



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

CÍNTIA DE MELO BRAGA

**ESTABELECIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO
DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS DA PELE DE RATOS
WISTAR APÓS APLICAÇÃO DE PREENCHEDORES: EFEITO DO ÁCIDO
HIALURÔNICO E DA POLICAPROLACTONA**

FORTALEZA

2021

CÍNTIA DE MELO BRAGA

**ESTABELECIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO
DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS DA PELE DE RATOS
WISTAR APÓS APLICAÇÃO DE PREENCHEDORES: EFEITO DO ÁCIDO
HIALURÔNICO E DA POLICAPROLACTONA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Ciências Biológicas II

Orientador: Prof. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B793e Braga, Cíntia de Melo.
Estabelecimento de modelo experimental para avaliação de alterações morfológicas e funcionais da pele de ratos wistar após aplicação de preenchedores: efeito do ácido hialurônico e da policaprolactona / Cíntia de Melo Braga. – 2022.
53 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.
1. Preenchedores Dérmicos. 2. Ácido hialurônico. 3. Modelos Animais. I. Título.

CDD 611

CÍNTIA DE MELO BRAGA

**ESTABELECIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO
DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS DA PELE DE RATOS
WISTAR APÓS APLICAÇÃO DE PREENCHEDORES: EFEITO DO ÁCIDO
HIALURÔNICO E DA POLICAPROLACTONA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Ciências Biológicas II

Aprovada em: ___ / ___ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Mônica Studart Mendes Moreira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Delane Viana Gondim
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Theodora Thays Arruda Cavalcante
Centro Universitário Inta - UNINTA

Prof. Dr. Luiz André Cavalcante Brizen
Universidade Christus (UNICHRISTUS)

Dedico à minha mãe, pelo amor incondicional,
incentivo e por dividir a autoria deste trabalho
comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, a Deus por ser a base das minhas conquistas, concedendo sabedoria e força para enfrentar as adversidades. Não tenho dúvidas de que Ele colocou as pessoas certas no meu caminho.

À minha mãe, que nunca poupou esforços para me proporcionar uma educação de qualidade. Agradeço o amor incondicional e exemplo de sabedoria e honestidade.

Ao meu pai e aos meus irmãos, Érica e Breno, pelo apoio e incentivo constantes.

Ao meu esposo, Rafael, pela compreensão, paciência, pelo carinho e amor dispensados em todas as horas, sendo sempre meu incentivo e minha força.

À minha orientadora, Profa Renata Leitão, agradeço pelo exemplo de honestidade e dedicação ao ensino e à pesquisa. Agradeço por ter aceitado o desafio de uma nova linha de pesquisa para que eu estivesse mais motivada. Agradeço o encorajamento e otimismo de sempre, por simplificar minhas dúvidas e por ser a principal responsável pelo meu desenvolvimento acadêmico ao longo dos últimos onze anos.

Aos colegas do laboratório, especialmente, a Josy, que tornaram meus dias mais tranquilos, leves e estiveram sempre dispostos a ajudar. Sem eles, esse trabalho não teria sido realizado. Agradeço por toda disponibilidade e confiança.

À minha querida dupla do mestrado, doutorado e da vida, Luane, pelo companheirismo, amizade e cumplicidade. Agradeço por dividir comigo momentos de alegria e aflição e sempre fazer o possível para ajudar.

À professora Delane Gondim, que hoje considero amiga, agradeço o incentivo constante, apoio intelectual e emocional nos momentos de aflição e por sempre vibrar com minhas conquistas.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, Theodora, Marcello, Marina, Bárbara, Profa. Mônica, minha imensa gratidão por terem tornado essa jornada mais leve. Gratidão pela confiança no meu trabalho e pelo apoio constante.

Aos estudantes de iniciação científica, Gabriela, Matheus e Lucas, agradeço pela disponibilidade e ajuda na execução dos experimentos.

Ao laboratório NEMPI, especialmente aos professores e ao apoio técnico, agradeço pela disponibilidade e ajuda.

RESUMO

A crescente demanda por tratamentos estéticos para reestruturação do contorno facial, tem impulsionado o desenvolvimento e aplicação de agentes preenchedores de tecidos moles. Dentro desse contexto, substâncias que restaurem o volume da pele e contorno facial perdidos ganham destaque. A policaprolactona (PCL), um polímero biodegradável, tem sido utilizada para melhorar a densidade dérmica, especialmente na face, por estimular a proliferação celular, além de preencher espaços vazios. O ácido hialurônico (AH) tem se destacado como o agente preenchedor mais utilizado mundialmente por restaurar o volume tecidual, além de hidratar e lubrificar os tecidos. OBJETIVOS: O presente trabalho tem por objetivo estabelecer um modelo experimental para investigar as alterações morfológicas da pele de ratos wistar em resposta a agentes preenchedores e compreender os mecanismos de ação do AH (Juvederm Voluma®) e PCL (Ellansé®). METODOLOGIA: O subcutâneo do dorso de ratos wistar foi a área receptora dos biomateriais, representados por PCL e AH. Os animais foram eutanasiados com 30 dias ou 60 dias e amostras de pele tratada e não tratada (NAIVE) foram removidas para avaliação histológica e imunohistoquímica para IBA-1, TGF- β e FGF. Foi realizada análise da deposição de colágeno tipo I e tipo III e da angiogênese. RESULTADOS: O AH apresentou-se como material amorfo e basofílico, entremeado por feixes de tecido conjuntivo com discreta proliferação capilar. Os fragmentos de pele com PCL, apresentavam intensa proliferação celular, agregados nucleares com a presença de células gigantes de corpo estranho e maior proliferação capilar quando comparado ao grupo AH. Observou-se um número maior de vasos nos grupos AH e PCL em relação ao NAIVE, no entanto, não houve diferença significativa na área dos vasos entre os grupos estudados. Observou-se um aumento significativo na contagem fibroblastos e fibrócitos nos fragmentos de pele inoculadas com AH e PCL em relação à pele sem preenchedor. O número de fibroblastos foi significativamente maior no grupo PCL quando comparado ao AH. O grupo PCL apresentou maior imunomarcagem para IBA-1 e TGF- β comparado aos grupos NAIVE e AH. Observou-se deposição de colágeno nos grupos tratados, especialmente colágeno do tipo III, no grupo PCL quando comparado ao AH. CONCLUSÃO: Nossos achados morfológicos demonstram a estimulação da atividade dos fibroblastos e uma regeneração ativa relacionada do tecido conjuntivo, com aumento de proliferação vascular e expressão de marcadores relacionados a proliferação tecidual, principalmente relacionada ao grupo PCL.

Palavras-chave: Preenchimento dérmico, policaprolactona, ácido hialurônico .

ABSTRACT

BACKGROUND: The demand for aesthetic treatments for facial contouring has driven the development and application of soft tissue filling agents. In this context, substances that restore lost skin volume and facial contour are highlighted. Polycane (PCL), a biodegradable polymer, has been used to improve the dermis, especially on the face, as it is a compact and compact polymer, in addition to accommodating compact spaces. Hyaluronic acid (HA) has emerged as the most used filling agent to restore tissue volume, in addition to hydrating and lubricating tissues. **OBJECTIVES:** The present work aims to establish an experimental model to investigate morphological changes in the skin of Wistar rats in response to filling agents and to understand the mechanisms of action of HA (Juvederm Voluma®) and PCL (Ellansé®). **MATERIALS AND METHODS:** The subcutaneous area of the back of Wistar rats was the recipient area of biomaterials, represented by PCL and AH. The animals were euthanized at 30 days or 60 days and samples of treated and untreated skin (NAIVE) were removed for histological and immunohistochemical evaluation for IBA-1, TGF- β and FGF. Analysis of type I and type III collagen deposition and angiogenesis was performed. **RESULTS:** HA appeared as an amorphous and basophilic material, interspersed with connective tissue bundles with discrete capillary proliferation. The skin fragments with PCL showed intense cell proliferation, nuclear aggregates with the presence of foreign body giant cells and greater capillary proliferation when compared to the AH group. A greater number of vessels was observed in the AH and PCL groups in relation to the NAIVE, however, there was no significant difference in the vessels between the groups studied. A significant increase in the fibroblast and fibrocytes count was observed in the skin fragments inoculated with HA and PCL in relation to the skin without filler. The number of fibroblasts was significantly higher in the PCL group when compared to the HA. The PCL group showed higher immunostaining for IBA-1 and TGF- β compared to the NAIVE and AH groups. Collagen deposition was observed in the treated groups, especially type III collagen, in the PCL group when compared to the HA. **CONCLUSION:** Our morphological findings demonstrate the stimulation of fibroblast activity and a related active regeneration of connective tissue, with increased vascular proliferation and expression of markers related to tissue proliferation, mainly related to the PCL group.

Keywords: Dermal filler, polycaprolactone, hyaluronic acid

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	14
1.1	Preenchimento de tecidos moles	14
1.2	Envelhecimento cutâneo	14
1.3	Ácido hialurônico.....	16
1.4	Policaprolactona	17
1.5	Modelo experimental.....	18
2	PROPOSIÇÃO	21
2.1.	Objetivo geral.....	21
2.2	Objetivos específicos.....	21
3	CAPÍTULO	22
4	CONCLUSÃO GERAL.....	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL	

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Preenchimento de tecidos moles

Os preenchimentos de tecidos moles tornaram-se um pilar no arsenal de procedimentos estéticos oferecidos aos pacientes. Já existe uma grande variedade de ofertas disponíveis no mercado, oferecendo uma excelente opção no tratamento do envelhecimento facial, rugas e defeitos de contorno. Eles são uma alternativa viável à cirurgia para pacientes que procuram um meio seguro, minimamente invasivo e acessível de manter uma aparência jovem. (BUCK; ALAM; KIM, 2009; HERRMANN et al., 2018)

De acordo com a Sociedade Americana de Cirurgiões Plásticos, 17,7 milhões de procedimentos cirúrgicos e minimamente invasivos (MIPs) foram realizados nos Estados Unidos (EUA) em 2018. Entre os anos de 2000 e 2018 houve um aumento 228% dos MIPs e estes passaram a representar quase 90% das intervenções estéticas realizadas nos EUA. (MATARASSO; NIKFARJAM; ABRAMOWITZ, 2016). No Brasil, de acordo o Censo feito em 2016 pela Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica, a procura por procedimentos estéticos não cirúrgicos aumentou 390% em dois anos. Tais procedimentos visam atingir resultados ideais com invasão mínima, recuperação mais rápida, cicatrizes reduzidas, baixo nível de estresse e satisfação do paciente (CONSIGLIO et al., 2016). As injeções de preenchimento de tecidos moles para o tratamento do envelhecimento facial podem resultar em diferentes efeitos na superfície da pele, dependendo da localização anatômica e do plano de injeção (COTOFANA et al., 2016)

Tem-se utilizado substâncias com capacidade bioestimuladora e/ou preenchedora como o ácido hialurônico (AH), ácido poli-L-láctico (PLLA), policaprolactona (PCL) e hidroxiapatita (HA) (DEVGAN; SINGH; DURAIRAJ, 2019; GRAIVIER et al., 2007)). Eles são aplicados de forma minimamente invasiva em regiões selecionadas, estimulando a formação de matriz extracelular conjuntiva ou promovendo o aumento de volume de forma discreta e satisfatória. (RUIZ-RODRIGUEZ; MARTIN-GORGOJO, 2019). Estes materiais têm ganhado popularidade por serem uma opção não cirúrgica, com custo relativamente baixo e não requererem muito tempo de recuperação (ROSAMILIA et al., 2020).

1.2 Envelhecimento cutâneo

O envelhecimento é um processo que ocorre naturalmente e a pele funciona como um ótimo marcador temporal, já que está passível de alterações por hábitos, predisposição

genética, morbidades e danos ambientais, principalmente os advindos dos raios ultravioleta (RUV). A diminuição na produção de colágeno é o principal determinante para o envelhecimento da pele, pois a quantidade, a integridade e a renovação desse componente são reduzidas ao longo do tempo. Além disso, a influência da radiação ultravioleta, aumenta a quantidade de metaloproteinases de matriz (MMP), que são responsáveis pela degradação de colágeno, o que contribui para a perda de suporte e elasticidade da pele, levando ao aparecimento de linhas e marcas de expressão (GUTOWSKI, 2016; ZERBINATI; CALLIGARO, 2018).

Embora os sinais de envelhecimento apareçam inicialmente na superfície da pele, com o tempo, as mudanças ocorrem muito além desse nível superficial e afetam todas as estruturas anatômicas, incluindo os músculos, ligamentos retentores, coxins de gordura e estruturas ósseas. Na face, por exemplo, para uma aparência jovem e esteticamente agradável, a arquitetura, o volume e a posição das estruturas anatômicas são essenciais. Os coxins de gordura, por exemplo, são gradualmente redistribuídos; atrofiam e se separam (DONOFRIO, 2000; FITZGERALD et al., 2010; KO; KORN; KIKKAWA, 2016; ROHRICH; PESSA; RISTOW, 2008). A reabsorção óssea notável também ocorre e não fornece o suporte estrutural necessário (DEVGAN; SINGH; DURAIRAJ, 2019; FITZGERALD et al., 2010; MENDELSON; WONG, 2012; ROHRICH; PESSA; RISTOW, 2008; SHAH; KENNEDY, 2018). A pele fica mais delgada, menos elástica, enrugada e as estruturas faciais mais profundas são afetadas pela perda de volume e flacidez (ORIÁ et al., 2003). Tudo isso resulta em uma deflação tridimensional (DEVGAN; SINGH; DURAIRAJ, 2019; MENDELSON; WONG, 2012).

