

Comparação da resposta imunológica à toxina botulínica tipo A na pele antes e após o tratamento da hiperidrose axilar

A comparison of the immunological response to botulinum toxin type A in skin before and after axillary hyperhidrosis treatment

RESUMO

Introdução: Há relatos de casos publicados e não publicados sobre *rash* cutâneo, erupções acneiformes e desenvolvimento de *Herpes simplex* em pacientes injetados com toxina botulínica para tratamento de rugas faciais e hiperidrose. Foi realizada uma pesquisa para determinar se há alteração imunológica na pele de pacientes tratados pela primeira vez com esta toxina. **Métodos:** Foi avaliada a resposta imunológica à toxina tipo A na pele de 15 pacientes com hiperidrose axilar antes e após sua aplicação. Os seguintes marcadores imuno-histoquímicos foram utilizados para definir o perfil imunológico local antes e depois da aplicação de toxina botulínica: CD4+, CD8+, CD1a, CD25, anti-TNF- α , HLA-DR, ICAM-1, anti-IFN- γ e anti-IL-4. **Resultados e discussão:** Realizou-se análise estatística descritiva de cada marcador, e os dados obtidos foram avaliados pelo teste dos sinais de Wilcoxon. Conclui-se que não houve alteração na pele após o tratamento da hiperidrose com toxina botulínica A quando comparados os marcadores.

Palavras-chave: axilar, hiperidrose, resposta imunológica, toxina botulínica, tratamento da hiperidrose.

ABSTRACT

Introduction: There are both unpublished and published anecdotal case reports of skin rash, acneiform eruptions and onset of *Herpes simplex* in patients injected with botulinum toxin for treatment of facial wrinkles and hyperhidrosis. We carried out a research to determine if there are immunological changes in the skin in ab initio treatment of patients with botulinum toxin. **Methods:** The immunological response to botulinum toxin type A was assessed in skin before and after its application in 15 patients with axillary hyperhidrosis. The following immunohistochemical markers were used to determine the local immunological profile before and after application of botulinum toxin: CD4+, CD8+, CD1a, CD25, anti-TNF- α , HLA-Dr, ICAM-1, anti-IFN- γ and anti-IL-4. **Results and discussion:** A descriptive statistical analysis of each marker was carried out and the data were analyzed by Wilcoxon sign test. It was concluded that there was no alteration in skin after hyperhidrosis treatment with botulinum toxin a when markers were compared.

Keywords: axillary, hyperhidrosis, immunological response, botulinum toxin, hyperhidrosis treatment.

Autores:

Bhertha Miyuki Tamura¹
Luiz Carlos Cucé²

¹Doutora em Dermatologia pela Faculdade de Medicina da USP

²Livre-docente, Doutor em Dermatologia pela Faculdade de Medicina da USP, Titular do Departamento de Dermatologia da Universidade de Santo Amaro

Correspondência para:

Bhertha M. Tamura
Rua Ituxi, 58, apt. 603
Saúde – Rio de Janeiro – RJ
CEP: 04055-020
Tel: (11) 5584-9354
Fax: (11) 5051-6961
E-mail: bhertha.tamura@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

As complicações mais frequentes decorrentes do uso de toxina botulínica e de sua aplicação com fins cosméticos descritas na literatura médica incluem equimose, hematoma, dor, desconforto ou sensação de peso na testa, erupções acneiformes, cefaleia, parestesia, ptose do supercílio, conjuntivite, visão embaçada, fotofobia, diplopia, edema, pápula eritematosa transitória, sensação de corpo estranho nos olhos, enxaqueca, estrabismo, disfagia e lacrimejo.^{1,2} As complicações eventualmente advindas do tratamento da hiperidrose incluem fraqueza muscular, parestesia, hiperidrose compensatória, equimose, hematoma, dor e outras que se devem à técnica anestésica escolhida e utilizada pelo médico.³⁻⁵ As complicações relacionadas a outros tratamentos

Recebido em: 10/08/2009
Aprovado em: 15/10/2009
Declaramos a inexistência de conflitos de interesse.

incluem hipocromia,⁶ dor, paralisia facial, epífora, dificuldade de mastigação, ectrópio, entrópico, conjuntivite, visão embaçada, fotofobia, diplopia, conjuntivite, equimose, hematoma, edema, sensação de corpo estranho nos olhos, diarreia, enxaqueca, tosse, disfonia, epistaxe, infecção urinária, estrabismo, lacrimejamento, fraqueza muscular (fibrose e atrofia muscular), alterações musculares decorrentes de aplicação incorreta, gosto metálico, trauma neural transitório, hipotonia, dor cervical, obstrução respiratória, xerostomia e disfunção da bexiga.⁷⁻¹³ Finalmente, os sintomas sistêmicos descritos incluem fraqueza geral, boca e olhos secos, retenção urinária, sensação de frio, sintomas da síndrome de botulismo,¹⁴ fadiga, náusea, vômito, exantema da pele, formação de anticorpos, alergia à albumina, crise miastênica, síndrome neuromuscular,^{10, 12, 13, 15-18} reação tipo I¹² e faciíte necrotizante.¹⁹

