resultados de las inmunotinciones indican que el uso de TBT-A (0.5 UI), reducen significativamente el número de fibroblastos comparado con el grupo control tal como se muestra en la figura 1. Las diferencias significativas se encontraron en el día 3, 6 y 12. La tabla 1 muestra las diferencias de ambos grupos dependiendo el día de estudio.

Efecto de la TBT-A en la migración de células inflamatorias.

Las células inflamatorias fueron evaluadas mediante tinción de hematoxilina y eosina. Se tomaron en cuenta cualquier tipo de célula inflamatoria, principalmente encontrándose macrófagos y neutrófilos. El uso de TBT-A aumenta la migración de células inflamatorias a lo largo del tiempo evaluado, sin embargo, solo en el día 12 se encontraron diferencias significativas demostrando menor migración de células inflamatorias en el grupo de TBT-A. En la figura 2 se muestra la manera de distribución de células inflamatorias dependiendo el día de estudio.

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

La angiogénesis fue evaluada mediante tinción de hematoxilina y eosina. 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. (Figura 3)

Los resultados de comparación de medias del conteo de fibroblastos, células inflamatorias y formación de nuevos vasos sanguíneos en cada grupo de tratamiento y día de evaluación están agrupados en la figura 4.

Análisis histológico

Al realizar el análisis histológico se logró identificar adecuado neoformación en ambos grupos (Figura 5). La Figura 6 muestra la diferencia en proliferación de fibroblastos en ambos grupos, vale la pena mencionar que estos resultados fueron corroborados mediante inmunohistoquímica con CD-34. (Figura 7)

5. DISCUSIÓN

Este estudio demuestra el efecto de la TBT-A en la modulación de una herida cerrada por primera intención en las etapas iniciales de la cicatrización, evidenciando una disminución de la proliferación fibroblastos y células inflamatorias, así como el aumento del número de vasos sanguíneos de neoformación.

La TBT-A ha demostrado su utilidad como tratamiento múltiples enfermedades donde destacan; blefaroespasma, tortícolis espasmódica, distonias, hiperhidrosis axilar y palmar entre otros. Su mayor indicación y uso es para la disminución de líneas de expresión glabellares y frontales, en el campo cosmético.^{12,13,14}

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, lo cual disminuye la isquemia en los bordes y promueve un mejor microambiente (disminuyendo la hipoxia e isquemia). Los autores asumen que la mejoría de las cicatrices se debe a una inhibición de la contracción de la musculatura debajo de la herida lo cual mejora el microambiente por las razones previamente explicadas.^{15,16} Independientemente de esto, se ha tratado de identificar características intrínsecas de las moléculas capaces de realizar modificaciones a la cicatrización.

Nuestro estudio fue diseñado con características de diseños previos, pero innovando en aspectos metodológicos. La dosis de 0.5 U en cada una de las heridas

se basó en estudios experimentales previos en murinos los cuales han demostrado su eficacia y seguridad.^{17,18} El uso de murinos para estudios experimentales en la piel está bien justificado debido a las similitudes con la piel de los seres humanos. Las diferencias más reconocidas son: una dermis papilar menos desarrollada, y un mayor número de glándulas sebáceas y folículos pilosos. Sin embargo, las características de la epidermis, dermis y tejido celular subcutáneo son similares a la piel de los seres humanos.¹⁸

El objetivo principal de este estudio fue determinar la proliferación de fibroblastos en heridas bajo el efecto de la TBT-A. Nuestros resultados indican una disminución de los fibroblastos y de las células inflamatorias en el lado donde se trató con TBT-A y de manera simultánea un aumento en el desarrollo de vasos. Esto es similar a lo reportado por Lee y colaboradores en un modelo experimental en ratas en heridas con cierre por segunda intención; en este estudio el seguimiento es a dos meses y no demuestran diferencias significativas al final del seguimiento, esto puede estar explicado por la gran capacidad de las ratas para modular la inflamación en una cicatriz mediado por su avanzado sistema inmune.¹⁹ Con base en los resultados de estos dos estudios se demuestra el efecto de la TBT-A durante el proceso de cicatrización tanto en sus etapas iniciales como en sus etapas tardías; su efecto ocasiona una disminución de la tensión superficial lo cual disminuye la isquemia ocasionando una menor migración de células inflamatorias y fibroblastos.

