

Efeito da triancinolona na apoptose celular e nas alterações morfológicas em queloides

Effect of triamcinolone in keloids morphological changes and cell apoptosis

JOÃO MÁRCIO PRAZERES DOS SANTOS¹; CLÁUDIO DE SOUZA, ACBC-MG²; ANÍLTON CÉSAR DE VASCONCELOS²; TARCIZO AFONSO NUNES²

R E S U M O

Objetivo: comparar o efeito da triancinolona injetável em cicatrizes queloidianas quanto ao número de células em apoptose e avaliar o efeito da triancinolona quanto às alterações no comprimento, altura e espessura dessas cicatrizes. **Métodos:** estudo clínico longitudinal, prospectivo, controlado, aleatorizado, unicego, com 15 pacientes portadores de queloides de orelha distribuídos em dois grupos: grupo 1, com sete pacientes submetidos apenas às exérese dos queloides; e grupo 2, com oito pacientes submetidos às exérese das lesões após três sessões de infiltração de 1ml de hexacetonida de triancinolona (20mg/mL), com intervalos de três semanas entre elas, assim como entre a última sessão e a operação. Os dois grupos foram homogêneos quanto à: idade ($p=0,867$), sexo ($p=0,782$) e tempo de evolução da cicatriz queloidiana ($p=0,779$). As cicatrizes queloidianas dos pacientes do grupo 2 foram medidas quanto ao comprimento, altura e espessura antes da injeção da triancinolona e antes do procedimento cirúrgico. Um observador mascarado realizou detalhamento morfológico e quantificação das células nas peças cirúrgicas, coradas com HE. Foi criado um índice apoptótico. **Resultados:** os dois grupos foram homogêneos quanto à: idade ($p=0,867$), sexo ($p=0,782$) e tempo de evolução da cicatriz queloidiana ($p=0,779$). o índice apoptótico no grupo 1 foi 56,82 e no grupo 2, 68,55, sem diferença ($p=0,0971$). As reduções nas dimensões dos queloides dos grupos 2 foram 10,12% para o comprimento ($p=0,6598$), 11,94% para a altura ($p=0,4981$) e 15,62% para a espessura ($p=0,4027$). **Conclusão:** a infiltração de triancinolona nas cicatrizes queloidianas não aumentou o número de apoptoses e não houve redução das dimensões, comprimento, altura e espessura dos queloides.

Descritores: Apoptose. Queloides. Triancinolona Acetonida. Cicatrização.

INTRODUÇÃO

Os queloides são afecções fibroproliferativas¹ com ocorrência em cinco a 15% das cicatrizes, independentemente do sexo². Podem ser originados por incapacidade do organismo em interromper o processo de cicatrização, causando o excesso de proliferação celular e a produção aumentada de colágeno³. A apoptose é a forma mais adequada de ajustar a quantidade de fibroblastos e de outras células durante a cicatrização, assim como em outros eventos fisiológicos, por apresentar menor inflamação e ser um processo regulado⁴.

As pesquisas não obtiveram êxito completo em elucidar as causas dos queloides e, como consequências disso, os tratamentos são variados e nem sempre apresentam bons resultados^{2,3}. A abordagem terapêutica atualmente adotada para o tratamento dos queloides é composta de várias opções e, entre elas, encontram-se a ressecção cirúrgica e a infiltração de corticoide intralesional⁵⁻⁸. Os glicocorticoides são empregados há pelo menos cinco décadas⁷ e atuam diminuindo o processo inflamatório, o que poderia ser um dos causadores dos queloides, entretanto,

essa pode ser apenas uma das ações⁹. Foram realizadas investigações em culturas de fibroblastos *in vitro* com o objetivo de elucidar a ação dos corticoides no aumento de apoptoses^{10,11}. Esse fato nos motivou a pesquisar o efeito da triancinolona na cicatriz queloidiana, *in vivo*.

O objetivo deste estudo foi comparar o efeito da triancinolona injetável em cicatrizes queloidianas quanto ao número de células em apoptose e avaliar o efeito da triancinolona quanto às alterações no comprimento, altura e espessura das cicatrizes.