No aspecto histológico, as mudanças faciais ocorrem associadas às alterações no colágeno e elastina, relacionadas ao envelhecimento intrínseco e extrínseco, contribuindo para aumento da flacidez da pele (ORIÁ et al., 2003). O colágeno, principal constituinte da matriz extracelular, torna-se fragmentado, com distribuição espaçada e diminuição na quantidade total devido ao aumento da atividade das metaloproteinases da matriz e alterações no fator de crescimento e transformação- β (TGF- β) por ação das espécies reativas de oxigênio geradas no processo de envelhecimento (FISHER et al., 2009; SHIN et al., 2019). TGF- β é um importante regulador fisiológico da manutenção da matriz extracelular e do reparo tecidual. Controla a homeostase do colágeno, regulando sua produção e degradação e parece desempenhar um papel crucial para o desenvolvimento de fibrose. (VARGA; ROSENBLUM; JIMENEZ, 1987). É um marcador conhecido por ser um potente quimioatraente para células endoteliais e

fibroblastos, bem como para células imunes inatas, como neutrófilos e monócitos (GILBERT; VICKARYOUS; VILORIA-PETIT, 2016).

Um dos grandes desafios do século XXI é o combate ao envelhecimento, definido como um conjunto de mecanismos fisiológicos que alteram as capacidades físicas e intelectuais do ser humano. O envelhecimento da pele é apenas uma parte visível desse processo. O sistema imunológico, outro componente fundamental na manutenção da homeostase cutânea e na cicatrização eficiente de feridas, também sofre os efeitos do tempo e a consequente imunossenescência cutânea limita a resposta anti-infecciosa e vacinal (BOISMAL et al., 2020)

Tradicionalmente, tratamentos que buscam rejuvenescimento facial se concentram na remoção do excesso de pele por meio de ressecção cirúrgica e recapeamento superficial da pele com peelings profundos. Nos últimos anos, ocorreu uma grande mudança na busca pelo rejuvenescimento facial, com ênfase crescente na melhora cosmética minimamente invasiva (ROHRICH; RIOS; FAGIEN, 2003). Desde que a aparência do rosto passou a ser considerada fator importante de bem-estar e saúde, o número de procedimentos estéticos realizados em todo o mundo aumenta continuamente (CARRUTHERS, 2017; OGDEN; GRIFFITHS, 2008; SOBANKO et al., 2015).

A ciência dos biomateriais busca, além do aspecto terapêutico de doenças e traumas, estudar formas de atenuar as marcas do envelhecimento. Neste sentido, busca, fundamentalmente, resgatar parte das funções estéticas ou anatômicas através de uma resposta biomaterial/hospedeiro apropriada. A biofuncionalidade destes materiais está ligada ao seu comportamento no meio fisiológico e, estudar alternativas de tratamento para corrigir e amenizar as deformidades cutâneas, restaurar funções biológicas, contribui substancialmente com a área de biomateriais. Bioestimuladores e preenchedores presentes no mercado apresentam alta biocompatibilidade, no entanto, os mecanismos celulares associados aos seus efeitos são pouco explorados e conhecidos. Nesse sentido parece-nos interessante padronizar um modelo experimental em ratos Wistar para avaliar as alterações celulares e morfológicas da pele decorrentes do uso de ácido hialurônico e policaprolactona.

1.3 Ácido hialurônico

O ácido hialurônico (AH) é um dos principais constituintes da matriz extracelular em vertebrados e membro da família dos glicosaminoglicanos. É um polissacarídeo linear, não ramificado, formado por unidades de dissacarídeo repetidas de ácido (1,4)-glucurônico-b (1,3)-N-acetilglucosamina (GlcNAc) conectadas por ligações glicosídicas. Foi isolado pela primeira

vez do humor vítreo bovino por Meyer e Palmer em 1934 (WEIGEL; HASCALL; TAMMI, 1997).

Este ácido está presente em vários tecidos conectivos de animais, desempenhando diferentes funções, tais como lubrificação, hidratação e manutenção da estrutura tecidual. Além disso, está envolvido em eventos de proliferação e migração celular, bem como angiogênese (SCHIRALDI; GATTA; DE ROSA, 2013). Alguns órgãos possuem altas concentrações de ácido hialurônico(AH), tais como o cordão umbilical, fluido sinovial e o humor vítreo. Na pele e em cartilagens, a sua função é ligar-se à água e manter a tonicidade e elasticidade dos tecidos. Nas articulações proporciona um efeito de amortecimento e lubrificação, proporcionando um meio protetor para as células (PRATT, 2021; SALWOWSKA et al., 2016).

O AH pode ser extraído do fluido sinovial, pele, tendões, do humor vítreo dos olhos, do cordão umbilical e da crista de galo. Quando disponível comercialmente é obtido ainda por fermentação de *Streptococcus* do grupo C ou A. O método de extração química é limitado pela disponibilidade de recursos, enquanto a fermentação de *Streptococcus* é limitada devido os altos custos e preocupações com a patogenicidade. Portanto, um método de produção alternativo usando cepas recombinantes tem sido mais utilizado industrialmente- (YU; STEPHANOPOULOS, 2008)

O padrão dos dissacarídeos que formam AH sintético é idêntico em todos os organismos vivos. Esta propriedade o torna uma molécula altamente biocompatível em comparação com certos preenchimentos baseados em proteínas (por exemplo, colágeno), que podem exibir especificidades de sequência de aminoácidos que podem ser reconhecidas pelo sistema imunológico do paciente- (JEON O, et al., 2007). Os preenchimentos à base de ácido hialurônico (AH) são os preenchimentos dérmicos mais comuns e populares usados para fins estéticos- (BRANDT; CAZZANIGA, 2008)

1.4 Policaprolactona (PCL)

Sintetizado pela primeira vez no início da década de 1930, a policaprolactona (PCL) é um poliéster alifático composto por unidades de repetição de hexanoato, com propriedades físicas, térmicas e mecânicas que dependem de seu peso molecular e do seu grau de linealidade (LABET; THIELEMANS, 2009; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). Embora seja hidrofóbico, o PCL possui várias características desejáveis para a engenharia tecidual, incluindo biodegradabilidade, biocompatibilidade e alta permeabilidade.

O polímero possui uma variedade de aplicações, como fios de sutura, vasos sanguíneos artificiais, regeneração de nervos, partículas carreadoras de medicamentos e aplicações de engenharia de tecidos (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). A partir do PCL é possível produzir uma rede altamente porosa de suporte celular que pode ser dissolvida na maioria dos solventes orgânicos. Além de existirem muitos métodos de fabricação e de poder ser misturado com outros polímeros para melhorar a hidrofobicidade (ABEDALWABA et al., 2013). Aplicações PCL mais recentes incluem o desenvolvimento de nanocompósitos, onde nanopartículas são incorporadas em matrizes PCL em combinação com técnicas de modificação de superfície.

Em 2009, um novo bioestimulador de colágeno (Ellansé®, Sinclair Pharma, London, UK) foi introduzido na Europa. Composto por microesferas de PCL suspensas em um carreador de gel de carboximetilcelulose aquosa (CMC). É o único material de preenchimento à base de PCL. As microesferas de PCL são regulares e com superfície lisa. Ellansé® é composto por 30% em volume de PCL suspensa homogeneamente no carreador de gel de CMC aquoso, que representa 70% do volume. O gel CMC é responsável pelo efeito imediato; as microesferas pela produção contínua de colágeno e formação de um arcabouço que facilita a deposição de matriz extracelular. O CMC é um derivado de celulose não tóxico bem conhecido amplamente utilizado (KIM; VAN ABEL, 2015)

As propriedades reológicas favoráveis da formulação, como a alta elasticidade, contribuem para uma distribuição uniforme das microesferas, evitando a migração. O gel CMC é absorvido em 1 a 2 meses. O efeito imediato é seguido por um efeito sustentado, graças ao colágeno produzido e à formação do arcabouço tridimensional, feito pelas microesferas de PCL distribuídas, que passam a ser entremeadas por fibras colágenas.(CHRISTEN; VERCESI, 2020). Os efeitos de restauração de volume, remodelagem e rejuvenescimento proporcionam resultados naturais duradouros e melhoria da qualidade da pele. A taxa de eventos adversos é baixa e nenhum evento adverso inesperado foi relatado. (CHRISTEN; VERCESI, 2020). O uso da PCL na estética é considerado uma opção segura e duradoura para restaurar proporções e características faciais juvenis e recuperar a aparência saudável (BAE et al., 2016).

1.5 Modelo experimental para a avaliação do efeito de preenchedores subcutâneos

Modelos animais têm se mostrado uma ferramenta útil para avaliar o comportamento biológico e caracterizar o desempenho de diferentes biomateriais. Esta caracterização permite um melhor entendimento de quais produtos podem ser mais adequados

para indicações específicas (HEE et al., 2015). Para o delineamento de um modelo experimental, faz-se necessário a compreensão da organização estrutural da pele do animal selecionado. Dessa forma é possível determinar do local mais adequado para a deposição dos preenchedores a serem avaliados.

Os modelos de alterações morfológicas de pele, tradicionalmente, inoculam os biomateriais na camada dérmica de roedores (CABRAL et al., 2020; JEONG et al., 2016; LEE; LEE; CHUNG, 2019; NICOLAU; MARIJNISSEN-HOFSTÉ; NICOLAU, 2013), um dos planos de injeção utilizados para aplicação de preenchedores. No entanto, por razões de segurança, na clínica, a maioria dos profissionais prefere usar uma cânula romba para as injeções, o que torna o preenchimento a nível dérmico inviável. Com cânula romba, o plano de injeção passa a ser subcutâneo, uma tendência de uso na atualidade (NADRA et al., 2021) Por essa razão, o modelo experimental sugerido no presente trabalho avalia a aplicação subcutânea.

Driskell e colaboradores, em 2014, estudaram a evolução e o desenvolvimento do tecido adiposo associado à pele com o objetivo de estabelecer uma nomenclatura para esse tecido. Subjacente à derme reticular, existe uma camada espessa de adipócitos que envolve os folículos pilosos maduros em roedores e humanos. Tradicionalmente, todo o tecido adiposo branco associado à pele é considerado um depósito denominado hipoderme ou região subcutânea. Porém, cada camada adiposa possui a morfologia e características fisiológicas da camada adiposa varia entre as espécies. Conforme ilustra a Figura 1, elaborada pelo autor em 2014, em roedores, o tecido adiposo branco dérmico está diretamente abaixo da derme reticular da pele e é claramente separado do depósito do tecido adiposo branco subcutâneo, por uma camada muscular chamada de *panniculus carnosus*. Embora muitos outros mamíferos, incluindo humanos, não tenham o *panniculus carnosus*, camadas de tecido adiposo existem sob a derme reticular em várias espécies, incluindo porcos e humanos.

No presente trabalho, os preenchedores foram injetados no tecido adiposo subcutâneo, abaixo do *panniculus carnosus*, simulando o plano de preenchimento mais usado atualmente e propondo um modelo experimental para análise do comportamento celular de biomaterias preenchedores.

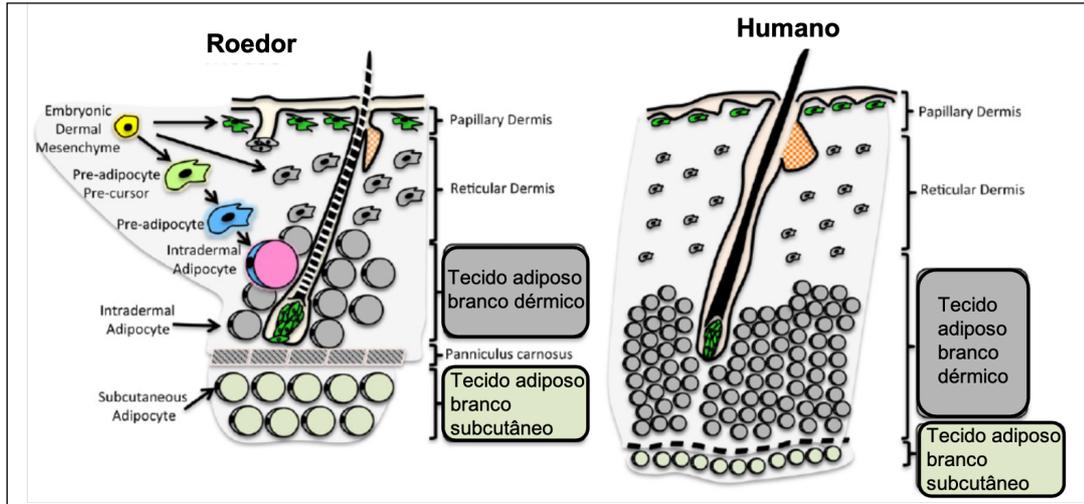


Figura 1 – Diferenças entre a pele e tecido subcutâneo de roedores e humanos.