Las células inflamatorias disminuyeron conforme avanzaron los días. Entre mayor inflamación se encuentra en una herida se puede considerar un proceso más patológico. Cicatrices hipertróficas y queloides tienen mayor número de células

inflamatorias. El uso de TBT-A puede disminuir esta migración, suponemos que esto se debe a que la menor tensión dinámica de la herida produce menor isquemia y con ello produce una mejor cicatrización.

A diferencia de la disminución de fibroblastos y células inflamatorias demostradas en nuestro estudio; Kucukkaya y colaboradores reportan una mayor concentración de fibras de colágena, secundario a una mayor concentración de miofibroblastos, así como una mayor infiltración de células inflamatorias en un modelo experimental de injertos cutáneos en ratas. Los autores realizaron el análisis histopatológico a los dos meses de seguimiento lo cual varía con nuestra metodología. A diferencia de este estudio nosotros evaluamos la fase inflamatoria de la cicatrización mientras que ellos reportan los resultados en la fase proliferativa y de remodelación lo cual podría explicar la diferencia en los hallazgos.¹⁸

Además de la disminución de la cuenta de fibroblastos, la TBT-A reduce la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos²⁰ y en modelos experimentales en conejos se ha evidenciado que no es dosis dependiente²¹, presentando un efecto de citotoxicidad en los fibroblastos.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones; la primera es el tamaño de muestra, la decisión de utilizar cada uno de los modelos experimentales como autocontrol y que sean de la misma cepa nos permite eliminar sesgos y variabilidad intra-inter animal. Aun así, los grupos de estudio son pequeños lo cual podría no permitirnos encontrar diferencias a momento de evaluar las células estudiadas. Otro punto a considerar es la manera histopatológica de evaluar la proliferación de las células, sin embargo,

el uso de CD-34 para la determinación de células estromales y fibroblastos ha sido empleado por otros autores.

6. 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 y al mismo tiempo aumentando la angiogénesis. Los resultados de este estudio abren una línea de investigación para demostrar el beneficio del uso de toxina botulínica tipo A en procesos patológicos durante la cicatrización.

7. REFERENCIAS

1. Childs DR, Murthy AS. Overview of wound healing and management. *Surg Clin N Am* 2017; 97:189-207.
2. Lebeda FJ, Dembek ZF, Adler M. Kinetic and Recreation Pathway Analysis in the Application of Botulinum Toxin A for wound Healing. *J Toxicol* 2012; 5:1-10.
3. Gassner HG, Sherris DA. Chemoimmobilization: improving predictability in the treatment of facial scars. *Plast Reconstr Surg*. 2003; 5: 1464-1466.
4. Wilson AM. Use of botulinum toxin type A to prevent widening of facial scars. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117:1758-1766.
5. Gassner, H. G., Sherris, D. A., and Otley, C. C. Treatment of facial wounds with botulinum toxin A improves cosmetic outcome in primates. *Plast. Reconstr. Surg.* 105: 1948, 2000.
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; 9:1128-1129.
7. Jeong HS, Lee BH, Sung HM, Park SY, Ahn DY, Jung MS, et al. Effect of botulinum toxin type A on differentiation of fibroblasts derived from scar tissue. *Plast Reconstr Surg* 2015; 136:171-178.)
8. Miao YY, Liu J, Zhu J, Tao YL, Zhang JA, Luo D, et al. The effect of botulinum toxin type A on expression proliferating of long non-coding 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 (2011). Guide for the care and use of laboratory animals. (8th Edition). Washington, DC: The National Academies Press.
11. Woodley DT. Distinct fibroblasts in the papillary and reticular dermis: implications for wound healing. *Dermatol Clin* 2017; 35:95-100.
12. Forbat E, Ali FR, Al-Niami F. Non-cosmetic dermatological uses of botulinum neurotoxin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016; 30:2023-2029.
13. Gart MS, Gutowski KA. Overview of botulinum toxins for aesthetic uses. *Clin Plast Surg* 2016; 43:459-471.
14. Fock J, Galea MP, Stillman BC, et al. Functional outcome following botulinum toxin A injection to reduce spastic equinus in adults with traumatic brain injury. *Brain Inj* 2004; 18:57–63.
15. Wilson AM. Use of botulinum toxin type A to prevent widening of facial scars. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117:1758-1766.
16. Sherris, D. A., and Gassner, H. G. Botulinum toxin to minimize facial scarring. *Facial Plast. Surg.* 18: 35, 2002.
17. Kim YS, Roh TS, Lee WJ, et al. The effect of botulinum toxin A on skin flap survival in rats. *Wound Repair Regen* 2009; 17:411–417.
18. Kucukkaya D, Irkoren S, Oxkan S, Sivrioglu N. The effects of botulinum toxin A on the wound and skin graft contraction. *J Craniofac Surg* 2014;25: 1908–1911.
19. Lee BJ, Jeong JH, Wang SG, Lee JL, Goh EK, Kim HW. Effect of botulinum toxin type A on a rat surgical wound model. *Clin Experimen Otorhin* 2009; 2:20-27.

