

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

Maria Cristina Cardoso de Mendonça

***Peeling* de fenol pontuado no tratamento do fotoenvelhecimento facial: estudo
histoquímico e imuno-histoquímico**

**Juiz de Fora
2018**

Maria Cristina Cardoso de Mendonça

***Peeling* de fenol pontuado no tratamento do fotoenvelhecimento facial: estudo
histoquímico e imuno-histoquímico**

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, área de concentração: Saúde Brasileira, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Julião Vieira Aarestrup

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup

Juiz de Fora

2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

de Mendonça, Maria Cristina Cardoso.

Peeling de fenol pontuado no tratamento do fotoenvelhecimento facial : estudo histoquímico e imuno-histoquímico / Maria Cristina Cardoso de Mendonça. -- 2018.

93 f. : il.

Orientadora: Beatriz Julião Vieira Aarestrup

Coorientador: Fernando Monteiro Aarestrup

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2018.

1. Envelhecimento da Pele. 2. Fenol. 3. Abrasão Química. 4. Histopatologia. 5. Imuno-Histoquímica. I. Aarestrup, Beatriz Julião Vieira, orient. II. Aarestrup, Fernando Monteiro, coorient. III. Título.

Maria Cristina Cardoso de Mendonça

**Peeling de fenol pontuado no tratamento do fotoenvelhecimento facial: estudo
histoquímico e imuno-histoquímico**

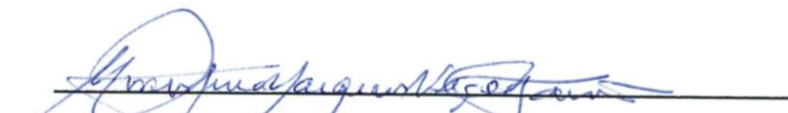
Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, área de concentração: Saúde Brasileira, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Saúde.

Aprovada em: 12 / 07 / 2018

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Beatriz Julião Vieira Aarestrup – Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora



Profa. Dra. Maria Christina Marques Nogueira Castañon
Universidade Federal de Juiz de Fora



Profa. Dra. Maria Teresa Feital de Carvalho
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Didier Silveira Castellano Filho
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora – Suprema



Profa. Dra. Rachel Rocha Pinheiro Machado
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora – Suprema

Dedico este trabalho ao meu pai Acrycio Henriques de Mendonça Júnior, que tanto me ensinou em vida: o amor pela família e pela medicina. Pai carinhoso, médico competente e humano e professor de tantos médicos formados nessa Universidade. Saudades, paizinho!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus, que tudo vê e nos ilumina e a Nossa Senhora, mãe de todos nós.

Agradeço à minha mãezinha, Athanéa, pessoa que admiro e me espelho, que me dá forças só com o seu olhar.

Ao meu filho Estevão, meu amor maior. Gratidão por ter você ao meu lado.

Aos meus orientadores Bia e Fernando, pelo carinho e paciência comigo. Pessoas ímpares, que só me acrescentam a cada dia.

Ao Professor Akinori, pelos ensinamentos estatísticos, fundamentais para compreensão dos dados.

A todos os professores e funcionários do CBR que sempre se mostraram solícitos comigo e com os quais aprendi muito.

Ao Anticorpos Laboratório (Niterói-RJ) pela confecção das lâminas para imuno-histoquímica.

Às pacientes que participaram da pesquisa.

Aos amigos e parentes que de alguma forma me apoiaram com palavras e com afeto.

“As coisas em geral não são tão fáceis de aprender e dizer como normalmente nos querem levar a acreditar: a maioria dos acontecimentos é indizível, realiza-se em um espaço que nunca uma palavra penetrou, e mais indizíveis do que todos os acontecimentos são as obras de arte, existências misteriosas, cuja vida perdura ao lado da nossa, que passa”.

Rainer Maria Rilke

RESUMO

Introdução: A aparência física da população, que vive cada dia mais, vem assumindo um papel significativo quando nos referimos à saúde e bem-estar geral. Portanto as questões dermatológicas assumem, a cada dia, uma grande importância médica. Os *peelings* químicos são um importante arsenal terapêutico, sendo o *peeling* de fenol classicamente recomendado para tratamento de clareamento de pele, atenuação das rugas estáticas e flacidez cutânea da face, exigindo sedação em ambiente hospitalar. Na técnica pontuada, sua execução pode ser feita em ambiente ambulatorial, com segurança. Objetivo: investigar os mecanismos pelos quais a técnica se mostra eficaz quando aplicado de forma pontuada, avaliando as alterações da matriz extracelular colagenosa, das fibras elásticas e as fibras colágenas Tipo I e Tipo III, por morfometria automática, e o aumento de células de origem mesenquimal da derme através da imuno-histoquímica. Métodos: Foram utilizados blocos de biópsias de pele da face de pacientes do sexo feminino (n = 17) realizadas antes e depois do tratamento que foram atendidas no Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, submetidas ao protocolo de cinco sessões de *peeling* de fenol pontuado. Os cortes histológicos foram submetidos à análise histopatológica de rotina (HE), análise histoquímica para fibras elásticas (Verhoeff) e para fibras colágenas Tipo I e Tipo III (*picrosirius red*) e à análise imuno-histoquímica para células com expressão vimentina positiva na derme. Três pacientes foram excluídas, por material insuficiente nos blocos para todas essas colorações. Os dados foram expressos em média aritmética simples \pm desvio padrão, mediana e expostos em *boxplot*. Resultados: Ao compararmos as concentrações de matriz extracelular colagenosa pelo HE e de fibras elásticas (Verhoeff) houve uma relação inversa na histomorfometria, onde das oito pacientes que apresentavam as menores concentrações de fibras colágenas do grupo, seis possuíam as maiores concentrações de fibras elásticas. Das seis pacientes que apresentavam as maiores concentrações de fibras colágenas do grupo, todas apresentavam concentração abaixo da média do grupo para fibras elásticas. Quanto a análise da relação entre fibras colágenas Tipo III e Tipo I, houve uma inversão de valores por maior ganho de fibras colágenas Tipo I em relação as fibras colágenas Tipo III. Na imuno-

histoquímica, 64,28% das pacientes (n = 9) apresentou aumento da celularidade mesenquimal. Conclusão: os resultados sugerem que a melhora clínica no tratamento do fotoenvelhecimento facial com a técnica proposta pode estar correlacionada com o maior equilíbrio entre material colágeno e elástico, com maior produção de fibras colágenas Tipo I em relação as fibras colágenas Tipo III e com o aumento do número de células mesenquimais nas amostras pós-tratamento. Diante dos resultados sugerimos que novos estudos sejam realizados, tanto clínicos quanto experimentais, para melhor elucidar os mecanismos de ação da técnica.

Palavras-Chave: Envelhecimento da Pele. Fenol. Abrasão Química. Histopatologia. Imuno-Histoquímica. Vimentina. Colágeno Tipo I. Colágeno Tipo III.

ABSTRACT

Introduction: The physical appearance of the population has been increasingly taking on a significant role when we speak of general health and well-being. Thus, dermatological questions take on an ever greater medical significance. Chemical peels are an important therapeutic arsenal, with phenol peeling being classically recommended for treatment of skin lightening, attenuation of static wrinkles and facial skin flaccidity, requiring sedation in a hospital environment. In the punctuated technique, treatment can safely be done in an outpatient setting. Objective: investigating the mechanisms by which the technique proves effective when applied in a punctuated form and evaluating the changes in the collagenous extracellular matrix, elastic fibers and Type I and Type III collagen fibers, by automatic morphometry, and the increase of dermal mesenchymal cells, through immunohistochemistry. Methods: Facial skin biopsy blocks from female patients (n = 17), taken before and after treatment at the Dermatology Service of the Universidade Federal de Juiz de Fora University Hospital, were used. Patients were submitted to the protocol of five punctuated phenol peeling sessions. The histological sections were submitted to routine histopathological analysis (HE), histochemical analysis for elastic fibers (Verhoeff) and for Type I and Type III collagen fibers (picrosirius red), and immunohistochemical analysis for cells with positive vimentin expression in the dermis. Three patients were excluded because of insufficient material in the blocks for all of these stains. The data were expressed as simple arithmetic mean \pm standard deviation, median, and shown in boxplot. Results: Upon comparing the collagenous extracellular matrix concentrations by HE and for elastic fibers (Verhoeff), there was an inverse relation in the histomorphometry, where of the eight patients with the lowest concentrations of collagen fibers in the group, six had the highest concentrations of elastic fibers. Of the six patients who had the highest concentrations of collagen fibers in the group, all of them had a concentration for elastic fibers below the group mean. Regarding the analysis of the relationship between Type III and Type I collagen fibers, there was an inversion of values due to the higher gain of Type I collagen fibers in relation to Type III collagen fibers. In the immunohistochemistry, 64. 28% of the patients (n = 9) presented increased mesenchymal cellularity. Conclusion: the results suggest that the clinical

improvement in the treatment of facial photoaging with the proposed technique may be correlated with the greater balance between collagen and elastic material, with a higher production of Type I collagen fibers in relation to Type III collagen fibers, and with the increase of the number of mesenchymal cells in the post-treatment samples. In view of the results, we suggest that new studies be conducted, both clinical and experimental, to better elucidate the action mechanisms of the technique.

Keywords: Skin Aging. Phenol. Chemexfoliation. Histopathology. Immunohistochemistry. Vimentin. Collagen Type I. Collagen Type III.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Técnica do <i>peeling</i> de fenol 88% pontuado	31
Figura 2 – Interface do software Zen pro 2012, Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha), demonstrando a marcação automática do colágeno	39
Figura 3 – Amostras obtidas a partir das biópsias antes e após tratamento (P15 e P12)	45
Figura 4 – Amostras obtidas a partir das biópsias antes e após tratamento (P1 e P8)	48
Figura 5 – Amostras obtidas a partir das biópsias antes e após tratamento	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Quantificação da área preenchida por fibras colágenas Tipo I em derme papilar	50
Gráfico 2 –	Quantificação da área preenchida por fibras colágenas Tipo I em derme reticular (n = 14)	51
Gráfico 3 –	Quantificação da área preenchida por fibras colágenas Tipo I em derme papilar e reticular (n = 14)	52
Gráfico 4 –	Quantificação da área preenchida por fibras colágenas Tipo III em derme papilar (n = 14)	53
Gráfico 5 –	Quantificação da área preenchida por fibras colágenas Tipo III em derme reticular (n = 14)	54
Gráfico 6 –	Quantificação da área preenchida por fibras colágenas Tipo III em derme papilar e reticular (n = 14)	55
Gráfico 7 –	Correlação da quantificação da área preenchida por fibras colágenas Tipo III / Tipo I em derme papilar e reticular (n = 14)	56
Gráfico 8 –	Quantificação da celularidade mesenquimal com expressão positiva para vimentina na derme papilar por imuno-histoquímica (n = 14)	58
Gráfico 9 –	Quantificação da celularidade mesenquimal com expressão positiva para vimentina na derme reticular por imuno-histoquímica (n = 14).....	59
Gráfico 10 –	Quantificação da celularidade mesenquimal com expressão positiva para vimentina na derme papilar e reticular por imuno-histoquímica (n=14).....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Comparação entre a quantidade de fibras colágenas (HE) e elásticas (Verhoeff)	49
--	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Análise comparativa de ganho e perda da quantidade de fibras colágenas das amostras obtidas antes e depois do tratamento 44
- Tabela 2 – Análise comparativa de ganho e perda da quantidade de fibras elásticas das amostras obtidas antes e depois do tratamento 46
- Tabela 3 – Médias aritméticas do número de células por campo microscópico em derme papilar e derme reticular de cada paciente (n = 14) 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μm^2	Micrômetros quadrados
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
FPS	Fator de Proteção Solar
HE	Hematoxilina-Eosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPL	Luz Intensa Pulsada
MEC	Matriz Extracelular
ml	Mililitros
mm	Milímetros
PBS	Tampão Fosfato-Salino
RUV	Raios Ultravioletas
TGF-B1	Fator de Crescimento Transformador
UV A	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA PELE	20
2.2	REPARO TECIDUAL.....	25
2.3	FOTOENVELHECIMENTO	27
2.4	<i>PEELING</i> DE FENOL PONTUADO	29
3	HIPÓTESE	33
4	OBJETIVOS	34
4.1	OBJETIVO GERAL.....	34
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5	MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1	SELEÇÃO DAS AMOSTRAS	35
5.1.1	Pacientes	35
5.1.2	Técnica do <i>peeling</i> de fenol pontuado	35
5.1.3	Obtenção de amostras para estudo histopatológico, histoquímico e imuno-histoquímico	36
5.2	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA ESTUDO HISTOPATOLÓGICO, histoquímico e imuno-Histoquímico.....	37
5.3	TÉCNICA E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E HISTOQUÍMICA	37
5.4	TÉCNICA E ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	40
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
6	RESULTADOS	43
6.1	Análise histopatológica da matriz extracelular colagenosa em coloração de rotina (HE)	43
6.2	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE FIBRAS ELÁSTICAS PELA COLORAÇÃO HISTOQUÍMICA (VERHÖEFF)	46
6.3	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DAS FIBRAS COLÁGENAS EM COLORAÇÃO HISTOQUÍMICA (<i>picrosirius red</i>)	49
6.3.1	Histomorfometria das fibras colágenas Tipo I	50
6.3.2	Histomorfometria de fibras colágenas Tipo III	52

6.4	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS (VIMENTINA)	56
7	DISCUSSÃO	62
8	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICES	76
	ANEXOS	78

1 INTRODUÇÃO

A aparência física da população, que vive cada dia mais, vem assumindo um papel significativo quando nos referimos à saúde e bem-estar geral, tendo as questões dermatológicas uma importância médica cada vez maior (BINIC et al., 2013; SERRI; IORIZZO, 2008). A pele desempenha um papel importante na comunicação interpessoal, é o órgão que transmite beleza, atraindo a atenção e contribuindo para as relações humanas. A expectativa de vida da população brasileira vem aumentando a cada ano. Em 2016, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) registrou a idade média de 75,8 anos para a população brasileira em geral. No estado de Minas Gerais, como em todo o Sudeste, essa idade é maior, ultrapassa os 77 anos, sendo que as mulheres possuem uma expectativa de vida superior a 80 anos (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2017). Com isso, temos as mulheres vivendo pelo menos um terço da sua vida no período pós-menopausa.

As alterações da pele que ocorrem com o envelhecimento levam ao ressecamento, flacidez, alterações vasculares, rugas e diminuição da espessura da pele. Por sua vez, a esse processo biológico do envelhecimento cutâneo na face, é acrescida a exposição solar, denominando-o, portanto, de *fotoenvelhecimento*, conduzindo à degeneração de fibras elásticas e colágenas, ao aparecimento de manchas pigmentadas e à ocorrência de lesões pré-malignas e malignas (BAUMANN, 2007; RABE et al., 2006; UITTO, 1997).

Um importante arsenal terapêutico para tratamento do envelhecimento cutâneo da face são os *peelings* químicos, que têm sido utilizados há milhares de anos e, ainda nos dias atuais (CLARK; SCERRI, 2008). Dentre as substâncias químicas utilizadas nos *peelings*, o fenol oferece resultados clínicos significativos e, classicamente, é recomendado para tratamento de clareamento de pele, atenuação das rugas estáticas e flacidez cutânea da face (BROWN; KAPLAN; BROWN, 1960).

Quando o *peeling* de fenol é realizado na face, de forma pontuada, ou seja, não contínua, utilizamos o mesmo princípio do fracionamento dos *lasers*, onde há preservação de tecido saudável em torno de pequenas áreas atingidas. A quantidade de fenol aplicada com essa técnica é mínima, tornando o *peeling* de fenol seguro e ainda assim eficaz em ambiente ambulatorial. Outro fator importante é

o baixo custo deste *peeling* quando comparado a outros procedimentos incluídos no arsenal terapêutico nesse século como os *lasers*, visto que tal técnica dispensa alta tecnologia e possibilita sua execução em consultório (DE MENDONÇA; AARESTRUP, F. M.; AARESTRUP, B. J. V., 2012).

Com a técnica de *peeling* ocorre uma queimadura controlada de partes do tecido que compõe a pele. Com a utilização do fenol 88% de forma pontuada, atingimos a epiderme, a derme papilar e parte da derme reticular, desencadeando o processo de reparo tissular. Inicialmente, há uma resposta inflamatória à injúria causada pelo agente químico, com o envolvimento importante das células residentes na derme como macrófagos e linfócitos em associação com as células hematogênicas (DARBY; HEWITSON, 2007).

Os fibroblastos desempenham papel fundamental na cicatrização e têm por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese dos componentes da matriz extracelular. Estudos sugerem que no processo de reparo tecidual surgem células denominadas miofibroblastos, derivados dos fibroblastos residentes em torno do processo de cicatrização. Estas células, exclusivas do tecido de granulação em amadurecimento, contribuem para o preenchimento da área lesada sintetizando intensamente elementos proteicos da matriz extracelular e fatores de crescimento que estimulam a proliferação de células saudáveis circunjacentes à lesão. Após a cicatrização, os miofibroblastos entram em apoptose. Os fibroblastos e os miofibroblastos são difíceis de distinguir ao microscópio óptico. Ambos expressam imunorreatividade ao marcador celular Vimentina, na imuno-histoquímica (DARBY; HEWITSON, 2007; HERZOG; BUCALA, 2010; WALKER; GUERRERO; LEINWAND, 2001).

Ainda no processo de reparo tecidual, os fibroblastos são ativados, sofrem proliferação, especialização e migração em direção a área lesada, produzindo colágeno e fibronectina, proteínas importantes na formação da matriz extracelular (DARBY; HEWITSON, 2007).

Em trabalho anterior, foi realizada avaliação da efetividade do *peeling* de fenol pontuado na melhora clínica com acompanhamento fotográfico digital e por estudo histopatológico pela Hematoxilina-eosina (HE) para avaliação de fibras colágenas e histoquímica pelo Verhoeff para avaliação de fibras elásticas (DE MENDONÇA, 2013; DE MENDONÇA; AARESTRUP, F. M.; AARESTRUP, B. J. V., 2012).

No presente estudo, buscando melhor compreender como o tratamento proposto age biologicamente na derme, foi realizada avaliação histoquímica para fibras colágenas e elásticas e imuno-histoquímica para análise de fibroblastos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA PELE

A pele é o manto de revestimento do organismo que isola os componentes orgânicos do meio exterior. É o maior órgão do corpo humano, correspondendo a mais de 15% do peso corporal e, juntamente com os seus anexos, constitui o sistema tegumentar (ROSS; PAWLINA, 2008). Este sistema tem como funções gerais a proteção física, mecânica e imunológica, impermeabilização, termorregulação e percepção tátil dos estímulos do meio ambiente. As três camadas que compõem a pele são a epiderme, mais superficial e em contato direto com o meio externo, a derme, intermediária, subjacente à epiderme e a mais profunda, a hipoderme ou tecido celular subcutâneo (FARAGE et al., 2007; SAMPAIO; RIVITTI, 2008).

A epiderme é constituída por epitélio pavimentoso estratificado ceratinizado cuja espessura apresenta variações de acordo com a localização. Na face, a espessura é aproximadamente 0,1 mm e nas pálpebras é ainda mais delgada, em torno de 0,04 mm (SAMPALIO; RIVITTI, 2008). Possui três tipos básicos de células: ceratinócitos, melanócitos e células de Langerhans. Existem também as chamadas células de Merkel, que se localizam-se na camada mais interna da epiderme, atuam como receptores do tato, sendo mais presentes na região palmo-plantar, mucosas oral e genital (JAMES; BERGER; ELSTON, 2016).

Os ceratinócitos, ou células escamosas, são células epiteliais pavimentosas de derivação ectodérmica. Uma das suas funções é a produção da queratina, um complexo filamentos proteico que não só forma o revestimento superficial (estrato córneo) da epiderme, mas também é a proteína estrutural de cabelo e unhas (JAMES; BERGER; ELSTON, 2016).

As células epiteliais da epiderme organizam-se em camadas, a saber: a camada basal ou germinativa, a mais interna; camada espinhosa ou Malpighiana; camada granulosa e camada córnea, assim dispostas da interface com a derme em direção a superfície (AARESTRUP, B. J. V., 2012). A camada basal é constituída de ceratinócitos e melanócitos dispostos em camada única. Seus ceratinócitos tem

forma cilíndrica, se dispõem com seu maior eixo perpendicular à junção dermo-epidérmica, citoplasma basófilo e núcleos grandes. À medida que sofrem mitose, as células seguem em direção à superfície apresentando modificações morfológicas que representam sua diferenciação. A camada espinhosa é formada por células escamosas com configuração poliédrica que vão se achatando progressivamente à medida que avançam mais superficialmente. A camada granulosa caracteriza-se por células que possuem grande quantidade de grânulos de querato-hialina. A camada córnea é formada por células anucleadas, com membranas celulares espessas e cujo citoplasma é composto de filamentos de queratina em uma matriz amorfa. A fase degradativa da queratinização é caracterizada pelo desaparecimento de organelas celulares e a consolidação de todo o conteúdo em uma mistura de filamentos e envelopes de células amorfas (AARESTRUP, B. J. V., 2012; JAMES; BERGER; ELSTON, 2016; SAMPAIO; RIVITTI, 2008).

Os melanócitos, de origem neuroectodérmica, se situam somente na camada basal entremeados aos queratinócitos. Na coloração de rotina (HE), aparecem como células claras com núcleo pequenos. Em seu citoplasma há presença de organelas especializadas, denominadas melanossomas, onde ocorre a síntese e deposição da melanina que posteriormente é transferida para o citoplasma dos ceratinócitos, conferindo a pigmentação cutânea (AARESTRUP, B. J. V., 2012; SAMPAIO; RIVITTI, 2008). Além dos melanócitos, existem as células de Langerhans que constituem de 2 a 8% da população celular total da epiderme, sendo mais abundante na face, pescoço e membros. São células dendríticas apresentadoras de antígeno (APC), originárias da medula óssea, responsáveis pela resposta imunológica inata, fazendo endocitose dos antígenos que conseguem vencer as camadas mais superficiais (AARESTRUP, B. J. V., 2012; SAMPAIO; RIVITTI, 2008).