MÉTODOS

A investigação foi realizada no ambulatório de Cirurgia do Hospital Escola da Faculdade de Medicina de Barbacena (Centro de Especialidades Médicas – CEMED) e no Laboratório de Apoptose do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFMG (nº 0601.0.203.000-11), bem como, pelo CEP da Universidade Presidente Antônio Carlos (UNIPAC) (nº 911/2011).

1. Disciplina de Clínica Cirúrgica do Adulto I da Faculdade de Medicina de Barbacena – MG; 2. Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

Trata-se de um estudo clínico longitudinal, prospectivo, controlado, aleatorizado, unicego¹², no qual foram incluídos indivíduos com cicatriz queloidiana localizada no lobo da orelha decorrente de perfuração para uso de brinco e que autorizaram sua participação assinando termo de consentimento livre e informado. Não foram incluídos os indivíduos que apresentavam tratamento prévio da cicatriz, uso de medicações antimitóticas e/ou imunomoduladoras ou indivíduos que se recusaram em participar da pesquisa.

Os indivíduos foram submetidos à anamnese geral e a amostra foi composta de 15 indivíduos, sendo sete (46,67%) do sexo masculino e oito (53,33%) do sexo feminino, três brancos, sete pardos e cinco negros ($p=0,782$).

Foi utilizado o comando ALEATORIO (,), no qual foram definidos dois números atribuídos de forma randomizada a cada registro, assim constituindo dois grupos de indivíduos: Grupo 1 – sete (46,67%) indivíduos que se submeteram à ressecção dos queloides; Grupo 2 – oito (53,33%) indivíduos que receberam infiltração de corticoide intralesional previamente à ressecção cirúrgica.

Todos os pacientes foram submetidos à ressecção cirúrgica extramarginal da cicatriz queloidiana e foi realizada sutura, com pontos separados de Nylon monofilamentar 6-0. A extirpação da lesão foi o único procedimento nos indivíduos do grupo 1.

Nos pacientes do grupo 2, as cicatrizes queloidianas foram medidas, em centímetros, quanto ao comprimento, altura e espessura, com auxílio de paquímetro milimetrado (Rhosse®, São Paulo). Em seguida, foram realizadas três sessões de infiltração de 1ml de hexacetonida de triancinolona na concentração de 20mg/ml (miligrama por mililitro), na região central da cicatriz queloidiana, com intervalos de três semanas entre elas^{10,11}. Após três semanas da última sessão de infiltração, repetiu-se as medidas das cicatrizes queloidianas, seguido de sua ressecção. Os pontos cirúrgicos foram retirados com dez dias de pós-operatório e os indivíduos retornaram para avaliação mensal até os seis meses.

As peças cirúrgicas foram divididas em três fragmentos de até 0,5cm de espessura por seção longitudinal, incluindo o centro e a borda da lesão. Todos os fragmentos foram enviados ao Laboratório de Apoptose da UFMG, sendo que um fragmento foi acondicionado em formol a 10% tamponado e pH 7,4 para análises e os outros dois fragmentos foram acondicionadas em frascos com glutaraldeído e nitrogênio líquido para a realização de outra pesquisa.

Os espécimes fixados, em formol, foram processados segundo técnicas de rotina, cortados a 5µm e corados com hematoxilina-eosina (HE), para realização de detalhamentos morfológicos.

Empregou-se o microscópio de luz Olympus® CH 300, com objetiva planocromática com 40 vezes de aumento e foram ainda obtidas fotografias digitalizadas por meio de câmera JVC® TK 720V acoplada ao microscópio

para captura pelo analisador de imagens Honestech TVR® versão 2.5 para Windows®.

A quantificação das células foi realizada manualmente em imagens digitalizadas obtidas dos campos histológicos e analisadas no programa Image-Pro Plus®, versão 4.5.0.29, em cinco campos obtidos para cada lâmina, e determinada média entre essas quantificações. Essa avaliação foi feita por um único observador mascarado, que considerou como células apoptóticas as que apresentaram três ou mais das características morfológicas que se seguem: anoiquia, condensação do citoplasma, condensação nuclear, fragmentação nuclear, fragmentação celular. O índice apoptótico (IA) foi determinado pela seguinte fórmula: IA = número de células apoptóticas X100 / número de células totais.

Foram realizadas reações de TUNEL (*Terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP Nick-end Labelin*) para confirmar a presença de células apoptóticas evidenciadas na análise morfológica (*TdT-FragEL TM DNA Fragmentation Detection Kit®*, Calbiochem).