Alguns medicamentos contêm albumina humana, e o risco de contaminação e transmissão de doenças virais, inclusive da doença de Creutzfeldt-Jakob, não pode ser descartado.²⁰ A utilização em larga escala desse medicamento para o tratamento de várias doenças dermatológicas, até mesmo para a melhora das linhas faciais hiperkinéticas, tem despertado curiosidade sobre as alterações imunológicas que podem ocorrer na pele.

Foi realizado estudo e comparação da repercussão imunológica da toxina botulínica tipo A na pele, antes e após sua aplicação no tratamento de hiperidrose axilar. Para esse estudo, utilizaram-se os marcadores imuno-histoquímicos anti-CD1a, CD4+, CD8+, CD25, TNF- α , HLA-DR, ICAM-1, IFN- γ e IL-4. Foi escolhida essa doença e o local de tratamento pela simplicidade e rapidez da técnica, baixa morbidade, resposta de todos os pacientes ao tratamento e possibilidade de realização de biópsia cutânea em uma área não exposta. Todos os pacientes aceitaram participar desse estudo.

MÉTODOS

Este foi um estudo quase-experimental de coorte, não randomizado. Quinze pacientes com hiperidrose axilar foram selecionados para tratamento após terem sido informados sobre a terapia, as consultas de acompanhamento e como as biópsias seriam realizadas. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento, tendo sido o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição. Dos 15 pacientes, 14 eram do sexo feminino e um do sexo masculino, na faixa etária de 19 a 56 anos (média de 33,5 anos). Após o diagnóstico de hiperidrose, demarcamos a área axilar comprometida com o teste de Minor.^{2,5,21-23}

A toxina botulínica foi diluída com 4 mL de soro fisiológico imediatamente antes do tratamento. Foram injetadas intradermicamente (utilizando seringas de 1 mL e agulhas de 30 G ½) duas unidades por ponto.^{1,3,24,26-29} Essa diluição corresponde à razão de duas unidades de toxina para cada 0,08 mL

de solução. A distância mantida entre os sítios de injeção foi de 1,5 cm,³⁰⁻³³ e a técnica de injeção utilizada é descrita na Figura 1.

Na primeira etapa da pesquisa, injetamos toxina botulínica na axila esquerda e realizamos biópsia da pele normal da prega axilar direita. Trinta dias após a primeira injeção, tratamos a axila direita e realizamos biópsia da pele da prega axilar esquerda previamente tratada.

Técnica de Congelamento

O fragmento de biópsia a ser enviado para avaliação imuno-histoquímica foi colocado sobre um suporte de cortiça e revestido com uma solução crioprotetora (Tissue-Tek - Milles Laboratories, EUA). Em seguida, o fragmento foi gradualmente congelado em um frasco contendo isopentano liquefeito (Reagen), em um ambiente de nitrogênio líquido, embrulhado em papel-alumínio e mantido em nitrogênio líquido até o processamento.

Técnica de Imuno-histoquímica

A técnica de imunoperoxidase em tecido criopreservado foi usada e ajustada. Essa é a técnica atualmente aplicada pelo Laboratório de Dermatologia Tropical de São Paulo (HC-FMUSP). Os fragmentos de pele congelados foram submetidos à criomicrotomia para obter fragmentos de 4 μ m de espessura, coletados com lâminas de vidro revestidas com solução adesiva de 3-aminopropiltriétoxissilano (Sigma Chemical Co., St Louis, MO/EUA, código A3648), procedimento seguido de fixação com acetona anidra, pró-análise, por dez minutos, em temperatura ambiente. Após a fixação, os espécimes foram submetidos à reação imuno-histoquímica com o método do complexo estreptavidina-peroxidase (modificado de HSU, 1981).³⁴ O material foi lavado com água destilada e imerso em Tris-HCL (hidroximetilaminometano - ácido clorídrico) e tamponado a um pH de 7,4 por cinco minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio (3% em Tris-HCL) e o fragmento foi submetido a três imersões em tampão Tris-HCL por cinco

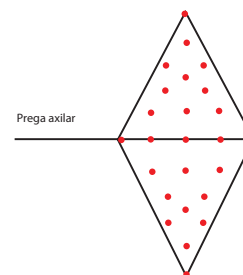


Figura 1 – Distribuição dos sítios de injeção de toxina botulínica na axila.