A derme está situada subjacente à epiderme e é composta por tecido conjuntivo propriamente dito, formado por células envolvidas pela matriz extracelular (MEC). A MEC da derme é composta pela substância fundamental amorfa, rica em mucopolissacárides, estruturas filamentosas como as fibras colágenas e elásticas aonde são acomodados os vasos, nervos e anexos epidérmicos (AARESTRUP, B. J. V., 2012; AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R.; AZULAY-ABULAFIA, 2015; SAMPAIO; RIVITTI, 2008).

A derme é dividida em duas regiões: a porção dérmica situada entre as cristas epiteliais chama-se derme papilar é composta de tecido conjuntivo

propriamente dito frouxo e tem como características histológicas intensas vascularização e inervação, sendo altamente celular e com fibras colágenas e fibras elásticas delicadas envolvidas por abundante substância fundamental amorfa. Profundamente à derme papilar, situa-se a derme reticular, formada por tecido conjuntivo propriamente dito denso, com fibras colágenas e elásticas mais espessas em relação à derme papilar e dispostas paralelamente a epiderme apesar de ser um tecido não modelado. Nesta porção da derme encontra-se a maior parte dos anexos cutâneos, como as glândulas sudoríparas, folículos pilosos com suas glândulas sebáceas e, proporcionalmente, menor concentração de fibras colágenas e substância fundamental amorfa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SAMPAIO; RIVITTI, 2008).

A substância fundamental amorfa, também chamada de substância fundamental intercelular tem consistência gelatinosa e envolve os demais elementos da derme. Destaca-se, aqui, que as propriedades da substância fundamental amorfa potencializam as propriedades gerais dos tecidos conjuntivos. O fluido presente no gel fornece um meio para trocas gasosas entre os elementos celulares e o sangue. Ainda, como as proteínas presentes na substância amorfa se associam a moléculas de adesão e fatores de crescimento, possibilitam ao conjuntivo como um todo desempenhar suas funções de defesa imunológica e cicatrização (AARESTRUP, B. J. V., 2012).

As células da derme são divididas em dois grandes grupos . O primeiro grupo é chamado de células fixas ou residentes, onde os fibroblastos desempenham importante papel estrutural, além de macrófagos e linfócitos; e o segundo grupo de células ocasionais ou móveis que são os neutrófilos, mastócitos e eosinófilos. Durante reações imunológicas e de reparo tecidual, a proporção entre estes elementos se modifica de acordo com a evolução do processo (SIMPSON et al., 2009).

Os fibroblastos são células fusiformes, de origem mesenquimal que se encontram amplamente distribuídos nos tecidos conjuntivos. Na pele podemos observar três tipos diferentes de subpopulações de fibroblastos com propriedades distintas: os fibroblastos superficiais situados na derme papilar, os fibroblastos reticulares, residentes na derme reticular e os fibroblastos associados aos folículos pilosos, onde há a presença de células-tronco (*stem cell*) (DARBY et al., 2014). Em

condições normais, é função dos fibroblastos a manutenção da homeostase do tecido.

Quando a pele sofre uma injúria, a fase inicial de reparação dérmica é mediada pela linhagem inferior e os fibroblastos dérmicos superiores são recrutados apenas durante a re-epitelização (DRISKELL et al., 2013). Esses fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, adquirindo capacidade contrátil. Sabe-se, até o momento, que tanto os fibroblastos quanto os miofibroblastos têm um importante papel no processo de reparo tecidual. Estas células se diferenciam, pois, os fibroblastos possuem expressão positiva para o marcador vimentina e expressão negativa para marcadores proteicos musculares como a alfa-actina do músculo liso (α -actina SM) e os miofibroblastos possuem, por sua vez, positividade de ambos marcadores (DARBY et al., 2014; LI; WANG, 2011). Os fibroblastos sintetizam a molécula de procolágeno, organizada em cadeias polipeptídicas específicas que são subsequentemente estruturadas em fibrilas de colágeno. Os colágenos fibrilares são o principal grupo encontrado na pele. Os diversos tipos de colágeno têm em comum o fato de serem compostos por três cadeias polipeptídicas, com uma sequência fixa de glicina a cada 3ª posição, intercaladas por dois outros aminoácidos, que, muito frequentemente, são a prolina e a hidroxiprolina. Essa composição faz com que as três cadeias se entrelacem de modo helicoidal, à semelhança de uma corda, aumentando a resistência da molécula à tração (AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R.; AZULAY-ABULAFIA, 2015; JAMES; BERGER; ELSTON, 2016). Do equilíbrio dinâmico da síntese e degradação do colágeno, depende a normalidade do tecido nas situações fisiológicas e de reparação (AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R.; AZULAY-ABULAFIA, 2015).

As proteínas fibrosas do material extracelular são denominadas fibras devido a sua forma alongada e cilíndrica. Existem duas famílias de proteínas: o sistema colágeno e o sistema elástico; ambas se estruturam em proteínas alargadas denominadas fibras, diferentes quanto a complexidade de organização, segundo o precursor protéico e a organização estrutural de cada unidade básica, conferindo características clínicas e microscópicas particulares a cada uma delas (SAMPAIO; RIVITTI, 2008).

O colágeno corresponde a 30% do volume total da derme e 70% do seu peso seco. Dentre as 15 variedades já identificadas na pele, destacam-se os colágenos Tipos I e III, sendo o Tipo I o mais abundante e principal componente das

fibrilas, correspondendo a 80% da composição das fibras (BOLOGNIA; JORIZZO; SCHAFFER, 2015).

A estrutura do colágeno do Tipo I é uniforme e cada fibra exhibe estrias cruzadas. As fibras de colágeno estão dispostas de forma frouxa na derme papilar e de forma mais densa e em grandes feixes na derme reticular. Sua organização em feixe confere à pele alta resistência à força de tração e de tensão (AARESTRUP, B. J. V., 2012; BOLOGNIA; JORIZZO; SCHAFFER, 2015; SAMPAIO; RIVITTI, 2008).

No reparo tecidual, o conteúdo de colágeno Tipo III apresenta-se em maior quantidade quando comparada as situações estacionárias. Este também é um importante componente da vasculatura, particularmente das paredes arteriais (BOLOGNIA; JORIZZO; SCHAFFER, 2015). É o colágeno predominante no desenvolvimento fetal e encontra-se em maior quantidade na infância quando comparamos a senescência (LOVELL et al., 1987).

Para diferenciação dos tipos de colágenos presentes na derme, utiliza-se a coloração *picrosirius red* na histoquímica, onde através de diferenças de refrigência da luz, na microscopia de polarização, vai determinar o tipo de colágeno existente na amostra (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978).

A elasticidade da pele depende da estrutura das fibras elásticas. Uma propriedade característica destas proteínas é que podem ser esticadas em 100% ou mais e ainda retornam à forma original. Os principais componentes das fibras elásticas são a elastina e as microfibrilas. A elastina consiste em uma proteína cujo monômero denominamos *tropoelastina*. As microfibrilas consistem principalmente em fibrilinas e possuem o diâmetro de 10 a 12 nanômetros. As fibras elásticas são divididas em três tipos: (1) as fibras oxitalânicas, fibras mais delicadas, presentes na derme papilar e com disposição perpendicular à junção dermo-epidérmica; (2) as fibras elaunínicas, que ocupam uma posição intermediária na derme e fazem a ligação entre as oxitalânicas e as fibras elásticas mais profundas e (3) as fibras elásticas maduras, que se mostram mais espessas e contêm cerca de 90% da elastina e estão situadas na derme reticular e se dispõem paralelamente à epiderme. Os fibroblastos depositam a elastina até preencher toda a estrutura fibrilar e ao final deste processo, tem-se a fibra elástica madura (BOLOGNIA; JORIZZO; SCHAFFER, 2015; SAMPAIO; RIVITTI, 2008). Frances e outros (1990) demonstraram que as fibras oxitalânicas e elaunínicas não sofrem variação de acordo com o sexo ou idade, quando analisadas em pele não exposta à radiação solar. Já as fibras

elásticas maduras situadas em derme reticular possuem um aumento da área ocupada a partir a sexta década de idade (FRANCES et al., 1990).

2.2 REPARO TECIDUAL

Quando se faz um *peeling* de fenol pontuado na face, provoca-se uma queimadura controlada da pele, atingindo a epiderme, a derme papilar e parte da derme reticular, desencadeando o processo de reparo tissular (DE MENDONÇA; AARESTRUP, F. M.; AARESTRUP, B. J. V., 2012).

O reparo tecidual é um processo dinâmico e complexo que se inicia imediatamente após a injúria. Didaticamente, é dividido em três fases inter-relacionadas que se sobrepõem: inflamação; proliferação e amadurecimento com remodelação com formação de tecido cicatricial maduro (DARBY; HEWITSON, 2007; SIMPSON et al., 2009).

A fase inflamatória começa com o dano aos capilares, desencadeando a formação de um coágulo de sangue constituído por fibrina e fibronectina. As células endoteliais têm importante função nessa fase (SHIN et al., 2014). O gradiente quimiotático permite que uma variedade de células recrutadas migre para dentro da lesão. As plaquetas presentes no coágulo sanguíneo liberam quimiocinas múltiplas, que participam do recrutamento de células inflamatórias, neutrófilos e macrófagos, responsáveis pela limpeza por meio de fagocitose com produção de enzimas digestivas, radicais livres de oxigênio e ácidos, assim como pela indução inicial da proliferação celular compensatória desencadeada pela liberação de fatores de crescimento proporcionalmente à atividade fagocitária (HINZ, 2007; LI; WANG, 2011).

A presença dos macrófagos no local da injúria parece estar relacionada a uma melhor resolução na cicatrização, visto que essas células secretam substâncias anti-inflamatórias como TGF- β 1 (fator de crescimento transformador) e VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) (MIRZA; DIPIETRO; KOH, 2009; SCHREML et al., 2010).

Em questão de poucas horas, os ceratinócitos da epiderme, próximos à área lesada, secretam fatores que estimulam a fibrinogênese e angiogênese, como

TGF β 1 e VEGF e fator de crescimento epidérmico (EGF) (DARBY; HEWITSON, 2007).

O segundo estágio de cicatrização é a fase proliferativa, onde os fibroblastos auxiliam a angiogênese, requisito para o desenvolvimento e manutenção do tecido de granulação, permitindo fechamento da ferida e restauração da integridade tecidual (BLAKAJ; BUCALA, 2012). Nessa fase, os fibroblastos são ativados, transformando-se em miofibroblastos. Estes sintetizam e depositam componentes da matriz extracelular (MEC), como as fibras colágenas Tipo I, glicoproteínas e proteoglicanos e também exibem uma propriedade contrátil. Cerca de 50% dos miofibroblastos presentes no tecido derivam dos fibroblastos residentes na derme, sendo que o restante podem ser derivados das *stem cells* presentes no folículos pilosos ou mesmo das células da parede vascular dos vasos situados no local da injúria (LI; WANG, 2011).

Fenotipicamente, os miofibroblastos são um tipo de célula intermediária entre os fibroblastos e as células do músculo liso. Os miofibroblastos surgem na fase inicial da formação de tecido de granulação, tornam-se mais abundante nessa fase proliferativa e desaparecem progressivamente no estágio final da cicatrização, possivelmente por apoptose (LI; WANG, 2011).

Na imuno-histoquímica, os miofibroblastos expressam positivamente a vimentina e negativamente a desmina como os fibroblastos, mas também expressam positivamente para a proteína alfa-actina do músculo liso (α -SM actina) (DARBY et al., 2014). A diferenciação dos miofibroblastos se torna temporariamente aparente quando os mesmos começam a expressar alfa actina em quantidades cada vez maiores por volta do 8º ao 15º dia durante a cicatrização. Esta isoforma da actina desaparece progressivamente dos miofibroblastos e deixa de ser detectada por volta do 30º dia (HINZ, 2007).

Finalmente, o amadurecimento funcional é atingido com a reepitelização, com reorganização citoarquitetural dos ceratinócitos, modelamento da matriz extracelular dérmica e sua revascularização, bem como a restituição da junção dermo-epidérmica (DARBY; HEWITSON, 2007).

2.3 FOTOENVELHECIMENTO

O envelhecimento cutâneo é um processo fisiológico complexo que se forma de maneira acumulativa, onde fatores ambientais ou extrínsecos como a exposição solar e a poluição, se somam ao envelhecimento biológico. Dentre os fatores extrínsecos, a radiação solar é, de fato, o maior formador de dano cutâneo na face. Acredita-se que 80% do envelhecimento facial se devam a exposição crônica a essa radiação. À medida que o envelhecimento acontece, a pele vai se tornando mais fina, mais seca, com menor capacidade de elasticidade e com o surgimento de rugas finas (BAUMANN, 2007).

O termo *fotoenvelhecimento* é utilizado quando os danos induzidos pela radiação ultravioleta (UV), se sobrepõem ao envelhecimento intrínseco da pele exposta cronicamente ao sol, como na face (EL-DOMYATI et al., 2002).

Clinicamente, a pele fotoenvelhecida se apresenta mais áspera e pálida, com alterações de pigmentação e, com rugas finas e grosseiras. Em um estágio mais avançado, surgem lesões actínicas benignas e pré-malignas como as ceratoses actínicas e malignas (carcinomas basocelular e escamoso) (HUGHES et al., 2011). A radiação UV possui subdivisões onde as principais radiações que possuem efeitos sobre a pele são: (1) UVB, que tem comprimento de onda entre 290-320 nm, penetra até a epiderme e é a radiação responsável pelo eritema e queimadura solar e, (2) UVA, que possui comprimento de onda maior que o anterior, entre 320-400 nm e, portanto, atinge a epiderme e a derme, além de ser a responsável pela maioria das alterações crônicas do fotodano, ativando as metaloproteinases da matriz extracelular que estimulam a produção de colagenase, gelatinase e estromelisin-1 nos fibroblastos, resultando na deterioração das fibras colágenas e elásticas e diminuição na síntese de procolágeno Tipo I (FARAGE et al., 2008).

Em uma pele jovem, a derme papilar apresenta fibras bem organizadas, formando uma malha fibrilar delicada, pouco compacta e com fibras que se dispõem em direção à epiderme, enquanto que na derme reticular essas fibras encontram-se mais espessas e compactadas e se posicionam paralelamente à epiderme. Com o envelhecimento cutâneo o volume dérmico diminui e essa malha fibrilar localizada na

derme papilar tende a desaparecer e os feixes de colágeno da derme reticular mostram-se mais espessos e desorganizados (HUMBERT et al., 2012).

Microscopicamente, as principais alterações provocadas pelo envelhecimento são observadas na derme, com maior atrofia da matriz extracelular, menor número de fibroblastos e, conseqüentemente, diminuição da quantidade e mudança na organização de fibras colágenas e elásticas. Há uma alteração e quebra da síntese dos colágenos Tipos I e III. Essas alterações são causadas por uma diminuição na síntese de procolágeno pelos fibroblastos e um aumento da degradação do colágeno por maior atividade das metaloproteinases. A proporção entre os tipos de fibras de colágeno mudam com o avançar da idade. Em peles mais jovens, ou seja, até a quarta década de vida, 80% das fibras existentes são de colágeno Tipo I e 15% do Tipo III. Em peles mais velhas, essa relação muda ocorrendo uma grande diminuição de fibras colágenas do Tipo I, além de um menor volume total de fibras, diminuindo 1% a cada ano (BAUMANN, 2007).

No envelhecimento, há também a apoptose de células do endotélio vascular que diminui a integridade e a elasticidade dos vasos sanguíneos, alterando as reações nos processos inflamatórios. Shin e outros (2014) demonstraram que a vimentina pode ser um bom marcador do envelhecimento endotelial celular.

Do ponto de vista clínico, são atribuídos aos danos ao colágeno a fragilidade e perda de elasticidade da pele idosa (BAUMANN, 2007; HUMBERT et al., 2012). Também foi relatado que a proporção do colágeno de Tipo III para Tipo I aumenta com o envelhecimento por perda principalmente do colágeno Tipo I (LOVELL et al., 1987). Essa perda é ainda maior nas peles que sofrem com a radiação solar, sendo essa perda igualmente demonstrada na áreas aonde as rugas estão presentes como na pele ao redor das mesmas (BAUMANN, 2007; EL-DOMYATI et al., 2014; KAWABATA et al., 2014).

No envelhecimento cutâneo, associado a exposição às radiações solares, as fibras elásticas apresentam uma progressiva fragmentação e destruição de sua rede organizada ao longo de toda derme. As fibras oxitalânicas e eulanínicas, situadas mais próximas a superfície e, portanto mais expostas aos raios UV, diminuem em quantidade e perdem sua arquitetura em rede. As fibras elásticas maduras, situadas mais profundamente, são substituídas por um material elástico distrófico (HUGHES et al., 2011; KAWABATA et al., 2014; LEE et al., 2008). Esta é a

característica histológica mais evidente na derme de peles fotoenvelhecidas, denominada *elastose solar*.

Destaca-se, de modo interessante, que embora haja na elastose um aparente ganho de material elástico, o que se observa é uma redução na produção de fibras elásticas funcionais e um aumento da produção de material elastótico não funcional (WEIHERMANN et al., 2017).

2.4 PEELING DE FENOL PONTUADO

O *peeling* de fenol é utilizado para tratamento do fotoenvelhecimento desde meados do século XX, quando Joseph C. Urkov, cirurgião plástico, publicou relato de sua experiência de 15 anos de utilização do fenol no tratamento de 2000 pacientes com cicatrizes, manchas e rugas, concluindo ser esse agente seguro e eficaz. Mas, somente a partir da década de 60 que os médicos americanos Thomas J. Baker e Howard L. Gordon legitimaram de forma definitiva o *peeling* de fenol para tratamento do fotoenvelhecimento, associando o fenol ao óleo de cróton, sabão líquido e água destilada (LANDAU, 2005).

A população ideal para realização deste tipo de *peeling* deve ter pele clara e fina, ou seja, segundo a classificação de Fitzpatrick, indivíduos com pele do fototipo I, II e III (LANDAU, 2005). Na concentração de 88%, há poucos relatos clínicos, sendo utilizado principalmente em trabalhos experimentais com animais (LARSON; KARMO; HETTER, 2009; MONHEIT, 2001; MOY; PEACE; MOY, 1996).

O fenol ou ácido carbólico (C_6H_5OH) é um derivado do coaltar, formado por cristais transparentes que são diluídos em água. Possui odor característico, e seu aspecto varia de incolor a rosado, tornando-se escurecido quando exposto ao ar e à luz. Uma vez diluído, atinge a concentração máxima de 88%. Quando utilizado nessa concentração promove uma lesão química da epiderme, da derme papilar, chegando até a derme reticular superficial. Durante esse processo, o fenol produz a desnaturação das proteínas da pele, produzindo uma ação queratolítica por rompimento das pontes de enxofre da queratina. Dadas suas propriedades, quanto maior a concentração do fenol na formulação, maior será a coagulação da queratina, menor sua penetração e menor a toxicidade (LARSON; KARMO; HETTER, 2009).

Clinicamente, essa ação é apresentada como um branqueamento ou *frost* nos locais aonde o fenol foi aplicado. A parte tratada, após esse aspecto evolui para crosta após 24 horas e posterior queda das mesmas após alguns dias (FISCHER et al., 2010; HETTER, 2000).

Diante do exposto, ressaltamos que a aplicação do fenol em pequenas áreas corporais, como ao redor dos olhos ou em toda face na forma pontuada é segura e não leva a complicações cardiovasculares (DE MENDONÇA; AARESTRUP, F. M.; AARESTRUP, B. J. V., 2012; GATTI, 2008).

A utilização do *peeling* de fenol 88%, na forma pontuada, teve como inspiração o fracionamento aplicado aos *lasers* ablativos, como o *laser* de dióxido de carbono (CO₂). O fracionamento fez a propedêutica para fotoenvelhecimento tornar-se um procedimento de regime ambulatorial. A técnica fracionada do *peeling* de fenol 88% consiste na formação de colunas de ablação químicas com destruição epidérmica e dérmica, que são circundadas por tecido não-tratado onde se encontram unidades pilo-sebáceas com células-tronco (*stem cells*) intactas, assim como fibroblastos na derme não afetada, facilitando a reepitelização e a remodelação do colágeno nesses locais (BRIGHTMAN et al., 2009). Essa técnica fracionada de *peeling* foi desenvolvida de modo inédito nesta linha de pesquisa e publicada pela primeira vez em 2012 (DE MENDONÇA; AARESTRUP, F. M.; AARESTRUP, B. J. V., 2012).

A Figura 1 mostra o branqueamento ou *frost* que surge de forma imediata a aplicação de fenol 88% na técnica pontuada e a formação das crostas (Figura 1).

Figura 1 – Técnica do *peeling* de fenol 88% pontuado



Legenda: A – Técnica do *peeling* de fenol 88% pontuado com a formação do *frost*; B – Técnica do *peeling* de fenol 88% pontuado com o aparecimento das crostas após quatro dias.

Fonte: A autora, 2018

Desta forma, considerando a hipótese de que a melhora clínica proporcionada pelo *peeling* de fenol pontuado, já demonstrada em trabalho e artigo anteriores, se deve a reestruturação de fibras colágenas e elásticas na derme, este trabalho foi elaborado visando, através da análise histoquímica e imunohistoquímica, melhor elucidar os mecanismos pelos quais o tratamento proposto age biologicamente na derme, dando continuidade em nossa linha de pesquisa (DE MENDONÇA, 2013; DE MENDONÇA; AARESTRUP, F. M.; AARESTRUP, B. J. V., 2012).