20. Jeong HS, Lee BH, Sung HM, Park SY, Ahn DY, Jung MS, et al. Effect of botulinum toxin type A on differentiation of fibroblasts derived from scar tissue. *Plast Reconstr Surg* 2015; 136:171-178.
21. (Liu DQ, Li XJ, Weng XJ. Effect of BTXA on inhibiting hypertrophic scar formation in a rabbit ear model. *Aesth Plast Surg* 2017 [Epub ahead of print]).

8. TABLA

Tabla 1.

Diferencia de conteo de celularidad entre el lado control y el lado experimental (TBT-

A)

Célula estudiada	Día	Grupo		Valor de p
		Control	Botox	
Células inflamatorias	3	41.16 ± 13.8	47.66 ± 15.31	0.458
	6	43.75 ± 16.11	62.75 ± 30.65	0.315
	9	31.60 ± 13.72	94.00 ± 24.73	0.799
	12	24.25 ± 9.30	8.50 ± 3.22	0.037
Fibroblastos	3	49.33 ± 15.70	27.00 ± 9.52	0.017
	6	33.5 ± 7.72	17.50 ± 5.32	0.017
	9	72.40 ± 31.54	94.00 ± 24.73	0.265
	12	34.25 ± 6.99	14.80 ± 1.79	0.009
Angiogénesis	3	13.50 ± 3.39	5.1 ± 1.50	0.001
	6	5.30 ± 0.94	5.25 ± 2.21	0.969
	9	6.74 ± 2.93	7.18 ± 1.52	0.776
	12	4.95 ± 0.75	8.67 ± 1.05	0.002

9. FIGURA

Figura 1.

Promedio de células inflamatorias por día de seguimiento en cada grupo de estudio.