Comparação entre a estrutura anatômica de pele de roedores e humanos. Definição do desenvolvimento e localização anatômica do tecido adiposo branco dérmico e tecido adiposo branco subcutâneo na pele de mamíferos. Células troco encontradas na derme originam tecido adiposo branco dérmico que consiste nas populações de pré-adipócitos e adipócitos intradérmicos em pele de ratos adultos. O tecido adiposo dérmico tem morfologia e desenvolvimento diferente do tecido adiposo subcutâneo, que está localizado abaixo do pânículo carnoso. A pele humana não apresenta um pânículo carnoso detectável. (Fonte: Adaptado de Driskell, R. R. et al, 2014.)

2 PROPOSIÇÃO.

2.1 Objetivo geral

Desenvolvimento e padronização de um modelo experimental em ratos Wistar para avaliar alterações celulares e morfológicas da pele após aplicação de preenchimento com ácido hialurônico (AH) e policaprolactona (PCL)

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as alterações histopatológicas decorrentes da aplicação de AH e PCL;
- Avaliar a influência do AH e PCL sobre a proliferação de fibroblastos e no número de fibrócitos, associado à expressão do fator de crescimento de fibroblasto (FGF);
- Avaliar os efeitos do AH e PCL na proliferação vascular;
- Avaliar a capacidade do AH e PCL em ativar macrófagos;
- Avaliar os efeitos do AH e PCL na expressão do fator de crescimento transformador beta (TGF- β);
- Avaliar os efeitos do AH e PCL na deposição e organização de fibras colágenas;
- Avaliar a influência do AH e PCL no volume local de tecido adiposo.

3 CAPÍTULO

REGIMENTO INTERNO

Por se tratar de pesquisa envolvendo animais, o projeto de pesquisa referente a esta tese foi submetido à apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob número de protocolo: **7904140420** (Anexo A). Todos os experimentos somente foram iniciados após a aprovação pelo CEUA. Esta Tese de Doutorado baseia-se no Artigo 37º do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado. Os resultados obtidos estão apresentados na forma de artigo científico redigido para ser adequado e submetido à revista escolhida para publicação (Experimental Dermatology; ISSN: 1600-0625; Fator de impacto: 3,5; A2). Esse artigo, no entanto, está apresentado em português seguindo as normas do Programa de Pós-Graduação que determina a apresentação em inglês apenas para os artigos já previamente aceitos para publicação.

Estabelecimento de modelo experimental para avaliação de alterações morfológicas e funcionais da pele de ratos wistar após aplicação subcutânea de preenchedores: efeito do ácido hialurônico e da policaprolactona

Cintia de Melo Braga¹, Conceicao da Silva¹, Deborah Nunes de Melo², Ana Paula Negreiros Nunes³, Gerly Anne de Castro Brito¹, Renata Ferreira de Carvalho Leitão¹

¹Departamento de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil.

²Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil.

³ Departamento de Clínica Odontológica, Faculdade de farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil.

RESUMO

Preenchimentos faciais injetáveis oferecem uma excelente opção no tratamento do envelhecimento facial, rugas e defeitos de contorno. A policaprolactona (PCL) e o ácido hialurônico (AH) têm sido usados com essa finalidade, recuperando o volume tecidual perdido e melhorando o contorno facial. No entanto, os mecanismos envolvidos no comportamento destes biomateriais na intimidade dos tecidos não estão totalmente esclarecidos. O presente trabalho objetiva estabelecer um modelo experimental para investigar as alterações celulares e morfológicas da pele de ratos wistar em resposta à aplicação de AH e PCL, para a compreensão dos mecanismos associados a esses efeitos. O tecido subcutâneo do dorso de ratos wistar, foi usado como área receptora dos biomateriais, representados pelos produtos comerciais Ellansé®, contendo policaprolactona (PCL) e Juvederm Voluma®, contendo, ácido hialurônico(AH). Os animais foram eutanasiados com 30 dias ou 60 dias e amostras de pele tratada e não tratada (NAIVE) foram removidas para avaliação histológica e imunohistoquímica para IBA-1, TGF- β e FGF. Foi realizada análise da deposição de colágeno tipo I e tipo III, da neovascularização e do tecido adiposo. Na análise histológica, AH apresentou-se como material amorfo e basofílico, entremeado por feixes de tecido conjuntivo. Os fragmentos de pele com PCL, apresentavam intensa proliferação celular, com a presença de células gigantes de corpo estranho e maior proliferação capilar quando comparado ao grupo AH. Observou-se um número maior de vasos nos grupos AH e PCL em relação ao NAIVE. Observou-se um aumento significativo na contagem fibroblastos e fibrócitos nos fragmentos de pele inoculadas com AH e PCL, associado ao aumento na expressão de FGF. O número de fibroblastos foi significativamente maior no grupo PCL quando comparado ao AH. O grupo PCL apresentou maior imunomarcagem para IBA-1 e TGF- β comparado aos grupos NAIVE e AH. Observou-se deposição de colágeno nos grupos tratados, especialmente colágeno do tipo III, no grupo PCL quando comparado ao AH. Nossos achados morfológicos demonstram a estimulação da atividade dos fibroblastos e uma regeneração ativa relacionada do tecido conjuntivo, com aumento de proliferação vascular e expressão de marcadores relacionados a proliferação tecidual, principalmente relacionada ao grupo PCL. Observamos ainda, um aumento de tecido adiposo, no entanto, são necessários novos estudos para confirmar esse achado.

Palavras-chave: Preenchimento dérmico, policaprolactona, ácido hialurônico.

1 INTRODUÇÃO

A pele, assim como outros órgãos, sofre um processo natural de envelhecimento como consequência do tempo. Além disto, está exposta diretamente aos danos ambientais, principalmente a radiação ultravioleta (UV) (NAYLOR; WATSON; SHERRATT, 2011). Como consequência desse processo surgem deficiências de contorno, rugas, perda da matriz dérmica; diminuições nas fibras de colágeno e elásticas que resultam em elasticidade diminuída (GUTOWSKI, 2016; ORIÁ et al., 2003; ZERBINATI; CALLIGARO, 2018). Além do envelhecimento cutâneo, também são observadas perdas tridimensionais na face, envolvendo ossos, músculos e coxins de gordura, todos repercutindo na aparência envelhecida. Para minimizar essas perdas, muitos preenchedores dérmicos têm sido usados, preenchendo rítmicos e recuperando volume tecidual devido à doenças ou ao próprio envelhecimento (KONTIS, 2013). Preenchimentos de tecidos moles oferecem uma forma menos invasiva com menos tempo de inatividade do que as intervenções cirúrgicas tradicionais (ASPS, A.S.o.P.S. 2018).

Um dos preenchedores dérmicos bastante utilizados é o ácido hialurônico (AH), devido à sua biocompatibilidade, não imunogenicidade, biodegradabilidade e da alta capacidade de absorção de água. O AH desempenha diferentes funções, tais como lubrificação, hidratação e manutenção da estrutura tecidual. Além disso, está envolvido em eventos de proliferação e migração celular, bem como angiogênese (SCHIRALDI; GATTA; DE ROSA, 2013). Outro material também usado com a finalidade preenchedora é a policaprolactona (PCL), polímero que fornece correção segura e duradoura das perdas de volume relacionadas ao envelhecimento ou alterações de contorno facial. Os principais resultados estéticos obtidos com o uso da PCL são volume restaurado, redefinições de contorno e redução de rugas. Seu efeito positivo na qualidade da pele também tem sido amplamente divulgado. O perfil de segurança, a facilidade de injeção e a longevidade ajustável são fatores determinantes para a escolha desse produto (DE MELO et al., 2017)

Dentro desse contexto, substâncias que restaurem o volume tecidual perdido, como AH e PCL, ganham destaque. No entanto, os mecanismos envolvidos no comportamento desses materiais na intimidade dos tecidos, não estão totalmente esclarecidos. Logo, o presente trabalho, tem como objetivo estabelecer um modelo experimental em ratos Wistar para investigar as alterações celulares e morfológicas da pele após a aplicação de policaprolactona, e ácido hialurônico, utilizando técnicas de histomorfometria e autofluorescência.

2 MÉTODOS

2.1 Desenho do estudo e aspectos éticos

Este foi um estudo randomizado, controlado e cego. Os protocolos experimentais foram executados de acordo com as diretrizes aprovadas pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) para uso de animais experimentais. CONCEA 7904140420 / 2020

2.2 Animais

Os experimentos foram realizados em 16 ratos Wistar, machos, com peso de 200 –250g, provenientes do biotério central da UFC, alojados em área climatizada, com exaustores e redução de ruídos. Os animais foram mantidos em caixas plásticas com tampa metálica em ambiente de ciclo claro-escuro de 12 horas, com 4 animais em cada caixa e temperatura local controlada. A alimentação foi através de ração industrial, com água à livre demanda. Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados, a dor, o sofrimento e o estresse dos mesmos.

2.3 Preenchedores dérmicos

No presente estudo, foram utilizados os preenchedores Juvéderm Voluma® (Allergan®) e Ellansé® (Sinclair Pharma, London, UK). O Juvéderm Voluma® é um preenchedor dérmico homogeneizado composto por ácido hialurônico reticulado na concentração de 20 mg / ml em tampão fisiológico com lidocaína. Juvéderm Voluma® é produzido por *Streptococcus equi* e reticulado usando éter diglicidílico de 1,4-butanodiol (BDDE) em um processo de reticulação de etapa única em que as moléculas de alto e baixo peso molecular são misturadas. O Ellansé®, é um estimulador de colágeno à base de PCL composto por 30% de microesferas de PCL sintéticas suspensas em carboximetilcelulose aquosa a 70%.

2.4. Modelo Experimental para a inoculação de preenchedores dérmicos.

Após anestesia com cetamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (10mg/kg; i.p.), foi realizada tricotomia do dorso dos animais, e injeção das amostras em bolus de 0,05ml, contendo PCL ou AH, no tecido subcutâneo do dorso dos animais, logo abaixo do *panniculus carnosus*, usando uma agulha 26G. Cada animal, recebeu os dois biomateriais, inoculados em dois pontos distintos da região dorso-lateral, respeitando uma distância mínima de 5cm entre eles. Foram acompanhados, diariamente, durante 7 dias para verificar sinais de inflamação aguda nos locais

de inoculação. Os animais foram eutanasiados com overdose de xilazina 2% (30mg/kg) e cetamina 10% (240mg/kg), trinta (n=8) ou sessenta dias (n=8) após a injeção dos preenchedores. A pele do dorso de cada animal foi rebatida, permitindo a realização de uma inspeção visual no tecido subcutâneo com os preenchedores. Buscou-se sinais de inflamação e fibrose, além da observação do ganho de volume relacionado a cada preenchedor. Em seguida, amostras de pele contendo AH, PCL, assim como amostras de pele sem nenhum preenchimento (NAIVE) foram removidas cirurgicamente e divididas em dois fragmentos, sendo um fixado em formalina tamponada a 10% e o outro armazenado a -80 ° C para posterior processamento para confecção de lâminas histológicas e extração de proteína, respectivamente.

2.5 Análise histopatológica

Os tecidos fixados em formalina tamponada a 10% foram processadas para inclusão em parafina. Foram preparadas lâminas histológicas, usando cortes de tecido com 4 µm de espessura, coradas com hematoxilina e eosina (HE), tricrômico de Mallory e picrosirius red. Um patologista experiente, que não conhecia o controle ou o tratamento, realizou todas as análises histológicas. As seções coradas com HE foram avaliadas qualitativamente em pelo menos 6 espécimes por grupo, considerando 5 campos por lâmina, em um aumento de 200x. Foi investigado a presença de achados inflamatórios, tais como infiltrado celular, edema e hemorragia. Realizou-se ainda, a partir das lâminas coradas em HE, a contagem de fibroblastos e fibrócitos em pelo menos 6 lâminas de cada grupo, AH, PCL e NAIVE, considerando 5 campos por lâmina, no aumento de 400x. A partir das lâminas coradas com Tricrômico de Mallory, foi investigado o efeito dos biomateriais na vasculatura do tecido conjuntivo presente na periferia dos implantes, através da quantificação do número de vasos sanguíneos e da área total de vasos. Foram utilizados pelo menos 6 espécimes por grupo. Inicialmente, foram identificadas as áreas de maior vascularização (hot spot) para a delimitação e medição das áreas dos dez maiores vasos sanguíneos, considerando o diâmetro transversal, a partir de imagens digitalizadas. As imagens foram capturadas através de uma câmera digital acoplada a um microscópio Leica, em aumento de 400x, e analisadas com o Software LAS V3.7.0 (LEITÃO et al., 2007). A quantificação dos vasos também foi realizada observando 5 campos por lâmina e 6 espécimes por grupo, utilizando o aumento de 200X. As lâminas coradas com picrosirius red foram fotografadas com câmera DFC 295 acoplada ao microscópio óptico sob luz polarizada (Leica DM 2000). A avaliação da deposição de fibras colágenas do tipo I e III foi realizada na periferia dos biomateriais após polarização da luz, permitindo a diferenciação do

colágeno tipo I (birrefringência laranja- amarelado a laranja e vermelha) e tipo III (birrefringência verde ou verde-amarela). De cada lâmina, foram selecionados e fotomicrografados 10 campos histológicos no aumento de 400x. As imagens foram analisadas com ajuda do *Photoshop*, obtendo-se o percentual de colágeno por meio da análise de partículas automatizadas de acordo com seleção e medida das áreas com base na cor. Os valores para cada tipo de colágeno no *Threshold Colour* foram padronizados para todas as imagens.