3 HIPÓTESE

A melhora clínica proporcionada pelo *peeling* de fenol pontuado se deve ao aumento de células mesenquimais e de fibras colágenas e elásticas na derme.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os mecanismos pelos quais o *peeling* de fenol pontuado age biologicamente na derme.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o grau de amadurecimento do colágeno dérmico por meio da coloração histoquímica *picrosirius red*;
- Quantificar células com expressão positiva para vimentina na derme por meio da imuno-histoquímica;
- Correlacionar os resultados de estudo anterior em coloração de rotina e histoquímica (Verhoeff) com os dados obtidos no presente estudo.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

5.1.1 Pacientes

Para realização desse trabalho, foram selecionadas 17 pacientes (n = 17) do sexo feminino atendidas no Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) com idade entre 45 e 69 anos (média = 55,76 anos), com pele entre os tipos I e III, segundo a classificação de Fitzpatrick (Apêndice A), com fotoenvelhecimento graus II-III de acordo com a escala de Glogau (Apêndice A) e que não tinham realizado procedimento estético ou cirúrgico na face nos últimos seis meses antes do início do tratamento (FITZPATRICK, 1988; GLOGAU, 1996). O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-HU/CAS da UFJF) tendo recebido sua aprovação sob os números 0080/2009 (Anexo A) e 0115/2009 (Anexo B). A pesquisa cumpriu todas as determinações da Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466, de 12 de dezembro de 2012. O aceite das pacientes selecionadas se deu mediante assinatura dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo C).

5.1.2 Técnica do *peeling* de fenol pontuado

As pacientes foram submetidas, em ambiente ambulatorial, ao protocolo elaborado com cinco sessões de *peeling* pontuado de fenol 88%, com intervalo entre cada sessão de um mês. O volume de fenol 88% utilizado em cada sessão não ultrapassou a 0,2ml.

O modo de preparo para 10ml da solução de fenol a 88% se dá da seguinte maneira: pesar o fenol; dissolver o fenol em água destilada; completar o volume com água destilada; embalar em vidro âmbar e rotular.

Outros materiais necessários para realização da técnica são: luva descartável de procedimento; algodão; álcool 70% e palito de madeira.

Para a aplicação do fenol, um palito de madeira foi embebido na solução de fenol a 88% e levado pontualmente sobre a pele, nas rugas e fora delas, principalmente sobre as regiões periorbitárias e perioral. O mesmo procedimento também foi realizado nas regiões pré-auriculares. A distância entre cada ponto de aplicação foi cerca de 3mm entre cada ponto, ou seja, uma distância sempre igual ou maior que a área atingida em cada ponto com o fenol,. A mesma técnica foi aplicada nas áreas mandibulares, inframandibulares e submentoniana, cobrindo toda a face. Após o surgimento do *frost*, a aplicação do algodão embebido em álcool 70% foi realizada para alívio da sensação de ardência (DE MENDONÇA, 2013; DE MENDONÇA; AARESTRUP, F. M.; AARESTRUP, B. J. V., 2012).

Após cada sessão as pacientes foram orientadas a usar diariamente filtro solar com Fator de Proteção Solar (FPS) 30 ou superior e a utilizar um produto lubrificante (gel de silicone ou óleo mineral) em caso de eritema, irritação ou prurido após a formação das crostas (FULTON; PORUMB, 2004). Todas as pacientes toleraram bem cada sessão de *peeling*, não havendo necessidade de sedação.

5.1.3 Obtenção de amostras para estudo histopatológico, histoquímico e imuno-histoquímico

Foram realizadas duas biópsias na face de cada paciente. A primeira, na região pré-auricular, antes do início do procedimento e a segunda, na região pre-auricular contra-lateral, um mês após a quinta sessão do *peeling* de fenol pontuado. Para cada biópsia foi realizada com o *punch* 3 mm e sob anestesia local, em ambiente ambulatorial.

5.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA ESTUDO HISTOPATOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO

Cada bloco foi submetido à microtomia com cortes de 5µm de espessura. Após a confecção da lâmina, dois cortes correspondentes a cada amostra foram separados para coloração de rotina (HE), histoquímica (Verhoeff e *picrosirius red*) e para imuno-histoquímica (Vimentina). Após as colorações os cortes foram montados em lamínulas com Entellan (Merck 1. 07961, Alemanha).

Na primeira etapa desse estudo, foram confeccionados lâminas com dois cortes em cada uma delas e as mesmas foram preparadas pelo serviço de anatomia patológica do Hospital Universitário da UFJF. Todo o material foi fixado em formol a 10%, incluído em parafina, seguindo-se as técnicas convencionais de processamento e onde foram feitas as colorações de rotina (HE) e histoquímica (Verhoeff).

Em uma segunda etapa, foram confeccionadas outras lâminas contendo dois cortes em cada uma delas para análise histoquímica (*picrosirius red*) e imuno-histoquímica (vimentina). A coloração *picrosirius red* foi realizada no laboratório de histologia do Centro de Biologia da reprodução (CBR) da UFJF e a imuno-histoquímica (vimentina) foi realizada no Anticorpos Laboratório (Niterói-RJ). Durante a análise dos blocos, observou-se que seis blocos não possuíam material suficiente para confecção das lâminas, sendo excluídos do estudo.

A começar dessa avaliação, restaram 28 lâminas confeccionadas a partir de 28 blocos de biópsias de 14 pacientes, sendo 14 lâminas das biópsias antes do procedimento e 14 lâminas das biópsias realizadas 30 dias após o término do protocolo.

5.3 TÉCNICA E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E HISTOQUÍMICA

A coloração com hematoxilina e eosina (HE) é provavelmente a técnica mais utilizada na coloração dos tecidos, devido à sua simplicidade e à sua capacidade de permitir visualizar uma grande quantidade diferente de estruturas

teciduais. A hematoxilina comporta-se como um corante básico e cora, em azul, o núcleo das células de modo basófilo. A eosina é ácida e cora predominantemente o citoplasma e as fibras de colágeno que possuem caráter básico, variando do rosa ao laranja ou vermelho (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A técnica histoquímica de Verhoeff é um dos métodos de coloração mais utilizados para demonstrar a presença de fibras elásticas no tecido. Essa técnica baseia-se em um método regressivo no qual todo o tecido se encontra saturado de reagente, e o excesso de corante é removido de forma seletiva. A técnica consiste em: desparafinar e hidratar; corar 15 min. na solução para fibras elásticas de Verhoeff; lavar em água corrente 20 min.; passar por água destilada; diferenciar em cloreto férrico 2%, sob controle microscópico, onde as fibras elásticas devem salientar-se em negro contra fundo cinza claro; tiosulfato de sódio 5% – 1 min.; lavar em água destilada 5 min.; contracorar com solução de van Gieson 1 min. (JONES; BANCROFT; GAMBLE, 2008).

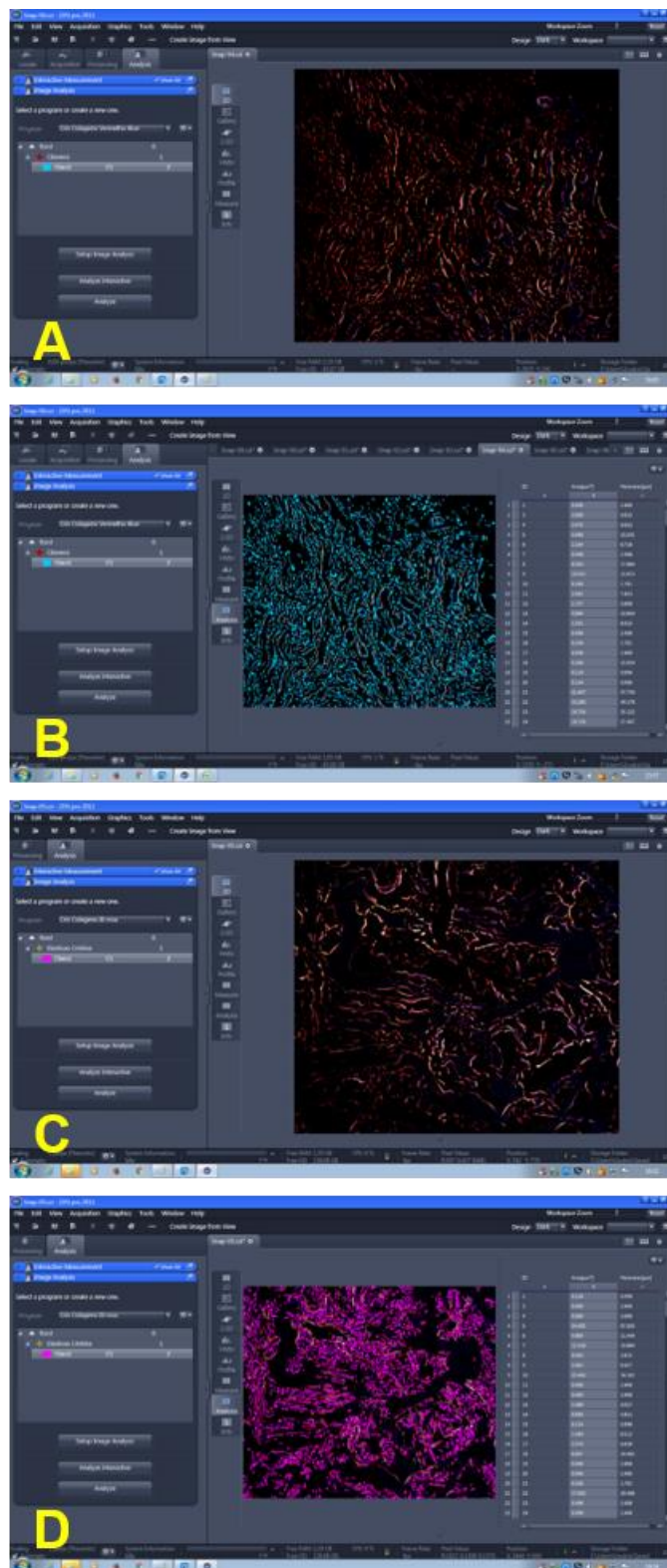
A técnica para coloração pelo *picrosirius red* consiste em: desparafinizar os cortes histológicos em xilol; hidratar – série decrescente de álcool até a água; Imersão em solução de uso do *picrosirius red* por 30 min.; lavagem na água destilada; passarem três cubas com álcool, sendo 10 mergulhos em cada; passar em 3 cubas com xilol, sendo 10 mergulhos em cada e montagem habitual com lamínula.

Na coloração *picrosirius*, sob a luz polarizada, o colágeno Tipo I cora-se em vermelho vivo e o colágeno do Tipo III cora-se em verde-amarelado (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978).

Para esta avaliação, as amostras foram observadas em toda sua extensão em microscópio óptico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha), pela doutoranda e por dois avaliadores independentes com formação e experiência em histopatologia.

Após observação, foram selecionados campos representativos da derme papilar e da derme reticular para análise histopatológica e histoquímica para captura fotográfica digital para morfometria automática pelo programa *Zen pro* 2012, Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) (Figura 2).

Figura 2 – Interface do *software* Zen pro 2012, Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha), demonstrando a marcação automática do colágeno



Notas: Coloração em *picrosirius red* evidenciando em vermelho vivo os feixes de colágeno Tipo I (A) e em verde amarelado os feixes de colágeno Tipo III (C) e a suas marcações automáticas correspondentes gerada pelo programa (B e D). Aumento original 400x.

Fonte: A autora, 2018

Após a captura das imagens e dos valores totais obtidos em cada imagem, foi realizada uma média aritmética para cada região da derme, ou seja, inicialmente uma média aritmética para a derme papilar e uma média aritmética para a derme reticular e, posteriormente, a média aritmética entre ambas. Para essa análise foram selecionados no mínimo quatro e no máximo oito campos tanto em derme papilar, quanto em derme reticular, para cada lâmina, perfazendo toda a extensão de cada lâmina. Essa diferença no número de campos ocorreu por diferenças no tamanho das amostras dos blocos utilizados.

Os dados obtidos a partir das análises histopatológicas e histoquímicas antes e depois da técnica do *peeling* de fenol pontuado foram comparados de forma pareada.

5.4 TÉCNICA E ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para identificação das células positivas para a expressão de vimentina na derme, o método do complexo avidina-biotina peroxidase anti-peroxidase foi utilizado (Santa Cruz Biotecnologia, INC). O método utilizado compreendeu as seguintes etapas: Fixação em acetona (10 min.); Reidratação dos cortes em tampão fosfato-salino (PBS), potencial hidrogeniônico (pH) 7,4 (10 min.); bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 0,4% (30 min.); lavagem em PBS (10 min.); incubação com soro normal de cavalo (Vector Laboratory, Inc., Burlington, Califórnia, EUA) em câmara úmida (20 min.); incubação com o anticorpo primário policlonal anti-vimentina (Vimentin Anticorpo V9: sc-6260 Santa Cruz 1:100); lavagem em PBS (10 min.); incubação com anticorpo de cabra biotilado (Dakopatts, Copenhagen, Dinamarca) diluído a 1:150 em PBS (30 min.); lavagem em PBS (30 min.); incubação com tampão acetato 0,2 M (molar), pH 5,2 (10 min.); revelação do produto da reação imunológica empregando a solução de 3-amino-9-eticarbazol (1 a 3 min.); lavagem em água corrente (10 min.); contra-coloração com hematoxilina de Harris (1 min.); lavagem em água corrente (10 min.); montagem da lâmina com elvanol (polivinil álcool) e lamínula.

Após observação, foram selecionados campos representativos da derme papilar e da derme reticular, no mínimo quatro e, no máximo, oito campos para

análise imuno-histoquímica (400x) e captura fotográfica digital para morfometria semi-automática. Essa diferença no número de campos ocorreu por diferenças no tamanho das amostras dos blocos utilizados. As células que apresentaram pigmentação castanha intracitoplasmática foram consideradas positivas, independente da intensidade da expressão.

Os dados obtidos a partir da análise imuno-histoquímica antes e depois da técnica do *peeling* de fenol pontuado foram comparados de forma pareada.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A aquisição, processamento e análise das fotomicrografias foram realizadas no Software ZEN pro 2012, um sistema de captura, processamento e análises de imagens para microscopia digital. A densidade de área de fibras colágenas (HE), de densidade de área birrefringente de colágeno Tipos I e III (marcado com *picrosirius red*) e densidade de área de fibras elásticas (marcado com Verhoeff) foram mensuradas (em μm^2) por identificação do espectro cromático (RGB) em cada campo histológico. A presença de células de origem mesenquimal foi computada por morfometria semiautomática (pela marcação do cromógeno vimentina na imuno-histoquímica).

As micro áreas mensuradas em cada fotomicrografia foram exportadas para o *Microsoft Office Excel* 365. Em seguida, em cada campo histológico, foi realizado o somatório das micro áreas obtendo um resultado único da área marcada/campo histológico. Os dados foram agrupados por grupo. Em seguida os dados foram expressos em médias aritméticas \pm desvio padrão. A normalidade da amostra foi verificada através dos testes Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino & Pearson para os dados não paramétricos e paramétricos. A diferença pareada entre as médias aritméticas, tomadas antes e depois da intervenção, foi testada através do Teste de Wilcoxon para os dados não paramétricos e Teste t pareado para os dados paramétricos. A diferença entre a média aritmética entre as razões entre Colágeno Tipo III por Colágeno Tipo I foi verificada através do Teste de Mann Whitney. Os dados não paramétricos e paramétricos foram apresentados em *boxplot*. Foi considerado um intervalo de confiança de 95%, e considerado significativo quando o

valor de $p < 0,05$. Os dados estatísticos foram analisados no *Graph Pad Prism 5.0* (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA).

6 RESULTADOS

Em artigo já publicado recentemente, constam 17 pacientes (n = 17) que iniciaram o estudo, porém 3 pacientes foram excluídas das análises do presente estudo devido ao esgotamento do material. Desse grupo final (n = 14) que completou todas as análises microscópicas, nove pacientes (64,28%) fazem parte do grupo de melhora expressiva, quatro (28,57%) fazem parte do grupo de melhora discreta e uma (7,14%) do grupo sem melhora clínica. Foram excluídos os pacientes números 3, 14 e 16 que constam nesse artigo (DE MENDONÇA et al., 2018).

6.1 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA MATRIZ EXTRACELULAR COLAGENOSA EM COLORAÇÃO DE ROTINA (HE)

Analisando os dados publicados em artigo de fevereiro de 2018 (Anexo D), verificamos que das 14 pacientes que tiveram todas as colorações realizadas ao final do processamento do material, oito apresentavam densidade de colágeno abaixo da média do grupo ($< 25.450/100.000\mu\text{m}^2$) e seis apresentavam densidade acima da média do grupo ($> 25.450/100.000\mu\text{m}^2$) antes do tratamento. O valor de $25.450/100.000\mu\text{m}^2$ foi o resultado da média aritmética de todas 14 amostras das biópsias realizadas antes do início do protocolo, sendo a mediana do grupo com valor igual a $21.263/100.000\mu\text{m}^2$.

Dentre as oito que apresentaram densidade abaixo da média, sete tiveram aumento dessa densidade. Em uma paciente não houve aumento dessa densidade e também não houve melhora clínica (“patient 6” ou P6). Já dentre as seis pacientes com as densidades mais altas de colágeno pré-tratamento, cinco apresentaram diminuição. Apenas uma paciente (“patient 5” ou P5) apresentou aumento (ganho = 5,67%), sendo que a mesma tinha uma densidade pouco acima da média do grupo (valor = $26.027/100.000\mu\text{m}^2$) (DE MENDONÇA et al., 2018).

Esses valores e os números de cada paciente, presentes no artigo de De Mendonça e outros (2018), estão apresentados na Tabela 1.

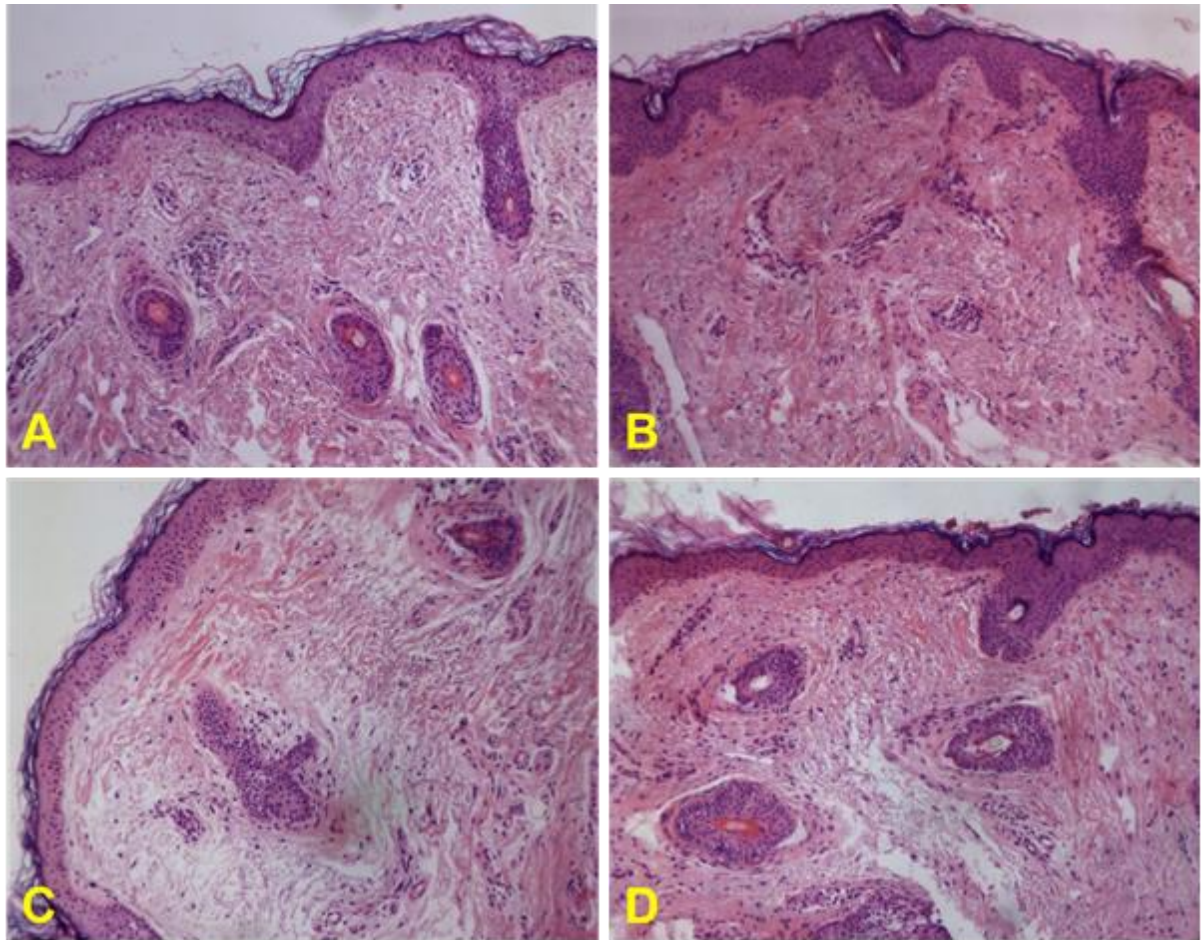
Tabela 1 – Análise comparativa de ganho e perda da quantidade de fibras colágenas das amostras obtidas antes e depois do tratamento

Melhora clínica acentuada		Concentração de fibras colágenas nas amostras < 25.450/100.000 μm^2		Concentração de fibras colágenas nas amostras > 25.450/100.000 μm^2		Total n (%)
		Ganho n (%)	Perda n (%)	Ganho n (%)	Perda n (%)	
Sim (I)	9	6 (42,85)	0	0	3 (21,42)	9 (64,28)
Não (II)	5	1 (7,14)	1 (7,14)	1 (7,14)	2 (14,28)	5 (35,71)
Total	14	7 (50)	1 (7,14)	1 (7,14)	5 (35,71)	14 (100,00)

Fonte: DE MENDONÇA et al., 2018

Na Figura 3 estão presentes dois exemplos: Paciente 15 (P15) do grupo que apresentava concentração de fibras colágenas abaixo da média mensuradas pela morfometria automática na coloração HE e Paciente 12 (P12) do grupo que apresentava concentração acima da média (Figura 3).