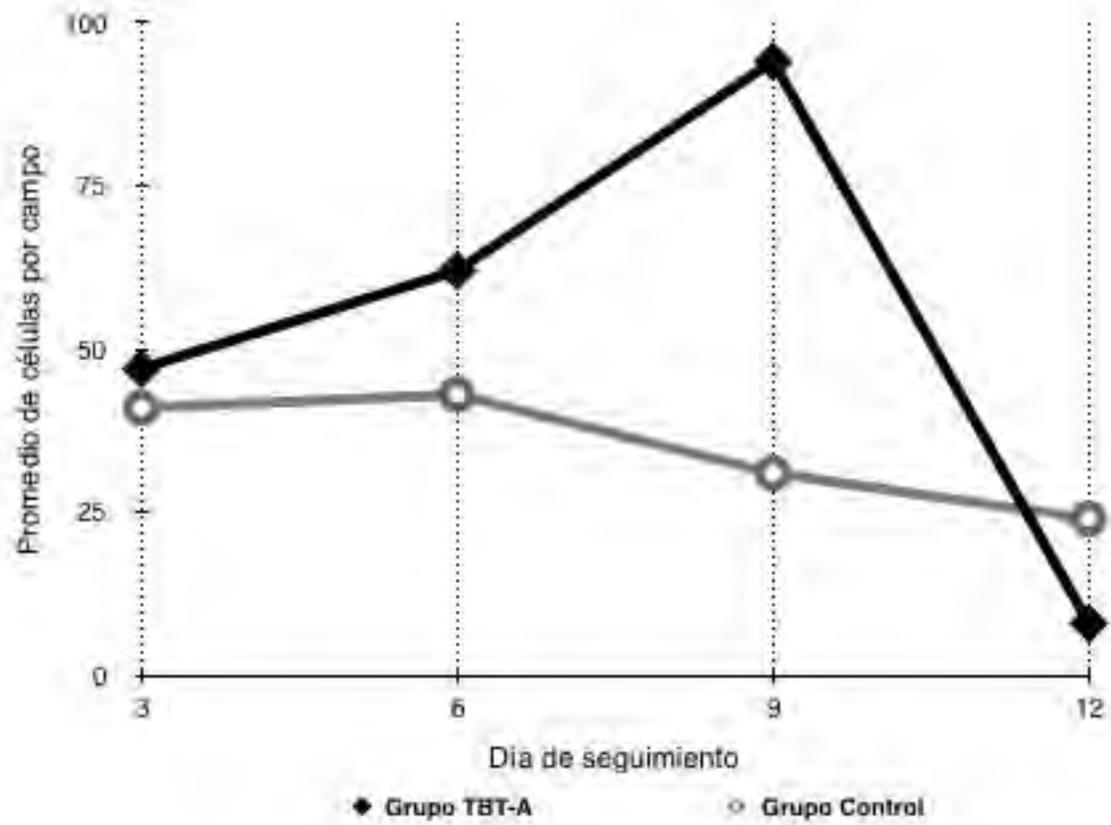


Figura 2

Promedio de fibroblastos por día de seguimiento en cada grupo de estudio. El asterisco implica diferencia significativa.