2.6 Análise imunohistoquímica

Análises imunohistoquímicas para IBA-1, TGF- β e FGF foram realizadas nos grupos NAIVE, PCL e AH pelo método da estreptavidina-biotina peroxidase em formalina (HSU; RAINE, 1981). Seções de tecido foram fixadas, incluídas em parafina, cortadas em 4 μ m de espessura e montadas em lâminas de microscópio revestidas com poli-L-lisina. Após a desparafinização, a recuperação antigênica foi realizada com solução de recuperação com tampão citrato (pH 6,0) por 20 min a 95 ° C. A peroxidase endógena foi bloqueada com H₂O₂ a 3% por 10 min para reduzir a ligação não específica. As seções foram então incubadas com anti-IBA-1 (diluição 1: 100; Santacruz Biotechnology; Califórnia, EUA), anti- TGF β (diluição 1: 100; Santacruz Biotechnology; Califórnia, EUA), anti-FGF (diluição 1: 100; Santacruz Biotechnology; Califórnia, EUA) diluídos em diluente de anticorpo DAKO por 1 h. Os locais de ligação do anticorpo foram visualizados por incubação com solução de diaminobenzidina-H₂O₂ (DAB, DAKO; Califórnia, EUA). Um controle negativo sem o anticorpo primário foi realizado em paralelo com a incubação. As lâminas foram contrastadas com hematoxilina, desidratadas em série de álcool graduado, clarificadas em xilol e cobertas com lamínula. A positividade para IBA-1, TGF- β , e FGF foi determinada por coloração marrom ao nível do citoplasma no tecido conjuntivo. A quantificação citoplasmática de células imunomarcadas foi realizada em pelo menos 6 lâminas por grupo. De cada lâmina, foram selecionados e fotomicrografados 5 campos histológicos (aumento de 400x) com câmera digital acoplada a um microscópio óptico (Leica DM 2000, Wetzlar, Alemanha). As imagens foram analisadas com ajuda do *Photoshop 8.0* para quantificar o percentual da área imunomarcada. O percentual da área imunomarcada foi calculada a partir da razão entre a área imunomarcada (em pixels) e a área total (em pixels), como descrito anteriormente (BREY et al., 2003).

$$\% \text{ \u00e1rea marcada} = \frac{\text{\u00c1rea imunomarcada (pixels)} \times 100}{\text{\u00c1rea total (pixels)}}$$

2.7 Western blot

Inicialmente, preparou-se 20 μ g de prote\u00edna referente a cada amostra, a partir de tecido congelado, adicionando tamp\u00e3o da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β -mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 s, aquecendo no banho maria (95\u00b0C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4\u00b0C, 30s). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de prote\u00ednas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 v nos primeiros 15 min para deposi\u00e7\u00e3o das amostras no fundo do po\u00e7o e 120 v para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% (FGF, e β -actina) e tamp\u00e3o de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Ap\u00f3s a corrida, efetuou-se a transfer\u00eancia por eletroforese das prote\u00ednas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 vezes por duas horas em tamp\u00e3o de transfer\u00eancia (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Ap\u00f3s esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agita\u00e7\u00e3o constante, para reduzir as liga\u00e7\u00f5es inespec\u00edficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) dilu\u00eddo em tamp\u00e3o salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo tr\u00eas lavagens por 10 min cada. Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas, overnight a 4\u00b0C sob agita\u00e7\u00e3o constante, com os anticorpos FGF (1:100; Invitrogen, EUA) ou anti- β -actina (1:200; Santa Cruz, EUA) dilu\u00eddos em 1% de BSA em TBST. Ap\u00f3s essa etapa, realizaram-se tr\u00eas lavagens de 10 min cada com TBST. As membranas foram incubadas com os anticorpos secund\u00e1rios HRP-goat anti-rabbit (1:1000; Invitrogen, EUA) por duas horas, em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas tr\u00eas vezes, dura\u00e7\u00e3o de 10 min cada, com TBST. Adicionou-se o reagente de quimioluminesc\u00eancia (BioRad, EUA, *Clarity western ECL blotting substrate*) e as membranas foram agitadas por 5 min. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ChemiDoc XRS (BioRad, EUA) ou expostas a filme radiogr\u00e1fico. A densidade das bandas foi mensurada por meio do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA)

2.8 An\u00e1lise estat\u00edstica

Os dados foram apresentados como média \pm SEM. Análise de variação (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, usando GraphPrism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). O nível de significância adotado foi de ($p < 0,05\%$) para todas as análises.

3 RESULTADOS

3.1 Inspeção visual das alterações induzidas por AH e PCL na pele de ratos *wistar*

Ao rebater a pele do dorso do animal (Fig 1A), foi possível observar, macroscopicamente, um aumento de volume tecidual no local de aplicação dos preenchedores, sugerindo a presença de PCL (Fig 1B) e AH (Fig 1C) no tecido subcutâneo. O local receptor do AH apresentou-se de forma nodular, translúcida, com consistência elástica e superfície lisa. Ao cortar do tecido em dois fragmentos, observou-se superfície homogênea e elástica. Já o local que recebeu a inoculação de PCL apresentava bordas irregulares, ligeiramente elevadas, esbranquiçada, com consistência firme e superfície granulosa ao corte.

3.2 Alterações microscópicas induzidas por AH e PCL na pele de ratos *wistar*

A resposta biológica à injeção dos biomateriais foi examinada histologicamente para investigar os efeitos de AH e PCL. Na figura 1D, pode-se observar a estratificação da pele do roedor, evidenciando o plano de aplicação dos biomateriais, abaixo do *panniculus carnosus*. Após 30 dias da injeção, o grupo AH apresentou-se, em lâminas coradas com HE, como um material amorfo, levemente basofílico, dissociando lóbulos de gordura (Fig 1F, 1I); O biomaterial (AH) também estava entremeado por feixes de tecido conjuntivo. Não foi observada nenhuma reação tecidual histologicamente aparente, exceto por pequenos e esporádicos agregados nucleares, compatíveis com células gigante de corpo estranho, e presença de tecido adiposo na periferia do material, conforme ilustra a figura 1O. Em algumas áreas, observou-se ainda discreta proliferação capilar, sempre associada a presença da substância injetada. Já nas amostras de PCL, observou-se proliferação celular acentuada de células com citoplasma granular, núcleos em sua maioria excêntricos, pequenos, redondos e de cromatina fina, compatíveis com macrófagos. Proliferação de pequenos vasos foi observada, assim como de tecido conjuntivo frouxo, com áreas focais apresentando feixes de colágeno mais espessos, demonstrando uma fibrose moderada (Figs. 1G, 1J). Este tecido conjuntivo foi encontrado na periferia da massa de PCL e difusamente entre as partículas do material. Após 60 dias, persistiram os pequenos capilares em AH, porém com distribuição mais regular, sem denotar reação tecidual

considerável (Fig 1L). Nas amostras com PCL, havia menor celularidade, com menor quantidade de células granulares e mais tecido conjuntivo fibroso entre as partículas do material, além de células mais espaçadas entremeadas por feixes fibras colágenas (Fig 1M). A presença de capilares foi mantida quando comparada ao período de 30 dias. Quanto ao tecido adiposo, ao examinar as lâminas coradas em HE, foi possível observar maior presença desse tecido nos grupos tratados com AH e PCL quando comparados ao grupo controle (NAIVE) (Fig 1N, 1O, 1P) e, aparentemente, maior quantidade de gordura em AH quando comparado a PCL.

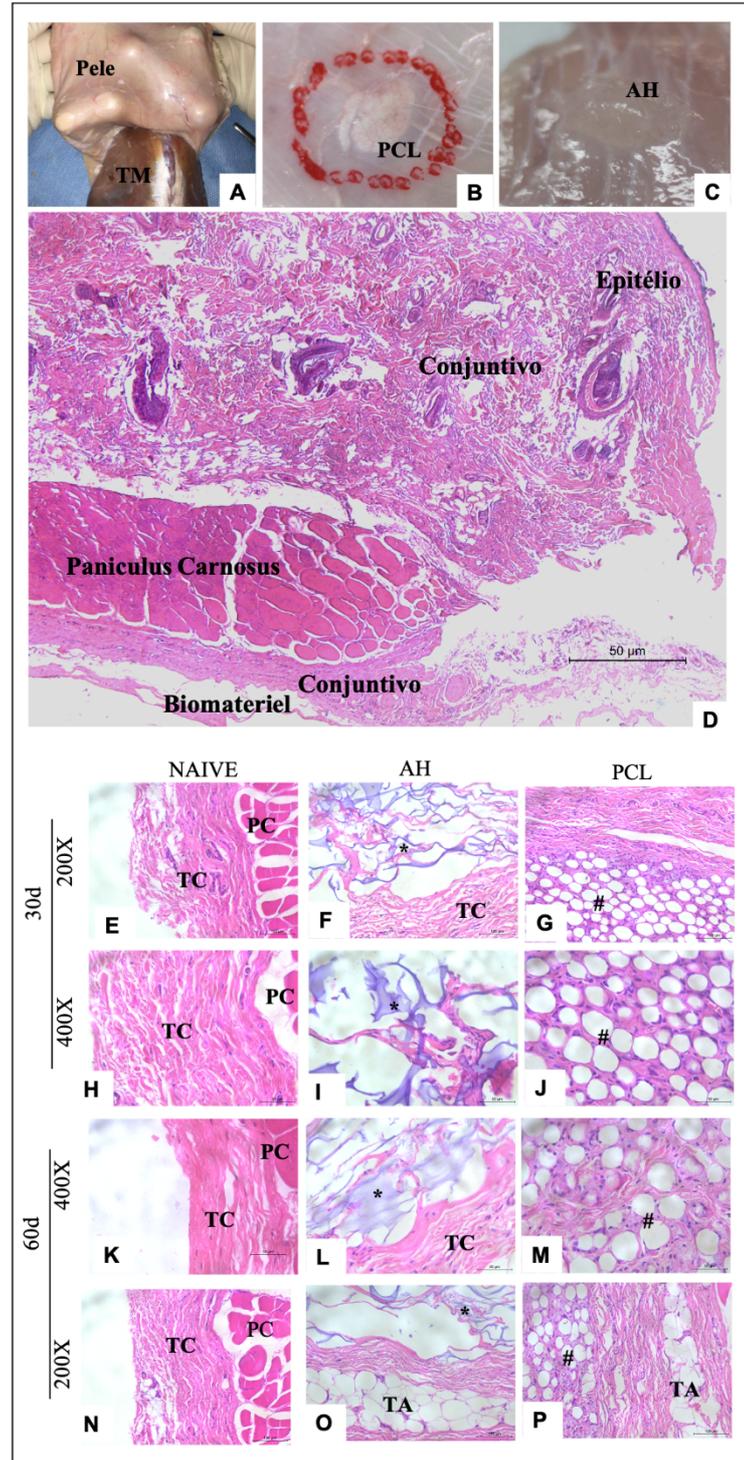


Figura 1 – Macroscopia e microscopia da pele do rato após tratamento com PCL (#) e AH(*). A, pele do animal rebatida evidenciando o tecido muscular (TM). B, inspeção visual de PCL. C, inspeção visual de AH. D, topografia microscópica da pele do rato destacando a presença do *panniculus carnosus* (aumento 40x). E, H, K, são fotomicrografias da pele do rato não tratada, em 30 e 60 dias, representadas pelo grupo NAIVE. F, I e L são fotomicrografias da pele do rato tratada com AH. G, J e M, são fotomicrografias da pele do rato tratada com PCL. N, O e P, evidenciam presença de tecido adiposo (TA) no tecido conjuntivo frouxo, abaixo do *panniculus carnosus*, nos grupos tratados com AH e PCL.