Figura 3 – Amostras obtidas a partir das biópsias antes e após tratamento (P15 e P12)



Notas: Fotomicrografia. Coloração HE. Aumento original 100x.

Paciente 15 do grupo abaixo da média e com ganho de 34,24%: (A) antes e (B) depois.

Paciente 12 do grupo acima da média e com perda de 35,70% (C) antes e (D) depois.

Fonte: A autora, 2018

6.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE FIBRAS ELÁSTICAS PELA COLORAÇÃO HISTOQUÍMICA (VERHÖEFF)

Das 14 pacientes que tiveram todas as colorações realizadas ao final do processamento do material, oito apresentaram densidade de material elástico abaixo da média do grupo ($< 17.382/100.000\mu\text{m}^2$) e 6 apresentaram densidade acima da média do grupo ($> 17.382/100.000\mu\text{m}^2$) antes do tratamento. O valor de $17.382/100.000\mu\text{m}^2$ foi o resultado da média aritmética de todas as amostras, sendo a mediana do grupo com valor igual a $11.297/100.000\mu\text{m}^2$.

Das oito pacientes que apresentavam densidade abaixo da média do grupo, sete tiveram aumento dessa densidade. A paciente que não obteve aumento dessa densidade (“patient 11” ou P11) apresentava a maior densidade desse grupo (valor = $11.690/100.000\mu\text{m}^2$), sendo seu valor um pouco acima da mediana do grupo e a mais próxima da média.

Das seis pacientes com densidade acima da média do grupo de material elástico pré-tratamento, cinco apresentaram diminuição. A única paciente que apresentou ganho (“patient 10” ou P10) possuía densidade próxima a média do grupo (valor = $18.081/100.000\mu\text{m}^2$) e apresentou ganho de 9,14%, o menor ganho de todo o grupo.

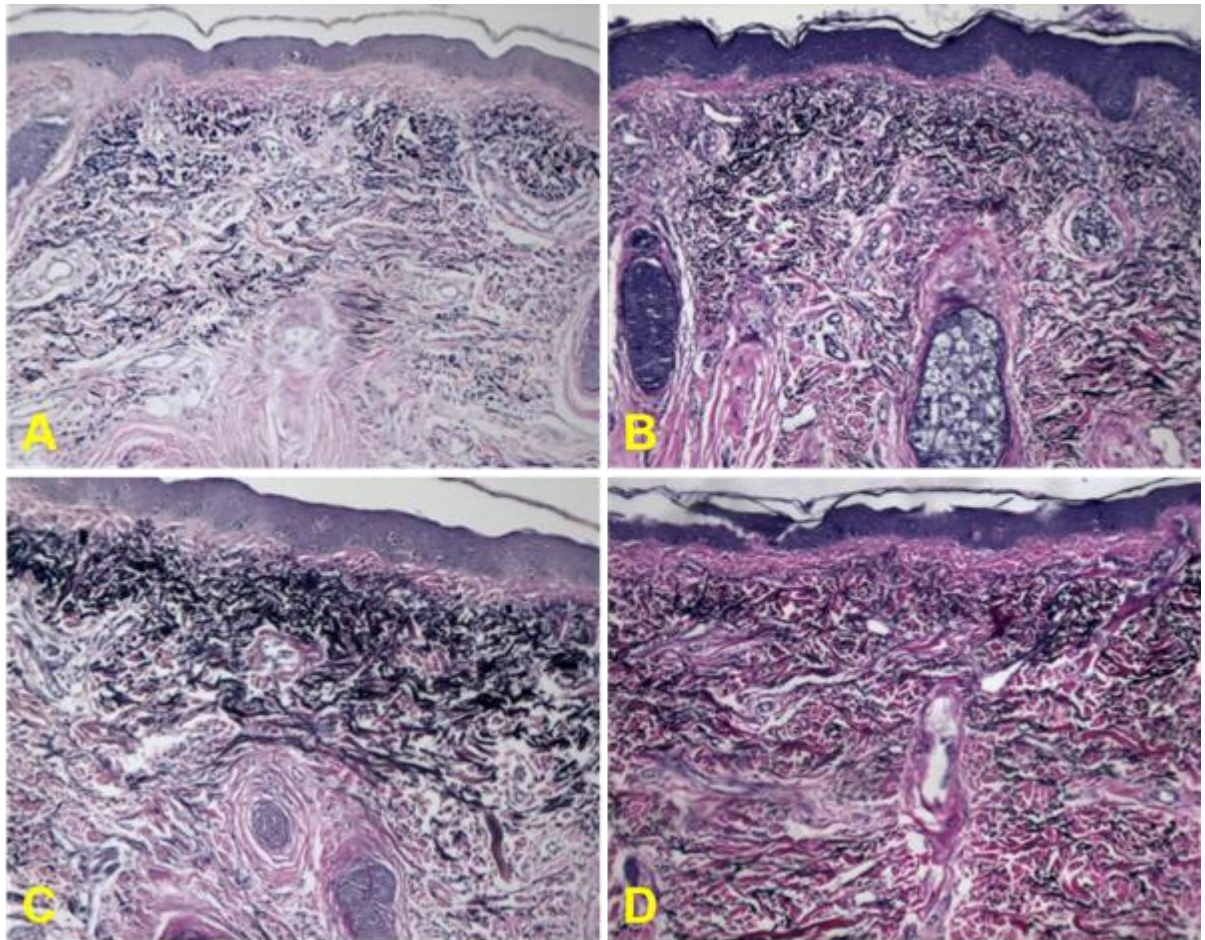
Esses valores e os números de cada paciente, presentes no artigo De Mendonça e outros (2018) e estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Análise comparativa de ganho e perda da quantidade de fibras elásticas das amostras obtidas antes e depois do tratamento

Melhora clínica acentuada		Concentração de fibras elásticas nas amostras $< 17.382/100.000 \mu\text{m}^2$		Concentração de fibras elásticas nas amostras $> 17.382/100.000 \mu\text{m}^2$		Total n (%)
		Ganho n (%)	Perda n (%)	Ganho n (%)	Perda n (%)	
Sim (I)	9	4 (28,57)	1 (7,14)	1 (7,14)	3 (21,42)	9 (64,28)
Não (II)	5	3 (21,42)	0	0	2 (14,28)	5 (35,71)
Total	14	7 (50)	1 (7,14)	1 (7,14)	5 (35,71)	14 (100,00)

Na Figura 4 estão apresentados dois exemplos: paciente 1 (P1) do grupo que apresentava concentração abaixo da média de fibras elásticas mensuradas pela morfometria automática na coloração Verhoeff e Paciente 8 (P8) do grupo que apresentava concentração acima da média do grupo dessas fibras (Figura 4).

Figura 4 – Amostras obtidas a partir das biópsias antes e após tratamento (P1 e P8)



Notas: Fotomicrografia. Coloração histoquímica Verhoeff. Aumento original 100x.

Paciente 1 do grupo abaixo da média e com ganho de 152,70% (A) antes e (B) depois do tratamento.

Paciente 8 do grupo acima da média e com perda de 27,05% (C) antes e (D) depois do tratamento.

Fonte: A autora, 2018

Ao compararmos as concentrações de fibras colágenas e elásticas presentes nas amostras pré-tratamento, nota-se que das oito pacientes que apresentaram concentração de fibras colágenas abaixo da média do grupo, seis apresentaram concentração de fibras elásticas acima da média. De forma interessante, das seis pacientes que apresentaram concentração acima da média do grupo de fibras colágenas, todas apresentaram concentração abaixo da média do grupo para fibras elásticas (Quadro 1).

Quadro 1 – Comparação entre a quantidade de fibras colágenas (HE) e elásticas (Verhoeff)

	Concentração de fibras elásticas abaixo da média do grupo (n)	Concentração de fibras elásticas acima da média do grupo (n)
Concentração de fibras colágenas abaixo da média do grupo	2 P9, P15	6 P2, 6, 8, 10, 13, 17
Concentração de fibras colágenas acima da média do grupo	6 P1, 4, 5, 7, 11, 12,	0

Fonte: DE MENDONÇA et al., 2018

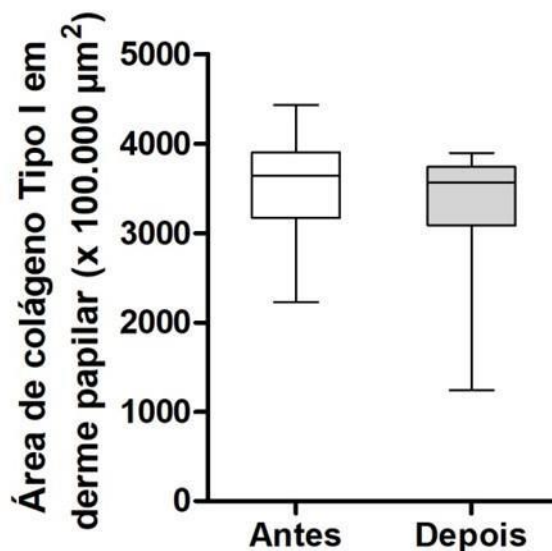
6.3 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DAS FIBRAS COLÁGENAS EM COLORAÇÃO HISTOQUÍMICA (*picrosirius red*)

A partir dos dados obtidos na avaliação histomorfométrica automática, foram feitas médias aritméticas da derme papilar, da derme reticular separadamente e da soma das duas, tanto nos cortes histológicos de biópsias prévias quanto nos cortes histológicos de biópsias após o tratamento. Os dados paramétricos obtidos a partir das análises histoquímicas antes e depois da técnica do *peeling* de fenol pontuado foram expressos em mediana e valores mínimos e máximos e comparados de forma pareada pelo teste de “t”. Todas as amostras passaram no teste de normalidade.

6.3.1 Histomorfometria das fibras colágenas Tipo I

Na derme papilar, antes do tratamento, o valor mínimo foi de 2.229/100.000 μm^2 , o valor máximo foi de 4.430/100.000 μm^2 com desvio padrão de 641,9 μm^2 e mediana de 3.641/100.000 μm^2 . Após o tratamento o valor mínimo atingiu 1.245/100.000 μm^2 e o valor máximo atingiu 3.896/100.000 μm^2 com desvio padrão de 700,6 μm^2 e mediana de 3.563/100.000 μm^2 . Comparando-se esses dados foi aplicado o Teste “t” para amostras pareadas que mostrou $p = 0,50$ (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Quantificação da área preenchida por fibras colágenas Tipo I em derme papilar



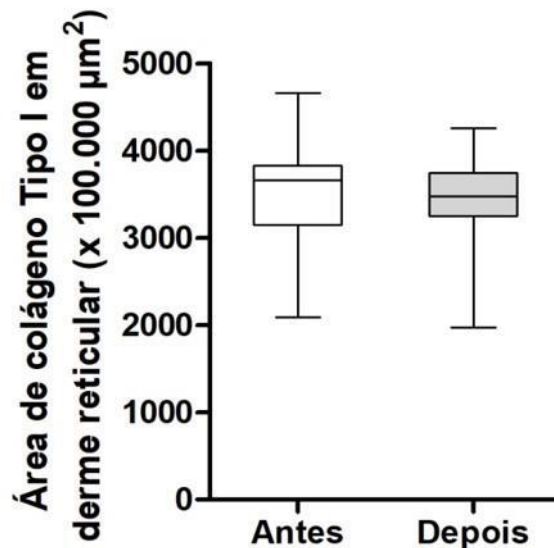
Notas: Resultados expressos em μm^2 .
 Antes (mediana = 3.641 \pm SD 641,9).
 Depois (mediana = 3.563 \pm 700,6).
 ($p = 0,50$)

Fonte: A autora, 2018

Na derme reticular, antes do tratamento o valor mínimo foi de 2.089/100.000 μm^2 , o valor máximo foi de 4.662/100.000 μm^2 com desvio padrão de 655,2 μm^2 e mediana de 3.665/100.000 μm^2 . Após o tratamento o valor mínimo atingiu 1.975/100.000 μm^2 e o valor máximo atingiu 4.260/100.000 μm^2 com desvio

padrão de $581,4\mu\text{m}^2$ e mediana de $3.472/100.000\mu\text{m}^2$. Comparando-se esses dados foi aplicado o Teste “t” para amostras pareadas que mostrou $p = 0,71$ (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Quantificação da área preenchida por fibras colágenas Tipo I em derme reticular (n = 14)

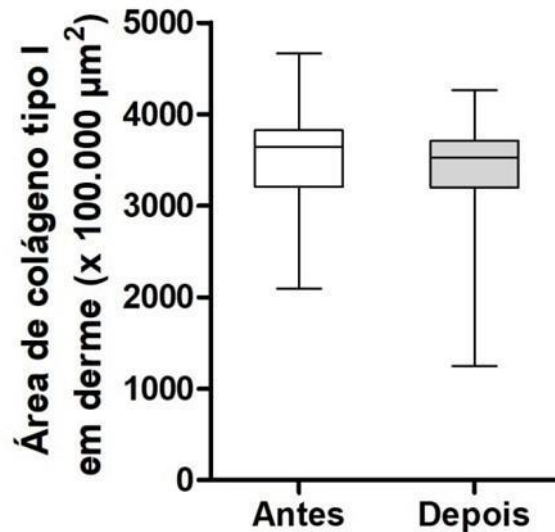


Notas: Resultados expressos em μm^2 .
 Antes (mediana = $3.665 \pm \text{SD } 655,2$).
 Depois (mediana = $3.472 \pm 581,4$)
 ($p = 0,71$)

Fonte: A autora, 2018

A soma das fibras colágenas Tipo I na derme papilar e derme reticular, antes do tratamento, teve o valor mínimo de $2.089/100.000\mu\text{m}^2$ e o valor máximo foi de $4.662/100.000\mu\text{m}^2$, com desvio padrão de $637,0\mu\text{m}^2$ e mediana de $3.641/100.000\mu\text{m}^2$. Após o tratamento o valor mínimo atingiu $1.245/100.000\mu\text{m}^2$ e o valor máximo atingiu $4.260/100.000\mu\text{m}^2$ com desvio padrão de $633,9\mu\text{m}^2$ e mediana de $3.522/100.000\mu\text{m}^2$. Comparando-se esses dados foi aplicado o Teste “t” para amostras pareadas que mostrou $p = 0,43$ (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Quantificação da área preenchida por fibras colágenas Tipo I em derme papilar e reticular (n = 14)



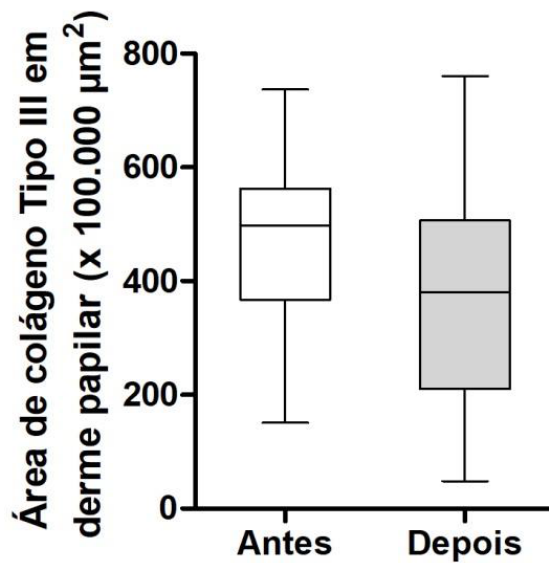
Notas: Resultados expressos em μm^2 .
 Antes (mediana = $3.641 \pm \text{SD } 637,0$).
 Depois (mediana = $3.522 \pm \text{SD } 633,9$).
 ($p = 0,43$)

Fonte: A autora, 2018

6.3.2 Histomorfometria de fibras colágenas Tipo III

Na derme papilar, antes do tratamento, o valor mínimo foi de $150,9/100.000\mu\text{m}^2$, o valor máximo foi de $737,1/100.000\mu\text{m}^2$ com desvio padrão de $168,2\mu\text{m}^2$ e mediana de $498,1/100.000\mu\text{m}^2$. Após o tratamento o valor mínimo atingiu $48,28/100.000\mu\text{m}^2$ e o valor máximo atingiu $760,5/100.000\mu\text{m}^2$ com desvio padrão de $189,9\mu\text{m}^2$ e mediana de $380,4/100.000\mu\text{m}^2$. Comparando-se esses dados foi aplicado o Teste “t” para amostras pareadas que mostrou $p = 0,13$ (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Quantificação da área preenchida por fibras colágenas Tipo III em derme papilar (n = 14)

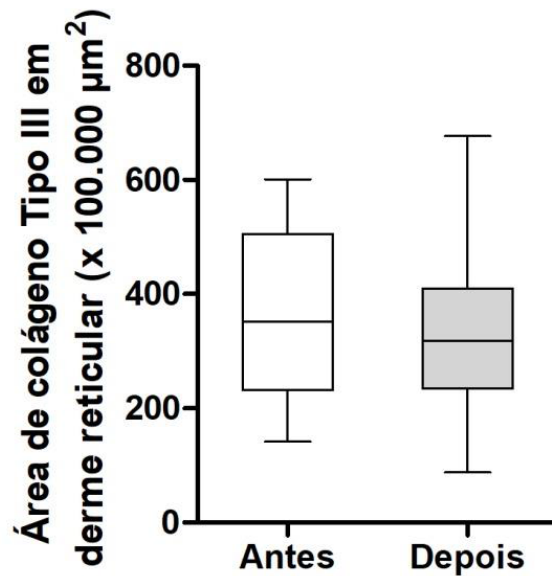


Notas: Resultados expressos em μm^2 .
 Antes (mediana = 498,1 \pm SD 168,2).
 Depois (mediana = 380,4 \pm SD 189,9).
 ($p = 0,13$).

Fonte: A autora, 2018

Na derme reticular, antes do tratamento, o valor mínimo foi de 141,6/100.000 μm^2 , o valor máximo foi de 600,7/100.000 μm^2 com desvio padrão de 152,6 μm^2 e mediana de 352,0/100.000 μm^2 . Após o tratamento o valor mínimo atingiu 87,86/100.000 μm^2 e o valor máximo atingiu 677,1/100.000 μm^2 com desvio padrão de 137,9 μm^2 e mediana de 317,6/100.000 μm^2 . Comparando-se esses dados foi aplicado o Teste “t” para amostras pareadas que mostrou $p = 0,55$ (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Quantificação da área preenchida por fibras colágenas Tipo III em derme reticular (n = 14)

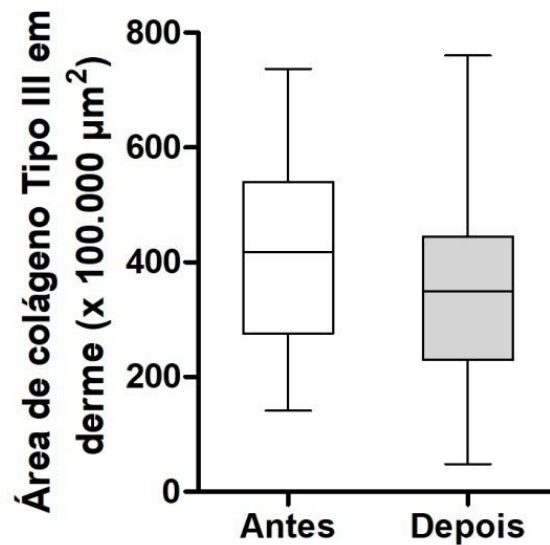


Notas: Resultados expressos em μm^2 .
 Antes (mediana = $352,0 \pm \text{SD } 152,6$).
 Depois (mediana = $317,6 \pm \text{SD } 137,9$).
 ($p = 0,55$)

Fonte: A autora, 2018

A soma das fibras colágenas Tipo III na derme papilar e derme reticular, antes do tratamento, teve o valor mínimo de $141,6/100.000\mu\text{m}^2$ e o valor máximo foi de $737,1/100.000\mu\text{m}^2$ com desvio padrão de $164,2\mu\text{m}^2$ e mediana de $417,8/100.000\mu\text{m}^2$. Após o tratamento o valor mínimo atingiu $48,28/100.000\mu\text{m}^2$ e o valor máximo atingiu $760,5/100.000\mu\text{m}^2$ com desvio padrão de $164,0\mu\text{m}^2$ e mediana de $348,9/100.000\mu\text{m}^2$. Comparando-se esses dados foi aplicado o Teste “t” para amostras pareadas que mostrou $p = 0,13$ (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Quantificação da área preenchida por fibras colágenas Tipo III em derme papilar e reticular (n = 14)

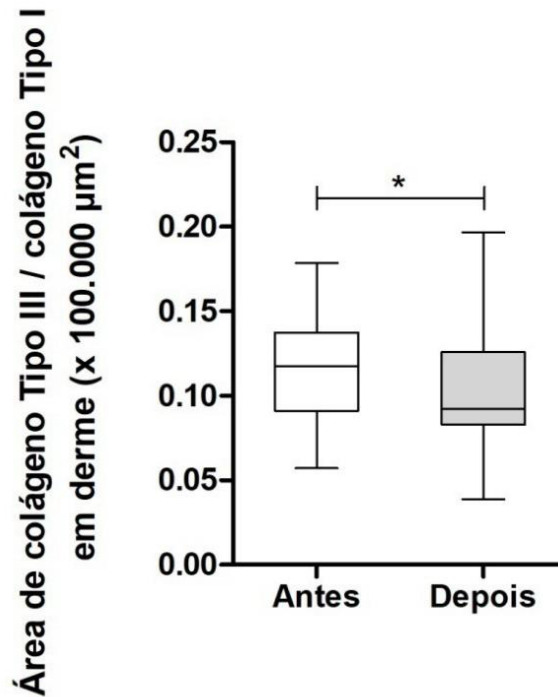


Notas: Resultados expressos em μm^2 .
Antes (mediana = $417,2 \pm \text{SD } 164,2$).
Depois (mediana = $348,9 \pm \text{SD } 164,0$).
($p = 0,13$)

Fonte: A autora

Quando comparamos os resultados de fibras colágenas Tipo I e Tipo III com o *peeling* de fenol pontuado e aplicamos o teste de Mann-Whitney para variáveis independentes, foi encontrado o valor de $p = 0,032$ como demonstrado no Gráfico 7.