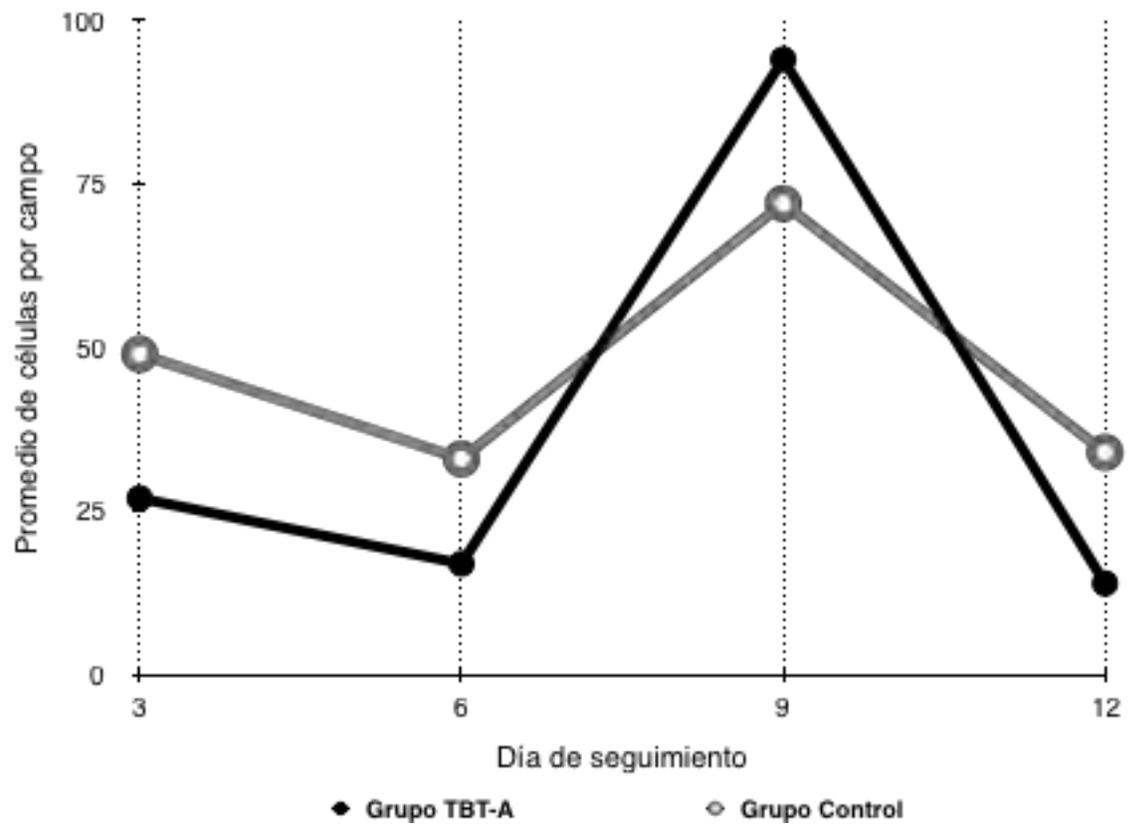


Figura 3

Promedio de angiogénesis por día de seguimiento en cada grupo de estudio. El asterisco implica diferencia significativa.