3.3 Efeito dos biomateriais na proliferação celular e neovascularização

A presença de agregados nucleares, fusão de células epitelióides, compatíveis com macrófagos ativados, foram constatadas através da análise da imunomarcação para IBA-1. (Fig 2A), caracterizada pela marcação de células com coloração acastanhada na pele dos ratos submetidos à injeção de AH e PCL. Esta análise mostrou, após 30 dias da aplicação dos biomateriais, aumento significativo de macrófagos ativados em AH e PCL quando comparados ao grupo NAIVE, assim como, maior presença de macrófagos ativados em PCL quando comparado ao AH. ($p < 0,05$). Após 60 dias, o padrão de atividade de macrófagos apresentou uma leve redução nos grupos tratados, sendo significativa apenas a redução dessa atividade do grupo AH quando comparados os períodos de 30 e 60 dias.

A análise imunohistoquímica para TGF- β mostrou, com 30 dias, aumento significativo na imunomarcação de TGF- β nos grupos AH e PCL quando comparados ao grupo NAIVE, mas não apresentaram diferença estatística entre si. Após 60 dias, houve redução significativa na imunomarcação nos grupos AH e PCL quando comparado ao período anterior (30 dias), e observou-se diferença estatística entre os dois grupos tratados, sendo PCL com maior marcação que AH neste período, como representa o gráfico da figura 2B.

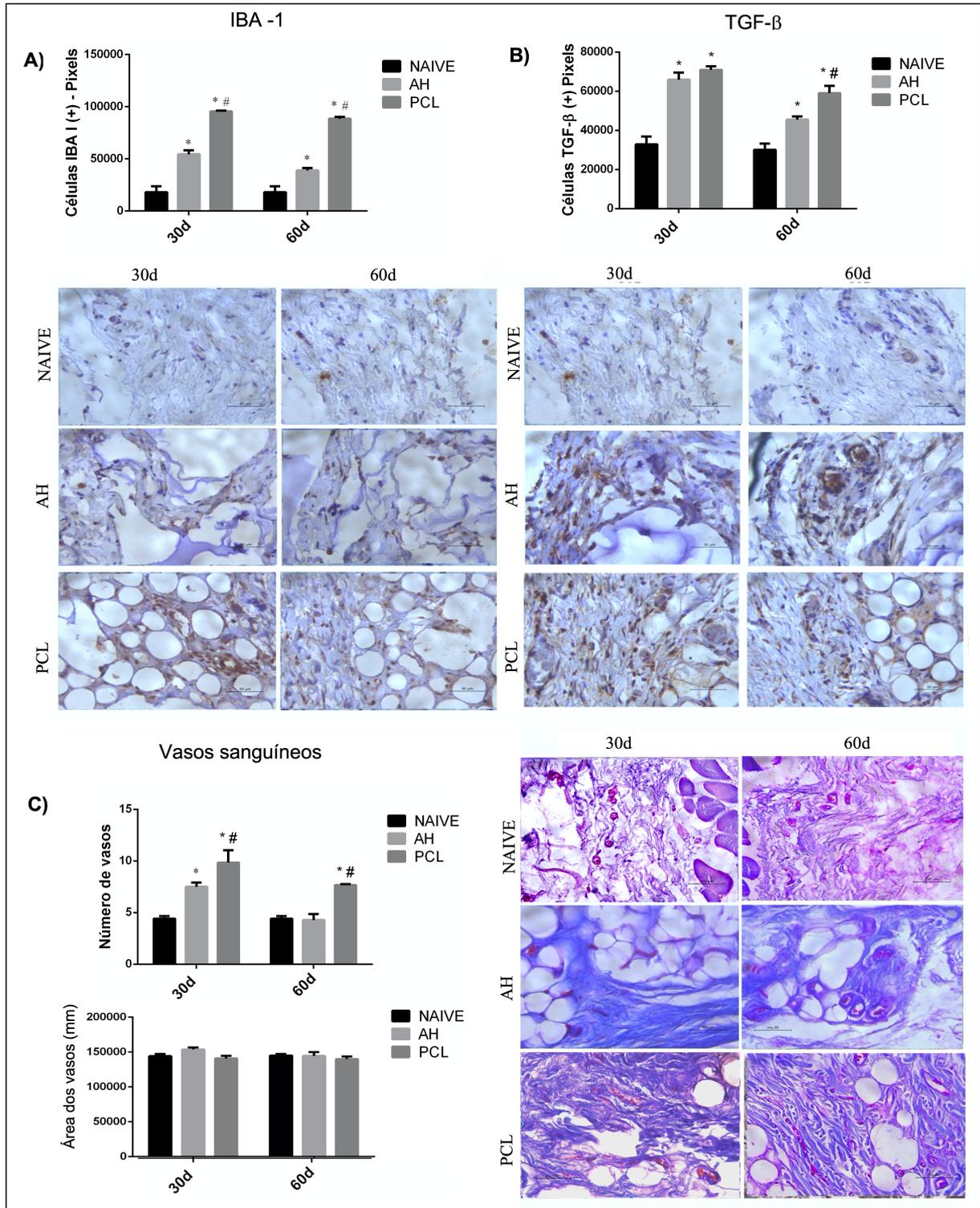


Figura 2 – Imunohistoquímica para IBA-1, TGF-β e análise de neovascularização usando Tricômico de Mallory. A) Imunomarcagem para IBA-1 em 30 e 60 dias e quantificação da presença de macrófagos ativadas expressa no gráfico. B) imunomarcagem para TGF-β em 30 e 60 dias e quantificação expressa no gráfico. C) Medida da área dos vasos na periferia dos biomateriais e quantificação do número de vasos nos períodos de 30 e 60 dias após aplicação. As barras apresentam a média de \pm EPM de 6 animais por grupo. * representa a significativa diferença

de AH e PCL quando comparado ao NAIVE, em 30 e 60 dias. # representa a diferença significativa de PCL em relação a AH. (* $p < 0.001$), ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

A proliferação vascular observada nas lâminas coloradas em HE foi quantificada através da coloração de Tricrômico de Mallory (Fig 2C), permitindo a mensuração do número e da área dos vasos. Quanto ao número de vasos, após 30 dias de injeção, foi observado aumento estatisticamente significativo nos grupos AH e PCL quando comparados ao grupo controle, sendo PCL com número de vasos estatisticamente maior que AH ($p < 0,05$). Após 60 dias, houve uma redução do número de vasos nos grupos experimentais, AH e PCL, mas foi mantido o aumento significativo dos vasos nestes grupos em relação ao NAIVE, como pode ser observado em gráfico na figura 2C. Não foi observado, no entanto, efeito dos biomateriais em relação à área dos vasos em nenhum dos períodos estudados, como também mostra o gráfico e ilustram as imagens (Fig 2C).

Na análise histopatológica também foi evidenciado aumento no número de fibroblastos e fibrócitos, especialmente nos 30 primeiros dias após a injeção dos biomateriais. O aumento foi significativo, para os dois tipos celulares nos grupos AH e PCL quando comparados ao NAIVE ($p < 0,05$). Observou-se maior número dessas células no grupo PCL quando comparado ao AH ($p < 0,05$), em ambos os períodos de observação Fig(3 B).

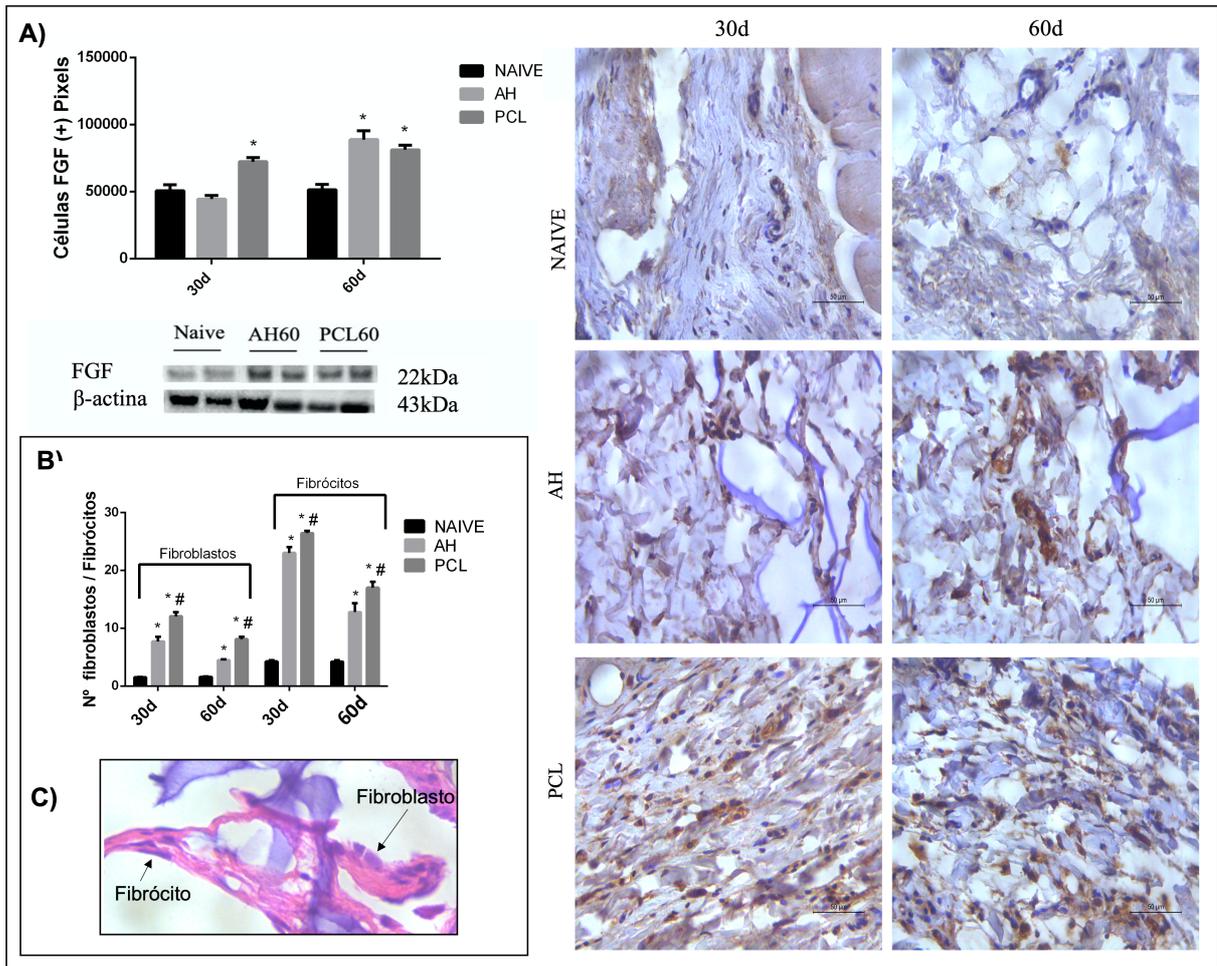


Figura 3 - Número de fibroblastos / fibrócitos, imunomarcção e expressão proteica de FGF. A) Imunomarcção para FGF em 30 e 60 dias e quantificação das células FGF positivas expressas no gráfico. B) Contagem de fibrócitos e fibroblastos em 30 e 60 dias representada no gráfico. C) Imagem ilustrativa do fibrócito e fibroblasto no tecido conjuntivo adjacente ao biomaterial. As barras apresentam a média de \pm EPM de 6 animais por grupo. * representa a significativa diferença de AH e PCL quando comparado ao NAIVE, em 30 e 60 dias. # representa a diferença significativa de PCL em relação a AH. (* $p < 0.001$), ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

A análise imunohistoquímica para FGF mostrou, em 30 dias, um aumento significativo na imunoexpressão desta citocina no grupo PCL quando comparado ao NAIVE e AH, como pode ser observado na figura 3C e confirmado nas imagens representativas da coloração acastanhada no citoplasma dos fibroblastos. Em 60 dias, a imunomarcção para FGF tornou-se maior nos dois grupos tratados quando comparados ao NAIVE, no entanto, não foi observada diferença significativa entre eles. Resultado observado no gráfico da figura 3A que mostra a quantificação dessas células e também no gráfico que mostra a expressão protéica de FGF.

A deposição de colágeno na pele que recebeu os biomateriais foi avaliada, após 30 e 60 dias, através de cortes histológicos corados com *picrosirius red*, observados ao microscópio de

luz polarizada, Evidenciou-se, na periferia dos materiais, que não houve diferença significativa na deposição de colágeno tipo I nos períodos avaliados e também entre os grupos. Este colágeno está representado por fibras organizadas de coloração amarelo avermelhada, tanto no grupo AH como em PCL ($p < 0.001$) (Fig 4) Nesses grupos, era possível observar uma dominância de colágeno tipo III, representado por fibras de cor verde, como pode ser observado nas ilustrações e confirmado nos gráficos que quantificam as áreas marcadas em vermelho e verde, representando, respectivamente, os colágenos tipo I e III.