Gráfico 7 – Correlação da quantificação da área preenchida por fibras colágenas Tipo III / Tipo I em derme papilar e reticular (n = 14)



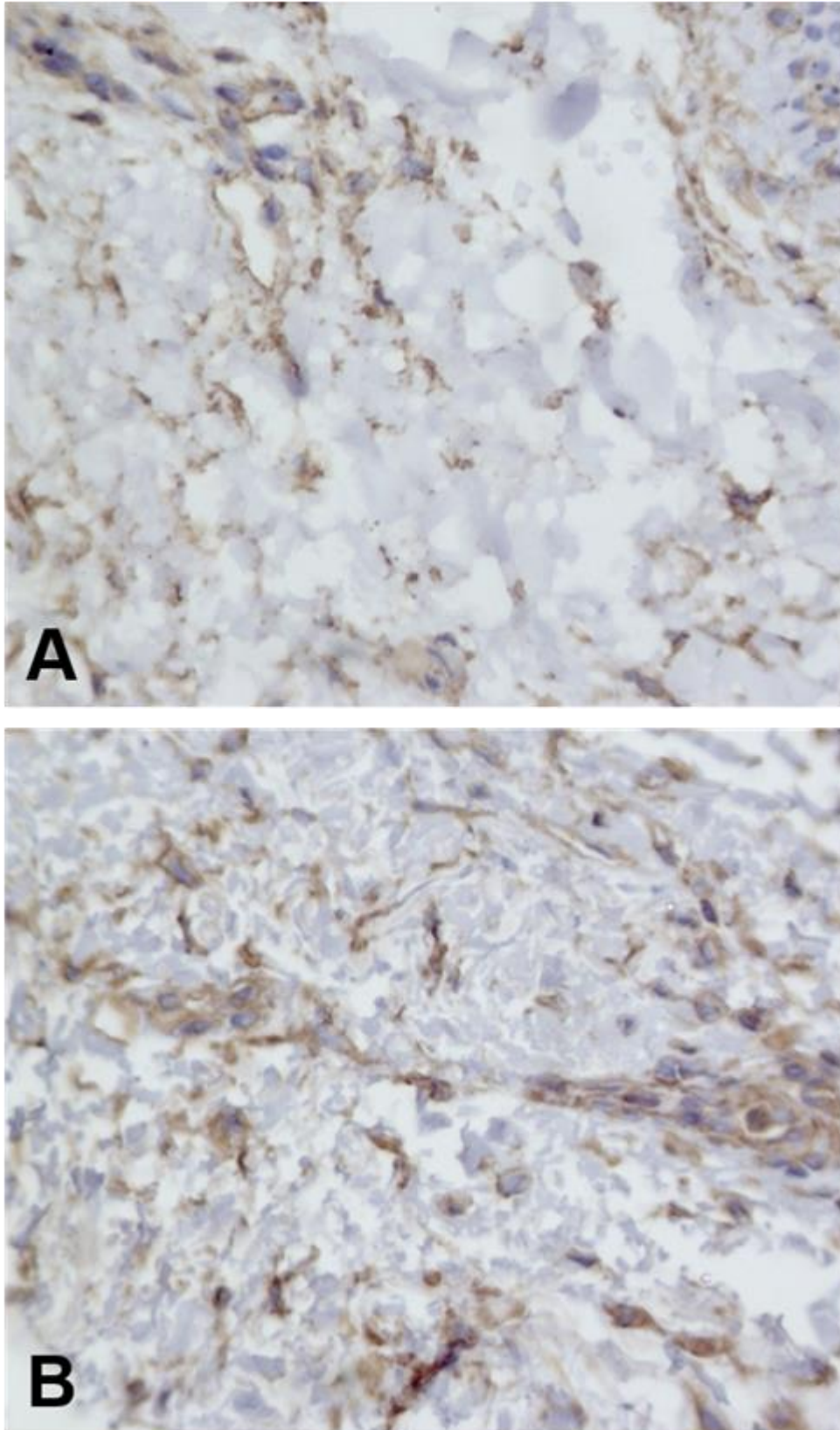
Notas: Resultados expressos em μm^2 .
 Antes (mediana = 0,102 \pm SD 0,059).
 Depois (mediana = 0,089 \pm SD 0,051)
 ($p = 0,032$)

Fonte: A autora, 2018

6.4 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS (VIMENTINA)

Foram realizadas a captação e digitalização das imagens com marcação de células com expressão positiva para vimentina e a execução da morfometria semiautomática em todos os campos digitalizados dos cortes utilizados (Figura 5).

Figura 5 – Amostras obtidas a partir das biópsias antes e após tratamento

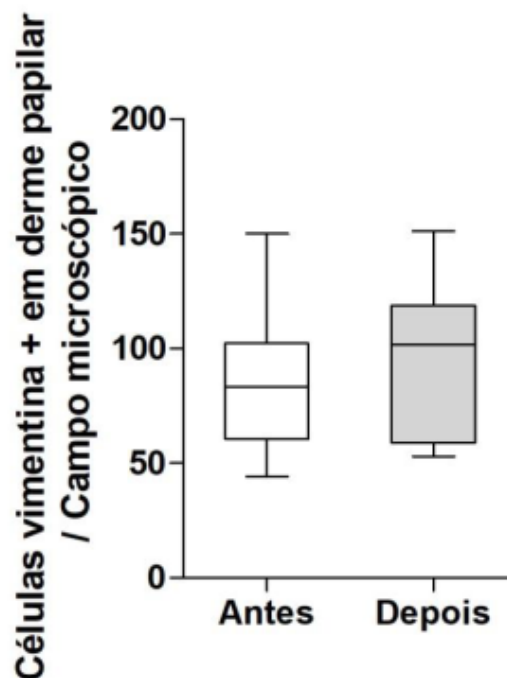


Notas: A – antes; B – depois. Fotomicrografia. Coloração Imuno-histoquímica (vimentina). Aumento original 400x. Marcação de células com expressão positiva para vimentina na cor castanha.
Fonte: A autora, 2018

Foram feitas médias aritméticas das células marcadas na derme papilar, na derme reticular e em ambas, tanto nos cortes histológicos de biópsias prévias quanto nos cortes histológicos de biópsias após o tratamento. Os dados não paramétricos obtidos a partir das análises imuno-histoquímicas antes e depois da técnica do *peeling* de fenol pontuado foram expressos em mediana e valores mínimos e máximos e comparados de forma pareada pelo teste de Wilcoxon. As amostras passaram no teste de normalidade.

Na derme papilar, antes do tratamento o valor mínimo foi de 44,33 células/campo microscópico e o valor máximo foi de 150 células/campo microscópico com desvio padrão de 28,4 e mediana de 83,4 células/campo microscópico. Após o tratamento o valor mínimo atingiu 53 células/campo microscópico e o valor máximo atingiu 151 células/campo microscópico com desvio padrão de 34,25 e mediana de 101,5 células/campo microscópico. Comparando-se esses dados foi aplicado o Teste de Wilcoxon que mostrou $p = 0,29$ (Gráfico 8).

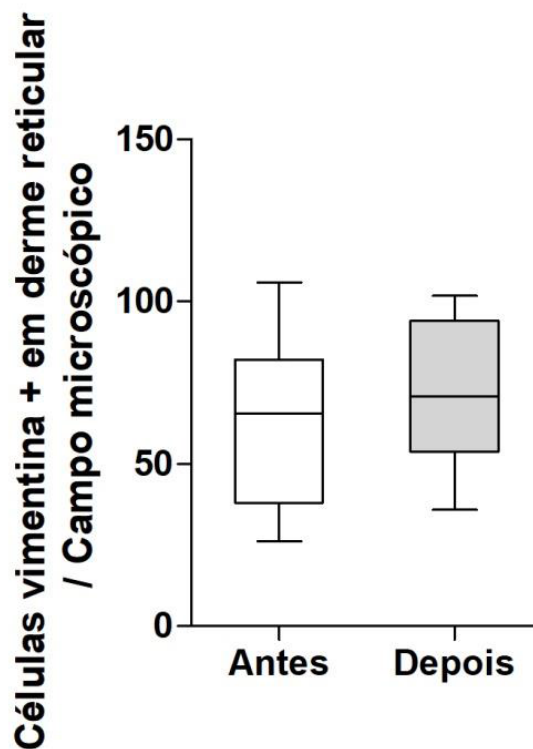
Gráfico 8 – Quantificação da celularidade mesenquimal com expressão positiva para vimentina na derme papilar por imuno-histoquímica (n = 14)



Notas: Antes (mediana = 83,4 ± SD 28,2).
Depois (mediana = 101,5 ± SD 34,25).
($p = 0,29$)

Na derme reticular, antes do tratamento o valor mínimo foi de 26 células/campo microscópico e o valor máximo foi de 105,8 células/campo microscópico com desvio padrão de 25,07 e mediana de 65,6 células/campo microscópico. Após o tratamento o valor mínimo atingiu 35,8 células/campo microscópico e o valor máximo atingiu 101,8 células/campo microscópico com desvio padrão de 21,92 e mediana de 70,70 células/campo microscópico. Comparando-se esses dados foi aplicado o Teste de Wilcoxon que mostrou $p = 0,24$ (Gráfico 9).

Gráfico 9 – Quantificação da celularidade mesenquimal com expressão positiva para vimentina na derme reticular por imuno-histoquímica (n = 14)



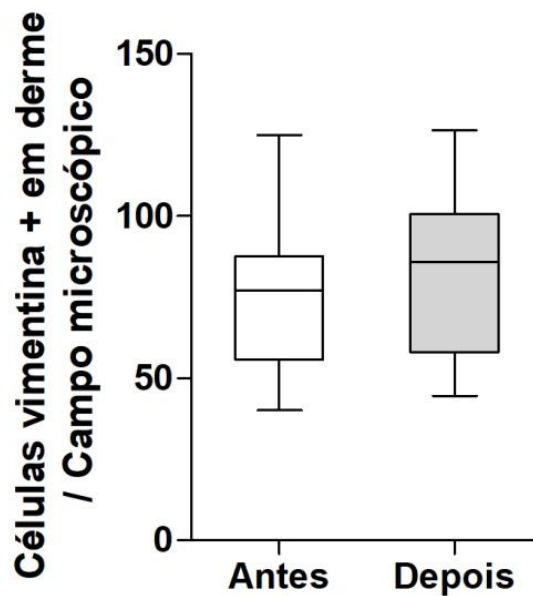
Notas: Antes (mediana = 65,6 ± SD 25,07).
 Depois (mediana = 70,7 ± SD 21,92).
 ($p = 0,24$)

Fonte: A autora, 2018

A soma das médias da derme papilar com a derme reticular teve, antes do tratamento o valor mínimo de 40,04 células/campo microscópico e o valor máximo de 124,9 células/campo microscópico com desvio padrão de 24,86 e mediana de

77,07 células/campo microscópico. Após o tratamento o valor mínimo atingiu 44,6 células/campo microscópico e o valor máximo atingiu 126,5 células/campo microscópico com desvio padrão de 26,06 e mediana de 85,95 células/campo microscópico. Comparando-se esses dados foi aplicado o Teste de Wilcoxon que mostrou $p = 0,25$ (Gráfico 10).

Gráfico 10 – Quantificação da celularidade mesenquimal com expressão positiva para vimentina na derme papilar e reticular por imuno-histoquímica (n =14)



Notas: Antes (mediana = 77,07 \pm SD 24,86).
 Depois (mediana = 85,95 \pm SD 26,06).
 ($p = 0,25$)

Fonte: A autora, 2018

Ao individualizarmos os resultados, separando cada paciente com suas médias de derme papilar e derme reticular antes e depois do tratamento, temos que das 14 pacientes, 9 (64,28%) mostraram aumento do número de células com expressão positiva para vimentina (Tabela 3).

Tabela 3 – Médias aritméticas do número de células por campo microscópico em derme papilar e derme reticular de cada paciente (n = 14)

Pacientes	Antes	Depois
P1	101,10	126,50
P2	40,04	85,10
P4	83,00	56,38
P5	43,75	58,60
P6	107,60	120,50
P7	74,53	50,04
P8	47,70	44,60
P9	124,90	86,80
P10	63,90	60,40
P11	84,30	117,70
P12	58,48	97,63
P13	82,30	93,80
P15	83,00	103,90
P17	82,70	118,70

Fonte: A autora, 2018

7 DISCUSSÃO

Os *peelings* químicos, principalmente o *peeling* de fenol, representam uma boa opção para tratamento do fotoenvelhecimento facial, muitas vezes provocando o adiamento de intervenções cirúrgicas (FABBROCINI; DE PADOVA; TOSTI, 2009). Embora novas técnicas tenham sido introduzidas nessas últimas décadas como os *lasers* ablativos, essas técnicas são muito dolorosas, necessitam sedação em ambiente hospitalar para sua realização e requerem tempo prolongado para recuperação (BRIGHTMAN et al., 2009; PRIGNANO et al., 2009).

Para que uma modalidade terapêutica se torne aceitável, ela deve oferecer vantagens significativas em relação aos tratamentos disponíveis. A introdução do princípio do fracionamento dos *lasers* à técnica do *peeling* de fenol, desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa, cuja técnica foi denominada de “*Peeling* de Fenol Pontuado” se mostrou eficaz sob o ponto de vista clínico, com perfil de segurança para ser realizado em ambiente ambulatorial e de baixo custo (DE MENDONÇA, 2013; DE MENDONÇA et al., 2018; DE MENDONÇA; AARESTRUP, F. M.; AARESTRUP, B. J. V., 2012). Segundo Brody (2018), ao comentar o artigo recém-publicado, declara que “as fotografias clínicas demonstram melhora suficiente para se adicionar essa técnica à literatura” (BRODY, 2018, p. 248).

Na literatura, vários trabalhos demonstram a eficácia do *peeling* de fenol aplicado em toda face com a fórmula de Baker & Gordon (FABBROCINI; DE PADOVA; TOSTI, 2009; FISCHER et al., 2010). Em estudos que compararam, *in vivo*, a ação do laser ablativo de CO₂ com o *peeling* de fenol, segundo a fórmula de Baker & Gordon, o *peeling* de fenol demonstrou maior penetração, atingindo até a derme reticular (LANGSDON; MILBURN; YARBER, 2000). Ambas as técnicas demonstraram efetividade porém, também apresentaram longos períodos de desconforto e eritema pós-operatório (LANGSDON; MILBURN; YARBER, 2000; MOY; KOTLER; LESSER, 1999).

Pesquisas desenvolvidas em nosso grupo de pesquisa com a técnica inédita da aplicação de fenol 88%, de forma pontuada, demonstraram além de importante melhora clínica, resultados histopatológicos positivos como reorganização do colágeno, diminuição da fragmentação e reorganização das fibras elásticas (DE MENDONÇA et al., 2018; DE MENDONÇA; AARESTRUP, F. M.; AARESTRUP, B.

J. V., 2012). Segundo Monheit (2012), citando o primeiro artigo (DE MENDONÇA; AARESTRUP, F. M.; AARESTRUP, B. J. V., 2012), “a histopatologia confirma a produção de colágeno e o espessamento de derme superior, devendo (a técnica proposta) ser adicionada à prática clínica, como importante instrumento terapêutico não cirúrgico para o fotoenvelhecimento facial.” (MONHEIT, 2012, p. 2015).

Os resultados do presente estudo reforçam as evidências de que o tratamento proposto modifica favoravelmente as características histológicas da derme fotoenvelhecida. Frances e outros, já em 1990, ao realizar a análise morfométrica das fibras elásticas da pele normal de acordo com idade, demonstrou haver uma perda quantitativa de fibras elásticas em torno de 30% por volta da quinta década de vida. Estes autores utilizaram em seu estudo a mesma metodologia de quantificação que apresentamos, porém, de modo interessante, ele salienta de modo preciso que a histomorfometria não é capaz de distinguir o material elástico não funcional das fibras elásticas funcionais (oxitalânicas, eulanínicas e maduras) (FRANCES et al., 1990).

Tendo este aspecto em mente, para desenvolvimento deste trabalho, foi realizada avaliação qualitativa das fibras nos cortes histológicos de pele. Foi observado que, das amostras de 17 pacientes (participantes do estudo publicado em fevereiro de 2018), 15 pacientes (88,23%) apresentaram reorganização e 14 pacientes (82,35%) apresentaram redução da fragmentação de fibras elásticas e, ainda nesse artigo foi demonstrado que 12 (70,58%) das 17 pacientes também mostraram reorganização das fibras colágenas quando analisadas pela coloração de rotina (DE MENDONÇA et al., 2018).

Existem autores que demonstram haver uma relação inversa entre a quantidade de áreas coradas de colágeno e áreas coradas para material elástico nas peles fotoexpostas (EL-DOMYATI et al., 2002; KAWABATA et al., 2014).

El-Domyati e outros (2002) analisaram 83 biópsias de pele fotoexposta e compararam as proporções e qualidade das fibras da derme com amostras provenientes de pele de pacientes voluntários saudáveis, sem exposição à radiação solar, abrangendo idade de 6 a 84 anos. Os autores concluíram que a elastina depositada na derme fotoexposta era morfologicamente anormal e, proporcionalmente, ocupava as áreas de colágeno perdido (EL-DOMYATI et al., 2002).

Kawabata e outros (2014) realizaram avaliação histoquímica e imuno-histoquímica para avaliar, respectivamente, alterações em fibras de colágeno e expressão da decorina, proteína que modula a fibrilogênese do colágeno. Os autores analisaram 34 amostras histológicas de pele do rosto e os resultados demonstraram alteração inicial das fibras elásticas na derme profunda e ausência de expressão da decorina naquelas amostras provenientes de peles gravemente alteradas (KAWABATA et al., 2014).

Weiherrmann e outros (2017) sugerem que embora haja um aparente ganho de material elástico na elastose, o que se observa é uma redução na produção de fibras elásticas funcionais e um aumento da produção de material elástico não funcional.

Nossos resultados corroboram essa relação inversa, pois as pacientes que possuíam as maiores concentrações de material elástico também possuíam concentrações baixas de material colágeno e, de modo interessante, as pacientes que apresentaram as maiores concentrações de material colágeno, apresentaram baixa concentração de material elástico.

Porém, a relação entre a diminuição da quantidade de colágeno e as mudanças morfológicas das fibras elásticas observadas no fotodano não estão bem estabelecidas (KAWABATA et al., 2014).

Em nosso estudo, após o tratamento, foi observada mudança de comportamento das fibras colágenas e elásticas. As pacientes que possuíam as maiores concentrações de material elástico e, também, as menores concentrações de material colágeno, apresentaram uma inversão nessas concentrações, apresentando ganho de material colágeno e perda na quantidade de material elástico, demonstrando um provável ganho na qualidade dessas fibras.

Em 2013, Sachs e outros publicaram um estudo onde foi demonstrado que a menor concentração de colágeno antes do tratamento pode ser fator de melhor resposta a produção de colágeno Tipo I, principal fibra colágena constituinte da derme e que diminui à medida que ocorre o envelhecimento (SACHS et al., 2013).

Resultado semelhante foi observado nas amostras do presente trabalho, visto que das oito pacientes que apresentavam as menores concentrações de colágeno antes do tratamento, sete exibiram aumento dessa concentração, sendo

que seis delas apresentaram melhora clínica expressiva (DE MENDONÇA et al., 2018).

Diversos estudos sobre o envelhecimento da pele demonstram haver diferenças entre o envelhecimento biológico ou intrínseco e o envelhecimento extrínseco ou fotoenvelhecimento, este último encontrado em áreas foto expostas, como a face (CONTET-AUDONNEAU; JEANMAIRE; PAULY, 1999; FARAGE et al., 2008).

Microscopicamente, no envelhecimento cronológico há uma mudança de proporção entre os colágenos Tipos I e III, com diminuição de fibras colágenas Tipo I (BAUMANN, 2007). À medida que a pele envelhece, há uma menor produção e uma maior degradação do colágeno Tipo I, aumentando a razão entre colágeno Tipo III e colágeno Tipo I (HUMBERT et al., 2012; LOVELL et al., 1987).

Nas amostras deste estudo, não foram observadas diferenças relevantes na quantificação das fibras colágenas Tipo III e Tipo I, de forma isolada, em comparação antes e após o tratamento. Porém, ao analisarmos a relação entre colágeno Tipo III e colágeno Tipo I, observamos que tal diferença diminui significativamente após o tratamento com *peeling* de fenol pontuado, sugerindo que este fenômeno ocorra provavelmente por ganho de colágeno Tipo I e diminuição de fibras colágenas Tipo III. Essa relação, segundo Wulf e outros (2004), encontra-se aumentada em peles fotoexpostas quando comparada a peles não fotoexpostas.

El-Domyati e outros (2011) analisaram os efeitos da radiofrequência monopolar em seis voluntárias como proposta de terapêutica não-ablativa para o tratamento do envelhecimento facial. Os mesmos autores, em 2013, analisaram as diferenças entre o laser ablativo (sessão única) e o laser ablativo fracionado (quatro sessões), em seis voluntárias por grupo. Foram obtidas amostras de pele para análise microscópica e os resultados demonstraram aumento de fibras colágenas Tipo I e Tipo III após um mês do tratamento em ambos os trabalhos (EL-DOMYATI et al., 2011, 2013). Ainda, os autores citam como fator limitador da pesquisa o pequeno número de pacientes, mas destacam a boa resposta terapêutica e a relevância da análise histopatológica. Ressaltamos que na metodologia proposta por El-Domyati e outros (2011, 2013) não foi realizada avaliação de possíveis alterações na relação entre o colágeno Tipo III e Tipo I.