minutos. A área em torno do fragmento foi enxuta, e o anti-corpo primário, diluído em albumina bovina sérica (ABS), foi adicionado em gotas. As diluições dos anticorpos primários foram padronizadas com o uso de fragmentos de pele de psoríase (para anticorpos anti-ICAM-1 e anti-CD1a) e de extratos tonsilares obtidos após tonsilectomias eletivas para os anticorpos anti-CD4+, anti-CD8+ e anti-HLA-DR. O material foi incubado durante a noite em câmara úmida e, no dia seguinte, os espécimes foram submetidos a três imersões em Tris-HCL, por cinco minutos. Após a secagem da área em torno do fragmento, o anticorpo secundário biotinilado foi gotejado; isto é, a anti-imunoglobulina G de rato foi produzida em coelhos para os seguintes anticorpos: anti-ICAM-1 (DAKO, código M7063, titulação 1/100), anti-HLA-DR (DAKO, código M704, titulação 1/150), anti-CD4+ (DAKO, código M0716, titulação 1/100), anti-CD8+ (DAKO, código M7103, titulação 1/100), anti-CD1a (DAKO, código M721, titulação 1/100), anti-CD25 (DAKO, código M0731, titulação 1/20), anti-TNF- α (Santa Cruz, código SC-1350, titulação 1/50), IFN- γ (R&D, código AF285-NA, titulação 1/20) e para o anticorpo anti-LihL-4 (R&D, código AF204-NA, titulação 1/20).

Após a imersão dos espécimes em Tris-HCL (três alterações em cinco minutos), a área que circunda o fragmento foi seca. O complexo terciário estreptavidina-biotina-peroxidase (complexo binário StrepABC/HRP, rato/coelho, Dako, código KO492) foi colocado em uma diluição de 1:500, e os espécimes foram incubados em câmara úmida, por uma hora, a 35-37 °C. Após essa etapa, eles foram imersos em Tris-HCL três vezes em cinco minutos.

O desenvolvimento da reação de imunoperoxidase ocorreu com uma solução de 0,006%, 3,3 cloridrato de diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemicals, código D-5637/D-8001) em um tampão de Tris-HCL, acrescido de 600 μ L de peróxido de hidrogênio 20 volumes (H₂O₂/20 v), por três minutos. Após coloração, os espécimes foram lavados em água destilada. Realizou-se contracoloração com hematoxilina de Carazzi por um minuto, e os espécimes foram lavados novamente por cinco minutos.

O material foi desidratado em uma cadeia ascendente de álcool etílico, diafanizado em xilol e revestido com uma resina sintética Permound (Fisher Scientific Fair Lawn, NJ/EUA, código SP15-100) e uma lamínula. O controle positivo da reação foi obtido por meio da observação dos fragmentos de controle (pele psoriásica e tonsila), concomitantemente com o material que estava sendo estudado. O controle negativo das reações foi indicado pela ausência de anticorpos primários, que foram substituídos pelo tampão Tris-HCL.

Avaliação histomorfométrica dos espécimes coletados

Preparou-se um total de 32 lâminas com hematoxilina-eosina para o controle; e 288 lâminas foram preparadas por

reações imuno-histoquímicas. Avaliações histomorfométricas foram realizadas utilizando o Kontron Eletronic 300 Image Analysis System. A estação de trabalho foi composta por um microscópio óptico binocular (Zeiss), uma câmera de vídeo colorida (Sony CCD-Iris), placa de digitalização de imagens, um microcomputador com processador Pentium 133 MHz, IBM-PC compatível, operando em Windows 95 - 32 bits.

As imagens foram digitalizadas com o auxílio de um programa específico para a análise de imagem (Kontron 300), o que permitiu a partilha de dados com processador de texto (Microsoft Word) e planilha eletrônica (Microsoft Excel). A utilização desses programas determinou a análise e a interpretação do tratamento, a aquisição de valores de medição das estruturas com todas as variáveis possíveis e a distribuição automática de dados gerados pela estação de análise de imagem para planilhas eletrônicas e processador de texto.

Os fragmentos histológicos foram processados no sistema de análise de imagem usando lentes objetivas de 2x e 4x e lentes oculares de 10x. Essa quantificação foi realizada na menor unidade espacial, denominada pixel. O fator de calibração (FC) foi calculado automaticamente em pixels e esse fator foi utilizado pelo programa para os cálculos correspondentes em micrômetros (μ m), de acordo com a calibração.

A pele representada nos cortes histológicos das amostras foi analisada com avaliação aleatória da derme e da epiderme. A fração da área foi analisada com uma ampliação de 20x (anti-CD1a, anti-ICAM-1 e anti-TNF- γ). A contagem de células foi realizada por campo, com uma ampliação de 40x e um total de dez campos por lâmina foram contados (anti-CD25, anti-LihL-4, anti-CD4+, anti-CD8+, anti-IFN- γ e anti-HLA-DR). A média da contagem desses campos foi utilizada para a obtenção dos resultados finais.