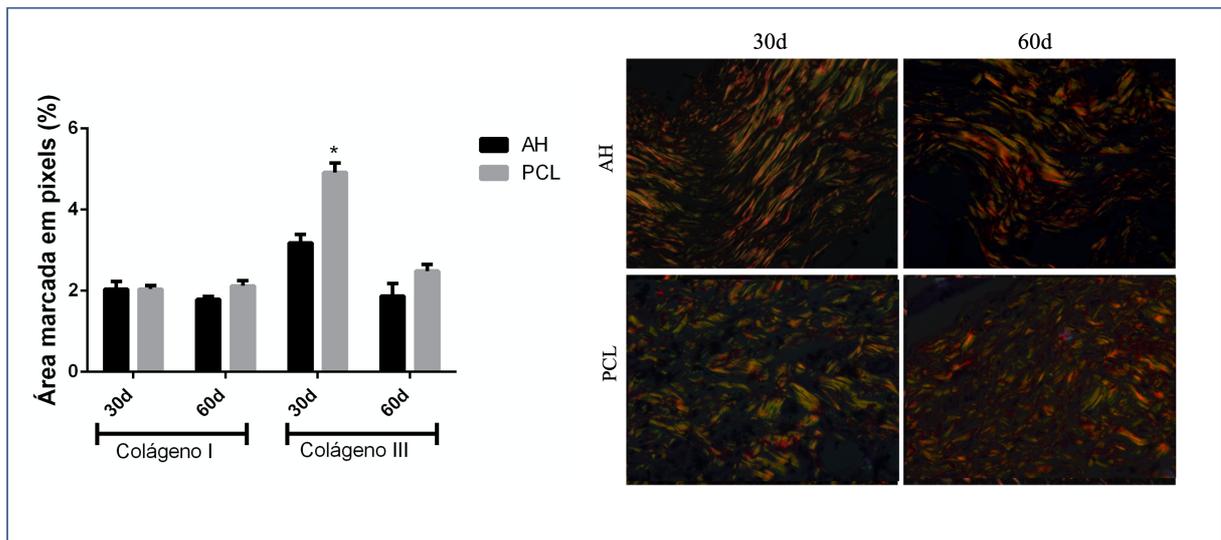


Figura 4– Gráfico representativo da quantificação de fibras colágenas tipo I e III coradas com Picosirius Red e fotomicrografia da pele do rato nos grupos experimentais AH e PCL. * representa diferença significativa de PCL quando comparado ao AH em 30 dias. (* $p < 0.001$), ANOVA seguido pelo teste de Tukey. É possível observar a presença de colágeno tipo I (vermelho) e colágeno tipo III (verde). Aumento de 400x.

4 DISCUSSÃO

Os preenchedores são as substâncias mais utilizadas na medicina estética (HANEKE, 2014) e são uma alternativa viável à cirurgia para pacientes que procuram um meio seguro, minimamente invasivo e acessível de manter uma aparência jovem e corrigir deficiências de contorno da face. (BERTOSSO et al., 2020). Estes produtos tornaram-se um pilar no arsenal de procedimentos estéticos e médicos oferecidos aos pacientes. Já existe uma grande variedade de opções disponíveis no mercado, mas os mecanismos associados aos seus efeitos ainda não estão totalmente esclarecidos (BUCK; ALAM; KIM, 2009). Sabe-se que as reações fisiológicas induzidas por estes biomateriais são condicionadas pelas suas propriedades físicas, bioquímicas, pelas características dos pacientes e pela técnica de injeção utilizada. (GRIFFITH, 2000)

Para uma melhor compreensão da interação biológica desempenhada pelos preenchedores, modelos em roedores têm se mostrado uma ferramenta útil, avaliando, além de alterações morfológicas na pele, a capacidade de elevação e a resistência à deformação do tecido (HEE et al., 2015). Tradicionalmente, estes modelos experimentais, inoculam os biomateriais na camada dérmica (CABRAL et al., 2020; JEONG et al., 2016; LEE; LEE; CHUNG, 2019; NICOLAU; MARIJNISSEN-HOFSTÉ, 2013), um dos planos de injeção utilizados para aplicação de preenchedores. No entanto, por razões de segurança, na clínica, a maioria dos profissionais prefere usar uma cânula romba para as injeções, o que torna o preenchimento a nível dérmico inviável. Com cânula romba, o plano de injeção passa a ser subcutâneo, uma tendência de uso na atualidade (NADRA et al., 2021). Por essa razão, o modelo experimental padronizado no presente trabalho avalia os efeitos da aplicação subcutânea dos preenchedores.

Em geral, a estrutura da pele de roedores, difere da pele humana. Este fato deve ser sempre levado em consideração em estudos experimentais. Nos roedores, a epiderme é delgada, há uma alta densidade de folículos pilosos. O tecido adiposo branco dérmico é delgado e está diretamente abaixo da derme reticular, claramente separado do tecido adiposo branco subcutâneo por uma camada muscular chamada de *panniculus carnosus* (RIPPA; KALABUSHEVA; VOROTELYAK, 2019). Embora muitos outros mamíferos, incluindo humanos, não tenham o *panniculus carnosus*, existem camadas de tecido adiposo sob a derme reticular em várias espécies, incluindo porcos e humanos (DRISKELL et al., 2014). Considerando a perspectiva de aplicação de preenchedores a nível subcutâneo, iniciamos o desenvolvimento e padronização do nosso modelo experimental, possibilitando avaliar as

alterações morfológicas na pele de ratos wistar após aplicação do ácido hialurônico (AH) e policaprolactona (PCL). A crescente demanda mundial por preenchimentos de tecidos moles, nos motiva a investigar a ação direta desses materiais na intimidade dos tecidos.

A inspeção visual da pele rebatida dos ratos após a eutanásia, assim como a análise histopatológica, nos dois períodos avaliados, confirma a biocompatibilidade, não sendo evidenciados sinais clínicos, macro ou microscópicos de inflamação. Essa inspeção visual da pele rebatida, mostrou que AH apresentou-se com aspecto nodular, aparentando ganho de volume, já a partir de 30 dias após a inoculação do biomaterial. Já nos tecidos com PCL, foi observada perda de volume após 30 e 60 dias em relação ao volume inicial, observado a partir da inspeção visual da pele do animal logo após a aplicação do Ellansé. Está descrito na literatura que, de fato, ocorre reabsorção do carreador de CMC, presente no Ellansé, ao longo dos dias. Com 70% de CMC na sua composição, Ellansé, apresenta diminuição geral no volume devido a reabsorção do veículo após um mês. Aproximadamente 50% do volume original de CMC é substituído por novo tecido vascular e tecidos conjuntivo. A chave para manter o volume após a injeção de preenchimento a base de PCL, portanto, é a formação de novo tecido vascular e a deposição de colágeno (KIM; VAN ABEL, 2015), efeitos observados no presente estudo. A partir de nossos achados, pode-se sugerir que a capacidade volumizadora de PCL está aquém da capacidade do ácido hialurônico. A literatura relata, de fato, que o AH, além de promover volumização de forma direta, tem uma importante função higroscópica, contribuindo para o ganho de volume, visto que os AH presentes no mercado têm apresentação abaixo da sua concentração de equilíbrio (STOCKS et al., 2011).

A análise histológica confirmou a presença dos biomateriais no tecido subcutâneo, abaixo da camada muscular esquelética *panniculus carnosus*. O grupo AH não apresentou nenhuma reação tecidual histologicamente aparente, exceto pela discreta neovascularização e aparente aumento de tecido adiposo na região periimplante. AH é considerado, por alguns autores, minimamente imunogênico, por ser degradado enzimaticamente pela hialuronidase, justificando ter se tornado o preenchedor temporário mais comumente utilizado e com resultados clinicamente satisfatórios de volumização. Corroborando com esse dado, o presente trabalho observou claramente um aumento importante no volume da área que recebeu HA tanto 30 como 60 dias após a aplicação.

Os preenchimentos dérmicos de ácido hialurônico são hoje considerados o material preferido para intervenções cosméticas minimamente invasivas (SIGNORINI et al., 2016). Sugere-se que o fato de a unidade monomérica básica de AH não apresentar especificidade para qualquer órgão ou espécie, AH é considerado imunologicamente inerte (BRANDT;

CAZZANIGA, 2008; FARAHANI et al., 2012). De acordo com trabalho publicado na literatura, uma vez injetado na pele, o AH provoca uma reação inflamatória leve na fronteira do tecido hospedeiro seguida por um crescimento fibroso gradual, que ancora o gel ao tecido circundante do hospedeiro, evitando a migração do produto (CHRISTENSEN et al., 2008). Nossas análises macroscópicas e histológicas, após 30 e 60 dias, não detectaram nenhum sinal característico de inflamação aguda. Observamos que AH induz a formação discreta de tecido conjuntivo fibroso, o que provavelmente contribui para evitar o deslocamento do material. Ademais, observamos um aumento de tecido adiposo na periferia de AH, no entanto, nenhuma mensuração foi realizada, sendo necessários estudos adicionais para confirmar esse achado.

Em 2020, Nadra e colaboradores demonstraram a partir de estudos *in vitro* que o tratamento com AH reticulado mostrou efeitos benéficos na adesão e sobrevivência celular, bem como na redução da lipólise basal e induzida em adipócitos totalmente maduros. Nesse trabalho, AH reticulado promoveu a aderência celular e preservou a capacidade adipogênica dos pré-adipócitos durante uma cultura celular prolongada, trazendo evidências adicionais do papel benéfico dos preenchedores à base de HA reticulado na manutenção da gordura subcutânea. Por outro lado, outro trabalho publicado em 2017 demonstrou que AH promoveu a proliferação de células-tronco derivadas do tecido adiposo e diferenciação dessas células em adipócitos, sugerindo uma ação do AH relacionada ao aumento do número de adipócitos. (GUO et al., 2017). A presença de tecido adiposo associada ao PCL, pareceu menos evidente quando comparada ao AH e maior quando comparada ao NAIVE. No entanto, novos estudos são necessários para confirmar esse dado. Não encontramos evidências na literatura que corroborem com esse achado.

Ao analisar as amostras de PCL, identificamos, entre as partículas do material, intensa proliferação celular, neovascularização, além de deposição de matriz extracelular entre as partículas e deposição discreta de colágeno. Foram observados ainda, alguns focos do carreador CMC na análise de 30 dias e 60 dias. Após 60 dias, a celularidade reduziu, mostrando um aparente aumento na deposição de colágeno entre as partículas quando comparado à análise de 30 dias. Há relato na literatura de que o próprio CMC, carreador das partículas de PCL, parece estimular a reação do tecido até a completa reabsorção do biomaterial, sendo encontradas algumas células gigantes na sua periferia (KIM; VAN ABEL, 2015). Está bem estabelecido na literatura, que a presença de biomaterial pode induzir uma reação de corpo estranho, onde monócitos migram para o tecido, transformando-se em macrófagos, que juntamente com as plaquetas, sintetizam fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformador beta (TGF β), que promovem a migração de fibroblastos (ZDOLSEK; EATON;

TANG, 2007). De fato, foi observado, através de imunohistoquímica para IBA-1, aparecimento de maior número de macrófagos ativados nos grupos experimentais AH e PCL quando comparado ao grupo controle (NAIVE). Este aumento foi mais expressivo na avaliação de 30 dias, sendo as amostras com PCL com número maior de macrófagos ativados quando comparado ao AH e, ambos (AH e PCL) apresentando maior imunomarcagem para IBA-1 em relação ao grupo NAIVE. Em 60 dias, houve redução significativa de macrófagos ativados em AH em relação à análise de 30 dias, no entanto, a diferença estatística em relação ao NAIVE foi mantida. Ao contrário, o número de macrófagos ativados no grupo PCL manteve-se alto mesmo após 60 dias, uma vez que não se observou diferença significativa na imunomarcagem de IBA-1 entre as análises de 30 e 60 dias nas amostras com PCL. O maior número de macrófagos neste grupo provavelmente está relacionado às características físicas da policaprolactona, que se apresenta como microesferas imunologicamente inertes e grandes o suficiente para induzir agregação de macrófagos. Como foi mencionando anteriormente, os macrófagos liberam TGF- β , regulando o comportamento celular. TGF- β é conhecido por ser um potente quimioatraente para células endoteliais e fibroblastos, bem como para células da imunidade inata, como neutrófilos e monócitos (GILBERT; VICKARYOUS; VILORIA-PETIT, 2016), TGF- β pode ser considerado um importante regulador fisiológico tanto para a manutenção da matriz extracelular, como também em processos de reparo tecidual (VARGA; ROSENBLOOM; JIMENEZ, 1987).