Além das alterações entre as proporções de fibras, a comparação quantitativa das células da derme com expressão positiva para a vimentina, antes e

depois do tratamento com o fenol pontuado revelou dados interessantes. O aumento da quantidade de células mesenquimais quando comparamos cada indivíduo antes e depois do tratamento foi observado em 64,28% das amostras.

Shin e outros (2014), com o objetivo de identificar possíveis biomarcadores de envelhecimento, realizaram análise proteômica com o objetivo de identificar proteínas expressas em células endoteliais microvasculares dérmicas humanas (HDMEC) tratadas com luz ultravioleta (UV) ou intensa pulsada (IPL). Os autores destacaram, diante dos resultados, que a vimentina é um marcador útil para a senescência celular, bem como para avaliar o nível de envelhecimento. Ainda, destacam de modo interessante que o estímulo à expressão da vimentina pode representar um alvo para o tratamento do envelhecimento da pele (SHIN et al., 2014).

Cao e outros (2011) demonstraram, em cultura de fibroblastos, boa resposta metabólica destas células, com aumento da produção de fibras colágenas Tipos I e III, quando submetidas à luz intensa pulsada. Nas amostras do presente trabalho, o aumento da quantidade de células mesenquimais pós tratamento, somado à mudança no perfil de fibras da matriz extracelular, sugere que a aplicação do fenol de forma pontuada pode não só estimular maior celularidade mesenquimal, mas também influenciar a síntese proteica das mesmas.

Park e outros (2013), realizaram trabalho experimental em 20 camundongos fêmeas (Skh: HR-1) com o objetivo de avaliar o papel da terapia fotodinâmica no tratamento do fotoenvelhecimento. Os autores observaram, nas amostras não tratadas, que alterações estruturais no retículo endoplasmático de fibroblastos da derme levaram à diminuição da produção de colágeno por estas células e que, por outro lado, a terapêutica proposta atuou sobre essas alterações normalizando a produção de colágeno.

Apesar de dados obtidos a partir de trabalhos experimentais possibilitarem amostras mais homogêneas e permitirem maior controle das condições de pesquisa (DE SICA et al., 2016; EL-DOMYATI et al., 2016; MEZZANA; VALERIANI, 2007; PARK et al., 2013; SUN et al., 2018), destacamos que em estudos clínicos temos a oportunidade de verificar as alterações cutâneas *in vivo*. Em nossa pesquisa o número de voluntárias foi equivalente a maioria dos artigos publicados para tratamento do fotoenvelhecimento facial (EL-DOMYATI et al., 2011, 2013; GONSER et al., 2017; LANGSDON; MILBURN; YARBER, 2000; MOY;

KOTLER; LESSER, 1999). A técnica foi executada em toda a face, possibilitando, com isso, correlacionar a melhora clínica com as modificações histopatológicas da pele fotoenvelhecida tratada, comparando as análises das pacientes de modo individualizado e como grupo amostral. Na microscopia, do ponto de vista histomorfométrico, verificou-se um aumento quantitativo de fibras colágenas Tipo I e maior celularidade mesenquimal e, do ponto de vista morfológico, houve uma substituição de material elastótico por material elástico funcional, através da diminuição da fragmentação e reorganização de fibras elásticas.

Tierney e Hanke fizeram, a partir do Medline (2010), uma revisão da literatura sobre os recentes avanços para tratamento do fotoenvelhecimento com terapias combinadas. Os autores coletaram 24 artigos, sendo ensaios clínicos com voluntários, sendo que em apenas 10 incluíam abordagem histológica. Desses artigos, nenhum deles empregou o *peeling* de fenol como parte da terapêutica combinada. Apenas um artigo utilizou a técnica do *peeling químico* (*peeling* de ácido retinóico 5%) associado a microdermoabrasão. Nesse artigo, três pacientes se submeteram a três sessões de microdermoabrasão seguidas do *peeling* e três pacientes se submeteram somente ao *peeling* de ácido retinóico 5% isoladamente. Houve correspondência clínica e histológica com resposta semelhante nos dois grupos (HEXSEL et al., 2005; TIERNEY; HANKE, 2010).

Os autores Tierney e Hanke ainda destacam, nesse artigo, haver uma demanda cada vez maior por parte dos pacientes por tratamentos que envolvam menores riscos, recuperação rápida, mas ainda com eficácia. Nesse raciocínio de otimizar os tratamentos, as terapias combinadas vem ganhando mais força a cada dia, procurando combinar técnicas que visem aumentar a eficiência sem aumentar os riscos (TIERNEY; HANKE, 2010).

Desta forma, podemos sugerir que o *peeling* de fenol pontuado deve ser considerado como uma técnica a ser combinada a outras terapias, por sua simplicidade na execução, eficácia clínica, baixo custo e segurança.

8 CONCLUSÕES

O *peeling* de fenol pontuado é efetivo no tratamento do fotoenvelhecimento facial.

A melhora clínica proporcionada pelo *peeling* de fenol pontuado está relacionada: (1) ao aumento do número de células de origem mesenquimal presentes na derme, muitas delas, responsáveis por uma resposta positiva no ganho de fibras colágenas Tipo I quando comparadas as fibras colágenas Tipo III; (2) a mudança de comportamento das fibras colágenas e elásticas, com uma inversão em suas concentrações, apresentando ganho de material colágeno e perda na quantidade de material elástico, demonstrando um provável ganho na qualidade dessas fibras.

Sendo um estudo clínico, nem todas as características histopatológicas que determinaram a resposta ao tratamento, foram observadas nas amostras de pele das pacientes ao mesmo tempo e na mesma intensidade.

Por isso, sugerimos ampliar, nessa linha de pesquisa, o trabalho, até mesmo com grupos experimentais.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, B. J. **Histologia essencial**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2012.
- AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R.; AZULAY-ABULAFIA, L. **Dermatologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2015.
- BAUMANN, L. Skin ageing and its treatment. **The Journal of Pathology**, London, v. 211, n. 2, p. 241–251, 2007.
- BINIC, I. et al. Skin Ageing: Natural Weapons and Strategies. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 2013, p. 1–10, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/827248/>>. Acesso em: 31 mar. 2018.
- BLAKAJ, A.; BUCALA, R. Fibrocytes in health and disease. **Fibrogenesis & tissue repair**, London, v. 5, p. S6, 2012. Supplement 1.
- BOLOGNIA, J. L.; JORIZZO, J. L.; SCHAFFER, J. V. **Dermatologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 jun. 2013. Seção 1, p. 59.
- BRIGHTMAN, L. A. et al. Ablative and fractional ablative lasers. **Dermatologic Clinics**, Philadelphia, v. 27, n. 4, p. 479–489, 2009.
- BRODY, H. J. Commentary on Punctuated 88% Phenol *Peeling* for the Treatment of Facial Photoaging. **Dermatologic Surgery**, Hagerstown, v. 44, n. 2, p. 248, 2018.
- BROWN, A. M.; KAPLAN, L. M.; BROWN, M. E. Phenol-induced histological skin changes: hazards, technique, and uses. **British Journal of Plastic Surgery**, Edinburgh, v. 13, p. 158–169, 1960.
- CAO, Y. et al. Effects of intense pulsed light on the biological properties and ultrastructure of skin dermal fibroblasts: potential roles in photoaging. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v. 29, n. 5, p. 327–332, 2011.

CLARK, E.; SCERRI, L. Superficial and medium-depth chemical peels. **Clinics in Dermatology**, New York, v. 26, n. 2, p. 209–218, 2008.

CONTET-AUDONNEAU, J. L.; JEANMAIRE, C.; PAULY, G. A histological study of human wrinkle structures: comparison between sun-exposed areas of the face, with or without wrinkles, and sun-protected areas. **The British Journal of Dermatology**, Oxford, v. 140, n. 6, p. 1038–1047, 1999.

DARBY, I. A. et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, Auckland, v. 7, p. 301–311, 2014.

DARBY, I. A.; HEWITSON, T. D. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. **International Review of Cytology**, New York, v. 257, p. 143–179, 2007.

DE MENDONÇA, M. C. C. **Peeling de fenol pontuado no tratamento de fotoenvelhecimento**: estudo clínico e histopatológico. 2013. 85 f. Dissertação (Mestrado em Saúde) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

DE MENDONÇA, M. C. C. et al. Punctuated 88% phenol *peeling* for the treatment of facial photoaging: a clinical and histopathological study. **Dermatologic Surgery**, Hagerstown, v. 44, n. 2, p. 241–247, 2018.

DE MENDONÇA, M. C. C.; AARESTRUP, F. M.; AARESTRUP, B. J. V. Clinical protocol for punctuated 88% phenol peels in the treatment of photoaging: a histopathological study of three cases. **Dermatologic Surgery**, New York, v. 38, n. 12, p. 2011–2015, 2012.

DE SICA, R. C. P. et al. Study of 1550-nm Erbium glass laser fractional non-ablative treatment of photoaging: Comparative clinical effects, histopathology, electron microscopy, and immunohistochemistry. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, London, v. 18, n. 4, p. 193–203, 2016.

DRISKELL, R. R. et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. **Nature**, Basingstoke, v. 504, n. 7479, p. 277–281, 2013.

EL-DOMYATI, M. et al. Forehead wrinkles: a histological and immunohistochemical evaluation. **Journal of Cosmetic Dermatology**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 188–194, 2014.

EL-DOMYATI, M. et al. Fractional versus ablative erbium:yttrium-aluminum-garnet laser resurfacing for facial rejuvenation: an objective evaluation. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 68, n. 1, p. 103–112, 2013.

- EL-DOMYATI, M. et al. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. **Experimental Dermatology**, Copenhagen, v. 11, n. 5, p. 398–405, 2002.
- EL-DOMYATI, M. et al. Microdermabrasion: a clinical, histometric, and histopathologic study. **Journal of Cosmetic Dermatology**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 503–513, 2016.
- EL-DOMYATI, M. et al. Radiofrequency facial rejuvenation: evidence-based effect. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 64, n. 3, p. 524–535, 2011.
- FABBROCINI, G.; DE PADOVA, M. P.; TOSTI, A. Chemical peels: what's new and what isn't new but still works well. **Facial plastic surgery: FPS**, New York, v. 25, n. 5, p. 329–336, 2009.
- FARAGE, M. A. et al. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 87–95, 2008.
- FARAGE, M. A. et al. Structural characteristics of the aging skin: a review. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, London, v. 26, n. 4, p. 343–357, 2007.
- FISCHER, T. C. et al. Chemical peels in aesthetic dermatology: an update 2009. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, Oxford, v. 24, n. 3, p. 281–292, 2010.
- FITZPATRICK, T. B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Archives of Dermatology**, Chicago, v. 124, n. 6, p. 869–871, 1988.
- FRANCES, C. et al. Elastic fibers in normal human skin. Variations with age: a morphometric analysis. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 57–67, 1990.
- FULTON, J. E.; PORUMB, S. Chemical peels: their place within the range of resurfacing techniques. **American Journal of Clinical Dermatology**, Auckland, v. 5, n. 3, p. 179–187, 2004.
- GATTI, J. E. Eyelid phenol peel: an important adjunct to blepharoplasty. **Annals of Plastic Surgery**, Boston, v. 60, n. 1, p. 14–18, (discussion 19- 20), 2008.
- GLOGAU, R. G. Aesthetic and anatomic analysis of the aging skin. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, Philadelphia, v. 15, n. 3, p. 134–138, 1996.

GONSER, P. et al. Histological case-control study of *peeling*-induced skin changes by different *peeling* agents in surgically subcutaneous undermined skin flaps in facelift patients. **Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery: JPRAS**, Amsterdam, v. 70, n. 11, p. 1660–1665, 2017.

HERZOG, E. L.; BUCALA, R. Fibrocytes in health and disease. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v. 38, n. 7, p. 548–556, 2010.

HETTER, G. P. An examination of the phenol-croton oil peel: Part I. Dissecting the formula. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 105, n. 1, p. 227–239, 2000.

HEXSEL, D. et al. Microdermabrasion followed by a 5% retinoid acid chemical peel vs. a 5% retinoid acid chemical peel for the treatment of photoaging - a pilot study. **Journal of Cosmetic Dermatology**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 111–116, 2005.

HINZ, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. **The Journal of Investigative Dermatology**, New York, v. 127, n. 3, p. 526–537, 2007.

HUGHES, M. C. et al. Comparison of histological measures of skin photoaging. **Dermatology (Basel, Switzerland)**, Basel, v. 223, n. 2, p. 140–151, 2011.

HUMBERT, P. et al. In the shadow of the wrinkle: theories: Aging process and wrinkle histological features. **Journal of Cosmetic Dermatology**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 72–78, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Agência de notícias. Expectativa de vida do brasileiro sobe para 75,8 anos**. 2012. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/18469-expectativa-de-vida-do-brasileiro-sobe-para-75-8-anos.html>>. Acesso em: 12 fev. 2018.

JAMES, W. D.; BERGER, T.; ELSTON, D. **Andrews' diseases of the skin: clinical dermatology - expert consult**. 12. ed. Milton: Elsevier, 2016.

JONES, M. L.; BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. Connective Tissues and Stains. In: BANCROFT, J. D. (Org.). **Theory and Practice of Histological Techniques**. 6. ed. New York: Elsevier, 2008. p. 151–153.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008.

JUNQUEIRA, L. C. U.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Archivum Histologicum Japonicum**, Okayama, v. 41, n. 3, p. 267–274, 1978.

KAWABATA, K. et al. A new objective histological scale for studying human photoaged skin. **Skin Research and Technology**, Oxford, v. 20, n. 2, p. 155–163, 2014.

LANDAU, M. Advances in deep chemical peels. **Dermatology Nursing**, Pitman, v. 17, n. 6, p. 438–441, 2005.

LANGSDON, P. R.; MILBURN, M.; YARBER, R. Comparison of the laser and phenol chemical peel in facial skin resurfacing. **Archives of Otolaryngology – Head & Neck Surgery**, Chicago, v. 126, n. 10, p. 1195–1199, 2000.

LARSON, D. L.; KARMO, F.; HETTER, G. P. Phenol-croton oil peel: establishing an animal model for scientific investigation. **Aesthetic Surgery Journal**, St. Louis, v. 29, n. 1, p. 47–53, 2009.

LEE, J. Y. et al. Loss of elastic fibers causes skin wrinkles in sun-damaged human skin. **Journal of Dermatological Science**, Amsterdam, v. 50, n. 2, p. 99–107, 2008.

LI, B.; WANG, J. H. -C. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement. **Journal of Tissue Viability**, Salisbury, v. 20, n. 4, p. 108–120, 2011.

LOVELL, C. R. et al. Type I and III collagen content and fibre distribution in normal human skin during ageing. **The British Journal of Dermatology**, Oxford, v. 117, n. 4, p. 419–428, 1987.

MEZZANA, P.; VALERIANI, M. Rejuvenation of the aging face using fractional photothermolysis and intense pulsed light: a new technique. **Acta Chirurgiae Plasticae**, Praha, v. 49, n. 2, p. 47–50, 2007.

MIRZA, R.; DIPIETRO, L. A.; KOH, T. J. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 175, n. 6, p. 2454–2462, 2009.

MONHEIT, G. D. Commentary on Clinical protocol for punctuated 88% phenol peels in the treatment of photoaging: a histopathologic study of three cases. **Dermatologic Surgery**, Hagerstown, v. 38, n. 12, p. 2015, 2012.

MONHEIT, G. D. Medium-depth chemical peels. **Dermatologic Clinics**, Philadelphia, v. 19, n. 3, p. 413–425, 2001.

MOY, L. S.; KOTLER, R.; LESSER, T. The histologic evaluation of pulsed carbon dioxide laser resurfacing versus phenol chemical peels in vivo. **Dermatologic Surgery**, New York, v. 25, n. 8, p. 597–600, 1999.

MOY, L. S.; PEACE, S.; MOY, R. L. Comparison of the effect of various chemical *peeling* agents in a mini-pig model. **Dermatologic Surgery**, New York, v. 22, n. 5, p. 429–432, 1996.

PARK, J. -Y. et al. Ultrastructural changes in photorejuvenation induced by photodynamic therapy in a photoaged mouse model. **European Journal of Dermatology**, Montrouge, v. 23, n. 4, p. 471–477, 2013.

PRIGNANO, F. et al. Fractional CO₂ laser: a novel therapeutic device upon photobiomodulation of tissue remodeling and cytokine pathway of tissue repair. **Dermatologic Therapy**, Hoboken, v. 22, p. S8-15, 2009. Supplement 1.

RABE, J. H. et al. Photoaging: mechanisms and repair. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 55, n. 1, p. 1–19, 2006.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia**: texto e atlas. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008.

SACHS, D. L. et al. Hypo-collagenesis in photoaged skin predicts response to anti-aging cosmeceuticals. **Journal of Cosmetic Dermatology**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 108–115, 2013.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 4^a. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2018.

SCHREML, S. et al. Wound healing in the 21st century. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 63, n. 5, p. 866–881, 2010.

SERRI, R.; IORIZZO, M. Combating aging skin. **Clinics in Dermatology**, New York, v. 26, n. 2, p. 105, 2008.

SHIN, J. U. et al. Altered vimentin protein expression in human dermal microvascular endothelial cells after ultraviolet or intense pulsed light treatment. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 46, n. 5, p. 431–438, 2014.

SIMPSON, R. M. L. et al. Age-related changes in pericellular hyaluronan organization leads to impaired dermal fibroblast to myofibroblast differentiation. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 175, n. 5, p. 1915–1928, 2009.

SUN, W. et al. Comparison of Moderate and High Energy of a Nano-Fractional Radiofrequency Treatment on a Photoaging Hairless Mice Model. **Dermatologic Surgery**, Hagerstown, v. 44, n. 4, p. 569–575, 2018.

TIERNEY, E. P.; HANKE, C. W. Recent advances in combination treatments for photoaging: review of the literature. **Dermatologic Surgery**, Hagerstown, v. 36, n. 6, p. 829–840, 2010.

UITTO, J. Understanding premature skin aging. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 337, n. 20, p. 1463–1465, 1997.

WALKER, G. A.; GUERRERO, I. A.; LEINWAND, L. A. Myofibroblasts: molecular crossdressers. **Current Topics in Developmental Biology**, New York, v. 51, p. 91–107, 2001.

WEIHERMANN, A. C. et al. Elastin structure and its involvement in skin photoageing. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 241–247, 2017.

WULF, H. C. et al. Skin aging and natural photoprotection. **Micron**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 185–191, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Classificação de Fitzpatrick para os tipos de pele e Gradação do Fotoenvelhecimento segundo a Classificação de Glogau

Tipos de pele segundo a Classificação de Fitzpatrick	
Fototipo I	Pele muito clara, sempre queima, nunca bronzeia (muito branca);
Fototipo II	Pele clara, sempre queima e algumas vezes bronzeia com dificuldade (branca);
Fototipo III	Queima moderadamente e se bronzeia moderada e uniformemente (morena clara);
Fototipo IV	Se queima moderadamente, sempre se bronzeia (morena, orientais);
Fototipo V	Se queima minimamente, sempre se bronzeia (morena escura);
Fototipo VI	Nunca se queima, totalmente pigmentada (negra).

Fonte: A autora, adaptado de FITZPATRICK, 1988

Gradação do fotoenvelhecimento segundo a Classificação de Glogau		
Grau I	Fotoenvelhecimento leve	Presença de ríides periorculares, sem discromias, com sulcos ausentes ou insinuados;
Grau II	Fotoenvelhecimento moderado	Presença de rugas com o movimento, discromias leves, lentigos solares e sulcos insinuados ou de pequena intensidade;
Grau III	Fotoenvelhecimento avançado	Rugas estáticas (em repouso), discromias, telangectasias e com sulcos marcados. Ceratoses visíveis
Grau IV	Fotoenvelhecimento grave	Presença de rugas estáticas e gravitacionais, discromias, com sulcos muito marcados com flacidez de pele associadas. Ceratoses e câncer de pele

Fonte: A autora, adaptado de GLOCAU, 1996

ANEXOS

ANEXO A – Parecer nº 0080/2009 do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
HOSPITAL HUNIVERSITÁRIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP-HU CAS/UFJF
RUA CATULO BREVIGLIEI S/Nº
B. SANTA CATARINA
36036-110- JUIZ DE FORA - MG – BRASIL

Parecer nº 0080/2009

Protocolo CEP-UFJF: 0080/ 09 **FR:** 272653 **CAAE:** 0065.0.420.000-09

Projeto de Pesquisa: Peeling de fenol pontuado no tratamento do fotoenvelhecimento.

Versão do Protocolo e Data: 19/05/2009

Area Temática e Fase de Desenvolvimento: Ciências da Saúde

Pesquisador Responsável: Maria Cristina Cardoso de Mendonça

TCLE: 19/05/2009

Grupo : III

Pesquisadores Participantes: Dário Júnior de Freitas Rosa;
Sâmya Diégues Cedrim;
Rogério Estevam Farias

Instituição Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Sumário/comentários do protocolo:

Justificativa: Conforme a expectativa de vida da população aumenta, as questões dermatológicas relacionadas à população mais velha detêm uma importância médica cada vez maior. As alterações estruturais intrínsecas ocorrem como consequência natural do envelhecimento e são determinadas geneticamente. O índice intrínseco de envelhecimento da pele em qualquer indivíduo também pode ser dramaticamente influenciado por fatores pessoais e ambientais, principalmente a quantidade de exposição à radiação ultravioleta. O fotodano, que acelera consideravelmente os sinais de envelhecimento da pele, também eleva fortemente o risco de neoplasias cutâneas. Outros fatores ambientais que podem influenciar acentuando o processo de fotoenvelhecimento são o vento, umidade, doenças dermatológicas, fumo, álcool, alimentação.