A contagem das estruturas que poderiam ser bem individualizadas – como, por exemplo, células CD4+ e CD8+ na junção dermoepidérmica, células de Langerhans na área da epiderme, derme ICAM-1 e HLA-DR – foi orientada pelo núcleo da célula. Endotélio vascular corado foi desconsiderado na contagem de ICAM-1 e HLA-DR devido à ocorrência desse evento na pele normal. A contagem das estruturas individualizadas, como CD-25, anti-LihL-4, anti TNF- α e anti-IFN- γ , foi orientada por marcadores imuno-histoquímicos no citoplasma. Nesses casos, os núcleos corados foram desconsiderados. A leitura e a contagem foram realizadas por um observador qualificado e bem treinado.

Análise estatística

A análise estatística envolveu a utilização de um pacote estatístico denominado SPSS 10.0 for Windows. Realizou-se análise estatística descritiva para observar frequência, média, mediana, desvio-padrão e outros parâmetros; ou seja, as estatís-

ticas descritivas mostram mais claramente o comportamento e a distribuição dos dados. Para a avaliação das possíveis alterações imunológicas na pele de acordo com o aspecto imunohistoquímico, antes e após a injeção de toxina botulínica do tipo A, a análise estatística não paramétrica foi utilizada por meio do teste dos sinais de Wilcoxon.^{35,36}

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lâminas coradas com hematoxilina-eosina mostraram, em todos os casos, presença de pele normal compatível com a área estudada.

As Figuras de 2 a 8 mostram a avaliação e o número de estruturas que podiam ser bem individualizadas; as fotografias são representações dos espécimes marcados, indicando as células ou áreas que foram avaliadas pelo sistema de fotografia digitalizada descrito na seção “Métodos”. As estruturas são exibidas como a seguir: CD4+ (Figura 2) e CD8+ (Figura 3), linfócitos na junção dermoepidérmica, células de Langerhans (Figura 4) na região epidérmica; ICAM-1 dérmica (Figura 5) e HLA-DR (Figura 6) orientada pelos núcleos celulares. CD-25 (Figura 7), anti-LihL-4 (Figura 8), anti-TNF- α e anti-IFN- γ foram orientados por marcadores imunohistoquímicos no citoplasma.

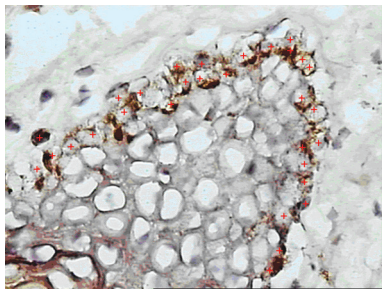


Figura 2 – Individualização de células marcadas (identificadas na fotografia com sinais vermelhos) com anticorpos anti-CD4+ para contagem de células. As setas apontam para algumas dessas células (ampliação de 40X).

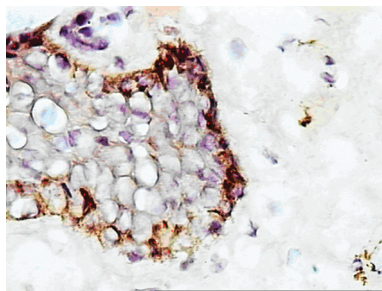


Figura 3 – Individualização de células marcadas (identificadas na fotografia com sinais vermelhos) com anticorpos anti-CD8+ para a contagem de células. As setas apontam para algumas dessas células (ampliação de 40X).

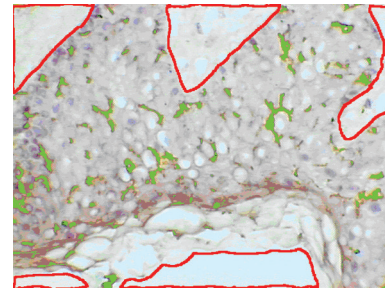


Figura 4 – Delimitação da epiderme (linha vermelha) e individualização de células marcadas com anticorpo anti-CD1 para a contagem de células (preenchido com verde) (ampliação de 20X).

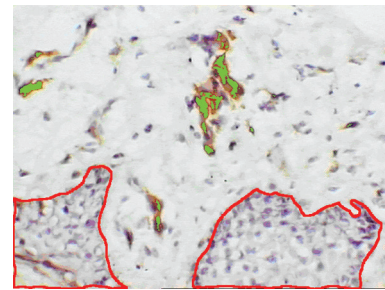


Figura 5 – Individualização da derme e epiderme (linha vermelha) e células marcadas com anticorpos anti-ICAM-1 para contagem de células que estão sendo preenchidas pela cor verde (ampliação de 20X).