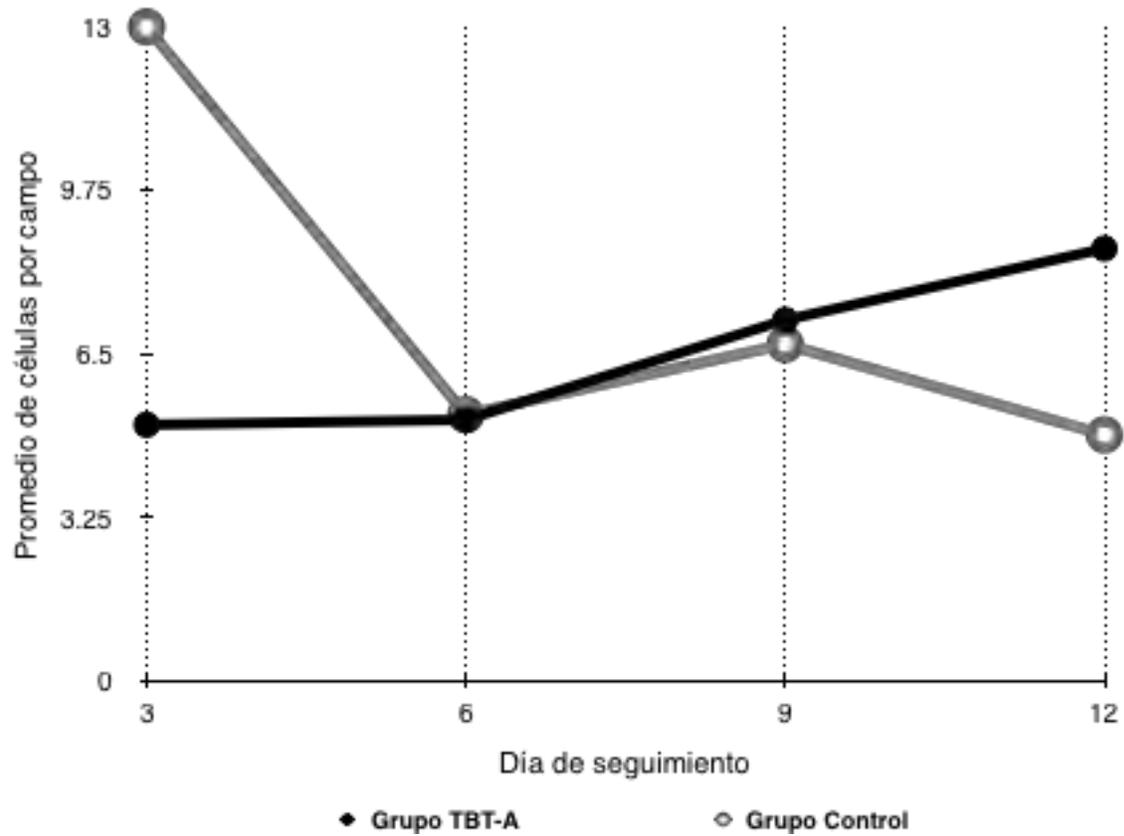


Figura 4

Diferencias en las medias de la cuenta de celularidad por grupo y día. El asterisco representa diferencia significativa.