Empregaram-se testes não paramétricos (teste de Mann-Whitney), pois os grupos apresentaram distribuição assimétrica e reduzido número de indivíduos^{13,14}, foi adotado o nível de significância de 5% ($p<0,05$).

RESULTADOS

A idade variou de 12 a 35 anos, o grupo 1 apresentou média de idade de 19,29 anos ($\pm 4,645$) e o grupo 2, a média de 35,38 anos ($\pm 30,336$) ($p=0,779$). Houve predominância de pardos e negros nos dois grupos, sendo seis indivíduos em cada grupo, o que correspondeu a 85,8% no grupo 1 e 75,0% no grupo 2.

Nos indivíduos do grupo 2, quando comparadas as medidas iniciais com as finais, após as infiltrações de corticoide as cicatrizes queloidianas apresentaram média de redução das suas dimensões, 10,12% no comprimento, 11,94% na altura e 15,62% na espessura, sem diferença ($p>0,05$) (Tabela 1).

Nos indivíduos do grupo 1 sem a infiltração de triancinolona nas cicatrizes queloidianas, o índice apoptótico foi 56,82 ($\pm 15,82$), enquanto nos indivíduos do grupo 2, com infiltração de triancinolona, esse índice foi 68,55 ($\pm 9,32$), sem diferença ($p=0,0971$). Não foi constatado efeito colateral pelo uso do corticoide nos indivíduos do grupo 2.

DISCUSSÃO

A diferenciação entre queloides e cicatrizes hipertróficas é impositiva, pois, apesar de mesma provável etiologia, exibem diferenças na apresentação clínica e no tratamento, como, por exemplo, as cicatrizes hipertróficas tendem à regressão^{15,16} e os queloides se apresentam em

Tabela 1 - Dimensões iniciais e finais das cicatrizes queloidianas dos indivíduos do grupo 2.

Dimensões	Inicial $\bar{x} \pm dp$	Final $\bar{x} \pm dp$	p *
Comprimento ^a	1,363 \pm 0,6413	1,225 \pm 0,5800	0,6598
Altura ^a	0,8375 \pm 0,3114	0,7375 \pm 0,2615	0,4981
Espessura ^a	0,8000 \pm 0,3071	0,6750 \pm 0,2712	0,4027

a: medida em centímetros; : média; dp: desvio-padrão; *: análise estatística: teste de Mann-Whitney.

locais diversos^{2,9}, portanto para homogeneizar a amostra, a inclusão na pesquisa restringiu-se aos indivíduos que apresentavam queloides no lobo da orelha. O trauma é essencial para desencadeamento do processo de formação dos queloides, podendo ser resposta às picadas de inseto⁹, acne³, incisões cirúrgicas¹⁷ e perfurações para utilização de brinco, como na totalidade dos indivíduos desse estudo.

Na casuística desta pesquisa, 80% dos indivíduos apresentaram pele pigmentada, se somados os integrantes dos dois grupos com pele negra ou parda, conforme avaliações prévias^{9,16,18}. Como na literatura, no presente estudo houve predominância dos queloides entre segunda e terceira décadas de vida^{9,16,18} e não houve diferença na distribuição entre os pacientes dos sexos masculino e feminino nos dois grupos ($p=0,782$)¹⁷. Também não houve diferença ($p=0,779$) entre os dois grupos de indivíduos quanto ao tempo de evolução dos queloides, com isso evitou-se que os resultados fossem influenciados por mais resistência de lesões maduras^{19,20}.

As infiltrações de triancinolona foram realizadas na região central dos queloides, uma vez que os fibroblastos dessa região são metabolicamente mais ativos, com o objetivo de causar mais efeito²¹. Na literatura não há consenso sobre a dose de corticoide a ser utilizada^{2,8,9,11} e a concentração de 20mg/mL é uma das comercialmente disponíveis. A opção de realizar as injeções com intervalos de três semanas baseou-se na farmacocinética, pois o fármaco forma depósito local e produz efeito por 21 dias, em média. O uso do corticoide pode ser acompanhado de efeitos colaterais, tais como atrofia, despigmentação, telangiectasia, necrose, ulceração e síndrome de Cushing^{2,17,18,22}. A ausência de efeitos colaterais neste estudo pode ser devida ao tratamento não ter sido prolongado por mais de três sessões e por ter sido utilizada concentração de 20mg/ml de triancinolona. Isso sugere a possibilidade de novas investigações desses efeitos quando da utilização por mais sessões ou concentrações maiores de corticoide. A aplicação clínica do corticoide para diminuição das massas queloidianas é um dos recursos terapêuticos^{7,8,18} e pode ser corroborada pela diminuição das dimensões dos queloides nesta pesquisa, que foi

12,56%, em média, quando considerados comprimento, altura e espessura conjuntamente.