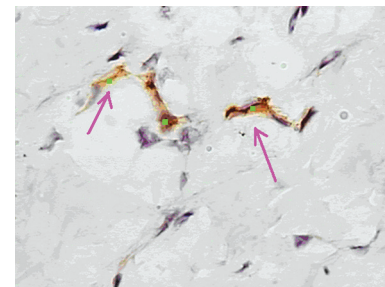


Figura 6 – Individualização das células marcadas (sinal verde, de acordo com as setas) com anticorpos anti-CD 25 para a contagem (ampliação de 40X).

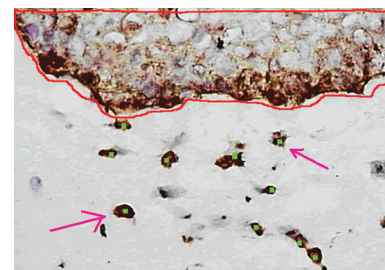


Figura 7 – Individualização da epiderme, derme (linha vermelha) e células marcadas com anticorpos anti-LihL-4 para a contagem (sinais verdes) (ampliação de 40X).

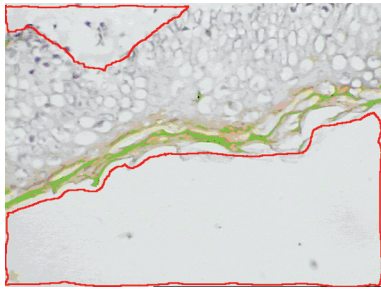


Figura 8 – Individualização de epiderme, derme (linha vermelha) e células marcadas com anticorpos anti-TNF- α para a contagem (preenchido em verde) (ampliação 20x).

Inicialmente, uma análise estatística descritiva foi realizada para cada marcador com valores semelhantes (Tabela I). Posteriormente, os dados foram analisados com o teste dos sinais de Wilcoxon (Tabelas II, III e IV). A avaliação dos fragmentos obtidos de pele do paciente, antes e após o tratamento da hiperidrose axilar, resultou nos seguintes dados, de acordo com o aspecto imuno-histológico. A marcação imuno-histoquímica pré-tratamento anti-CD1a mostrou o valor mínimo de células marcadas 0,19 e o máximo de 9,3 células/campo (média de 3,51 células/campo), anti-CD4+, com um mínimo de 12 e um máximo de 199 células/campo (média de 87,6 células/campo), anti-CD8+, com um mínimo de 8 e um máximo de 293 células/campo (média de 84,1 células/campo). A marcação imuno-histológica pós-tratamento anti-CD1a mostrou como valor mínimo de 0,41 célula marcada e o máximo de 7,5 células/campo),

anti-CD4 com um mínimo de 20 e um máximo de 131 células/campo (média de 89 células/campo, anti-CD8 +, com um mínimo de zero e um máximo de 293 células/campo (média de 83,6 células/campo); a avaliação imuno-histoquímica das lâminas usando o marcador anti-ICAM-1 na pele pré-tratamento mostrou valor mínimo de 0,045 e valor máximo de 1,9 célula/campo (média de 0,62 célula/campo) e valores pós-tratamento de 0,11 (mínimo) e de 1,55 célula/campo (máximo), média de 0,7 célula/campo. Na Tabela I, o nível de significância considerado foi de 0,05 nos testes dos sinais de Wilcoxon.

A marcação pré-tratamento anti-CD25, anti-TNF α , anti-HLA-DR, anti-IL-4 e anti-IFN- γ mostrou apenas um caso positivo, sendo o número de células pré-tratamento 30 e pós-tratamento, 2,05 e 6,85, 58 e 64, anti-IL-4, 0 e 85, anti-IFN- γ , 22 e 26 células/campo, respectivamente. Os dados das análises pré e pós-tratamento obtidos com os marcadores anti-CD4+ e CD8+ com o teste dos sinais de Wilcoxon mostram que não houve diferença significativa entre pré e pós-tratamento (Tabela II).

Ao analisar os dados em detalhes, observamos redução na variabilidade (ver desvio-padrão) para os marcadores, exceto para o anti-CD1a expresso na derme. Outro modo de observar esse resultado quando apenas o marcador anti-CD1a é analisado: os valores mínimo e máximo alteram significativamente, reduzindo assim a dispersão de dados. No entanto, se aplicarmos o teste para analisar as médias, chegaremos à conclusão de que a resposta para o marcador imuno-histoquímico anti-CD1 na derme antes e após o

Tabela I – Representação de espécimes cirúrgicos obtidos antes e após o tratamento da hiperidrose axilar; a avaliação foi feita com marcadores anti-CD1a na epiderme e com anti-CD4+, anti-CD8+ e anti-ICAM-1 na derme