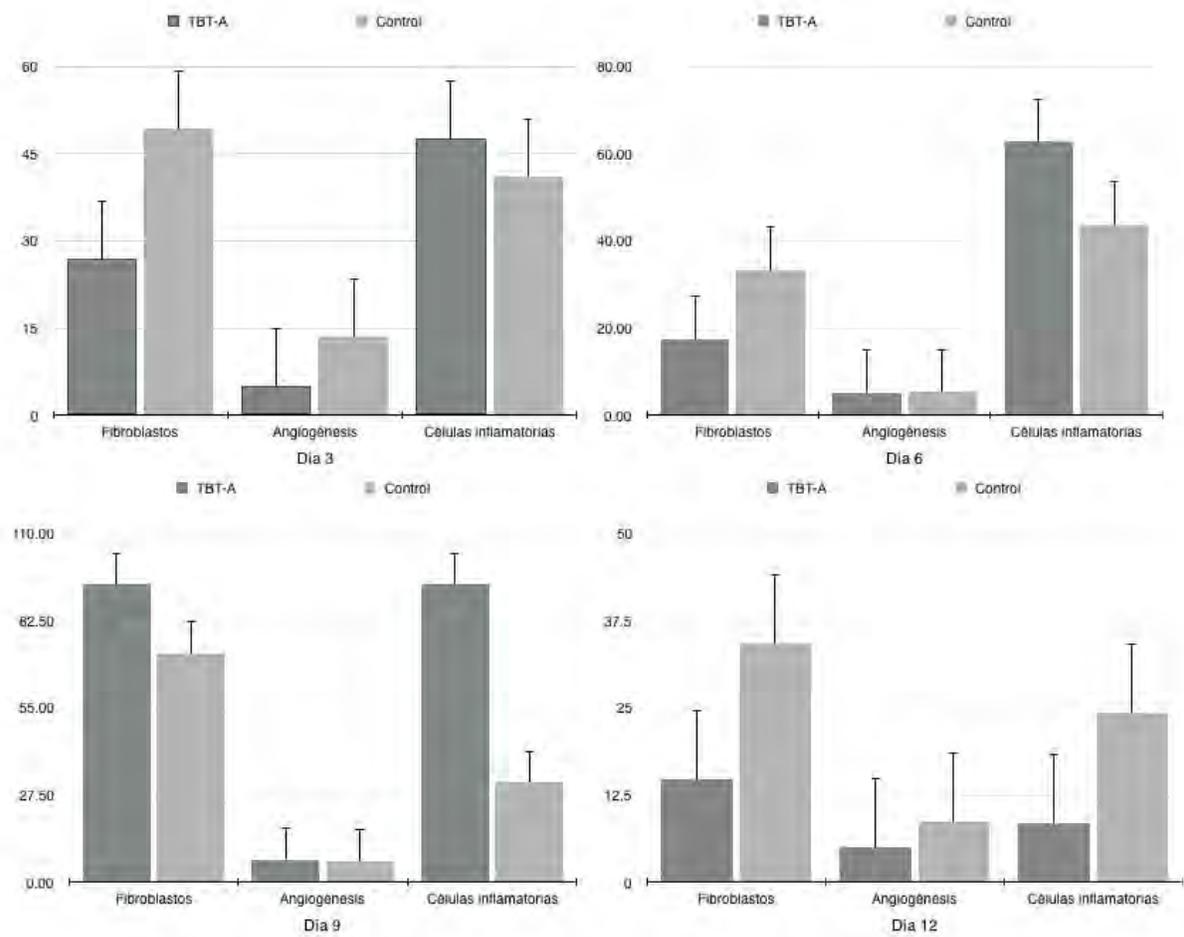


Figura 5.

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

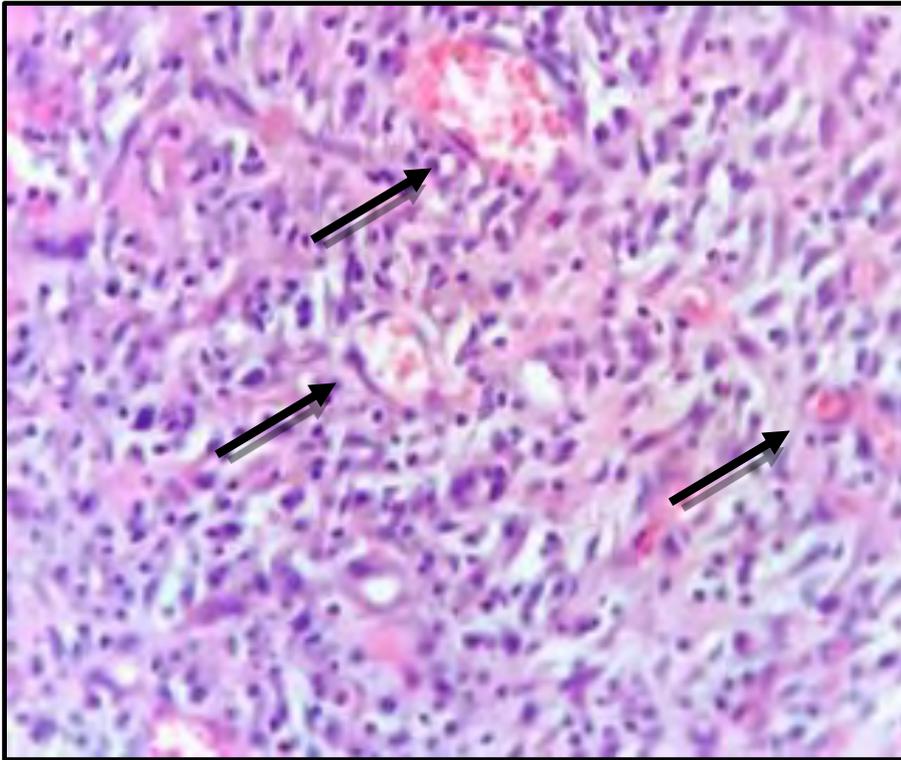


Figura 6.

Diferencia en la proliferación de fibroblastos en las heridas del día 12.