A comparação entre o índice apoptótico dos grupos 1 e 2 não demonstrou diferença significativa ($p=0,0971$), o que pode ser explicado por várias razões: amostra com número insuficiente para essa análise; rapidez com que a apoptose ocorre, podendo durar apenas 24 horas, como descrito por Kerr, Wyllie e Currie, em 1972²³; e o fato de que os queloides apresentam tecidos heterogêneos, a despeito de todas as tentativas dos autores de homogeneizar a amostra. Apesar da pesquisa não ter demonstrado aumento significativo no número de apoptoses, nos queloides infiltrados, esse aumento é digno de atenção, pois os fibroblastos dos queloides são mais resistentes à apoptose e apresentam taxas 22% mais baixas quando comparados com fibroblastos de pele normal ou cicatrizes consideradas normais²⁴.

A reação de TUNEL é um ensaio para detecção da fragmentação do DNA e, apesar de não ser específica para apoptose celular, pois a necrose também pode exibir essa fragmentação, essa reação vem sendo amplamente utilizada para quantificar a apoptose, tanto em cultura de células, quanto em tecidos conservados congelados, em formol ou parafina²⁵. A reação de TUNEL é método confiável para detecção de apoptoses, sobretudo quando confirmada por outro método, como a análise morfológica²⁵.

A necessidade da utilização desses testes possui desvantagens, pois para que os valores sejam significativos, $p<0,05$, as amostras devem ser maiores ou a diferença apresentada entre elas deve ser a maior possível¹⁴. Essas duas condições não foram atingidas nesta pesquisa.

Em razão do tamanho da amostra e dos resultados obtidos outros estudos deverão ser propostos no sentido de avaliar a ação da triancinolona em face de sua interferência na apoptose, assim como investigações de outros mecanismos de ação desse fármaco sobre as cicatrizes.

A infiltração de triancinolona nas cicatrizes queloidianas não aumentou o número de apoptoses e não houve redução das dimensões, comprimento, altura e espessura dos queloides infiltrados.

A B S T R A C T

Objective: to assess the effects of injectable triamcinolone on keloid scars length, height and thickness, and on the number of cells undergoing apoptosis. **Methods:** This study consists in a prospective, controlled, randomized, single-blinded clinical trial, conducted with fifteen patients with ear keloids divided into two groups: group 1 - seven patients undergoing keloid excisions, and group 2 - eight patients undergoing keloid excisions after three sessions of infiltration with one ml of Triamcinolone hexacetonide (20mg/ml) with three week intervals between them and between the last session and surgery. The two groups were homogeneous regarding age, gender and evolution of the keloid scar. The keloid scars of patients in group 2 were measured for the length, height and thickness before triamcinolone injection and before surgery. A blinded observer performed morphological detailing and quantification of cells in hematoxylin-eosin-stained surgical specimens. An apoptotic index was created. **Results:** The apoptotic index in group 1 was 56.82, and in group 2, 68.55, showing no significant difference as for apoptosis ($p = 0.0971$). The reduction in keloid dimensions in Group 2 was 10.12% in length ($p = 0.6598$), 11.94% in height ($p = 0.4981$) and 15.62% in thickness ($p = 0.4027$). **Conclusion:** This study concluded that the infiltration of triamcinolone in keloid scars did not increase the number of apoptotic cells and did not reduce keloids' size, length, height or thickness.

Key words: Apoptosis. Keloid. Triamcinolone Acetonide. Wound Healing.