	Anti-CD1a	Anti-CD1a	Anti-CD1a	Anti-CD1a	Anti-CD4	Anti-CD4	Anti-CD8	Anti-CD8	Anti-ICAM-1	Anti-ICAM-1
	Ep	Ep	Derme	Derme	Ep	Ep	Ep	Ep	Derme	Derme
	antes	30 dias	antes	30 dias	antes	30 dias	antes	30 dias	antes	30 dias
1	3,63	0,79			119	128	93	74	0,36	0,36
2	5,61	2,24	0,16	0,91	30	90	14	37	0,30	0,40
3	0,44	2,91	0,05	1,12	44	72	43	72	0,40	0,54
4	0,7	7,5	0,38	1,67	12	126	25	137	0,43	1,04
5	8,3	5,24	0,78	0,64	70	56	25	70	1,65	0,39
6	1,96	3,48	---	---	158	94	202	199	0,52	0,45
7	8,96	2,7	0,59	0,37	178	68	116	50	0,71	0,60
8	9,3	1,04	0,89	0,027	199	95	293	63	1,49	0,26
9	0,66	2,51	0,09	0,03	47	103	43	133	0,05	1,55
10	5,89	6,95	---	---	80	131	8	125	0,59	1,46
11	1,78	0,41	0,06	0,04	47	20	48	0	1,90	0,94
12	0,19	4,69	---	---	40	131	66	62	0,28	0,43
13	0,72	2,1	---	---	110	129	89	92	0,24	0,91
14	1,43	6,66	---	---	110	27	83	48	0,23	0,72
15	3,18	3,29	---	---	70	65	85	49	0,60	0,11
Média	3,51	3,5	0,37	0,60	87,6	89	84,1	83,6	0,65	0,68
P*	0,910		0,779		0,865		0,932		0,706	

tratamento é idêntica (Tabela III). Ao aplicarmos o teste *t* de Student, também concluímos que não há diferença significativa entre os resultados obtidos. Para os marcadores anti-TNF- α , anti-CD25, anti-HLA-DR, anti-LihL-4, IFN- γ e anti-ICAM-1 na epiderme, nenhuma conclusão foi obtida com base nos dados coletados, já que os resultados obtidos foram negativos em quase todas as lâminas analisadas. A análise dos dados pré e pós-tratamento obtidos com o marcador anti-ICAM-1 na derme por meio do teste dos sinais de Wilcoxon não mostrou diferença significativa em ambas as fases (Tabela IV).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As reações imunes foram abordadas sob diferentes aspectos, de acordo com a revisão da literatura, resultando em atualização da pesquisa atual e passada. O presente estudo teve como objetivo avaliar possíveis alterações na imunidade da pele dos pacientes que receberam injeção de toxina botulínica do tipo A. Até o presente, não encontramos na literatura qualquer estudo que tenha abordado tal questão em relação à ação dessa droga na pele. Encontramos o relato de uma paciente

que foi tratada para rugas faciais hiperkinéticas com toxina botulínica do tipo A por quatro vezes; uma semana depois de cada injeção, inclusive da primeira, a paciente desenvolveu *herpes simplex* na área tratada. Apesar de seu uso em larga escala para o tratamento de rugas de expressão e hiperidrose, não há observação clínica ou laboratorial sobre o que realmente ocorre na pele. Esses fatos despertaram nosso interesse em avaliar o comportamento imunológico na pele antes e após o uso dessa medicação.

Neste estudo, a segunda biópsia foi realizada trinta dias após a injeção da droga, com base em estudos na literatura médica, sugerindo que o processo de reconhecimento e ativação do sistema imune leva de vinte a trinta dias. Esse período é respeitado e, até o momento, a recomendação é que a reinjeção de BT deve ser evitada antes desse intervalo, a fim de minimizar a ocorrência de sensibilização.^{16,37} Foi demonstrado que a pele não apresenta qualquer anomalia imunológica causada por injeção das doses utilizadas pela maioria dos médicos para tratar hiperidrose — ao analisarmos os marcadores anti-CD4+, CD8+, HLA-DR, ICAM-1, TNF- α , CD25, LihL-4 e IFN- γ e os marcadores anti-CD1a na epiderme e na derme.

Os imunomarcadores foram escolhidos com o objetivo de definir um perfil da imunidade celular e saber se há qualquer estímulo humoral nesse tipo de tratamento. Quando analisados separadamente, os pacientes 3 e 4 apresentaram aumento de reação após o tratamento, enquanto os pacientes 7, 8 e 11 apresentaram reação diminuída (Tabela I).