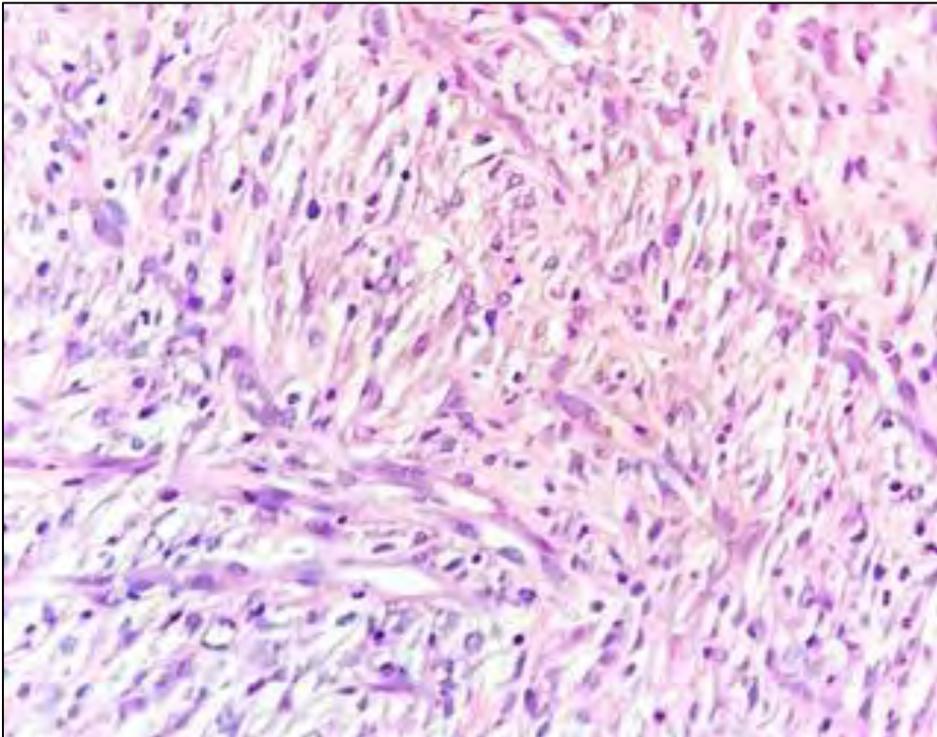
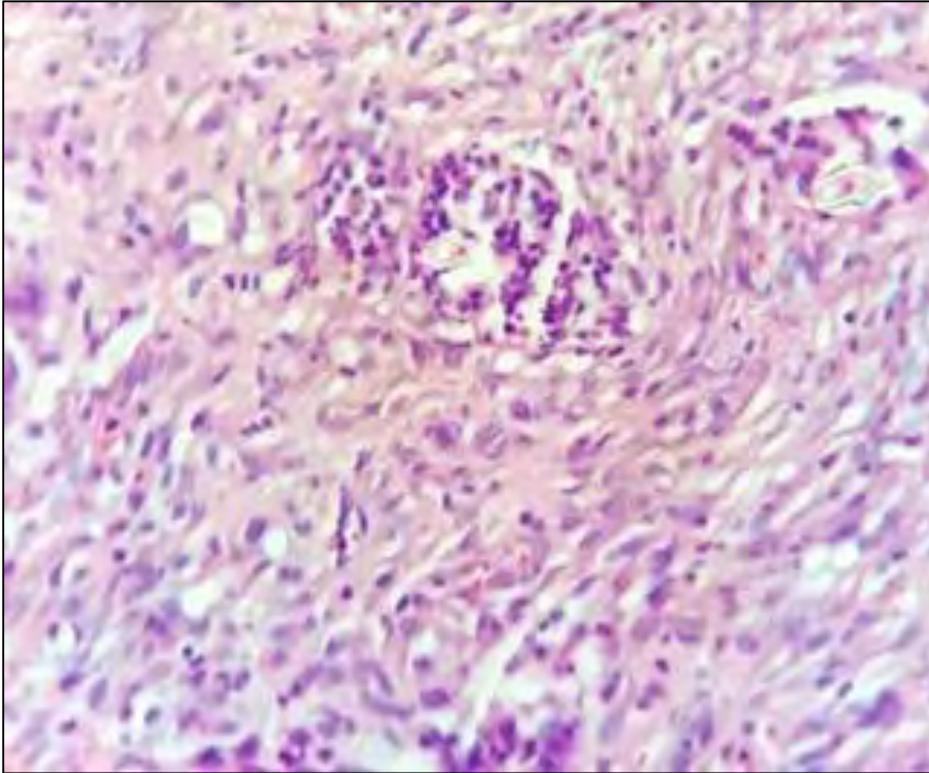


Figura 7

Cortes con inmunotinción con CD-34, para ayudar a la identificación de fibroblastos.