A incidência de lesões cutâneas induzidas pela luz do sol parece estar associada ao acúmulo de mutações nas células da pele. Tais mutações são causadas principalmente pela exposição aos raios ultravioleta. As técnicas de rejuvenescimento vêm se aperfeiçoando não apenas pelos avanços tecnológicos, mas também pela preocupação da população com a saúde e aparência física, bem como em decorrência da maior longevidade. As modificações da pele que ocorrem pelo envelhecimento intrínseco levam ao ressecamento, flacidez, alterações vasculares, rugas e diminuição da espessura da pele. Já o envelhecimento cutâneo devido à exposição ao sol conduz à degeneração de fibras elásticas e colágenas, ao aparecimento de manchas pigmentadas e à ocorrência de lesões pré-malignas ou malignas. Estudos demonstram uma correlação significativa entre as reduções em comprimento, espessura, número e área total de fibras elásticas e severidade das rugas, havendo também uma correlação positiva entre a quantidade de fibras colágenas regeneradas e a atenuação das rugas de expressão e estáticas. O fenol é um derivado do coaltar, também denominado ácido carbólico, e é formado por um odor característico e variar de incolor a rosado, tornando-se escurecido quando exposto ao ar e à luz. O fenol provoca coagulação das proteínas da pele resultando em rejuvenescimento facial intenso, quando utilizado corretamente. Na concentração de 88% penetra na derme reticular superior e é queratocoagulante, impedindo que ocorra penetração em níveis mais profundos. Quando diluído na formulação age como agente queratolítico, promovendo rompimento das pontes de enxofre da queratina e penetrando mais profundamente, sendo biotransformado no fígado e eliminado nos rins. Quanto maior a concentração do fenol na formulação, maior será a coagulação da queratina da pele, menor sua penetração e menor a toxicidade. A aplicação do fenol na pele por um período mais prolongado de tempo ocasiona sua penetração na derme superior, resultando a formação de uma nova camada de colágeno estratificado e conseqüente rejuvenescimento cutâneo. A regeneração epidérmica inicia em 48 horas após aplicação e completa no intervalo de sete a dez dias. O estudo histopatológico, utilizando inclusive colorações específicas que acentuam as fibras elásticas e colágenas, como orceína e tricrômio de

Prof.ª Dra. Anjela Maria Guilhermino
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
HU/CAS - UFJF
UFJF



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
HOSPITAL HUNIVERSITÁRIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP-HU CAS/UFJF
RUA CATULO BREVIGLIEI S/Nº
B. SANTA CATARINA
36036-110- JUIZ DE FORA - MG – BRASIL

Gomori, constitui um importante método para evidenciar as alterações dérmicas resultante da aplicação do fenol. A escolha do local de biópsia também atende um requisito importante de não causar prejuízo estético para a paciente e por isso é frequentemente realizado em rugas de regiões préauriculares ou temporais onde observa-se uma flacidez resultante do envelhecimento cronológico (que acabam por disfarçar o processo cicatricial) e as cicatrizes ficam menos evidentes, além de processos de cicatrização na face ocorrerem com menor número de complicações e da escolha de um *punch* de pequeno diâmetro. A biópsia controle após tratamento deve ser realizada no lado contralateral e em localização aproximada (com aplicação do fenol pontuado nesta localização anteriormente) já que a fibrose correspondente à cicatrização no local de biópsia prévia poderia atrapalhar a análise histológica. Classicamente o fenol é recomendado para uso como *peeling* em clareamento de pele, rugas, hiperpigmentação, tratamento de acne e cicatrizes, lentigos solares e ceratoses actínicas e seborreicas, embora trabalhos recentes apontem seu uso como auxiliar na blefaroplastia e no tratamento do xeroderma pigmentoso e verrugas plantares. Na metabolização do fenol, cerca de 20 a 25% da quantidade absorvida é conjugada no fígado em ácido glucurônico e ácido sulfúrico, e depois excretada. Concentrações elevadas de fenol no sangue podem ter efeito tóxico no miocárdio, provocando taquicardia, contrações ventriculares prematura, fibrilação atrial, fibrilação ventricular e dissociação eletromecânica. Quando aplicado em extensas áreas de superfície corporal, é importante tomar como precauções para o uso do *peeling* de fenol, com o fato de que devem ser evitados em pacientes que registrem existência de doença cardíaca, renal e hepática, episódios recorrentes de infecção herpética, exposição contínua aos raios ultravioleta, uso recente de isotretinoína, instabilidade psicológica, predisposição a quelóides e peles do tipo IV, V e VI (de acordo com a classificação de Fitzpatrick). Quando o *peeling* de fenol é utilizado em toda face, a área é dividida em pelo menos cinco regiões para que seja aplicado em cada uma das regiões com intervalo de 15 minutos, de modo que a concentração absorvida seja eliminada pela urina após sua metabolização sem causar problemas cardíacos. Destaca-se, ainda, que o fenol 88% quando usado em aplicação de pequenas quantidades em áreas corporais limitadas, de modo que toda concentração seja eliminada sem que ocorra acúmulo da substância na corrente sanguínea, seu uso torna-se seguro sem causar complicações cardiovasculares nos pacientes, sendo apenas descritos, nestes casos, alterações de pigmentação da pele, infecções secundárias e formação de eritema prolongado. Uma modalidade estética muito frequente na prática clínica atualmente é a utilização do *peeling* de fenol para tratamento localizado de rugas periorais sem que haja riscos à saúde dos pacientes que são submetidos a tal procedimento. Os pacientes ideais para realização deste tipo de *peeling* devem ter pele clara, fina e ressecada, ou seja, segundo Fitzpatrick, indivíduos com pele do tipo I, II e III e com rugas finas. O homem tem pele mais espessa, o que reduz a ação do fenol, resultando em menor eficácia do tratamento, em comparação com a mulher. Com o trabalho proposto, os autores pretendem descrever a experiência clínica do Serviço de Dermatologia do HU-UFJF na realização de *peeling* químico com a utilização de solução de fenol a 88% para promover rejuvenescimento cutâneo através do estímulo à regeneração e restauração das fibras colágenas e elásticas, atenuando os efeitos produzidos pelo fotodano. Por utilizar pequena quantidade do agente químico apenas nas áreas correspondentes a rugas cutâneas, consegue-se a anulação dos riscos cardiovasculares e de comprometimento renal secundários, quando comparado ao uso de grandes quantidades de fenol a 88% em áreas extensas da superfície corpórea.

Objetivo: comprovar, através de comparação clínica e histopatológica, os efeitos de rejuvenescimento cutâneo promovidos pela utilização de *peeling* de fenol a 88% pontuado aplicado em pequenas quantidades sobre as rugas de pacientes do sexo feminino de pele clara (fototipos I, II e III da classificação de Fitzpatrick) provenientes dos ambulatórios do Serviço de Dermatologia do HU-UFJF.

Metodologia: As pacientes terão as áreas do rosto em que será aplicada a substância fotografada, e serão submetidas a uma biópsia cutânea com *punch* com três milímetros de diâmetro de ruga localizada em região pré-auricular direita para avaliação da concentração e estrutura das fibras

Prof.ª Dra. Anízia Maria Gollner
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
HU/CAS da UFJF



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
HOSPITAL HUNIVERSITÁRIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP-HU CAS/UFJF
RUA CATULO BREVIGLIEI S/Nº
B. SANTA CATARINA
36036-110- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

colágenas e elásticas antes do *peeling* químico pela coloração hematoxilina-eosina e outras colorações específicas que acentuem essas fibras (orceína para melhor visualização das fibras elásticas e tricrômio de Gomori para visualização das fibras colágenas), após orientação e assinatura do termo de consentimento informado. A técnica consiste na aplicação em consultório médico com técnicas assépticas de palito com algodão embebido em fenol a 88% sobre as rugas finas da face (principalmente as rugas das regiões periorbitárias e periorais) e nas rugas da região pré-auricular. Após, espera-se cerca de cinco minutos e procede-se a lavagem. Cada paciente realizará cinco vezes o procedimento, com intervalo de 30 dias entre eles. O acompanhamento dos pacientes seguirá uma frequência semanal ou demanda espontânea no ambulatório de dermatologia do Hospital Universitário de Universidade Federal Juiz de Fora conforme necessidade do paciente. Após as cinco sessões mensais de aplicação de fenol a 88% pontuado em rugas finas da face os pacientes terão novamente fotografada as áreas de aplicação da substância, e será realizada uma nova biópsia com *punch*, agora localizada em região pré-auricular esquerda com o objetivo de avaliar mudança no aspecto e quantidade das fibras colágenas e elásticas em relação à biópsia realizada antes do procedimento. Além da comparação dos resultados histopatológicos, efetuaremos uma comparação do aspecto clínico após o *peeling* de fenol 88% pontuado, e o resultado será divulgado.

Revisão e referências: atualizada, sustentam os objetivos do estudo.

Características da população a estudar: 10 pacientes do sexo feminino, entre 45 e 59 anos de idade, provenientes dos ambulatórios gerais de dermatologia com pele clara de fototipos I, II ou III de Fitzpatrick e com rugas finas que não apresentem história de doença cardíaca, renal ou hepática e que não tenham realizado nenhum procedimento estético ou cirúrgico na face recentemente para não prejudicar a análise dos resultados.

Critérios de participação: estão descritos na população a estudar.

Orçamento e responsável pelo financiamento da pesquisa são apresentados e o responsável pela pesquisa será o pesquisador principal.

Instrumentos de pesquisa constam como anexos e estão adequados aos objetivos do estudo.

Cronograma: contem agenda para realização de diversas etapas de pesquisa, observando que a coleta de dados ocorrerá após aprovação do projeto pelo comitê. Início desta etapa previsto para julho de 2007.

Identificação dos riscos e desconfortos possíveis e benefícios esperados estão discriminados adequadamente.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE está em linguagem adequada, clara para compreensão dos participantes do estudo, com descrição suficiente dos procedimentos, explicitação de riscos e forma de contato com o pesquisador e demais membros da equipe.

Pesquisador: Maria Cristina Cardoso de Mendonça; titulação: Especialista em Dermatologia, apresenta experiência e qualificação para a coordenação do estudo. Demais membros da equipe também apresentam qualificação para atividade que desempenharão durante o estudo.

- Salientamos que o pesquisador deverá encaminhar a este comitê o relatório final.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-HU/CAS da UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96 e suas complementares, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Situação: Projeto Aprovado

Juiz de Fora, 29 de junho de 2009.

Profa. Dra. *Angela Maria Gollner*
Coordenadora – CEP

RECEBI

DATA: ___/___/2009

ASS: _____

ANEXO B – Parecer nº 0115/2009 do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
HOSPITAL HUNIVERSITÁRIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP-HU CAS/UFJF
RUA CATULO BREVIGLIEI S/Nº
B. SANTA CATARINA
36036-110- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

Parecer nº 0115/2009

Protocolo CEP-UFJF: 0065/09 **FR:** 272653 **CAAE:** 0065.0.420.000-09

Projeto de Pesquisa: Peeling de fenol pontuado no tratamento do fotoenvelhecimento.

Versão do Protocolo e Data: 12/08/2009

Area Temática e Fase de Desenvolvimento: Ciências da Saúde

Pesquisador Responsável: Maria Cristina Cardoso de Mendonça

TCLE: 12/08/2009

Grupo: III

Pesquisadores Participantes: Dário Júnior de Freitas Rosa;
Sâmya Diégues Cedrim;
Rogério Estevam Farias

Instituição: Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Material para análise: Novo projeto e nova versão de TCLE.

Sumário/comentários do protocolo:

Adendo ao projeto aprovado em 29 de junho de 2009. O projeto de pesquisa e o TCLE receberam atualizações devido à dificuldade em encontrar entre as pacientes atendidas nos ambulatórios de dermatologia do HU-UFJF o número total de 10 pacientes necessários que preencham os requisitos para dar andamento à pesquisa e que não apresentem as comorbidades referidas. Diante dessa justificativa, a mesma tem prejudicado o andamento da pesquisa proposta e procurando manter ao máximo dentro dos prazos estabelecidos no projeto para sua concretização, é solicitado a inclusão de pacientes com idade entre 60 e 75 anos entre as pacientes que farão parte do trabalho, de modo que a amostra passaria a ser composta de pacientes do sexo feminino, entre 45 e 75 anos de idade proveniente dos ambulatórios gerais de dermatologia com pele clara de fototipos I, II e III de Fitzpatrick e com rugas finas que não apresentem historia de doença cardíaca, renal ou hepática e que não tenham realizado nenhum procedimento estético ou cirúrgico na face recentemente para não prejudicar a análise dos resultados.

Serão mantidos os critérios de inclusão e exclusão e a metodologia do estudo.

Será incluído um TCLE que será assinado pelo paciente e pelo responsável ou representante legal do paciente quando se tratar de participante com 60 anos de idade ou mais, permanecendo o termo de consentimento já autorizado pelo CEP do HU-UFJF para pacientes entre 45 e 59 anos de idade. Este TCLE da participação de idosos, seguirá as normas estabelecidas pela lei 10.741/2003 (lei ordinária), sancionada em 01 de outubro de 2003, que dispõe sobre o estatuto do idoso e dá outras providências.

Situação: Projeto Aprovado

Juiz de Fora, 24 de agosto de 2009.

Prof.ª Dra. Angela Maria Gollner.
Coordenadora – CEP

(Assinatura)

Prof.ª Dra. Angela Maria Gollner
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
HU/CAS da UFJF

Prof. Ms. Antônio Fernando Políssovi
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
HU/CAS da UFJF

RECEBI

DATA: ___/___/2009

ASS: _____

ANEXO C – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido utilizados para pesquisa

SERVIÇO DE DERMATOLOGIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UFJF

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: MARIA CRISTINA CARDOSO DE MENDONÇA

PESQUISADORES: DÁRIO JÚNIOR DE FREITAS ROSA, SÂMIA DIÉGUES CEDRIM, ROGÉRIO ESTEVAM FARIAS.

ENDEREÇO: RUA CATULO BREVIGLIERI S/N. BAIRRO SANTA CATARINA - CEP: 36.036-110. – JUIZ DE FORA – MG

FONE: (32) 4009-5198 - E-MAIL: MCRISMENDONÇA@TERRA.COM.BR

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(A) Sr.(a) está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa "PEELING DE FENOL PONTUADO NO TRATAMENTO DO FOTOENVELHECIMENTO". Neste estudo pretendemos comprovar clinicamente e histologicamente, por análise microscópica de fragmentos da pele, os efeitos de rejuvenescimento cutâneo promovidos pelo peeling de fenol a 88% em solução líquida quando aplicado de forma pontuada sobre as rugas da face.

O motivo que nos leva a estudar este novo método de peeling contra o envelhecimento é importância cada vez maior que assumem as questões dermatológicas em pessoas mais velhas com o crescente aumento da expectativa de vida da população e a necessidade de procedimentos estéticos que impliquem em menos riscos à saúde deste grupo.

- Para este estudo realizaremos uma fotografia e biópsia (retirada de pequeno fragmento de pele) antes do procedimento em região pré-auricular (anterior à orelha) direita, seguida de cinco aplicações do fenol 88% com periodicidade mensal em rugas da face, com nova fotografia e biópsia em região pré-auricular (anterior à orelha) esquerda após o procedimento para comparação do efeito da medicação na redução das rugas.

Você será submetido a duas biópsias de pele (uma antes do início e outra após o término do trabalho) que resultará em duas cicatrizes de 03 (três) milímetros de diâmetro localizadas intencionalmente sobre rugas situadas em região anterior de orelhas para que seja obtido melhor efeito estético.

O peeling consiste na aplicação com palito revestido de algodão de solução de fenol a 88% sobre as rugas do rosto por 05 (cinco) vezes, com intervalo aproximando de 30 dias entre as aplicações. Podem ocorrer no local da aplicação eritema (vermelhidão) e alteração da cor (manchas), de caráter transitório e totalmente reversíveis. Não há riscos à saúde pela sua participação no trabalho, mas caso haja você será ressarcido de gastos decorrentes da sua participação pelo pesquisador responsável.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e privacidade, garantindo que imagens ou dados pessoais que possam identificá-lo não serão divulgados com os resultados da pesquisa, garantindo o anonimato das informações obtidas.

Os dados da pesquisa são confidenciais, de posse apenas da pesquisadora responsável (Maria Cristina Cardoso de Mendonça), e destinar-se-ão somente para apresentação e/ou publicação de caráter científicos da área e que poderão subsidiar outras pesquisas do autor, e apenas serão divulgados pós a sua autorização.

Prof.^a Dra. *Angela Maria Collier*
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
HU/CES da UFJF

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

O (A) Sr (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, no SERVIÇO DE DERMATOLOGIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA e a outra será fornecida a você.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo "PEELING DE FENOL PONTUADO NO TRATAMENTO DO FOTOENVELHECIMENTO", de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, _____ de _____ de 20_____.

Nome	Assinatura participante	Data

Nome	Assinatura pesquisador	Data

Nome	Assinatura testemunha	Data

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o

CEP - COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA - HU/CAS - UFJF

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UFJF

RUA CATULO BREVIGLIERI, S/N, BAIRRO SANTA CATARINA, JUIZ DE FORA - MG

CEP 36.036-110 – FONE: (32)4009-5100

Profª Dra. Angela Maria Galvão
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
 HU/CAS da UFJF

SERVIÇO DE DERMATOLOGIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UFJF

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: MARIA CRISTINA CARDOSO DE MENDONÇA

PESQUISADORES: DÁRIO JÚNIOR DE FREITAS ROSA, SÂMIA DIÉGUES CEDRIM, ROGÉRIO ESTEVAM FARIAS.

ENDEREÇO: RUA CATULO BREVIGLIERI S/N. BAIRRO SANTA CATARINA - CEP: 36.036-110. – JUIZ DE FORA – MG

FONE: (32) 4009-5198 - E-MAIL: MCRISMENDONÇA@TERRA.COM.BR

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pacientes com idade igual ou superior a 60 anos.

Eu, _____, na qualidade de responsável legal de _____, idade _____, concordo que o meu (minha) _____ (grau de parentesco) participe como voluntário do estudo "PEELING DE FENOL PONTUADO NO TRATAMENTO DO FOTOENVELHECIMENTO". Neste estudo pretendemos comprovar clínica e histologicamente, por análise microscópica de fragmentos da pele, os efeitos de rejuvenescimento cutâneo promovidos pelo fenol a 88% em solução líquida quando aplicado de forma pontuada (com palito revestido de algodão) sobre as rugas da face.

O motivo que nos leva a estudar este novo método de peeling contra o envelhecimento é importância cada vez maior que assumem as questões dermatológicas em pessoas mais velhas com o crescente aumento da expectativa de vida da população e a necessidade de procedimentos estéticos que impliquem em menos riscos à saúde deste grupo.

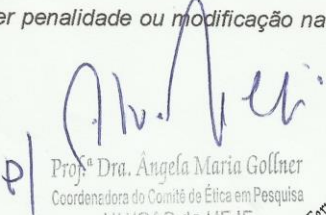
- Para este estudo realizaremos uma fotografia e biópsia (retirada de pequeno fragmento de pele) antes do procedimento em região pré-auricular (anterior à orelha) direita, seguida de cinco aplicações do fenol 88% com periodicidade mensal em rugas do rosto, com nova fotografia e biópsia em região pré-auricular (anterior à orelha) esquerda após o procedimento para comparação do efeito da medicação na redução das rugas.

Você será submetido a duas biópsias de pele (uma antes do início e outra após o término do trabalho) que resultará em duas cicatrizes de 03 (três) milímetros de diâmetro localizadas intencionalmente sobre rugas situadas em região anterior de orelhas para que seja obtido melhor efeito estético.

O peeling consiste na aplicação com palito revestido de algodão de solução de fenol a 88% sobre as rugas do rosto por 05 (cinco) vezes, com intervalo aproximando de 30 dias entre as aplicações. Podem ocorrer no local da aplicação eritema (vermelhidão) e alteração da cor (manchas escuras), de caráter transitório e totalmente reversíveis.

Não há riscos à saúde pela sua participação no trabalho, mas caso haja você será ressarcido de gastos decorrentes da sua participação pelo pesquisador responsável.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador


Prof.ª Dra. Angela Maria Gollner
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
HU/CAS da UFJF

Prof. Ms. Álvaro Ferrnando Polissotti
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
HU/CAS da UFJF

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e privacidade, garantindo que imagens ou dados pessoais que possam identificá-lo não serão divulgados com os resultados da pesquisa, garantindo o anonimato das informações obtidas.

Os dados da pesquisa são confidenciais, de posse apenas da pesquisadora responsável (Maria Cristina Cardoso de Mendonça), e destinar-se-ão somente para apresentação e/ou publicação de caráter científico da área e que poderão subsidiar outras pesquisas do autor, e apenas serão divulgados pós a sua autorização.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

O (A) Sr (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, no SERVIÇO DE DERMATOLOGIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA e a outra será fornecida a você.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo "PEELING DE FENOL PONTUADO NO TRATAMENTO DO FOTOENVELHECIMENTO", de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, _____ de _____ de 20 _____.