REFERÊNCIAS

- Tredget EE, Nedelec B, Scott PG, Ghahary A. Hypertrophic scars, keloids, and contractures. The cellular and molecular basis for therapy. *Surg Clin North Am.* 1997;77(3):701-30.
- Ceoviã R, Lipozenciã J, Bukviã Mokos Z, Stulhofer Buzina D, Kostoviã K. Why don't we have more effective treatment for keloids? *Acta Dermatovenerol Croat.* 2010;18(3):195-200.
- Shih B, Garside E, McGrouther DA, Bayat A. Molecular dissection of abnormal wound healing processes resulting in keloid disease. *Wound Repair Regen.* 2010;18(2):139-53.
- Ferrari CKB. Apoptose: a importância da maquinaria de morte celular no controle e na patogênese das doenças. *Rev ciênc méd.* 2000;9(1):21-31.
- de Oliveira GV, Nunes TA, Magna LA, Cintra ML, Kitten GT, Zarpellon S, et al. Silicone versus nosilicone gell dressings: a controlled trial. *Dermatol Surg.* 2001;27(8):721-6.
- Carroll LA, Hanasono MM, Mikulec AA, Kita M, Koch RJ. Triamcinolone stimulates bFGF production and inhibits TGF-beta1 production by human dermal fibroblasts. *Dermatol Surg.* 2002;28(8):704-9.
- Muneuchi G, Suzuki S, Onodera M, Ito O, Hata Y, Igawa HH. Long-term outcome intralesional injection of triamcinolone acetonide for the treatment of keloids scars in Asian patients. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2006;40(2):111-6.
- Widgerow AD, Chait LA, Stals PJ, Stals R, Candy G. Multimodality scar management program. *Aesthetic Plast Surg.* 2009;33(4):533-43.
- Juckett G, Hartman-Adams H. Management of keloids and hypertrophic scars. *Am Fam Physician.* 2009;80(3):253-60.
- Darougheh A, Asilian A, Shariati F. Intralesional triamcinolone alone or in combination with 5-fluorouracil for the treatment of keloid and hypertrophic scars. *Clin Exp Dermatol.* 2009;34(2):219-23.
- Durani P, Bayat A. Levels of evidence for the treatment of keloid disease. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2008;61(1):4-17.
- Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de pesquisa. *Acta Cir Bras.* 2005;20(supl 2):2-9.
- Siqueira AL, Tibúrcio JD. Estatística na área de saúde: conceitos, metodologia, aplicações e prática computacional. Belo Horizonte: Coopmed; 2011.
- Triola MF. Introdução à estatística. Atualização da tecnologia. 11ª ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos; 2013.
- Gupta S, Sharma VK. Standard guidelines of care: Keloids and hypertrophic scars. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2011;77(1):94-100.
- Wolfram D, Tzankov A, Pülz P, Piza-Katzer H. Hypertrophic scars and keloids—a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management. *Dermatol Surg.* 2009;35(2):171-81.
- Al-Attar A, Mess S, Thomassen JM, Kauffman CL, Davison SP. Keloid pathogenesis and treatment. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(1):286-300.
- Mustoe TA, Cooter RD, Gold MH, Hobbs FD, Ramelet AA, Shakespeare PG, et al. International clinical recommendations on scar management. *Plast Reconstr Surg.* 2002;110(2):560-71.
- Ueda K, Furuya E, Yasuda Y, Oba S, Tajima S. Keloids have continuous high metabolic activity. *Plast Reconstr Surg.* 1999;104(3):694-8.
- Wang XQ, Liu YK, Qing C, Lu SL. A review of the effectiveness of antimetabolic drug injections for hypertrophic scars and keloids. *Ann Plast Surg.* 2009;63(6):688-92.
- Lu F, Gao J, Ogawa R, Hyakusoku H, Ou C. Biological differences between fibroblasts derived from peripheral and central areas of keloid tissues. *Plast Reconstr Surg.* 2007;120(3):625-30.
- Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med.* 2005;353(16):1711-23.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currier AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.
- Ladin DA, Hou Z, Patel D, McPhail M, Olson JC, Saed GM, et al. p53 and apoptosis alterations in keloids and keloid fibroblasts. *Wound Repair Regen.* 1998;6(1):28-37.
- Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res.* 2007;139(1):143-56.

Recebido em 15/07/2014

Aceito para publicação em 05/09/2014

Conflito de interesse: nenhum

Fonte de financiamento: nenhuma

Endereço para correspondência:

João Márcio Prazeres dos Santos

E-mail: jmprazsantos@hotmail.com