Haverá diferenças individuais na resposta imunológica da pele após o tratamento da hiperidrose, em função de resposta tanto humoral quanto imunomediada por células-T em alguns indivíduos? E qual será o comportamento desses pacientes após a segunda injeção da medicação? Uma avaliação mais detalhada seria muito interessante, com a aplicação do protocolo adotado por Larsen *et al.* (1990),³⁷ Lukas *et al.* (1996)³⁸ e Sugiura *et al.* (2003),³⁹ acompanhando a migração celular com biópsias após 24 e 48 horas, além de avaliação após trinta dias. Acreditamos que esse estudo deve ser realizado a partir de nossa investigação para tentar determinar se há uma reação inflamatória local que seja ou não dependente de mediadores, ou o nível de envolvimento das células dendríticas epidérmicas na intensidade da resposta imune da pele aos agentes químicos de acordo com Lappin *et al.* (1996).⁴⁰

Portanto, no presente estudo, concluiu-se que não houve alteração na pele, antes ou após o tratamento da hiperidrose com toxina botulínica do tipo A, quando os marcadores anti-CD4+, anti-CD8+, anti-HLA-DR, anti-ICAM-1, anti-TNF- α , anti-CD25, anti-LihL-4, anti-IFN- γ e anti-CD1a aplicados na epiderme e na derme foram avaliados de acordo com as técnicas propostas neste estudo.

Tabela II – Dados das análises pré e pós-tratamento obtidos com os marcadores anti-CD4+ e CD8+ nos testes dos sinais de Wilcoxon

	Anti-CD4+ Antes	Anti-CD4+ 30 dias	Anti-CD8+ antes	Anti-CD8+ 30 dias
Média	87,60	89,00	87,00	80,73
Mediana	70,00	94,00	80,00	70,00
Desvio-padrão	56,51	37,11	73,42	49,52
Mínimo	12	20	14	0
Máximo	199	131	293	199

Tabela III – Análise dos dados pré e pós-tratamento obtidos com o marcador anti-CD1a por meio do teste dos sinais de Wilcoxon

	Anti-CD1a Epiderme	Anti-CD1a Epiderme	Anti-CD1a Derme	Anti-CD1a Derme
Média	3,5167	3,5007	0,3750	0,6009
Mediana	1,9600	2,9100	0,2700	0,5050
Desvio-padrão	3,2770	2,2494	0,3307	0,6016
Mínimo	0,19	0,41	0,05	0,03
Máximo	9,30	7,50	0,89	1,67

Tabela IV – Análise dos dados pré e pós-tratamento obtidos com o marcador anti-ICAM-1 por meio do teste dos sinais de Wilcoxon

	Anti-ICAM-1 Antes	Anti-ICAM-1 30 dias
Média	0,6497	0,6773
Mediana	0,4300	0,5400
Desvio-padrão	0,5644	0,4246
Mínimo	0,05	0,11
Máximo	1,9	1,55