Observamos, no presente trabalho, diferenças significativas na imunomarcagem para TGF- β entre os grupos AH e PCL quando comparados ao grupo NAIVE, tanto nas análises de 30 dias, como nas de 60 dias. Observou-se, nas análises de 60 dias, aumento significativo da expressão de TGF- β no grupo PCL em relação ao AH, o que não foi observado com 30 dias. A imunomarcagem foi observada especialmente no citoplasma de macrófagos. O aumento significativo na imunomarcagem de TGF- β no grupo PCL em relação ao AH após 60 dias está relacionado à maior expressão de IBA-1 observada no PCL, uma vez que a expressão de TGF- β por macrófagos é bem consolidado na literatura. Ademais, o aumento significativo de fibroblastos nos grupos AH e PCL (em relação ao NAIVE) também contribui para compreender a maior expressão de TGF- β nesses grupos. Apesar de macrófagos serem a maior fonte de TGF- β , estudos demonstram a expressão desse fator de crescimento por fibroblastos, especialmente durante processos de reparo (NEVERS et al., 2017), fechando um ciclo, no qual TGF- β expresso por macrófagos é um potente quimioatraente para fibroblastos, que por sua vez podem expressar TGF- β . De fato, o presente estudo observou um aumento significativo de fibroblastos e fibrócitos nos grupos AH e PCL em relação ao NAIVE em ambos os tempos avaliados. Os

fibroblastos são as células mais abundantes na derme. Uma característica dessas células é a capacidade de sintetizar e remodelar ECM. Em um processo de reparo, os preenchedores funcionam como um arcabouço para a proliferação dessas células, que são a base principal para a fibrogênese (DARBY; HEWITSON, 2007)

A literatura descreve ainda o papel quimioatraente de TGF- β para células endoteliais (FRANGOIANNIS, 2020). Corroborando com esse estudo, observou-se no presente trabalho aumento significativo no número de pequenos vasos, capilares, nos grupos AH e PCL, 30 dias após as inoculações, quando comparados ao NAIVE. O maior número de vasos no grupo PCL, ao contrário do observado no AH, manteve-se significativamente maior em relação do NAIVE mesmo após 60 dias. Esse resultado pode ser justificado, pelo menos em parte, pela manutenção de alta expressão de TGF- β observado no grupo PCL, mesmo após 60 dias. Apesar do maior número de vasos observados nos grupos AH e PCL, não se observou diferenças estatísticas em relação à área dos vasos entre os grupos experimentais, provavelmente devido à pequena secção transversal dos capilares.

Observamos ainda um aumento da expressão protéica, através de imunohistoquímica e Western Blot, para o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) tanto nos grupos AH como em PCL, quando comparados ao grupo NAIVE. Os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) são mitógenos de amplo espectro e regulam uma gama de funções celulares, incluindo a migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência. A sinalização de FGF desempenha papéis essenciais no desenvolvimento, metabolismo e homeostase do tecido. (XIE et al., 2020). Os membros da família FGF aumentam a proliferação e ativação de fibroblastos, estimulando o acúmulo de colágeno, bem como estimulando a angiogênese, sendo essenciais no processo de reparo tecidual (ARAÚJO et al., 2019; MURAKAMI; SIMONS, 2009; TURNER; GROSE, 2010). Os nossos dados reforçam esses estudos, uma vez que a maior expressão protéica de FGF foi acompanhada por aumento significativo do número de fibroblastos, vasos sanguíneos e colágeno em tecido inoculado por ambos os preenchedores avaliados.

A deposição de colágeno foi avaliada no tecido conjuntivo adjacente a massa de AH e PCL através da coloração de Picrosirius Red sob luz polarizada. Observamos que houve maior deposição de colágeno III, no período de 30 dias, em PCL quando comparado a AH, provavelmente relacionado ao aumento de FGF já neste período. Em 60 dias, houve redução significativa de colágeno III nos grupos AH e PCL comparando ao período anterior, sem diferença significativa entre AH e PCL. No entanto, quando avaliado o colágeno tipo I, não houve diferença entre AH e PCL em nenhum dos períodos avaliados.

Sabe-se que o colágeno I é o componente dominante da ECM na derme e é responsável por aproximadamente 70% de seu peso seco. Além disso, na pele adulta intacta, a proporção de colágeno I para colágeno III é de aproximadamente 4: 1. A quantidade de colágeno III aumenta temporariamente quando a pele é lesionada e durante a formação da neoderme. Na pele humana recém-cicatrizada, a proporção de colágeno I e III é de cerca de 1: 1, como na pele neonatal. Ao mesmo tempo, em resposta à uma ferida, a pele pode apresentar maior quantidade de colágeno III e ácido hialurônico, e menor quantidade de colágeno I (WOODLEY, 2017; XUE; JACKSON, 2015). A maior quantidade de colágeno III observadas em nossas análises, provavelmente está associada ao processo natural de reparo e cicatrização do tecido, que forma, inicialmente, colágeno III.

Em 2014, Kim e colaboradores, em estudo piloto, investigaram se o preenchimento dérmico à base de PCL induzia neocolagênese em tecido humano por análise histológica. Dois pacientes indicados para cirurgia de elevação da têmpora, foram incluídos no estudo. A PCL foi injetada por via intradérmica na região temporal, logo abaixo da linha do cabelo, área que seria incluída em cirurgia de lifting, 13 meses após a injeção. O tecido coletado após a cirurgia mostrou formação de colágeno ao redor das partículas de PCL, mantidas, mesmo após 13 meses da injeção. Outro estudo, comparou a neocolagênese e a produção de elastina estimulada por Radiesse® (hidroxilapatita de cálcio; CaHA, Merz Pharmaceuticals GmbH) e pelo Juvéderm® VOLUMA®, mesmo AH utilizado no presente estudo. Vinte e quatro mulheres receberam injeção supraperiosteal na região retroauricular e biopsias por punção foram feitas após 4 e 9 meses das injeções. Os autores destacaram que colágeno tipo I gradualmente substituiu o tipo III após 9 meses de injeção (YUTSKOVSKAYA; KOGAN; LESHUNOV, 2014)

Em 2014, um estudo em animais, utilizando Ellansé mostrou formação de colágeno tipo III e tipo I após 9 meses da injeção do biomaterial, e mais tarde, 21 meses após, predomínio de colágeno tipo I, que se depositou em torno das microesferas de PCL, sugerindo que o colágeno tipo III é substituído pelo I a longo prazo, de forma semelhante ao que ocorre na cicatrização de feridas (NICOLAU; MARIJNISSEN-HOFSTÉ, 2013). Baseando-se nesses estudos, acreditamos que a predominância de colágeno III, em relação ao colágeno I, observada no presente trabalho, esteja relacionada ao tempo de observação. Acreditamos que maior quantidade de colágeno I seria detectada em um período maior de observação.

Nossos dados reforçam estudos da literatura que mostram benefícios dos preenchedores provisórios na manutenção do volume da pele. Apesar do AH ter apresentado um efeito maior de volumização, o PCL foi capaz de estimular maior deposição de colágeno após 30 dias em relação ao AH. Esse resultado é reforçado pelo maior número de fibroblastos

observado no grupo PCL. Especulamos, portanto, que a maior volumização observada no grupo AH deva-se principalmente à sua ação higroscópica, efeito já bem estabelecido na literatura. Idealmente, na aplicação de materiais biocompatíveis não deve ocorrer reação tecidual exacerbada adjacente ao produto injetado. Espera-se uma inflamação leve, controlada e subclínica para prolongar a longevidade do produto. A reação local do tecido ao corpo estranho, por meio da fagocitose, é indiscutivelmente o fator mais importante na determinação da longevidade do preenchimento. Neste processo, algumas enzimas presentes no tecido e os radicais livres quebram o produto preenchedor em fragmentos que são removidos pelos macrófagos circulantes e, subsequentemente, pelos canais linfáticos (BENTKOVER, 2009).

CONCLUSÃO

O modelo padronizado para a avaliação de materiais preenchedores no subcutâneo, mostrou-se viável, mimetizando o plano de injeção utilizado em humanos e permitindo a análise das alterações celulares e morfológicas propostas neste estudo. Nossos achados morfológicos demonstram a estimulação da atividade dos fibroblastos e uma regeneração ativa relacionada do tecido conjuntivo, com aumento de proliferação vascular e expressão dos marcadores FGF e TGF- β , relacionados a proliferação tecidual, principalmente no grupo PCL. Observamos aumento de tecido adiposo relacionado aos grupos tratados. No entanto, não foi feita quantificação para mensurar esse aumento, sendo necessários novos estudos para confirmar esse achado e investigar o papel no tecido adiposo quando em contato com AH e PCL. O estudo indica que os períodos avaliados induziram a deposição de colágeno, principalmente do tipo III.

REFERENCIAS

ARAÚJO, R. et al. Fibroblast Growth Factors: A Controlling Mechanism of Skin Aging. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 32, p. 275–282, 2019.

BENTKOVER, S. H. The biology of facial fillers. **Facial Plastic Surgery**, v. 25, n. 2, p. 73–85, 2009.

BERTOSSI, D. et al. Non surgical facial reshaping using MD Codes. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 19, n. 9, p. 2219–2228, 2020.

BRANDT, F. S.; CAZZANIGA, A. Hyaluronic acid gel fillers in the management of facial aging. **Clinical Interventions in Aging**, v. 3, n. 1, p. 153–159, 2008.

BREY, E. M. et al. Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 51, n. 5, p. 575–584, 2003.

BUCK, D. W.; ALAM, M.; KIM, J. Y. S. Injectable fillers for facial rejuvenation: a review. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**, v. 62, n. 1, p. 11–18, 2009.

CABRAL, L. R. B. et al. Effect of hyaluronic acid and poly-l-lactic acid dermal fillers on collagen synthesis: An in vitro and in vivo study. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 13, p. 701–710, 2020.

CHRISTENSEN, L. H. et al. Tissue integration of polyacrylamide hydrogel: An experimental study of periurethral, perivesical, and mammary gland tissue in the pig. **Dermatologic Surgery**, v. 34, n. SUPPL 1, p. 68–77, 2008.

DARBY, I. A.; HEWITSON, T. D. Fibroblast Differentiation in Wound Healing and Fibrosis. 2007.

DE MELO, F. et al. Recommendations for volume augmentation and rejuvenation of the face

and hands with the new generation polycaprolactone-based collagen stimulator (Ellansé®). **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 10, p. 431–440, 2017.

DRISKELL, R. R. et al. Defining dermal adipose tissue. **Experimental Dermatology**, v. 23, n. 9, p. 629–631, 1 set. 2014.

FARAHANI, S. S. et al. Lip Nodules Caused by Hyaluronic Acid Filler Injection: Report of Three Cases. **Head and Neck Pathology**, v. 6, n. 1, p. 16–20, 2012.

FRANGOIANNIS, N. G. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. **Journal of experimental Medicina**, v. 217, 2020.

GILBERT, R. W. D.; VICKARYOUS, M. K.; VILORIA-PETIT, A. M. Biology Developmental Signalling by Transforming Growth Factor Beta Isoforms in Wound Healing and Tissue Regeneration. **Journal of Developmental Biology**, v. 4, n. doi: 10.3390/jdb4020021, p. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC58317>, 2016.

GRIFFITH, L. G. POLYMERIC BIOMATERIALS p. **Acta Biomaterialia**, v. 48, p. 263–277, 2000.

GUO, J. et al. Adipose-derived stem cells and hyaluronic acid based gel compatibility, studied in vitro. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 4, p. 4095–4100, 2017.

GUTOWSKI, K. A. Hyaluronic Acid Fillers: Science and Clinical Uses. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 43, n. 3, p. 489–496, 2016.

HANEKE, E. Adverse effects of fillers and their histopathology. **Facial Plastic Surgery**, v. 30, n. 6, p. 599–614, 2014.

HEE, C. K. et al. Rheological Properties and In Vivo Performance Characteristics of Soft Tissue Fillers. **Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]**, v. 41, p. S373–S381, 2015.

JEONG, S. H. et al. Long-lasting and bioactive hyaluronic acid-hydroxyapatite composite

hydrogels for injectable dermal fillers: Physical properties and in vivo durability. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 31, n. 3, p. 464–474, 2016.

KIM, J. A.; VAN ABEL, D. Neocollagenesis in human tissue injected with a polycaprolactone-based dermal filler. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 17, n. 2, p. 99–101, 2015.

KONTIS, T. C. Contemporary review of injectable facial fillers. **JAMA Facial Plastic Surgery**, v. 15, n. 1, p. 58–64, 2013.

LEE, S. J.; LEE, W. S.; CHUNG, C. H. Safety and efficacy of polycaprolactone copolymer nanosphere hydrogel injected into the scalp dermal tissue of rats. **Archives of Aesthetic Plastic Surgery**, v. 25, n. 4, p. 147–153, 2019.

LEITÃO, R. F. C. et al. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 59, n. 5, p. 603–612, 2007.

MELO, F. et al. Recommendations for volume augmentation and rejuvenation of the face and hands with the new generation polycaprolactone-based collagen stimulator (Ellansé®). **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 10, p. 431–440, 2017.

MURAKAMI, M.; SIMONS, M. Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. **Current Opinion in Hematology**, v. 15, p. 215–220, 2009.

NADRA, K. et al. A hyaluronic acid-based filler reduces lipolysis in human mature adipocytes and maintains adherence and lipid accumulation of long-term differentiated human preadipocytes. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 20, n. 5, p. 1474–1482, 2021.

NAYLOR, E. C.; WATSON, R. E. B.; SHERRATT, M. J. Molecular aspects of skin ageing. **Maturitas**, v. 69, n. 3, p. 249–256, 2011.

NEVERS, T. et al. Th1 effector T cells selectively orchestrate cardiac fibrosis in nonischemic heart failure. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 11, p. 3311–3329, 2017.