Nome	Assinatura participante	Data

Nome	Assinatura pesquisador	Data

Nome	Assinatura do responsável	Data

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o

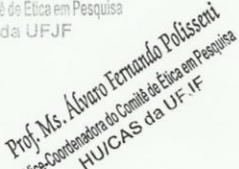
CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - HU/CAS - UFJF

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UFJF

RUA CATULO BREVIGLIERI, S/N, BAIRRO SANTA CATARINA, JUIZ DE FORA - MG

CEP 36.036-110 – FONE: (32)4009-5100


 Prof.ª Dra. Ângela Maria Gollner
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
 HU/CAS da UFJF


 Prof. Ms. Álvaro Fernando Polissenti
 Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
 HU/CAS da UFJF

ANEXO D – Artigo: Punctuated 88% Phenol Peeling for the Treatment of Facial Photoaging: A Clinical and Histopathological Study

Punctuated 88% Phenol Peeling for the Treatment of Facial Photoaging: A Clinical and Histopathological Study

MARIA CRISTINA C. DE MENDONÇA, MD, MSc,* NATÁLIA N. SEGHE TO, MD,*
FERNANDO M. AARESTRUP, MD, PhD,* AND BEATRIZ J.V. AARESTRUP, DDS, PhD*†

BACKGROUND Phenol peeling is considered an important agent in the treatment of facial rejuvenation; however, its use has limitations due to its high potential for side effects.

OBJECTIVE This article proposes a new peeling application technique for the treatment of photoaging, aiming to evaluate, clinically and histopathologically, the efficacy of a new way of applying 88% phenol, using a punctuated pattern.

METHODS The procedure was performed in an outpatient setting, with female patients, on static wrinkles and high flaccidity areas of the face. Accompanying photographs and skin samples were taken for histopathological analysis before and after treatment.

RESULTS It was shown that 88% phenol applied topically using a punctuated technique is effective in skin rejuvenation.

CONCLUSION The authors thus suggest, based on this new proposal, that further studies be conducted with a larger group of patients to better elucidate the action mechanisms of 88% phenol. This new form of application considerably reduced patients' withdrawal from their regular activities, besides reducing the cost, compared with the conventional procedure.

The authors have indicated no significant interest with commercial supporters.

Chemical peelings have been used for thousands of years and to this day are an important therapeutic tool for skin rejuvenation by producing a controlled destruction of the epidermis and dermis and their regeneration.¹ Among the chemical substances used, phenol provides significant clinical results and, classically, it is recommended for the use in peelings for skin lightening, attenuation of static wrinkles, and flaccidity of facial skin. When used in an 88% concentration, it promotes destruction of the epidermis, papillary dermis, and can reach as far as the superficial reticular dermis.²⁻⁴ This study proposes a new technique for the application of 88% phenol using a punctuated pattern over facial static wrinkles,

aimed at rejuvenation with a lower risk of side effects and a reduction in the period that patients withdraw from their regular activities.

Methods

Patients

The sample included 17 female patients (N = 17) attended in an outpatient setting at the Dermatology Service of the University Hospital of the Federal University of Juiz de Fora aged between 45 and 69 (mean = 55.7 years), skin phototypes I to III (Fitzpatrick scale), photoaging degrees II and III (Glogau scale), and who had not had any facial aesthetic or surgical procedure

*Laboratory of Immunopathology and Experimental Pathology/CBR, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil; †Department of Morphology, Institute of Biological Science, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

performed in the 6 months previous to initiating treatment. Patients who had cardiac, hepatic, or renal problems were excluded from the study, and those with facial inflammatory skin disease. Written informed consent was provided by all patients with a form approved by the university's medical ethics committee.

Punctuated Phenol Peeling Technique

The patients were submitted to 5 sessions of punctuated peeling with 88% phenol, with an interval of a month between each session. For each punctuated peeling, the authors used 0.2 mL of 88% phenol and a cocktail stick saturated with 88% phenol, conveyed precisely over the path of the fine facial wrinkles, especially those in the periorbital and perioral regions. The same procedure was performed on the wrinkles in the preauricular region. The distance between the points of application was approximately 3 mm, in other words, a distance always equal to or greater than the diameter of the area attained at each point with the phenol. The same technique was applied to the mandibular, inframandibular, and submental areas.

In each session, the patients were advised to wear Solar Protection Factor 30 sunscreen. No patient interrupted the treatment because of an adverse skin reaction.

Obtaining Samples for the Histopathological and Histochemical Studies

Every patient underwent 2 facial biopsies with a 3-mm punch; the first one was performed before the treatment, in the preauricular area and the second one 30 days after the fifth treatment session, in the same contralateral region.

Photographic Follow-Up

Photographs (Panasonic DMC-T24, Lumix, Osaka, Japan) were used for the comparison between the facial

clinical aspects of the patients, all taken by the same observer, before the first session and 30 days after the last one.

Processing Samples and Image Scanning

The skin samples were fixed in 10% formaldehyde; the material was placed in blocks with paraffin and submitted to microtomy with 5- μ m thick slices. Two slices corresponding to each sample were isolated for routine staining (hematoxylin and eosin) and histochemical staining (Verhoeff). The samples were thoroughly examined with a Zeiss optical microscope (Hallbergmoos, Germany) by 2 independent observers, both of them graduated and experienced in histopathology. After observation, representative areas of the epidermis and dermis were selected for descriptive histopathological analysis ($\times 100$), and 4 representative areas of the dermis ($\times 400$) were chosen for digital photographic capture for automatic morphometry with the Zen pro 2012 software by Zeiss (Hallbergmoos, Germany).

Histopathological and Statistical Analysis

The general microscopic characteristics of the skin were observed, and the organization of collagen and elastic fibers was descriptively evaluated. The difference in density of collagen and elastic fibers by captured area (μm^2) was obtained by automatic morphometric analysis. The data obtained in the evaluations before and after treatment were compared, and the descriptive statistical analyses were performed using the SPSS 13.0 software for Windows.

Results

The authors observed the correlation between clinical findings and the intensity of elastosis; 52.94% ($n = 9$) of the patients presented signs of intense photoelastosis; of these, 35.29% ($n = 6$) presented clear signs of clinical

TABLE 1. Clinical Evaluation

	<i>Pronounced Improvement, %</i>	<i>Discrete Improvement, %</i>	<i>No Improvement, %</i>	<i>Total, %</i>
Evident photoaging	6 (35.29)	3 (17.64)	0	9 (52.96)
Discrete photoaging	4 (23.52)	3 (17.64)	1 (5.88)	8 (47.05)
	10 (58.82)	6 (35.29)	1 (5.88)	17 (100)

TABLE 2. Descriptive Data Observed in the Histopathology of the Study Patients

Variable	Patient																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Reorganization of elastic fibers	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reduced fragmentation of elastic fibers	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+
Reorganization of collagen fibers	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0
Increased dermal-epidermal junction	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0

Source: Study data.
Description of the morphological characteristics of elastic and collagen fibers.
(+), increase in morphological observation.
(0), no change in morphological observation.

improvement with an accentuated mitigation of facial static wrinkles. In the patients (47.05%, $n = 8$) whose degree of aging was less influenced by solar exposure, showing finer and more delicate static wrinkles before treatment, 23.52% ($n = 4$) presented improvement in flaccidity and general facial skin lightening with little evidence of improvement in static wrinkles. Using the new proposed technique, the results presented in this

study have shown a total expressive clinical improvement in 58.82% ($n = 10$) of the patients and a more discrete clinical improvement in 35.29% ($n = 6$) of the patients (Table 1). The descriptive results obtained by microscopic analysis (dermo-epidermal interface area, organization and density of collagen, and elastic fibers) of the skin are presented comparatively before and after treatment for each patient (Table 2).

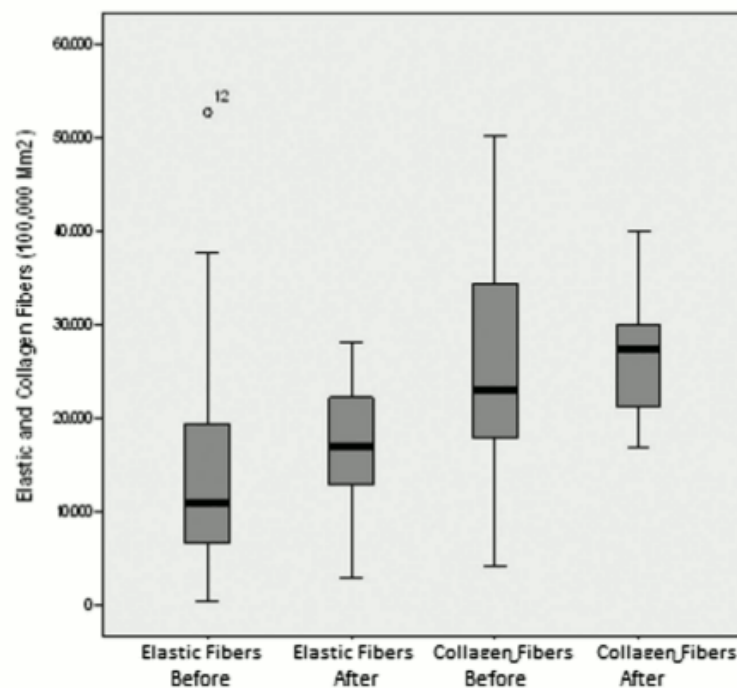


Figure 1. Automatic histomorphometry of elastic and collagen fibers. In the comparative analysis of collagen fiber area (μm^2) of samples before and after treatment stands out the average gain of these fibers, increase in median expressed by, and greater uniformity among samples determined by decreased range when compared with the sample obtained before treatment a pattern similar analysis was observed in elastic fibers.

PHENOL PEELING FOR THE TREATMENT OF FACIAL PHOTOAGING

TABLE 3. Comparative Analysis of Elastic Fiber Area (μm^2) of the Samples Obtained Before and After Treatment

Patient	Elastic Fiber Area (in 100,000 μm^2)	Elastic Fiber Gain (%)
Patient 1		
Before	10,003	
After	25,281	+152.70
Patient 2		
Before	52,698	
After	28,086	-46.70
Patient 3		
Before	4,281	
After	12,875	+200.74
Patient 4		
Before	5,188	
After	12,875	+148.16
Patient 5		
Before	8,749	
After	18,365	+109.90
Patient 6		
Before	19,429	
After	16,933	-12.84
Patient 7		
Before	3,920	
After	9,910	+152.80
Patient 8		
Before	20,304	
After	14,810	-27.05
Patient 9		
Before	10,904	
After	14,810	+35.82
Patient 10		
Before	18,081	
After	19,734	+9.14
Patient 11		
Before	11,690	
After	2,926	-74.97
Patient 12		
Before	408	
After	6,311	+1,446.81
Patient 13		
Before	37,676	
After	24,929	-33.83
Patient 14		
Before	6,680	
After	20,025	+199.77
Patient 15		
Before	9,737	
After	22,249	+128.49
Patient 16		

TABLE 3. (Continued)

Patient	Elastic Fiber Area (in 100,000 μm^2)	Elastic Fiber Gain (%)
Before	14,178	
After	9,625	-32.11
Patient 17		
Before	34,569	
After	22,251	-35.63

Source: Study data.

The comparative analysis of the area of elastic fibers (μm^2) of the samples obtained before and after treatment showed an overall gain, with an increase in the median and a decrease in the amplitude of the results as compared with the samples obtained before treatment (Figure 1). It is interesting to note that 17.64% of those sampled ($n = 3$), who presented greater density of elastic fibers before the treatment, showed a decrease in the area (negative gain), whereas 52.94% ($n = 9$) of the patients who presented lower density of elastic fibers before the treatment had a positive gain greater than 30% associated with an increase in the fibrous areas (Table 3).

In the comparative analysis of the area of collagen fibers (μm^2) of the samples obtained before and after treatment, the authors observed a moderate gain of these fibers (increase in the median) and more uniform samples (decrease in amplitude), as compared with samples obtained before treatment (Figure 1). The authors point out that, similar to what was observed in the analysis of elastic fibers, 47.05% of the samples ($n = 8$) presented a representative gain of over 30% in the deposition of collagen, and only 11.76% ($n = 2$) presented a decrease of over 30% in the area (Table 4 and Figure 2).

Discussion

Many studies that were conducted in the 90 seconds using different methods for the treatment of photoaging showed a significant correlation between the reduction in length, thickness, number, and total area of collagen and elastic fiber with the severity of wrinkles, although there is also a positive correlation

TABLE 4. Comparative Analysis of Collagen Fiber Area (μm^2) of the Samples Obtained Before and After Treatment

Patient	Collagen Fiber Area (in 100,000 μm^2)	Collagen Fiber Gain (%)
Patient 1		
Before	31,199	
After	29,568	-5.20
Patient 2		
Before	12,024	
After	19,954	+65.95
Patient 3		
Before	46,799	
After	34,799	-25.64
Patient 4		
Before	50,149	
After	23,463	-53.21
Patient 5		
Before	26,027	
After	27,505	+5.67
Patient 6		
Before	21,263	
After	17,686	-16.82
Patient 7		
Before	42,750	
After	40,012	-6.40
Patient 8		
Before	22,979	
After	36,898	+60.57
Patient 9		
Before	17,882	
After	36,898	+106.34
Patient 10		
Before	15,417	
After	16,793	+8.92
Patient 11		
Before	28,364	
After	21,365	-24.67
Patient 12		
Before	43,116	
After	27,720	-35.70
Patient 13		
Before	13,798	
After	34,368	+149.07
Patient 14		
Before	18,945	
After	30,043	+58.58
Patient 15		
Before	21,212	
After	28,476	+34.24
Patient 16		

TABLE 4. (Continued)

Patient	Collagen Fiber Area (in 100,000 μm^2)	Collagen Fiber Gain (%)
Before	4,177	
After	27,341	+554.56
Patient 17		
Before	16,554	
After	23,103	+39.56%

Source: Study data.

between the quantity of regenerated collagen and elastic fibers and the attenuation of static expression wrinkles.⁵⁻⁸

Several authors reported that the mechanisms by which chemical peelings achieve their results are not well established; however, there is an association between clinical improvement and gain in dermal volume by greater synthesis and remodeling of collagen and elastic fibers.^{6,9,10}

The literature describes studies that show clinical improvement with the continuous use of Baker-Gordon phenol formula on the face; nonetheless, there are no reports comparing this to the use of 88% phenol.^{3,11-14}

The authors point out that, in spite of the great success in the use of Baker-Gordon formula, the positive results of this study (94.11%, $n = 16$) were obtained using a therapeutic protocol with a minimal risks of cardiovascular or renal complications and a decrease in the time that patients have to withdraw from their daily activities.

The histopathological findings of this study were compatible with those described in the literature in relation to the use of the "conventional" technique.^{5,14} In both techniques, the authors observe the reorganization of collagen and elastic fibers, with an evident decrease in the fragmentation of elastic fibers.

Many authors correlate the increase in the density of these fibers with a greater conjunctive cellularity and consequent increase in the dermal volume.^{6,15} In this

PHENOL PEELING FOR THE TREATMENT OF FACIAL PHOTOAGING

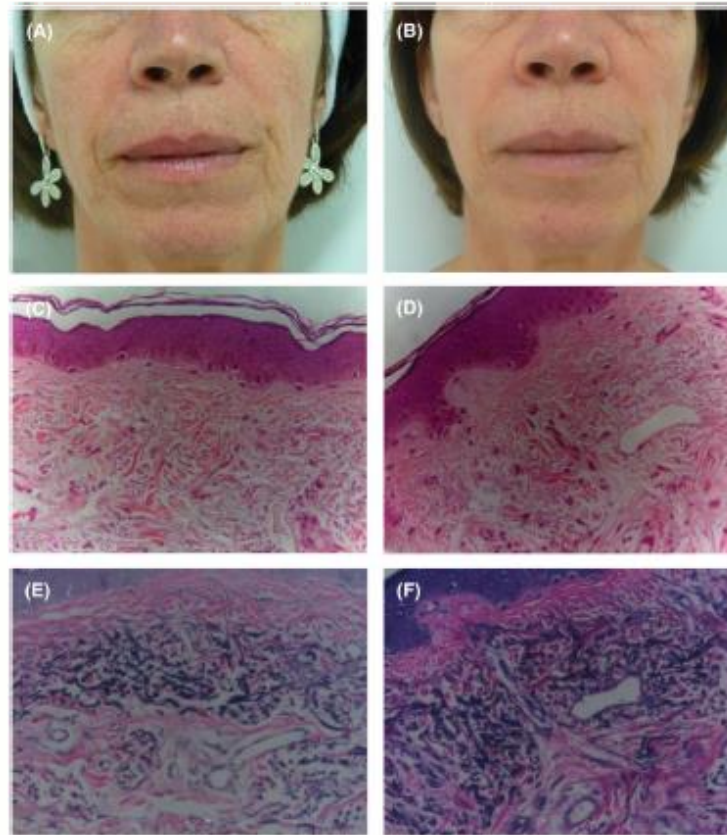


Figure 2. Comparative clinical and histopathological analyses. Note that the smoothing of facial wrinkles static compared the clinical findings before (A) and after (B) treatment with punctuated 88% phenol peeling, before punctuated 88% phenol peeling; in microscopic sections of skin obtained before treatment (C and E) is noted lower density and disorganization of collagen fibers when compared with samples obtained after treatment (D and F), especially in the papillary dermis; similar pattern is observed for the deposition of elastic fibers. Hematoxylin and eosin stain, original magnification $\times 200$ (C and D). Verhoeff histochemical stain, original magnification $\times 200$ (E and F).

study, the improvement in the reticular dermis observed in 58.82% ($n = 10$) of the patients confirms that 88% phenol in some procedures is a deep peeling-producing agent just like the phenol in the Baker-Gordon formula.^{1,11,13} However, in 35.29% ($n = 6$) of the patients, the authors observed that 88% phenol was a medium-deep peeling as opposed to the Baker-Gordon formula which penetrates to the mid reticular dermis.^{1,11-14}

Some authors observed in comparative studies that the rectification of the dermo-epidermal junction is a sign of skin photoaging, which is a criterion that was considered in the evaluation. The results show that only a few patients presented a correlation between the increase in the surface of the dermo-epidermal junc-

tion and clinical improvement (52.94%, $n = 9$).^{6,7,16} Similar data are sometimes observed in the literature, correlating the augmentation of the interface with skin thickness in treatments of phenol peeling in full face.^{4,6,15,16}

Even though so far in the literature, there is no comparison between the punctuated phenol technique and fractionated ablative lasers, there is no doubt that this new phenol technique is a less expensive option that is just as safe as fractionated lasers.

Thus, the authors highlight that the application of phenol to small areas of the body, in smaller quantities, as in the full face punctuated mode, makes its use safe at a low cost, and it involves a minimal risk of

cardiovascular complications.⁴ The technique used in this study was presented by De Mendonça, 2012 and commented on by Monheit, 2012, as a new approach to the nonsurgical facial antiaging treatment particularly for its low cost, low toxicity, and few side effects, compared with the Baker peeling technique.^{1,17,18}

In conclusion, this study evaluated and analyzed clinical and histopathological improvements of punctuated 88% phenol peeling for the treatment of facial photoaging. The results clearly demonstrate its effectiveness for skin rejuvenation.

With this new proposal, the authors suggest that further studies be conducted with larger group of patients to better elucidate the mechanisms of action of 88% phenol.

References

- Clark E, Scerri L. Superficial and medium-depth chemical peels. *Clin Dermatol* 2008;26:209-18.
- Larson DL, Karmo F, Hetter GP. Phenol-croton oil peel: establishing an animal model for scientific investigation. *Aesthet Surg J* 2009;29:47-53.
- Fischer TC, Perosino E, Poli F, Vieira MS, et al. Chemical peels in aesthetic dermatology: an update 2009. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 2010;24:281-92.
- Gatti JE. Eyelid phenol peel: an important adjunct to blepharoplasty. *Ann Plast Surg* 2008;60:14-8.
- Brown AM, Kaplan LM, Brown ME. Phenol-induced histological skin changes: hazards, technique, and uses. *Br J Plast Surg* 1960;13:158-69.
- Butler PEM, Gonzalez S, Randolph MA, Kim J, et al. Quantitative and qualitative effects of chemical *peeling* on photo-aged skin: an experimental study. *Plast Reconstr Surg* 2001;107:22-8.
- El-Domynati M, Attia S, Saleh F, Brown D, et al. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol* 2002;11:398-405.
- Giese SY, McKinney P, Roth SI, Zukowski M. The effect of chemosurgical peels and dermabrasion on dermal elastic tissue. *Plast Reconstr Surg* 1997;100:489-98.
- Han SH, Kim HJ, Kim SY, Kim YC, et al. Skin rejuvenating effects of chemical *peeling*: a study in photoaged hairless mice. *Int J Dermatol* 2011;50:1075-82.
- Sadick NS, Manhas-Bhutani S, Krueger N. A novel approach to structural facial volume replacement. *Aesthet Plast Surg* 2013;37:266-76.
- Fabbrocini G, De Padova MP, Tosti A. Chemical peels: what's new and what isn't new but still works well. *Facial Plast Surg* 2009;25:329-36.
- Fulton JE Jr, Porumb S. Chemical peels: their place within the range of resurfacing techniques. *Am J Clin Dermatol* 2004;5:179-87.
- Landau M. Advances in deep chemical peels. *Dermatol Nurs* 2005;17:438-41.
- Moy LS, Peace S, Moy RL. Comparison of the effect of various chemical *peeling* agents in a mini-pig model. *Dermatol Surg* 1996;22:429-32.
- Kligman AM, Baker TJ, Gordon HL. Long-term histologic follow-up of phenol face peels. *Plast Reconstr Surg* 1985;75:652-9.
- Baumann L. Skin ageing and its treatment. *J Pathol* 2007;211:241-51.
- De Mendonça MCC, Aarestrup FM, Aarestrup BJV. Clinical protocol for punctuated 88% phenol peels in the treatment of photoaging: a histopathological study of three cases. *Dermatol Surg* 2012;38:2011-5.
- Monheit GD. Commentary on clinical protocol for punctuated 88% phenol peels in the treatment of photoaging: a histologic study of three cases. *Dermatol Surg* 2012;38:2015.

Address correspondence and reprint requests to: Maria Cristina C. de Mendonça, MD, MSc, Laboratory of Immunopathology and Experimental Pathology/CBR, Federal University of Juiz de Fora, Rua Delorme de Carvalho, 130/301, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36021-000 Brazil, or e-mail: mcrismendonca@terra.com.br