REFERÊNCIAS

1. Guyuron B, Huddleston SW. Aesthetic indications for botulinum toxin injection. *Plast Reconstr Surg* 1994; 93:913-8.
2. Carruthers A, Kiene K, Carruthers J. Botulinum A exotoxin use in clinical dermatology. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34:788-97.
3. Glogau RG. Botulinum A neurotoxin for axillary hyperhidrosis. *Dermatol Surg* 1998; 24:817-9.
4. Glogau RG. Treatment of palmar hyperhidrosis with botulinum toxin. *Semin Cutan Med Surg* 2001 Jun; 20(2):101-8.
5. Lowe NJ, Yamauchi PS, Lask G *et al*. Efficacy and safety of botulinum toxin type A in the treatment of palmar hyperhidrosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Derm Surg* 2002; 28(9):822-7.
6. Friedland S, Burde RM. Porcelainizing discolorization of the periocular skin following botulinum A toxin injections. *J Neuro-Ophthalmol* 1996 Mar; 16(1):70-2.
7. Borodic G, Johnson E, Goodnough M, Schantz E. Botulinum toxin therapy, immunologic resistance, and problems with available materials. *Neurology* 1999 Oct 22; 53(7):1439-46.
8. Poewe W, Deuschl G, Nebe A *et al*. What is the optimal dose of botulinum toxin A in the treatment of cervical dystonia? Results of a double blind, placebo controlled, dose ranging study using Dysport. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64:13-7.
9. Brashear A, Lew MF, Dykstra DD *et al*. Safety and efficacy of NeuroBloc (botulinum toxin type B) in type A-responsive cervical dystonia. *Neurology* 1999 Oct 22; 53(7):1439-46.
10. Brashear A. The botulinum toxin in the treatment of cervical dystonia. *Semin Neurology* 2001; 21(1):85-90.
11. Brashear A, Gordon MF, Elovic E *et al*. Botox post-Stroke spasticity study group. Intramuscular injection of botulinum toxin for the treatment of wrist and finger spasticity after stroke. *N Engl J Med* 2002 Aug 8; 347(6):395-400.
12. Klein AW. Complications and adverse reactions with the use of botulinum toxin. *Semin Cutan Med Surg* 2001 Jun; 20(2):109-20.
13. Murray C, Solish N. Metallic taste: an unusual reaction to botulinum toxin A. *Dermatol Surg* 2003; 29:562-3.
14. Tugnoli V, Eleopra R, Quatrone R *et al*. Botulism-like syndrome after botulinum toxin type A injections for focal hyperhidrosis. *Br J Dermatol* 2002 Oct; 147(4):808-9.
15. Bell MS, Vermeulen LC, Sperling KB. Pharmacotherapy with botulinum toxin: Harnessing Nature's most potent neurotoxin. *Pharmacotherapy* 2000; 20(9):1079-91.
16. Borodic G, Johnson E, Goodnough M, Schantz E. Botulinum toxin therapy, immunologic resistance, and problems with available materials. *Neurology* 1996; 46:26-9.
17. Borodic G. Myasthenic crisis after botulinum toxin. *The Lancet* 1998 Dec; 352(9183):1832.
18. Lange DJ, Rubin M, Greene PE *et al*. Distant effects of locally injected botulinum toxin: a double-blind study of single fiber EMG changes. *Muscle Nerve* 1991 Jul; 14(7):672-5.
19. Latimer PR, Hodgkins PR, Vakalis AN *et al*. Necrotizing fasciitis as a complication of botulinum toxin injection. *Eye* 1998; 12(1):51-3.
20. Schaffner R, Kreyden OP. Complications and side-effects of botulinum toxin A. *Curr Probl Dermatol* 2002; 30:141-8.
21. Moraru E, Auff E, Schider P. Hyperhidrosis of the palms and soles. *Curr Probl Dermatol* 2002; 30:156-96.
22. Hund M, Kinkelin I, Naumann M, Hamm H. Definition of axillary hyperhidrosis by gravimetric assessment. *Arch Derm* 2002 Apr; 138:539-40.
23. Naumann M, Davidson JRT, Glaser DA. Hyperhidrosis: current understanding, current therapy. *cme. www.medscape.com/viewprogram/1540 Feb 28, 2003.*
24. Glogau RG. Botulinum A neurotoxin for axillary hyperhidrosis. *Dermatol Surg* 1998; 24:817-9.
25. Schnider P, Binder M, Kittler H *et al*. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of botulinum A toxin for severe axillary hyperhidrosis. *Br J Dermatol* 1999 Apr; 140(4):677-80.
26. Schnider P, Moraru E, Kittler H *et al*. Treatment of focal hyperhidrosis with botulinum toxin type A: long-term follow up in 61 patients. *Br J Dermatol* 2001; 145(2):289-93.
27. Naver H, Swartling C, Aquilonius SM. Palmar and axillary hyperhidrosis treated with botulinum toxin: one-year clinical follow-up. *Eur J Neurol* 2000; 7(1):55-62.
28. Heckmann M. Hyperhidrosis of the axilla. *Curr Probl Dermatol* 2002; 30:149-55.
29. Tamura BM, Chang B. Marking techniques and their influence on hyperhidrosis treatment in hyperhidrosis and botulinum toxin. *São Paulo ART Almeida & DM Hexsel* 2004; 141-7(a).
30. Goldman A. Treatment of axillary and palmar hyperhidrosis with botulinum toxin. *Aesth Plast Surg* 2000 24:280-2.
31. Heckmann M, Ceballos-Baumann AO, Plewig G. Botulinum toxin A for axillary hyperhidrosis (excessive sweating). *N Engl J Med* 2001 Feb; 344(7):488-93(a).
32. Heckmann M, Schaller M, Breit S, Plewig G. Evaluation of therapeutic success of hyperhidrosis therapy. *Arch Dermatol* Jan 2001; 137(1):94(b).
33. Naumann M. Evidence-based medicine: botulinum toxin in focal hyperhidrosis. *J Neurol* 2001; 248(Suppl 1):1/31-1/33.
34. Hsu H, Watanabe J. The inactivation profile of rabbit muscle creatine phosphokinase in Tris-acetate buffer solutions. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1981 Nov 29(11):3350-5.
35. Moron, CMA. Estudo clínico e imunohistoquímico da dermatite de contato das mãos. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo 2001:45-6.
36. Herrmann J, Mall V, Bigalke H *et al*. Secondary non-response due to development of neutralizing antibodies to botulinum toxin A during treatment of children with cerebral palsy. *Neuropediatrics* 2000 Dec; 31(6):333-4.
37. Larsen CP, Steinman RM, Wirmer-Pak M *et al*. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* 1990; 172:1483-93.
38. Lukas M, Stossel H, Hefel L *et al*. Human cutaneous dendritic cells migrate through dermal lymphatic vessels in a skin organ culture model. *J Invest Derm* 1996 Jun; 106(6):1293-9.
39. Sugiura K, Shamoto M, Sakamoto N *et al*. It is true that, when Langerhans cells migrate from the skin to lymph node, they are transported via lymph vessels. *Dermatol* 2003; 206(3):222-4.
40. Lappin MB, Kimber I, Norval M. The role of dendritic cells in cutaneous immunity. *Arch Dermatol Res* 1996 Mar; 288(3):109-21.