NICOLAU, P. J.; MARIJNISSEN-HOFSTÉ, J. Neocollagenesis after injection of a polycaprolactone based dermal filler in a rabbit. **The European Journal of Aesthetic Medicine and Dermatology original Article Neocollagenesis**, v. 3, n. 1, p. 19–26, 2013.

ORIÁ, R. B. et al. Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histo-morfometria e autofluorescência. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 425–434, 2003.

RIPPA, A. L.; KALABUSHEVA, E. P.; VOROTELYAK, E. A. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. **Cells**, v. 8, n. 6, p. 607, 2019.

SCHIRALDI, C.; GATTA, A.; DE ROSA, M. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. **Intech**, v. 32, n. July, p. 137–144, 2013.

SIGNORINI, M. et al. Global Aesthetics Consensus: Avoidance and Management of Complications from Hyaluronic Acid Fillers - Evidence- and Opinion-Based Review and Consensus Recommendations. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 137, n. 6, p. 961e-971e, 2016.

STOCKS, D. et al. Rheological evaluation of the physical properties of hyaluronic acid dermal fillers. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 10, n. 9, p. 974–80, 2011.

TURNER, N.; GROSE, R. Fibroblast growth factor signalling: From development to cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 2, p. 116–129, 2010.

VARGA, J.; ROSENBLOOM, J.; JIMENEZ, S. A. Transforming growth factor beta (TGF beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. **Biochemical Journal**, v. 247, n. 3, p. 597, 1987.

WOODLEY, D. T. Distinct Fibroblasts in the Papillary and Reticular Dermis: Implications for Wound Healing. **Dermatologic Clinics**, v. 35, n. 1, p. 95–100, 2017.

XIE, Y. et al. FGF/FGFR signaling in health and disease. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, 2020.

XUE, M.; JACKSON, C. J. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 3, p. 119–136, 2015.

YUTSKOVSKAYA, Y.; KOGAN, E.; LESHUNOV, E. A randomized, split-face, histomorphologic study comparing a volumetric calcium hydroxylapatite and a hyaluronic acid-based dermal filler. **J Drugs Dermatol**, v. 13, n. 9, p. 1047–1052, 2014.

ZDOLSEK, J.; EATON, J. W.; TANG, L. Histamine release and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans. **Journal of Translational Medicine**, v. 5, p. 1–6, 2007.

ZERBINATI, N.; CALLIGARO, A. Calcium hydroxylapatite treatment of human skin: Evidence of collagen turnover through picosirius red staining and circularly polarized microscopy. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 11, p. 29–35, 2018.

4 CONCLUSÃO GERAL

- O modelo padronizado para a avaliação de materiais preenchedores no subcutâneo, mostrou-se viável, mimetizando o plano de injeção utilizado em humanos e permitindo a análise das alterações celulares e morfológicas propostas neste estudo.
- Nossos achados morfológicos demonstram deposição de matriz extracelular no tecido adjacente aos biomateriais e envolvendo as partículas de PCL.
- AH e PCL induziram aumento da imunomarcagem de IBA-1, TGF- β e FGF
- AH e PCL induziram a neovascularização e proliferação de fibroblastos e fibrócitos
- Observamos aumento de tecido adiposo relacionado aos grupos tratados. No entanto, não foi feita quantificação para mensurar esse aumento, sendo necessários novos estudos para confirmar esse achado e investigar o papel no tecido adiposo quando em contato com AH e PCL.
- Nos períodos avaliados AH e PCL induziram a deposição de colágeno, principalmente do tipo III.

REFERÊNCIAS

- ABEDALWAFI, M. et al. Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A review. **Reviews on Advanced Materials Science**, v. 34, n. 2, p. 123–140, 2013.
- BAE, B. et al. Safety and long-term efficacy of forehead contouring with a polycaprolactone-based dermal filler. **Dermatologic Surgery**, v. 42, n. 11, p. 1256–1260, 2016.
- BOISMAL, F. et al. Vieillissement cutané. v. d, p. 1163–1172, 2020.
- BRANDT, F. S.; CAZZANIGA, A. Hyaluronic acid gel fillers in the management of facial aging. **Clinical Interventions in Aging**, v. 3, n. 1, p. 153–159, 2008.
- BUCK, D. W.; ALAM, M.; KIM, J. Y. S. Injectable fillers for facial rejuvenation: a review. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**, v. 62, n. 1, p. 11–18, 2009.
- CABRAL, L. R. B. et al. Effect of hyaluronic acid and poly-l-lactic acid dermal fillers on collagen synthesis: An in vitro and in vivo study. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 13, p. 701–710, 2020.
- CARRUTHERS, J. Suggested Injection Zone for Soft Tissue Fillers in the Temple ? Cutaneous Involvement in Adult Multisystemic Langerhans Cell Histiocytosis Successfully Treated With Pulsed Dye Laser. **Dermatologic Surgery**, p. 756–757, 2017.
- CHRISTEN, M. O.; VERCESI, F. Polycaprolactone: How a well-known and futuristic polymer has become an innovative collagen-stimulator in esthetics. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 13, p. 31–48, 2020.
- CONSIGLIO, F. et al. Suture with resorbable cones: Histology and physico-mechanical features. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 36, n. 3, p. NP122–NP127, 2016.
- COTOFANA, S. et al. The Anatomy of the Aging Face: A Review. **Facial Plastic Surgery**, v. 32, n. 3, p. 253–260, 2016.
- DEVGAN, L.; SINGH, P.; DURAIRAJ, K. Minimally Invasive Facial Cosmetic Procedures. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 52, n. 3, p. 443–459, 2019.
- DONOFRIO, L. M. Fat distribution: A morphologic study of the aging face. **Dermatologic Surgery**, v. 26, n. 12, p. 1107–1112, 2000.
- FISHER, G. et al. Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. **The American journal of pathology**, v. 174, n. 1, p. 101–114, 2009.
- FITZGERALD, R. et al. Facial aesthetic analysis. **Aesthetic surgery journal / the American Society for Aesthetic Plastic surgery**, v. 30 Suppl, 2010.
- GILBERT, R. W. D.; VICKARYOUS, M. K.; VILORIA-PETIT, A. M. Biology

- Developmental Signalling by Transforming Growth Factor Beta Isoforms in Wound Healing and Tissue Regeneration. **Journal of Developmental Biology**, v. 4, n. doi: 10.3390/jdb402021, p. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC58317>, 2016.
- GOLDIE, K. et al. Global Consensus Guidelines for the Injection of Diluted and Hyperdiluted Calcium Hydroxylapatite for Skin Tightening. **Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]**, v. 44, p. S32–S41, 2018.
- GRAIVIER, M. H. et al. Calcium hydroxylapatite (Radiesse) for correction of the mid- and lower face: Consensus recommendations. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 120, n. 6 S SUPPL., p. 55–66, 2007.
- GUTOWSKI, K. A. Hyaluronic Acid Fillers: Science and Clinical Uses. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 43, n. 3, p. 489–496, 2016.
- HEE, C. K. et al. Rheological Properties and In Vivo Performance Characteristics of Soft Tissue Fillers. **Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]**, v. 41, p. S373–S381, 2015.
- HERRMANN, J. L. et al. Biochemistry, Physiology, and Tissue Interactions of Contemporary Biodegradable Injectable Dermal Fillers. **Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]**, v. 44, p. S19–S31, 2018.
- JEONG, S. H. et al. Long-lasting and bioactive hyaluronic acid-hydroxyapatite composite hydrogels for injectable dermal fillers: Physical properties and in vivo durability. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 31, n. 3, p. 464–474, 2016.
- KIM, J. A.; VAN ABEL, D. Neocollagenesis in human tissue injected with a polycaprolactone-based dermal filler. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 17, n. 2, p. 99–101, 2015.
- KO, A. C.; KORN, B. S.; KIKKAWA, D. O. The Aging Face. **Survey of Ophthalmology**, 2016.
- LABET, M.; THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: A review. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 12, p. 3484–3504, 2009.
- LEE, S. J.; LEE, W. S.; CHUNG, C. H. Safety and efficacy of polycaprolactone copolymer nanosphere hydrogel injected into the scalp dermal tissue of rats. **Archives of Aesthetic Plastic Surgery**, v. 25, n. 4, p. 147–153, 2019.
- MATARASSO, A.; NIKFARJAM, J.; ABRAMOWITZ, L. Incorporating Minimally Invasive Procedures into an Aesthetic Surgery Practice. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 43, n. 3, p. 449–457, 2016.
- MENDELSON, B.; WONG, C. H. Changes in the facial skeleton with aging: Implications and clinical applications in facial rejuvenation. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 36, n. 4, p. 753–760, 2012.
- NADRA, K. et al. A hyaluronic acid-based filler reduces lipolysis in human mature

adipocytes and maintains adherence and lipid accumulation of long-term differentiated human preadipocytes. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 20, n. 5, p. 1474–1482, 2021.

NICOLAU, PIERRE J.; MARIJNISSEN-HOFSTÉ, J.; NICOLAU, P. J. original Article The European Journal of Aesthetic Medicine and Dermatology. **Medicine and Dermatology**, v. 3, n. 1, p. 19–26, 2013.

OGDEN, S.; GRIFFITHS, T. W. A review of minimally invasive cosmetic procedures. **BJD British Journal of Dermatology**, 2008.

ORIÁ, R. B. et al. Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histo-morfometria e autofluorescência. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 425–434, 2003.

PRATT, R. L. Hyaluronan and the fascial frontier. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, 2021.

ROHRICH, R. J.; PESSA, J. E.; RISTOW, B. The youthful cheek and the deep medial fat compartment. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 121, n. 6, p. 2107–2112, 2008.

ROHRICH, R. J.; RIOS, J. L.; FAGIEN, S. Role of new fillers in facial rejuvenation: A cautious outlook. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 112, n. 7, p. 1899–1902, 2003.

ROSAMILIA, G. et al. Soft tissue distribution pattern of facial soft tissue fillers with different viscoelastic properties. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 19, n. 2, p. 312–320, 2020.

RUIZ-RODRIGUEZ, R.; MARTIN-GORGOJO, A. Integral Facial Management of the Aesthetic Patient: The Skin Age Management Protocol. **Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)**, v. 110, n. 3, p. 197–205, 2019.

SALWOWSKA, N. M. et al. Physicochemical properties and application of hyaluronic acid : a systematic review. **Review Article Journal of Cosmetic Dermatology**, p. 1–7, 2016.

SCHIRALDI, C.; GATTA, A.; DE ROSA, M. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. **Intech**, v. 32, n. July, p. 137–144, 2013.

SHAH, A. R.; KENNEDY, P. M. The Aging Face. **Medical Clinics of North America**, v. 102, n. 6, p. 1041–1054, 2018.

SHIN, J. W. et al. Molecular mechanisms of dermal aging and antiaging approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2019.

SOBANKO, J. F. et al. Motivations for Seeking Minimally Invasive Cosmetic Procedures in an Academic Outpatient Setting Cosmetic Medicine. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 35, n. 8, p. 1014–1020, 2015.

VARGA, J.; ROSENBLOOM, J.; JIMENEZ, S. A. Transforming growth factor beta (TGF beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. **Biochemical Journal**, v. 247, n. 3, p. 597, 1987.

WEIGEL, P. H.; HASCALL, V. C.; TAMMI, M. Hyaluronan Synthases*. 1997.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 35, n. 10, p. 1217–1256, 2010.

YU, H.; STEPHANOPOULOS, G. Metabolic engineering of Escherichia coli for biosynthesis of hyaluronic acid. **Metabolic Engineering**, v. 10, n. 1, p. 24–32, 2008.

ZERBINATI, N.; CALLIGARO, A. Calcium hydroxylapatite treatment of human skin: Evidence of collagen turnover through picosirius red staining and circularly polarized microscopy. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 11, p. 29–35, 2018.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DA RESPOSTA CELULAR A ENXERTOS DE HIDROXIAPATITA, POLICAPROLACTONA E ÁCIDO HIALURÔNICO DE ALTA DENSIDADE EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS", protocolada sob o CEUA nº 7904140420 (ID 001779), sob a responsabilidade de **Renata Ferreira de Carvalho Leitão e equipe; CINTIA DE MELO BRAGA** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 15/12/2020.

We certify that the proposal "Microscopic evaluation of the cellular response to grafts of hydroxyapatite, polycaprolactone and high density hyaluronic acid in the subcutaneous tissue of rats.", utilizing 24 Heterogenics rats (24 males), protocol number CEUA 7904140420 (ID 001779), under the responsibility of **Renata Ferreira de Carvalho Leitão and team; CINTIA DE MELO BRAGA** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 12/15/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [06/2020](#) a [12/2020](#)

Área: [Departamento de Morfologia](#)

Origem: [Biotério Central da UFC](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [3 a 5 meses](#)

N: [24](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [200 a 300 g](#)

Local do experimento: Os experimentos serão conduzidos com ratos wistar machos, com peso variando de 200 - 300g, provenientes do biotério central da UFC e mantidos no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, recebendo água e comida ad libitum, em sala climatizada, com exaustão de gases e redução de ruídos.

Fortaleza, 24 de julho de 2021

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará