



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



MORGANA REGINA MENDONÇA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MORFO-FISICOQUIMICA E
BIOLÓGICA DE DIFERENTES ACIDOS HIALURÔNICOS (AHS). ESTUDO IN
VIVO E IN VITRO**

Araraquara

2017



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



MORGANA REGINA MENDONÇA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MORFO-FISICOQUIMICA E
BIOLÓGICA DE DIFERENTES ACIDOS HIALURÔNICOS (AHS). ESTUDO IN
VIVO E IN VITRO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Odontológicas – Área de Dentística
Restauradora, da Faculdade de
Odontologia de Araraquara, da para
obtenção de título de Mestre em Ciências
Odontológicas

Orientador: Dr. Hermes Pretel

Araraquara

2017

Oliveira, Morgana Regina Mendonça de

Avaliação das propriedades morfo-fisicoquímica e biológica de diferentes ácidos hialurônicos (AHS). Estudo in vivo e in vitro / Morgana Regina Mendonça de Oliveira. -- Araraquara: [s.n.], 2017
98 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Dentística Restauradora) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Hermes Pretel

1. Ácido hialurônico 2. Preenchedores dérmicos 3. Reologia
I. Título

MORGANA REGINA MENDONÇA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MORFO-FISICOQUIMICA E
BIOLÓGICA DE DIFERENTES ACIDOS HIALURÔNICOS (AHS). ESTUDO IN
VIVO E IN VITRO**

Comissão julgadora

Para obtenção de grau de Mestre

Presidente e orientador Dr. Hermes Pretel

2º Examinador: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

3º Examinador: Profa. Dra. Thallita Pereira Queiroz

Araraquara, 20 de setembro de 2017.

MORGANA REGINA MENDONÇA DE OLIVEIRA

NASCIMENTO: 01 de março de 1992, Araraquara, SP

FILIAÇÃO: Osmir Batista de Oliveira Junior e Denise Cristina Mendonça de Oliveria

2011 a 2014	Graduação em Odontologia pela Universidade de Araraquara - Uniara
2015 até a presente data	Aluna do curso de Mestrado no Programa de PósGraduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista – UNESP.
Mai de 2016	Estagio científico internacional realizado no Departamento de Materiais Dentários da Oklahoma University - Oklahoma, USA.
Setembro/2016 a Março de 2017	Mestrado Sandwich na Trent University - Canadá, no programa Emerging Leaders in the Americans Program

DEDICATÓRIA

A minha família, meus pais, Osmir e Denise, e meu irmão Caike, por serem a minha base, inspiração, admiração e meus grandes motivadores na busca para alcançar meus objetivos da melhor maneira possível. Por me conceder suporte, incentivo, e amor em todas as etapas da vida, sonhando comigo todos os meus sonhos. Dedico a vocês, todas as minhas pequenas e grandes conquistas.

Aos professores que foram responsáveis por ensinar, e inspirar meus caminhos na odontologia, e a todos que direta ou indiretamente foram responsáveis por alguma parte de meu crescimento, pessoal ou profissional, durante essa fase que esta sendo concluída.

Dedico ainda, aos meus amigos Mayara, Mauricio e Aldrey, meus parceiros de vida, por compartilharem mais uma etapa comigo e fazerem cada fase que compartilhamos juntos mais leve.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a **DEUS** por estar sempre a frente de meus caminhos e escolhas, cuidando para que meus passos me levem na direção certa e que em todas as minhas atividades suas bênçãos se manifestem.

Ao meu orientador Dr. Hermes Pretel, por esses anos que dispôs de sua paciência e dedicação, proporcionando crescimento e ensinamentos compartilhando sua amizade durante toda esta jornada.

Um agradecimento especial ao meu pai Osmir, sem o qual o caminho não teria sido trilhado desta maneira. Sua dedicação e amor ao trabalho me inspiram e me fizeram conquista este título e, a cada dia, abrem novos horizontes e possibilidades. Tenho muito orgulho em ter você como inspiração.

A minha mãe Denise e meu irmão Caike por completarem a base de nossa família e por proporcionarem todo o apoio necessário, dando estímulo, equilíbrio e serenidade para que minha carreira pudesse avançar em direção ao sucesso profissional. Sou muito grata por ter vocês ao meu lado.

Agradeço a doutoranda, amiga e sócia Helida Barud pela amizade, aprendizado em conjunto e momentos compartilhados, além de, toda ajuda e suporte nas etapas experimentais e cuidados com os ratos, que foram de fundamental importância na execução deste trabalho.

Não poderia de fazer um agradecimento muito especial aos alunos de iniciação científica Priscila Carvalho e Renan Barroso, sem aos quais esta pesquisa teria sido mais difícil de ser executada.

Um agradecimento especial aos Profs(as). Dr(as) Hernane Barud, Andreia Meneguim e Sandra Andrea Cruz pelos ensinamentos, apoio incondicional e colaboração na interpretação de dados que compõe este trabalho.

Agradeço as empresas colaboradoras DMC Equipamentos e InnovaPharma por fornecerem os materiais utilizados nessa dissertação.

Ao amigo Cristian Sánchez, pelo apoio e ensino de fotografia, que facilitaram muito o registro das etapas metodológicas e a confecção da apresentação dos resultados.

Agradeço ainda aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr, aos funcionários do biotério e os funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora pela dedicação e apoio recebidos.

Agradeço especialmente ao Sr. Pedro Sergio Simões, funcionário de Departamento de Morfologia, pelo apoio na execução da etapa de processamento histológico desse trabalho.

Agradeço ao LMA-IQ pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura e ao M.Sc. Diego Luis Tita.

Agradecemos ao Laboratório I Multiusuário de Análises Químicas pela disponibilidade de utilização do Espectrômetro de absorção na região do infravermelho médio e aos técnicos Alberto Camilo Alécio e Naira Canevarolo Pesquero

Aos funcionários da Secretaria da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de araraquara - UNESP, Cristiano e Alexandre pelo apoio e dedicação.

Aos funcionários da bibliotecas da FOAr - UNESP, meu agradecimento pelo auxílio e disposição.

Ao Prof. Dr. Andrew Vreugdenhil, Jayme Stabler e a todo grupo de pesquisa da universidade de TRENT University, no Canadá, pelo aprendizado que me proporcionaram nos âmbitos pessoal, profissional e científico. Ao

governo Canadense e ao programa ELAP pela bolsa de estudo fornecida da qual fez-se possível esta experiência incrível.

Ao CNPQ pelo fornecimento da bolsa de estudo que apoiou minha formação e realização deste estudo.

Oliveira MRM. Avaliação das propriedades morfo-físicoquímica e biológica de diferentes ácidos hialurônicos (AHs). Estudo in vivo e in vitro [Dissertação Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi realizar a caracterização morfo-físicoquímica e avaliar a resposta histopatológica e a biodegradação de AH indicados para preenchimento dérmico: DMC-Facial 12,5% (D12) e RennovaFill (RF) e aumento volumétrico de tecido: DMC-Facial 15% (D15) e RennovaLift (RL). A caracterização foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia dispersiva de raios X (EDX) e infra vermelha com transformada de Fourier (FT-IR) e reometria dinâmica oscilatória. Para avaliação da resposta histopatológica e da biodegradação foi implantado 0,1 mL de cada AH no plano sub-dérmico do dorso de 25 ratos Hostsman, aleatoriamente distribuídos em 5 grupos (n=5), de acordo com o tempo de implantação dos AH (7, 14, 30, 60 e 120 dias). Um examinador experiente (HP), calibrado e cego para os AHs utilizados analisou os cortes. Modelo loglinear e teste de qui-quadrado (χ^2) foram utilizados para avaliar a associação entre os AH e a intensidade da resposta histopatológica e biodegradação para $p < 0,05$. A hipótese nula (H_0) foi rejeitada pois tanto na caracterização morfo-físicoquímica quanto na avaliação da resposta histopatológica e da biodegradação mostraram diferenças significativas entre os AHs testados. Pode-se concluir que: 1) AH com a mesma indicação clínica diferem tanto nas características morfo-físicoquímicas como na resposta inflamatória provocada e no padrão de biodegradação. 2) O nível de resposta histopatológica depende do AH utilizado. 3) Uma morfologia estrutural característica de D12 e D15, formada por câmaras separadas por septos finos, com bordas afiladas e irregulares, provoca maior resposta inflamatória. 4) Todos os AH testados estimularam a neo-formação de fibroblasto e colágeno. 5) A biodegradação dos AH é inversamente proporcional a taxa de reticulação.

Palavras-chave: Ácido hialurônico. Preenchedores dérmicos. Reologia.

Oliveira MRM. Evaluation of the morpho-physico-chemical and biological properties of different hyaluronic acids (HAs). In vivo and in vitro study. [Dissertação Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

Abstract

The aim of this study was to perform the morpho-physicochemical characterization and to evaluate the histopathological response and biodegradation of AH indicated for dermal filling: DMC-Facial 12.5% (D12) and RennovaFill (RF) and tissue lifting: DMC-Facial 15% (D15) and RennovaLift (RL). The characterization was performed by scanning electron microscopy (SEM), X-ray dispersive (EDX) and Fourier transform infra red spectroscopy (FT-IR) and oscillatory dynamic rheometry. To evaluate the histopathological response and biodegradation, 0.1 mL of each HA was implanted in the dorsal subdermal plane of 25 male Hostsman rats, randomly distributed in 5 groups (n = 5), according to the time of implantation of AH: 7, 14, 30, 60 and 120 days). Slides were analyzed by a experienced examiner (HP), calibrated and blinded for the AH used. Loglinear model and chi-square statistical test (χ^2) were used to evaluate the association between AH and the intensity of histopathological response and biodegradation for $p < 0.05$. Results: The null hypothesis (H0) was rejected because both the morpho-physicochemically characterization and the histopathological analysis showed significant differences between the tested AHs. It can be concluded that: 1) AH with the same clinical indication differ in the morpho-physicochemical characteristics, in the inflammatory response and in the biodegradation pattern. 2) The level of histopathological response depends on the AH used. 3) A structural morphology characteristic of D12 and D15, formed by chambers separated by thin septa, with sharp and irregular borders, causes a greater inflammatory response, 4) All HA tested stimulated the fibroblast and collagen neoformation. 5) The biodegradation of HA is inversely proportional to the crosslinking rate.

Keywords Hyaluronic acid. Dermal fillers. Rheology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Considerações Gerais sobre o AH	19
2.2	Reticulação e Degradação	21
2.3	Resposta Tecidual	26
2.4	Propriedades Reológicas	29
2.5	Aplicações Odontológicas	31
3	PROPOSIÇÃO	33
4	MATERIAL E MÉTODO	34
4.1	Avaliação Visual/Táctil	36
4.2	Preparo das Amostras para MEV, EDX e FT-IR	36
4.3	Avaliação da Morfologia Estrutural por MEV	39
4.4	Composição Química Elementar (EDX)	39
4.5	Composição dos AH por FT-IR	39
4.6	Propriedades Viscoelásticas por Reometria Dinâmica Oscilatória	42
4.7	Resposta Tecidual aos Implantes de AH e Reabsorção do Biopolímero	43
4.7.1	Anestesia dos animais	44
4.7.2	Preparo dos animais	45
4.7.3	Obtenção das peças para análise e eutanásia dos animais	46
4.7.4	Processamento laboratorial e histológico	46
4.7.5	Resposta tecidual aos implantes de AH	47
4.8	Análise Estatística	48
5	RESULTADOS	50
5.1	Avaliação Visual/Táctil das Características Macroscópicas	50
5.2	Avaliação da Microestrutura e Micromorfologia Externa e Interna por MEV	51
5.3	Investigação da Composição Química Elementar por EDX	53
5.4	Investigação da Composição dos AH por FT-IR	55
5.5	Propriedades Viscoelásticas Analisadas por Reômetria Dinâmica Oscilatória ...	57
5.6	Resposta Tecidual aos Implantes de AH e Reabsorção do Biopolímero	63

5.7	Análise Estatística dos Eventos Histológicos.....	69
5.7.1	Intensidade da resposta inflamatória	69
5.7.2	Presença de fibroblasto/angiogênese	69
5.7.3	Presença e organização de fibra colágena	71
5.7.4	Degradação do gel	72
5.8	Diferença entre Produtos	75
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICE A - ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MEV	88
	APÊNDICE B - TABELA DE FREQUÊNCIAS DA RESPOSTA TECIDUAL	96
	ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA.....	98

1 INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) está presente naturalmente nos tecidos e fluidos do corpo humano em quantidades que decrescem ao longo do anos e é sintetizado principalmente pelos fibroblastos (Necaset al.³⁹, 2008). O mesmo é classificado bioquimicamente como um biopolímero de alto peso molecular de carga negativa, composto por várias unidades dissacarídeas de ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetilglicosamida (GlcNAc) unidas alternadamente por ligações glicosídicas β - 1,3 e β - 1,4. (Necas et al.³⁹, 2008)

Devido as suas excelentes características de biocompatibilidade, permeação ao oxigênio, biodegradabilidade, não mutagenicidade, modulação do processo de diferenciação celular e de reparação tecidual, (Bertl et al.⁶, 2015) e (Faga et al.¹⁶, 2013), o AH tem sido indicado como biomaterial substituto na reposição do fluido sinovial de articulações (Legré-Boyer³² 2015), lubrificante ocular (Lee et al.²⁹, 2017), prevenção de aderência tecidual em pós-cirúrgicos (Chen et al.¹⁰, 2017), regenerar feridas (Voigt et al.⁴⁷, 2012), hidratar a derme (Iannitti et al.²⁴, 2016), reduzir as marcas de expressões estáticas advindo do envelhecimento (Necas et al.³⁹, 2008) (Kablik et al.²⁷, 2009), tratar a harmonia facial, complementar o tratamento periodontal (Dahiya et al.¹³, 2013) e (Bertl et al.⁶, 2015), tratar o espaço negro gengival (Becker et al.⁴, 2010),(Lee et al.³¹, 2016) e no capeamento pulpar (Bogović et al.⁷, 2011). Recentemente, também tem sido indicado como barreira antiaderente/antimicrobiana para aplicações em medicina e odontologia (Romanò et al.⁴³, 2017).

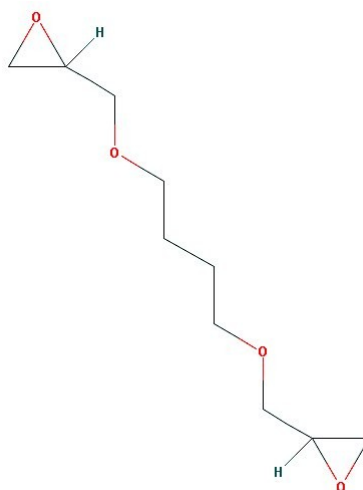
A versatilidade de tratamentos com o AH se faz possível devido à possibilidade de alterações na sua estrutura química pelo processo denominado de reticulação, também conhecido como *cross-linked* (Tezel et al.⁴⁶, 2008). O AH natural, sem as alterações da reticulação, não apresenta as propriedades mecânicas necessárias para promover a expansão e sustentação dos tecidos, muito menos durabilidade no quesito de biodegradação, o que inviabiliza sua aplicação clínica, pois é rapidamente degradado pela enzima hialuronidase (Tezel et al.⁴⁶, 2008).

A reação de reticulação pode ser realizada por via carboxílica ou hidroxílica, complementada ou não, pela agregação de outros compostos à cadeia polimérica (De Boulle et al.¹⁴, 2013). O objetivo da reticulação é aumentar o número de duplas ligações entre os diferentes segmentos das moléculas de AH, favorecendo a

formação de uma malha molecular densa, menos susceptível a biodegradação e com propriedades físico-mecânicas otimizadas. (Friedman et al.²¹, 2002) e (De Boulle et al.¹⁴, 2013).

Os agentes reticulantes mais utilizados nos AHs indicados para o uso clínico em preenchimentos dérmicos, e aumento volumétrico dos tecidos é o 1,4-butanodiol éter glicídico (BDDE) - Figura 1, ou a divinilsulfona (Segura et al.⁴⁴, 2005) e (De Boulle et al.¹⁴, 2013), que são adicionados na reação de reticulação para melhorar a estabilidade e, principalmente, para reduzir a biodegradação dos AHs (Noh et al.⁴⁰, 2006), (De Boulle et al.¹⁴, 2013), (Cena et al.⁸, 2014) e (Al-Sibani et al.¹, 2015).

Figura 1 - Molécula do reticulante 1,4-butanodiol éter glicídico (BDDE)



Fonte: PubChem URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

O processo de reticulação possibilita a obtenção de diferentes características do gel de AH. São descritos na literatura por exemplo sete diferentes tecnologias de reticulações que atualmente apresentam patentes de diferentes fabricantes como por exemplo: AH não animal estabilizado (NASHA®), Matriz 3D®, Vicross®, Tecnologia de equilíbrio ideal (OBT®), Matriz coesiva polidensa (CPM®), AH resiliente (RHA®) e rede interpenetrante (IPN-Like®). Cada uma destas tecnologias resulta em um gel de AH com características estruturais, de coesividade e viscoelasticidade distintas, o que, por sua vez, determinará diferenças em outras propriedades físico-mecânicas como comportamento térmico, padrão de intumescimento (swelling), e taxa de biodegradação (Micheels et al.³⁷, 2016).

Além disso, ainda pode se destacar que o processo de reticulação influi diretamente na biocompatibilidade do gel de AH formado. O tipo e o grau de reticulação, bem como presença de BDDE residual interferem no nível da resposta

inflamatória ao implante de AH nos tecidos (De Boulle et al.¹⁴, 2013). Tecnicamente, produtos mais reticulados apresentam maior capacidade de preenchimento e sustentação tecidual, menor taxa de biodegradação e inicialmente maior processo inflamatório, (Kablik et al.²⁷, 2009) (De Boulle et al.¹⁴, 2013).

Essa resposta inflamatória transitória, parece ser uma vantagem do AH, pois pode resultar no encapsulamento desse biopolímero por fibras colágenas o que, conseqüentemente, aumenta a eficácia e a longevidade dos tratamentos realizados (Matarasso et al.³⁵, 2006), (Baumann et al.³, 2007) e (Narins et al.³⁸, 2010).

Além disso, não está claro se somente o nível e tipo de reticulação é o fatores responsável por esse encapsulamento, ou se outros fatores como composição, arranjo estrutural, pH do gel, e comportamento reológico também contribuem para esta eficácia diferenciada.

De acordo com seu comportamento reológico o AH pode ser classificado como um biopolímero viscoelástico. Essa viscoelasticidade é diretamente influenciada pelo nível de reticulação do material. Assim, AHs mais reticulados são mais viscosos e apresentam maior módulo de elasticidade, proporcionam maior sustentação tecidual e tratamentos mais duráveis, porém tem baixa capacidade de se recuperar de deformações.

No mercado, estão disponíveis para os profissionais, AHs de alta, média e baixa reticulação. Porém não se sabe se estes produtos tem comportamentos reológicos semelhantes e, nem se induzem resposta inflamatória diferenciada, que poderia resultar desempenho clínico distinto.

A taxa de biodegradação é outra propriedade que pode influenciar no desempenho dos tratamentos realizados com AH. Em princípio uma maior reticulação diminui a taxa de biodegradação do material e possibilita que este biopolímero seja utilizado para diferentes aplicações de média e longa duração. Segundo (Falcone et al.¹⁷, 2008), a taxa de biodegradação do AH pode ser estimada ao se multiplicar a concentração de AH no gel pela elasticidade do produto. Estes dados podem ser obtidos a partir da informação dos fabricantes e por estudos de reologia. No entanto, a relação entre o grau de reticulação e a taxa de biodegradação ainda não esta totalmente definida. Da mesma forma, pouco se sabe sobre a influência da taxa de biodegradação e a resposta tecidual ao AH.

Pelo exposto fica clara a importância de estudos que avaliem se AHs com maior reticulação são encapsulados por fibras colágenas e, se a composição

química, o arranjo estrutural, o comportamento reológico e a biodegradação do biopolímero contribuem de alguma forma para a resposta tecidual ao material.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Os resumos desta sessão foram organizados por tópicos para melhor compreensão da evolução do conhecimento científico sobre o uso do AH, sua aplicação na odontologia suas propriedades físico-mecânicas, químicas e a resposta biológica ao implante de AH nos tecidos.

2.1 Considerações Gerais sobre o AH

Segundo Matarasso et al.³⁵ (2006), a Sociedade Americana de Cirurgia Plástica Estética cerca de 12 milhões de procedimentos cosméticos (2,1 milhões de cirurgias e 9,7 milhões de não-cirúrgicos) foram realizados nos Estados Unidos em 2004. Destes, quase 900 mil dos procedimentos não cirúrgicos foram procedimentos de aumento de tecido mole usando enchimentos de ácido hialurônico. Embora o uso de todos os preenchimentos tenha aumentado de 2003 para 2004, o uso de preenchimento de AH em específico aumentou quase 700 por cento. Este aumento em todos os procedimentos cosméticos reflete a tendência crescente, especialmente com o aumento da concorrência no trabalho, para manter um estilo de vida e aparência juvenil. Recomenda-se atenção específicas para o uso do AH Restylane em cada área alvo potencial, incluindo o tipo de anestesia, técnicas de injeção, volume de injeção, uso em combinação com outros procedimentos e expectativa de longevidade das correções.

Fan et al.¹⁸ (2006), realizaram teste por espectro FT-IR com objetivo de avaliar grupos que compõe estruturalmente AH e suas atribuição. Os resultados do espectro FT-IR neste ensaio concordam com o emitido pela ASTM². Além disso, o espectro Raman tem sido usado como complemento com o objetivo de provar os achados no FTIR. Com base no reconhecimento preliminar dos grupos funcionais na HA, o dicroísmo circular do material também foi explorado.

Baumann et al.³ (2007), compararam a eficácia e a segurança de gel de AH com colágeno bovino utilizados para correção volumétrica na região nasolabial (NLF). 439 voluntários com ruga nasolabial moderada ou severa receberam aplicação dos materiais e a evolução do tratamento foi acompanhada por 1 ano. Os resultados mostraram uma correção mais duradoura para o AH comparado ao colágeno bovino apesar de ambos os materiais de preenchimento serem igualmente bem tolerados pelos pacientes.

Necas et al.³⁹ (2008), realizaram uma revisão de literatura que descreve o metabolismo, diferentes funções fisiológicas e patológicas, propriedades farmacológicas básicas e o uso clínico do ácido hialurônico (AH). Concluindo que por meio de descobertas multidisciplinares o AH pode ser indicado com sucesso para uma gama de aplicações biomédicas. Destacaram ainda que futuras terapias clínicas dependem de uma compreensão mais detalhada dos efeitos do peso molecular e concentração de HA e como essa biomolécula interage especificamente com células e componentes da matriz extracelular ECM.

Tezel et al.⁴⁶ (2008), explicaram a ciência básica do HA e descreveram a influência das propriedades físicas dos preenchedores dérmicos, tais como, o grau de reticulação, dureza do gel, consistência do gel, viscosidade, força de extrusão, concentração de HA e extensão da hidratação nos resultados clínicos. Além disso, descreveram a composição química dos monômeros dissacarídeos de AH e como formam e são reticuladas as cadeias poliméricas. Enfatizam a importância do conhecimento do plano químico e físico dos preenchedores dérmicos de AH para a correta escolha do preenchedor dérmico de AH apropriado.

Em 2009, Kablik et al.²⁷ (2009), discutiram as principais propriedades físicas e os métodos utilizados na caracterização de preenchimentos dérmicos de vários materiais disponíveis no mercado. Para as propriedades físicas, foram medidas concentração, relação gel-fluido, concentração de AH gel, grau de modificação do AH, porcentagem de reticulação, intumescimento, módulo e tamanho de partícula. Os resultados demonstraram que os enchimentos comerciais exibem uma grande variedade de propriedades. Com isso, sugerem ao clínico combinar os fatores que influenciam o desempenho do preenchimento com o resultado desejado pelo paciente para selecionar o produto ideal para alcançar o melhor resultado estético.

Com o objetivo de comparar a efetividade e segurança de AH de matriz polidensificada (CPMHA) com colágeno bovino (COL) em correções volumétricas de intensidade média e profunda, Narins et al.³⁸ (2010), realizaram um estudo onde envolveu 118 pacientes que receberam a aplicação dos materiais em lados contralaterais de sulcos nasolabiais e mensurada usando escala da classificação de severidade de rugas a cada duas semanas no período de 1 ano. Os resultados revelaram uma melhora significativamente maior para o CPMHA em comparação ao COL levando os autores a concluírem que AH de matriz polidensificada é mais efetivo que o colágeno bovino.

Em 2012, Voigt et al.⁴⁷ (2012), realizaram uma revisão sistemática da literatura e meta-análise para identificar ensaios controlados randomizados, avaliando o uso de derivados de AH em cicatrizes de queimaduras, epitélio cirúrgico e feridas crônicas. Notou-se, na maioria dos ensaios controlados randomizados que, os derivados de AH melhoraram significativamente a cicatrização de feridas versus terapias tradicionais ou placebo.

Micheels et al.³⁷ (2016), avaliaram laboratorialmente diferentes propriedades de géis de AH com o objetivo de entender melhor suas propriedades e indicações particulares. Foram descritas e avaliadas 7 tecnologias de reticulação: AH (NASHA® [Restylane®]), 3D Matrix (Surgiderm® 24 XP), matriz polidensificada coesa (CPM® [Belotero® Balance]), interpenetrando a rede (IPN-like [Stylage® M], Vycross® (Juvéderm Volbella®), tecnologia de equilíbrio ótimo (OBT® [Emervel Classic]) e HA resiliente (RHA® [Teosyal Global Action]). Os géis foram submetidos a testes de coesão, que mostrou variação para os 7 géis sendo o NASHA e o CPM os de menos e maior coesividade respectivamente; teste de resistência ao estiramento, que confirmou os achado do teste de coesão; e exame microscópico, que revelou variáveis de tamanho e distribuição nas partículas de AH dos 7 géis sendo o CPM não apresentou partículas visíveis ao microscópio. Os resultados laboratoriais levaram os autores a concluir que as diferentes tecnologias podem influenciar no comportamento de cada gel podendo ajudar os profissionais a selecionar o produto ideal para uma indicação de tratamento específica.

Legré-Boyer³² (2015), tece considerações sobre o uso do AH como fluido de viscosuplementação para tratamento de osteoartrite, O autor destaca que a viscosuplementação tem uma moderada mas significativa eficácia (20%) , reduzindo a dor e melhorando a função, em especial, quantos as articulações do tornozelo e ombro são tratadas. No entanto, os resultados são decepcionantes quando o AH é aplicado para tratar a articulação do quadril. Os melhores resultados de viscosuplementação foram obtidos quando o AH foi utilizado para tratar o tornozelo ou ombro.

2.2 Reticulação e Degradação

Nobuhiko et al.⁴⁰ (1992), avaliaram a degradação por radicais hidroxil e por inflamação de um hidrogel de AH reticulado com éter glicidílico. Observaram que os radicais hidroxil provocaram uma degradação rápida porem limitada dos hidrogéis.

Para evitar a degradação pela enzima hialuronidase, micro esferas capazes de serem liberadas durante a degradação foram incorporadas na matriz de AH reticulada. A durabilidade do gel em função da resposta inflamatória foi analisada por experimento in vivo com implantação dos materiais em dorso de rato. Os autores concluíram que os géis de AH reticulados podem ser promissores como matrizes biodegradáveis responsáveis pela estímulo inflamatório e também tem potencial para liberação controlada de fármacos.

Em 2005, Segura et al.⁴⁴ (2005), em seu estudo para produção de géis de AH degradáveis investigaram uma estratégia de reticulação dirigida aos grupos álcool utilizando como agente de reticulação o diepoxi polietilenoglicol, posterior a incorporação de colágeno na solução de AH, a fim de garantir suporte na adesão celular. Observaram que os hidrogéis possuíam interior poroso (6 a 9 μm de diâmetro) e degradavam-se completamente em 14 dias na presença da enzima hialuronidase (100 U/mL) e em 3 dias na presença da collagenase (66 U/mL). Concluíram que a modificação química por reticulação não preveniu a biodegradação do AH.

Noh et al.⁴¹ (2006), avaliaram o efeito das ligações cruzadas e pesos moleculares nas propriedades de um hidrogel de (AH)-poli (óxido de etileno) (PEO). Para isso, adicionaram diferentes pesos moleculares a estrutura do hidrogel (100 kDa e 1,63 mDa) e a partir daí, analisaram a capacidade de intumescimento, resistência mecânica e comportamentos reológicos. Para obtenção do baixo peso molecular o hidrogel foi tratado previamente com uma solução de cloreto de hidrogênio e a metacrilato foi obtida por enxerto de metacrilato de aminopropil nos seus grupos funcionais de ácido carboxílico. Foram utilizados os recursos: cromatografia de permeação em gel (CPG), para avaliação de comportamento de peso molecular; e ressonância magnética nuclear-1 H (RMN) para medir o grau de ligações de metacrilato. Para os hidrogéis de baixo peso molecular os resultados mostraram que a formação de hidrogeleificação ocorre em menos tempo, as propriedades mecânicas são mais fortes, a absorção de água e o tamanhos de poros menores na sua superfície e secção transversal são menores. Tais resultados levaram os autores a concluir que diferenças do peso molecular devem ser consideradas na concepção dos hidrogéis, a fim de aprimorar suas propriedades.

Daar et al.¹² (2010), investigaram os efeitos de degradação da radiação de raios-X no AH em doses de radioterapia. Avaliaram aspectos quanto a viscosidade,

usando viscosímetro na faixa 0,01-1% p/v; e tensões de cisalhamento. O AH foi submetido a doses de radiação de fótons de 6 MV variando de 0 a 20 Gy, sendo a maior ênfase nas doses inferiores a 5 Gy. Uma relação dose-dependente entre a viscosidade e a taxa de cisalhamento foi observada, e a viscosidade foi reduzida com a dose de radiação com uma dose na faixa de 0-4 Gy. A dependência parece tornar-se mais fraca em concentrações mais elevadas, possivelmente porque a viscosidade do emaranhamento de polímero se torna dominante em relação ao peso molecular médio.

Yeom et al.⁵¹ (2010), desenvolveram um novo material de AH indicado para aumento volumétrico de tecidos, utilizando como método de reticulação a ligação direta de amida entre os grupos carboxila e hexametilenodiamina (HMDA) do HA, com uma modificação otimizada do grupo carboxila,. Esse método pode ser preparado em 5 minutos pela adição da solução de HMDA ativada com 1-etil-3- [3-(dimetilamino) propil] carbodiimida (EDC) e mono-hidrato de 1-hidroxibenzotriazole (HOBt) ao ácido hialurônico. Cinco tipos de amostras, um controle normal, um controle negativo, um controle positivo de Restylane, hidrogéis de HA (ADH) enxertados com dihidrazida de ácido adípico e HAHMDA, foram injetados subcutaneamente em camundongos Os resultados mostraram que os hidrogéis HA-HMDA exibiram o melhor efeito de aumento de tecido sendo estável por mais de 3 meses. As imagens histológicas revelaram excelente biocompatibilidade e segurança.

Hillel et al.²² (2012), realizaram um estudo para validar um modelo animal para comparar a degradação e a reação tecidual ao AH utilizado para do preenchimento do tecido. Quatro formulações de AH foram injetados na derme de ratos Sprague-Dawley. Três dimensões dos implantes foram medidas no dia 0, dia 1 e mensalmente durante 1 ano ou até a total reabsorção do material. Foram realizadas análises volumétricas, validadas pela ressonância magnética e análise histológica. Os resultados validaram a adequação da implantação de AH no espaço subcutâneo profundo, na derme e no panniculus carnosus. Os AH de alta e muito alta concentração mantiveram volumes e proporções de volume significativamente maiores que os de baixa concentração ao longo da duração do estudo. Esses resultados quantitativos validam o modelo da implantação de AH na subcutis de ratos como modelo pré-clínico acelerado para estudo de preenchimentos com este biopolímero

De Boulle et al.¹⁴ (2013), realizaram uma revisão de literatura com o objetivo de analisar o metabolismo de preenchimentos dérmicos de ácido hialurônico (AH) reticulados com 1,4-butanodiol diglycidil-éter (BDDE) e examinar a segurança dos subprodutos resultantes. Observaram que após a reação com AH, os grupos epóxi do BDDE são neutralizados, e apenas vestígios de BDDE não reagidos permanecem no produto. Os componentes que não reagiram degradam e se dividem em subprodutos inofensivos ou em subprodutos que são idênticos às substâncias já encontradas na pele. Concluíram por meio de análises clínicas acompanhadas nos últimos 15 anos que HA reticulado com BDDE e seus produtos de degradação mostram adequada segurança clínica.

Berkó et al.⁵ (2013), em seu estudo sobre hidrogéis baseados de HA linear ou reticulado com potencial indicação para preenchimento de tecidos em regiões mais profundas da pele, compararam as propriedades reológicas, a hidratação, a resposta inflamatória e a penetração cutânea in vitro e in vivo. O efeito de hidratação foi mantido e os parâmetros reológicos foram ligeiramente alterados após a reticulação. Os resultados mostraram que a formação de partículas menores de AH por meio do efeito da reticulação proporcionaram uma melhor difusão através de uma membrana sintética e uma melhor penetração através da epiderme humana e da pele animal viva em comparação com o AH linear.

Park et al.⁴² (2014), realizaram um estudo com objetivo de determinar os fatores que afetam a resistência a degradação dos géis de ácido hialurônico (AH) decorrentes de radicais e enzimas. Foram utilizados 3 tipos de AH: Juvederm Ultra Plus, Restylane Perlane, e Cleviel. Para testar a resistências a degradação enzimática foi realizado o teste com carbazole usando a hialuronidase como enzima. A resistência destes preenchedores à degradação radical foi medida pelo ensaio de deslocamento usando H_2O_2 . Os resultados mostraram menor resistência a degradação enzimática para o gel Juviderm, seguidos progressivamente pelos géis Perlane e Cleviel. Observou-se também AH tratado com H_2O_2 mostrou elevado grau de degradação para Perlane®, seguido por Juviderm, e, em seguida, Cleviel. Em ambos os casos o material Cleviel demonstrou o mais resistente além de demonstrar uma elevada resistência ao calor e menor taxa de intumescimento. Os estudos in vitro realizados sugerem que a diminuir a razão de intumescimento resulta em uma diminuição do grau de degradação de géis a base de AH.

Yang et al.⁵⁰ (2015), realizaram estudo com o objetivo de identificar e quantificar fragmentos modificados na biodegradação de hidrogéis. Foram avaliados três tipos de reticulação de AH: modificados com BDDE (grau de modificação total (t-MOD), grau de modificação nas ligações cruzadas (c-MOD) e grau de modificação na ligação pendente (p-MOD). Para isso, foi utilizada uma nova hialuronidase (HAase-B) produzida por *Bacillus* sp. A50 para digerir o hidrogel de AH. Os resultados mostraram que os materiais possuem diferentes t-MOD, c-MOD e p-MOD, mas a relação de c-MOD para p-MOD resulta em quase 75%. Os produtos de hidrogel da Q-Med têm t-MOD de cerca de 0,8% e c-MOD de cerca de 0,1%, a proporção de c-MOD para p-MOD é de cerca de 13%. Os hidrogéis de ANTEIS S.A têm valores de t-MOD muito maiores, a proporção de c-MOD e p-MOD é de cerca de 8%. As diferenças de parâmetros de reticulação indicam diferentes tecnologias de preparação de produtos de hidrogel.

Al-Sibani et al.¹ (2015) compararam a taxa de degradação de seis hidrogéis por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e por espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis). O sinal de degradação para cada um dos géis foi a quantidade percentual de N-acetil glucosamina (NAG) obtida após digestão enzimática de um dia. Para uma finalidade de comparação, os outros três hidrogéis foram classificados usando o método de perda de peso convencional que mostrou taxas de degradação relativamente maiores. A análise estatística revelou que não houve diferença significativa entre os métodos HPLC e UV-vis, no entanto, esses valores diferiram significativamente ($p < 0,05$) do valor obtido a partir do método de perda de peso.

Em 2015, Lee et al.³⁰ (2015), avaliaram AHs reticulados com BDDE com 3 pesos moleculares diferentes em relação a influência do peso molecular na razão de intumescimento e modulo de elasticidade. Observou-se uma maior capacidade de intumescimento para o material não reticulado e com maior peso molecular. Quanto maior era a concentração de AH puro no material maior foi sua capacidade de expansão e menor o seu grau de reticulação devido a uma maior quantidade de interações de cadeia AH cruzada. Diferentes resultados foram identificados para o modulo de elasticidade (G') que foi menor para AH reticulado nanoparticulado em comparação com o AH monofásicos, sendo um fator determinante para a longevidade clínica.

Chun et al.¹¹ (2016) prepararam um AH reticulado com microesferas e diferentes pesos moleculares com objetivo de identificar o efeito do peso molecular nas propriedades viscoelásticas. As cargas bifásicas dérmicas de AH foram preparadas misturando as microesferas de AH reticuladas e os AHs não reticulados. Observou-se que o módulo de elasticidade dos materiais aumentou com o aumento da fração volumétrica das microesferas. Além disso, as propriedades mecânicas e a sensação de texturização de partículas das cargas produzidas a partir de microesferas de AH (Chun et al.¹¹, 2016) (1058 kDa) reticuladas em suspensão em AH não reticuladas (1368 kDa) foram alcançadas com sucesso. Os AHs feitos de 1058 kDa exibiram módulos elásticos adequados (211 a 420 Pa) e sensação de texturização de partículas (escala 7 ~ 9).

2.3 Resposta Tecidual

Fernández-Cossío et al.¹⁹ (2006), compararam a resposta tecidual do uso de AH e PMMA como materiais de preenchimento. Os materiais apresentaram diferentes respostas teciduais sendo que o PMMA se mostrou altamente bioativo e sofreu infiltração celular e integração nos tecidos. O AH sofreu uma mínima infiltração celular e promoveu um fino encapsulado uniformemente. Concluiu-se que apesar dos dois materiais serem indicados para preenchimento e serem considerados biocompatíveis apresentam respostas teciduais distintas sugerindo que suas aplicações clínicas podem apresentar um comportamento diferente para cada material.

Flynn et al.²⁰ (2011) avaliou o comportamento histológico de géis de AH com diferentes composições químicas analisados no momento após a injeção do material e após 14 dias. Os resultados mostram que as diferentes características apresentam comportamento diferente. Os géis bifásicos demonstraram deposição em grandes poros, muitas vezes profundas na derme reticular e comprimem as fibras de colágeno. Os géis mono-densificados monofásicos mostram grandes grupos de AH em toda a espessura da derme reticular. Este material quebra as fibras de colágeno na maior parte do plano dérmico. O gel polifundido monofásico penetra na derme de maneira difusa e uniformemente distribuída, exceto na derme papilar, que permanece livre de material exógeno.

Micheels³⁶ (2001), por meio de testes intradérmicos, de transformação de linfócitos e histologia realizada nos exames cutâneos e nas áreas tratadas avaliou

alguns dos efeitos colaterais causados por reações alérgicas relacionadas ao uso de AH comerciais. Os testes cutâneos foram positivos para uma ou outra das duas preparações de AH injetáveis usadas em medicina estética. As diferentes biópsias mostraram alguma reação inflamatória crônica, mesmo 11 meses após o tratamento ou uma reação granulomatosa grave do tipo corpo estranho. A análise do soro revelou anticorpos positivos contra Restylane e/ou Hylaform e até mesmo ácido IgG e E anti-hialurônico. Concluíram que pacientes suscetíveis podem desenvolver reações alérgicas ao uso de AH injetáveis destacando a importância de se realizar mais testes intradérmicos prévios a realização de tratamentos com AH.

Friedman et al.²¹ (2002), realizaram revisão bibliográfica afim de analisar os efeitos adversos provocados pelo gel de ácido hialurônico de origem não-animal (Restylane, Perlane, Restylane linhas finas, Q-Med AB, Uppsala, Suécia) relatadas em pacientes provenientes da na Europa, Canadá, Austrália, América do Sul, e na Ásia no período entre 1999 e 2000. No ano de 1999 os pacientes tratados com ácido hialurônico de origem não-animal apresentaram queixa principal de hipersensibilidade localizada, podendo ser associada ao processo de fermentação secundária. No ano de 2000, a hipersensibilidade continuou sendo relatada como efeito adverso principal, porém, em menor escala devido a incorporação de matéria prima mais purificada. Concluíram que a hipersensibilidade pós-operatório é o principal efeito colateral causado pelos AHs.

Lemperle et al.³³ (2003), realizaram um estudo com objetivo de avaliar a biocompatibilidade e durabilidade de 10 produtos de preenchimento dérmico disponíveis comercialmente. Para tal, 0,1cc de cada material foi injetado no antebraço de um dos autores na região intradérmica profunda. A evolução do preenchimento de acordo com possíveis reações tecidual e tempo de permanência no tecido foi observada nos períodos de 1, 3, 6 e 9 meses. por meio de análise histológica e classificação de reação de corpo estranho. Apesar dos resultados mostrarem reações inflamatórias para todos os materiais (absorvíveis e não absorvíveis) todos mostraram-se clinicamente seguros. Concluíram que achados histológicos iniciais não são úteis para previsão de reações tardias.

Edwards et al.¹⁵ (2007), realizaram uma revisão de literatura com o objetivo de analisar os efeitos colaterais a longo prazo associados ao uso do AH reticulado. Concluíram que os preenchimentos dérmicos de AH quimicamente modificados, apresentam uma baixa incidência de efeitos colaterais sendo eles de fonte animal ou

não-animal. Ainda assim, os pacientes devem ser informados do risco potencial de reações adversas do tipo corpo estranho.

Faga et al.¹⁶ (2013), realizaram estudo observacional com objetivo de avaliar resultados clínicos e histológicos a longo prazo de feridas tratadas com ácido hialurônico (Hyalomatrix®). O estudo foi realizado em 11 feridas e foram observados, para o período de um mês, a formação de uma capa de tecido semelhante a pele. No período de 12 meses, ao final do tratamento, todas as feridas apresentavam-se estáveis apesar de demonstrarem uma taxa de 51-62% de retração. Os resultados obtidos por análise histológica mostraram regeneração com matriz extracelular rica em colágeno tipo I e fibras elásticas e menor taxa de colágeno tipo III. Com isso, os autores concluíram que embora os resultados demonstrem boas condições histológicas para regeneração ainda há um problema clínico de contratura secundária sem solução.

Cena et al.⁸ (2014), compararam dextrans reticulados em hidroxilpropil metacelulose (DiHMs, pH 5 ou 7) com polimetilmetacrilato em colágeno bovino (PMMA) e ácido hialurônico (AH) utilizados para o preenchimento de tecido mole de ratos. Os resultados mostraram que o AH manteve o tamanho ao longo do período experimental, mas por não promover formação de tecido fibroconectável grosso mostrou-se instável em relação a movimentação. Em comparação, o PMMA induziu formação de tecido fibroconectável moderadamente espessado, teve seu tamanho reduzido acentuadamente a partir do tempo postimplante (PI) de 3 semanas e tornando-se o menor no PI de 24 meses. O DiHM (pH 7) provocou forte encapsulamento fibroso em torno do enchimento e teve seu tamanho lentamente reduzido, mantido consideravelmente no PI de 24 meses. A taxa de redução do tamanho de DiHM (pH 5) foi mais lenta que a do PMMA e mais comparável ao AH. Imuno-histoquimicamente, os colágenos tipo I e III foram depositados dentro e fora de DiHMs (pH 5 e 7). Concluíram então, que o DiHM (pH 7) garante eficácia e segurança sendo uma boa alternativa para aumento de tecidos moles em seres humanos e animais.

Maioli et al.³⁴ (2015) investigaram o efeitos nociceptivos e inflamatórios de KO2. As respostas inflamatórias: hiperalgesia (versão eletrônica de filamentos de von Frey), hiperalgesia térmica (placa quente), edema (regra da pinça), recrutamento de leucócitos, estresse oxidativo e expressão de mRNA de ciclooxygenase-2 (PCR quantitativa) atividade de mieloperoxidase (ensaio colorimétrico), comportamentos

abertos de dor (flinches, tempo gasto com lambendo e pontuação) induzidas por KO₂ foram avaliadas em caudongos. Os componentes de estresse nociceptivo, inflamatório e oxidativo das respostas induzidas por KO₂ foram responsivo à morfina (opióide analgésico), quercetina (flavonóide antioxidante) e / ou celecoxib (ciclooxigenase anti-inflamatória-2 inibidores). Como comprovaram que o Colcluiram que o superóxido KO₂ induz dor/inflamação de forma eficiente e controlada concluir que este anion é uma valiosa ferramenta para estudar a resposta inflamatória e o efeito de diferentes farmacos.

Iannitti et al.²⁴ (2016), avaliaram segurança e biocompatibilidade histológica de produtos dos produtos um produto composto por AH não reticulado (Aliaxin® Global Performance), e um complexo que inclui vitaminas, antioxidantes, aminoácidos e Minerais (Viscoderm® Skinkò E), injetados na pele. Os resultados em animais não mostraram diferença entre os materiais para indução de reação alérgica. Além disso, os dois materiais aumentaram o colágeno e as fibras elásticas na pele. Nas aplicações em humanos, a injeção do Aliaxin® Global Performance, seguida por Viscoderm® Skinkò E, resultou em maior melhora na hidratação da dobra nasolabial, na perda de água transepidermica e na aparência estética das rugas, quando comparado com um protocolo baseado em Aliaxin® Global Performance sozinho. Concluíram então, que m os dois novos compostos baseados em AH com diferentes formas de reticulação e composição podem ser utilizados com segurança em pacientes que buscam procedimentos de rejuvenescimento facial com eficácia duradoura.

2.4 Propriedades Reológicas

Sundaram et al.⁴⁵ (2003), compararam seis matereias de AH reticulados indicados para preenchimento de tecidos moles (Restylane e Perlane de Medicis, Scottsdale, AZ, Restylane SubQ da Q-Med, Uppsala, Suécia, e Juvéderm Ultra, Juvéderm Ultra Plus e Juvéderm Voluma de Allergan, Pringy, França) e um preenchimento constituído por microesferas de CaHA num gel portador contendo carboximetilcelulose (Radiesse, BioForm Medical, Inc., San Mateo, CA). Avaliaram a viscosidade e elasticidade de cada gel de acordo com as medições de oscilação de deformação realizadas utilizando um Reómetro RS600 de Thermo Haake (Newington, NH) usando uma geometria de placa e placa com um intervalo de 1,2 mm. Os resultados confirmaram que os preenchimentos de tecidos moles podem ser

divididos em três grupos. Tais resultados permitem que o clínico classifique objetivamente os preenchedores, selecione produtos de preenchimento específicos com base em princípios científicos e preveja com segurança como esses produtos serão se comportaram depois de injetados.

Falcone et al.¹⁷ (2008), realizaram um estudo afim de avaliar as propriedades reológicas e físicas de ácidos hialurônicos reticulados. Para isso, foram utilizados ácidos hialurônicos de diferentes fontes preparados com diferentes agentes reticulantes, contendo diferenças em tamanhos de partículas e propriedades reológicas. Os dados obtidos mostraram relação entre persistência de preenchimento dérmico e persistência clínica de um material reticulado (polímero x %elástica) determinados pela massa e elasticidade do material. Tais resultados levaram os autores a concluir que deverão ser realizadas aumentos nas concentrações de polímeros e na elasticidade (G') dos materiais para se obter uma melhora da persistência clínica.

La Gatta et al.²⁸ (2013), realizaram um estudo em que compararam 8 géis de AH reticulados comerciais (Restylane; Amalian I , Amalian II, Amalian III, Amalian Lips , Viscofill Basic, Viscofill Medium and Viscofill Extra) em termos de características físicas e eficácia do produto, através de avaliação in vitro. Por meio de testes de comportamento reológico, solubilidade e propriedades de intumescimento (swelling) observaram que os géis não possuíam um equilíbrio de formulação entre si, mostrando diferentes capacidades de intumescimento, sendo também, dependentes da concentração total do AH insolúvel/solúvel e da taxa de reticulação, assim como a degradação enzimática.

Iannitti et al.²³ (2013), em seu estudo analisaram as propriedades reológicas e biológicas de um novo gel de AH (Variofill ®) com alta taxa de viscoelasticidade, com o objetivo de avaliar a resposta biológica e a taxa de degradação após implantação na região subcutânea de ratos no período de 18 meses. Os resultados reológicos mostraram que este gel de AH possui uma alta elasticidade (G') podendo resultar em um melhor efeito volumizante e aumento duradouro em tecidos moles. Além disso, mostraram que o material tem alta taxa de permanência nos tecidos, sendo uma característica importante ao planejar um tratamento rejuvenescedor ou procedimento cirúrgico restaurador, o que abre novas perspectivas sobre o uso de AH reticulado de alta densidade em procedimentos clínicos. Os resultados histológicos não demonstraram presença de inflamação significativa, sugerindo que o novo gel de AH

pode ser uma alternativa segura e eficaz em casos de tratamentos estéticos e cirúrgicos complementares.

2.5 Aplicações Odontológicas

Becker et al.⁴ (2010), realizaram um estudo piloto para avaliar um método de redução de deficiências papilares com a utilização de um gel de AH. Foram selecionados 11 pacientes (idade variando de 25 a 75 anos) com deficiência papilar mínima na zona estética. Após a administração de um anestésico local, foi aplicado 0,2ml de gel de ácido hialurônico em cada papila. Foi realizado acompanhamento de 3 em 3 semanas no período de 6 a 25 meses após a primeira aplicação e repetido o tratamento até 3 vezes. Para estabelecer um padrão de comparação foi realizada fotos iniciais e finais e avaliado através de uma fórmula derivada para determinar percentagem de alteração no espaço entre os exames negativos iniciais e finais. Os resultados mostraram boas porcentagens de melhoria mantidas pelo período de 6 a 25 meses, levando os autores a concluir que pequenas deficiências de papila presente entre implantes e dentes podem ser facilmente corrigidas por aplicação de gel preenchedor.

Bogović et al.⁷ (2011), realizaram um estudo com o objetivo de avaliar os efeitos e a eficiência de capeamento pulpar à base de ácido hialurônico, hidróxido de cálcio e adesivo de dentina no tecido pulpar de ratos Sprague-Dawley. Seus resultados mostraram que o ácido hialurônico é mais eficiente e o menos tóxico para a cobertura direta da polpa. Apesar de mostrarem maior grau de citotoxicidade que o AH, o hidróxido de cálcio e o adesivo dentinário ainda eram aceitáveis em termos de biocompatibilidade.

Dahiya et al.¹³ (2013), realizaram uma revisão de literatura com o objetivo de discutir as aplicações do ácido hialurônico no tratamento periodontal. Para tal, reuniu os artigos mais relevantes da literatura usando as palavras chave "Ácido hialurônico e doenças periodontais" e "Ácido hialurônico e gengivite". Dentro deste campo de pesquisa, o ácido hialurônico mostrou efeitos anti-inflamatórios e antibacterianos no tratamento de doenças periodontais além de mostrar-se uma alternativa a terapias mecânicas no tratamento de periodontite devido a suas propriedades cicatrizantes.

Bertl et al.⁶ (2015), realizaram uma revisão de literatura com o objetivo de avaliara o efeito da aplicação do ácido hialurônico como monoterapia ou adjuvante a

terapia periodontal cirúrgica ou não cirúrgica. Dentre os referencias selecionadas, foram avaliados dois estudos pré clínicos in vivo e 12 ensaios clínicos de tratamento cirúrgico e/ou não cirúrgico. A maioria dos estudos clínicos não demonstraram efeitos adversos com o uso de AH sobre o efeito de sangramento a sondagem (SS) e profundidade e redução de bolsa periodontal (PD) mostrando resultados estatisticamente significativos (SS - 19,5% e PD - 0,2-0,9mm). Concluíram que o uso de AH como adjuvante a tratamentos periodontais cirúrgicos e não cirúrgicos possuem efeito benéfico moderado sob variáveis de resultado de inflamação (BdP e PD residual) demonstrando um material seguro para utilização em terapias periodontais.

Yamada et al.⁴⁹ (2015), realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a eficiência do uso do método de engenharia de tecidos (TEP) para tratamento de regeneração de papilas interdetais e sua influência na estética do sorriso. Para isso, usou células estaminais mesenquimais (MSCs) como células isoladas; plasma rico em plaquetas (PRP) como fator de crescimento e ácido hialurônico (HA) como o scaffold. Os resultados foram avaliados do ponto de vista clínico registrando a distância da ponta da papila interproximal para a base da área de contato em cada região de estudo. Os resultados mostram uma melhora estética significativa podendo concluir que a TEP foi eficaz como alternativa para melhorar a estética do black space gengival, como também sugerem a possibilidade do AH ser utilizado em terapia regenerativa nas doenças periodontais.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente as características morfo-fisicoquímica, a resposta histopatológica e a biodegradação de ácidos hialurônicos indicados para preenchimento dérmico e aumento volumétrico de tecidos.

A hipótese nula (H0) testada foi que não existe diferença nas características morfo-fisioquímica nem na resposta histopatológica e no padrão de biodegradação nem entre géis de AH indicados para preenchimento dérmico, nem entre os indicados para aumento volumétrico de tecidos.

4 MATERIAL E MÉTODO

Nesse estudo foram comparados dois géis de AH comerciais produzidos pela empresa Croma GmbH Industriezeille, Leobendorf, Austria Rennova Fill (RF) Rennova Lift (RL) e dois experimentais (D12 e D15). Estes foram estrategicamente selecionados por apresentar reticulações distintas (maior e menor) de acordo com sua indicação de uso e plano de injeção na derme. Estas informações e também a concentração de AH no gel, taxa de reticulação do biopolímero, viscosidade, tamanho de agulha recomendada, tampão para estabilização de pH são apresentadas na Tabela 1. Estas informações foram obtidas das bulas do fabricante e por informação pessoal dos desenvolvedores. A Figura 2 mostra os quatro AHs utilizados neste estudo.

Figura 2 - Géis de ácidos hialurônico utilizados no estudo apresentados em ordem decrescente de reticulação e tipo (comercial ou experimental), de acordo com sua indicação de uso e plano de injeção na derme - Araraquara 2017.



Fonte: Imagem da autora

Tabela 1 - Grau de reticulação, sigla, concentração de AH na fórmula, indicação e fabricante dos produtos testados - Araraquara 2017.

Produto (sigla)	Concentração (mg/mL)	Taxa de reticulação	Indicação	Tamanho da agulha	Tampão (pH)	Lote e Validade
E1 (Experimental1)	22	Reticulado	Derme intermediária, rugas moderadas. Contorno e aumento de lábios	27 G1/2	Tampão fosfato de potássio monobásico pH - 7.2 (KH ₂ PO ₄)	Lot 01072015 Val 06/2017
E2 (experimental2)	22	Altamente reticulado	Derme profunda ou hipoderme. Rugas profundas. Contorno e volume facial	27 G1/2	Tampão fosfato de potássio monobásico pH - 7.2 (KH ₂ PO ₄)	Lot 02072015 Val 06/2017
RENNOVA [®] FILL (RF)	23	Reticulado	Derme intermediária, rugas moderadas. Contorno e aumento de lábios	27 G1/2	Tampão fosfato pH -6.8 a 7.4 q.b. cloreto de sódio	Lot 903133 Val 02/2019
RENNOVA [®] LIFT (RL)	23	Altamente reticulado	Derme profunda ou hipoderme. Rugas profundas. Contorno e volume facial	27 G1/2	Tampão fosfato Ph -6.8 a 7.4 q.b. cloreto de sódio	Lot 204178 Val 04/2019

Os produtos E1 e E2 fornecidos por DMC Group, São Carlos Brasil

Os produtos RENNOVA[®] FILL e Rennova[®] Lift são produzidos pela empresa Croma GmbH, Leobendorf - Austria

Fonte: Elaboração própria realizada a partir das informações pessoais do desenvolvedor (produtos E1 e E2) e material de divulgação do Importador (RF e RL) consultada no site: <https://www.mtoimportadora.com.br/qual-a-diferenca-entre-o-rennova-fill-e-o-rennova-lift/> em 03 de agosto de 2017.

Para testar a hipótese proposta (H0), amostras de E1, E2, RF e RL foram inicialmente submetidos as seguintes avaliações in vitro:

visual/táctil para descrever as características macroscópicas de aspecto dos géis o, percepção táctil da estruturação e extrusão pela luz agulha.

por microscopia eletrônica de varredura (MEV), para descrever a micromorfologia e a microestruturação da superfície externa e interna,

por espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDX) para estudar composição química elementar,

por espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FT-IR) para investigar a composição dos AHs e,

por reometria dinâmica oscilatória para investigar as propriedades viscoelásticas

4.1 Avaliação Visual/Táctil

Essa avaliação foi realizada para descrever as características macroscópicas de aspecto dos géis, percepção táctil da estruturação e extrusão pela agulha.

Para a avaliação visual macroscópica 0,1 mL de cada um dos géis de AH foi extruído da seringa original por pressão digito palmar através de agulha 27G 0,4X12mm Misawa lote:111207 (Misawa Medical Industry CO. Ltd. Iwaki City, Japan. Os aspectos de cor, translucidez, lisura superficial e textura dos géis foram descritos comparativamente.

Na sequência, amostra de 0,1 mL de cada AH, foi manipulada entre os dedos indicador e polegar com movimentos de rotação e abertura. Os materiais foram descritos quanto a textura e percepção de partículas no início e no fim a avaliação.

As considerações sobre as características de textura, consistência, extrusão e percepção táctil foram descritas comparativamente.

4.2 Preparo das Amostras para MEV, EDX e FT-IR

Como a análise por MEV envolveu a investigação da superfície externa e interna dos materiais, foi necessário fraturar as amostras. Após estudos preliminares, e para manter a micromorfologia e a microestrutura de cada material o mais intacta possível, foi decidido realizar congelamento rápido das amostras por imersão em nitrogênio líquido, seguido da fratura transversal, realizada por golpe seco de cinzel. Os fragmentos foram imediatamente identificados e colocados em

ultrafreezer -86 °C IULT335D/368 (Indrel Scientific, Londrina - Brasil) por 48 horas para posterior liofilização.

A grande quantidade de água e os compostos orgânicos que constituem o AH, causam interferências que inviabilizam o uso de amostras não preparadas nas análises por MEV/EDX e FT-IR. Assim, para viabilizar estas análises e para preservar, o máximo possível, a morfologia e estrutura originais dos géis de AH decidiu-se técnica de criodesidratação ou liofilização.

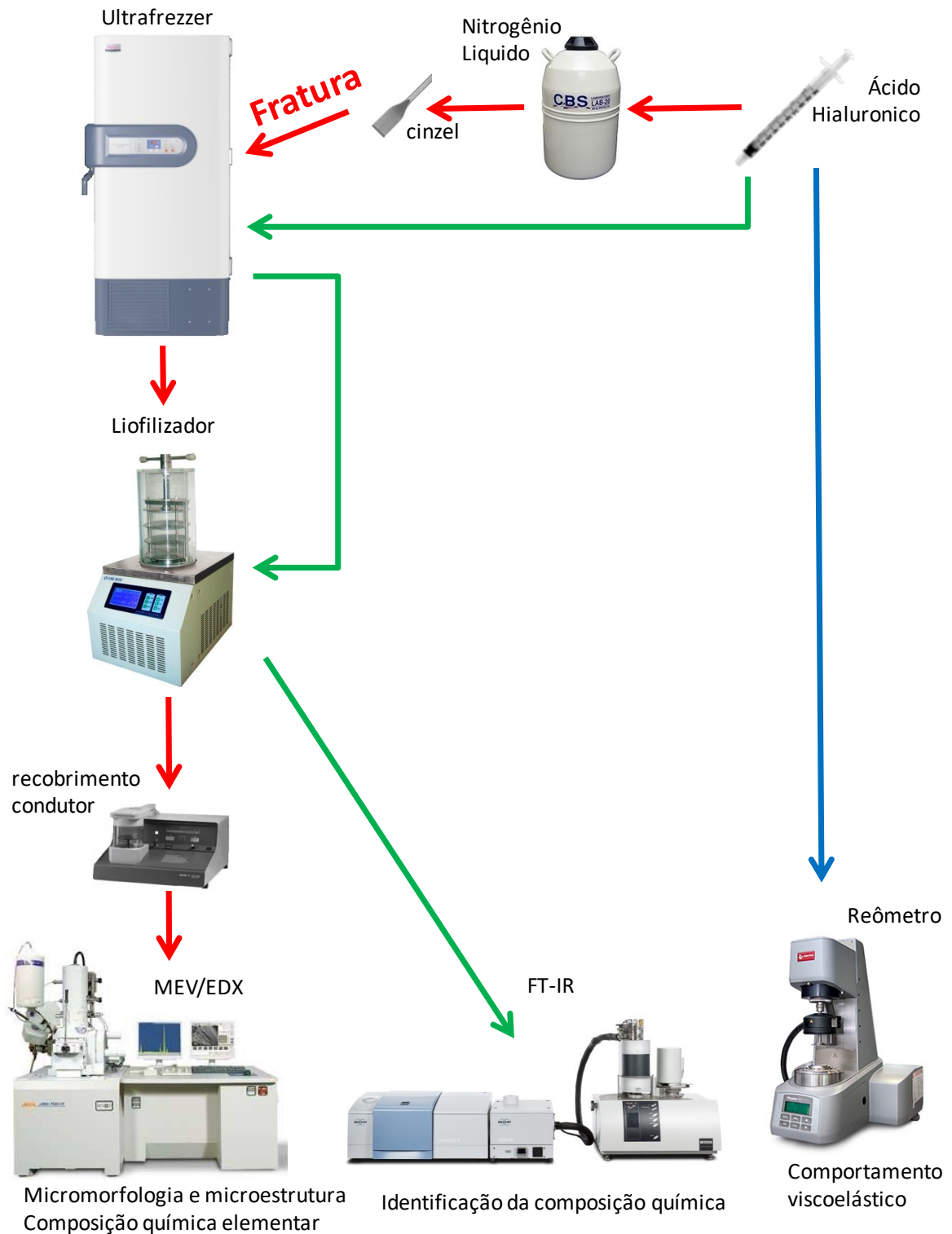
O processo de liofilização foi realizado em duas etapas: 1) congelamento das amostras em ultrafreezer -86 °C por 48 horas, para preservar a morfologia e a arquitetura originais e, 2) criodesidratação sob vácuo e temperatura de -50 ± 5 °C por 48 horas, a fim de remover todo o conteúdo de água das amostras, preservando o arcabouço de AH reticulado intacto. Esse processo foi realizado no liofilizador L101 (Liotop, São Carlos - Brasil), do laboratório de química medicinal e medicina regenerativa da Universidade de Araraquara (Quimera/Uniara).

Após a liofilização, as amostras analisadas em MEV/EDX receberam previamente, recobrimento condutor de carbono, realizado no equipamento BAL-TEC SCD 050, Capovani Brothers Inc, USA, do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista - Unesp.

As amostras utilizadas para a análise das propriedades reológicas não necessitaram de preparo prévio.

A sequência utilizada no preparo das amostras de D12, D15, RF e RL estão descritas na Figura 3.

Figura 3 - Sequência do preparo das amostras de AH necessário para análise em MEV, EDX, FT-IR - Araraquara 2017.



Fonte: Elaboração própria

4.3 Avaliação da Morfologia Estrutural por MEV

Para a análise por MEV as amostras recobertas com carbono foram fixadas em stubs com auxílio de fita adesiva de carbono Carbon Conductive Tape (Pelco Tabs - USA) de forma a expôr a superfície externa e interna dos AHs para análise.

Os espécimes foram analisados no microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão por campo - FEG-MEV JSM-7500F (Jeol Ltda, Tokio - Japan) do Laboratório de Microscopia Avançada (LMA) do Instituto de Química de Araraquara - Universidade Estadual Paulista - Unesp.

As análises foram realizadas com 2,00 kV SEI e fotomicrografias digitais padronizadas com 50, 250, 1000, 2500X de magnificação foram obtidas das áreas características da superfície externa e interna das amostras. As fotomicrografias com 50X e 250X foram obtidas com o modo LM, WD 9,00 mm e as de 1000 e 2500X com o modo GB_Low, WD 5,90 mm.

A micromorfologia e a microestrutrua de cada AH foi descrita de forma comparativa para evidenciar as diferenças e semelhanças entre os géis de AH testados. Os resultados foram discutidos frente aos descritos na literatura.

4.4 Composição Química Elementar (EDX)

A análise da composição química elementar foi realizada nos mesmos espécimes utilizadas para a análise por MEV com 10.0 kV de aceleração de voltagem. Foi realizada microanálise química qualitativa da área total da imagem. Os espectros EDX obtidos foram comparados para determinar as diferenças e semelhanças entre os AH em função do nível de reticulação de cada material.

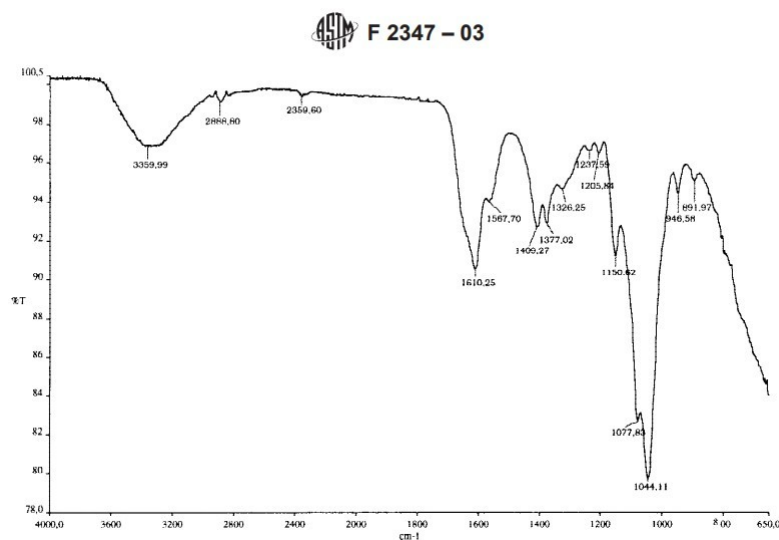
4.5 Composição dos AH por FT-IR

As análises por FT-IR foram realizadas no Microscópio FT-IR Hyperion 2000 da BRUKER (Bruker Optics Ltd, Milton/Ontário, Canadá) com detector de MCT e acessório objetiva ATR 20X, de cristal de germânio, com faixa de leitura de 400 a 4000 cm^{-1} , que corresponde a absorção de energia entre 11 kcal/M e 1 kcal/M, os dados foram analisados com auxílio do software OPUS Spectroscopy - Bruker. A amostra foi posicionada sobre o cristal de germanio e a cabeça de leitura do acessório ATR foi regulada e travada para a realização das análises

Os dados obtidos foram utilizados para elaborar os gráficos das curvas espectrais no software Origin 7.0 SRO (OriginLab Corporation, Northampton, MA - USA).

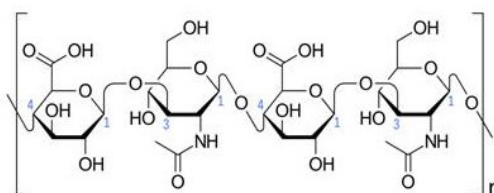
As curvas espectrais foram comparadas descritivamente em função dos picos vibracionais característicos de cada AH, considerando como referência os picos padrão do AH descritos pela Farmacopeia Britânica e pela norma F2347-03 da American Society for Testing and Materials (ASTM²) - Figuras 4 e 5.

Figura 4 - Espectro ATF FT-IR indicado pela American Society for Testing and Materials - ASTM como referência padrão para caracterização de AH e esquema da molécula de AH mostrando tipos de ligações químicas - Araraquara 2017.



Fonte: ASTM International², 2003

Figura 5 - Esquema representativo da molécula do AH demonstrando os grupamentos e tipos de ligações químicas - Araraquara 2017.



Fonte: https://en.wikipedia.org/wiki/Hyaluronic_acid#/media/File:Haworth_projection_of_hyaluronan.svg

As frequências típicas dos picos de absorção do AH no ATR FT-IR, seu grupo molecular correspondente, tipo de ligação e modo vibracional estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Compilação das frequências típicas das bandas de absorção, intensidade da banda: (forte (fo), média (me) e fraca (fr) ; grupos moleculares, tipo de ligação e modo vibracional característicos do AH no ATR FT-IR. elaborado a partir das referências (ASTM International², 2003) e (Fan, et al.¹⁸, 2006) - Araraquara 2017.

Frequência (intensidade)	Grupo molecular (tipo)	Tipo de ligação	Modo vibracional
3412,53 (me) 3359,99 (me)	O-H (álcool)	Intermolecular	Estiramento
1616,68 (fo)	C=C (acetona α,β insaturada)	Mono substituição	Estiramento
1411,31 (me)	O-H (ácido carboxílico)	--	Oscilação
1377,30 (me)	O-H (álcool)	--	Oscilação
1149,89 (fo)	C-O (álcool terciário)	--	Estiramento
1078,48 (fo)	C-O (álcool primário)	--	Estiramento
1044,53 (fo)	CO-O-CO (anidrido)	--	Estiramento
946,77 (me)	C=C (alceno)	Mono substituição	Oscilação
893,29(fr)	C=C (alceno)	Vinilideno	Oscilação

Fonte: Elaboração própria a partir de Chemistry⁹ 2017; Fan et al.¹⁸, 2006 e ASTM International², 2003.

Os resultados obtidos foram utilizados para investigar comparativamente a composição dos AHs.

4.6 Propriedades Viscoelásticas por Reometria Dinâmica Oscilatória

O comportamento viscoelástico dos géis de AH foi investigado no reômetro Modular Compact Rheometer - MCR 302 (Anton Paar Company, Wundschuh - Áustria) e interpretado com o software RheoCompass™ (Anton Paar), do Laboratório de reometria do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Foi realizado o teste dinâmico oscilatório de varredura de frequência, após determinação do limite individual de cada material. Os testes foram realizados utilizando geometria de placas paralelas com 1,2 mm de "gap", força de estresse oscilatória $\pm 5\%$ de amplitude, faixa de frequência de 0,1 a 500 rad/s, 24 pontos de leitura e 25 ± 1 °C de temperatura.

Após a configuração do aparelho e estabelecimento do "zero gap", uma amostra de 0,8 mL de AH foi colocado no centro da base de leitura. O reometro foi ativado e a geometria movimentou-se até comprimir uniformemente a amostra, mantendo uma distância de 1,2 mm entre placas. Após a remoção do excesso de material extravasado e a confirmação que toda a superfície das placas estava preenchida pelo material, o testes de varredura de frequência foi realizado conforme os parametros já descritos.

As propriedades reológicas de interesse para este estudo foram:

- 1) **Modulo de elasticidade (G')**, que avalia a "rigidez ou resistência" do gel a deformação. Esta propriedade também indica a capacidade do AH dar sustentação aos tecidos sem se deformar sob a tensão muscular provenientes das expressões faciais ou sob as forças que incidem sobre as papilas gengivais durante a mastigação e a higiene bucal.
- 2) **Modulo de viscosidade (G'')**, que avalia a "fluidez" ou capacidade do gel de AH se deformar ao receber tensão. Mostra também o quão "suave" o AH será ao ser injetado nos tecidos.

3) **Módulo de viscosidade complexa (η^*)**, que avalia a viscosidade do material em um experimento dinâmico oscilatório e representa a capacidade de não se espalhar após injetado e de ser adequadamente modelado. Essa propriedade é obtida com o uso da equação (SUNDARAM, et al.⁴⁵, 2003):

$$\eta^* = \frac{G^*}{\omega}$$

4) **Módulo de elasticidade complexa (G^*)** (Sundaram et al.⁴⁵, 2003), que avalia a elasticidade do material em um experimento dinâmico oscilatório. Para se obter o valor de G^* foi utilizada a seguinte equação:

$$G^* = \sqrt{(G'^2 + G''^2)}$$

5) **Tangente do ângulo de fase ($\tan\delta$)**, que situa o gel de AH como um material viscoelástico entre um sólido puro (Hookeano) cuja $\tan\delta = 0^0$, e um líquido puro (newtoniano) que tem $\tan\delta = 90^0$. O valor da $\tan\delta$ é obtido pela aplicação da equação:

$$\tan\delta = \frac{G''}{G'}$$

6) **Porcentagem de elasticidade (%E)**, cujos valores indicam quão mais fácil será a extrusão do gel pela agulha de pequeno calibre (27 G1/2" por exemplo). Esse dado foi calculado de acordo com a seguinte equação (Micheels³⁶, 2001) e (Falcone, et al.¹⁷, 2008):

$$\%E = \frac{(100 \times G')}{(G' + G'')}$$

4.7 Resposta Tecidual aos Implantes de AH e Reabsorção do Biopolímero

Ainda para testar a hipótese nula (H_0), também foi realizado estudo in vivo laboratorial, randomizado, controlado com triplo mascaramento para avaliar a

resposta tecidual ao implante de D12, D15, RF e RL no plano subcutâneo do dorso de ratos e a degradação do biopolímero em função do tempo.

Para o experimento foram utilizados 25 ratos machos (*Rattus Norvegicus*, variação *albinus*, Holtzman), com cerca de 300 gramas peso corporal. Os animais foram identificados e aleatoriamente divididos em 5 períodos experimentais (n=5), em função dos períodos de avaliação: 7, 14, 30, 60 e 120 dias. Cada animal recebeu implante de 0,10 mL de AH de cada um dos materiais. Este protocolo experimental esta descrito na Tabela 3 e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, sob Protocolo 22/2015 - ANEXO A.

Tabela 3 - Protocolo experimental com numero de animais em cada período de avaliação da resposta tecidual - Araraquara 2017.

Produtos	Quantidade de animais em função dos períodos de avaliação					Total
	T7 (07 dias)	T14 (14 dias)	T30 (30 dias)	T60 (60 dias)	T120 (120 dias)	
D12 D15 RF RL	5	5	5	5	5	25

Fonte: Elaboração própria

Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP e mantido no Biotério do subsolo da mesma instituição. Os animais foram mantidos em grupos de 5 animais em caixas plásticas com livre acesso a comida e água, em ambiente com temperatura e luz controlada por todo o período experimental.

4.7.1 Anestesia dos animais

Cada animal foi individualmente submetidos à anestesia intramuscular com Cetamin (Cloridrato de Cetamina 10% - Rhobifarma indústria Farmacêutica Ltda - Hortolândia - SP - Brasil) - anestésico geral (0,08ml/100grs) e Xylasin (Cloridrato de Xylazina 2% - Rhobifarma indústria Farmacêutica Ltda - Hortolândia - SP - Brasil) relaxante muscular e sedativo (0,04ml/100grs), aplicados com uma seringa de

insulina descartável 1ml com agulha 30 G1/2 (Injex Indústrias Cirúrgicas Ltda, Ourinhos, SP, Brasil), e mantido na gaiola até que o mesmo fosse anestesiado.

4.7.2 Preparo dos animais

Após anestesiado, cada animal recebeu tricotomia na região dorsal, realizada com uma máquina de depilação elétrica (Wahl Clipper Corp, Model Mc, USA), complementada por aparelho de barbear com lâmina de aço inoxidável (Gillette do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Na sequência o animal foi fixado em mesa cirúrgica, e recebeu anti-sepsia do campo operatório com solução de clorexidina a 2%.

Foi traçada uma linha divisória no dorso do animal tomando como referência o centro da sua cabeça e a inserção da cauda. Perpendicularmente a esta foram traçadas mais duas linha de referência, dividindo o dorso em 4 partes semelhantes Figura 6.

Figura 6 - Dorso do rato com a marcação dos quadrantes após a inserção dos géis de AH - Araraquara 2017.



Fonte: Aatoria própria

Diferentemente da aplicação em humanos, neste experimento a inserção dos produtos foi realizada na região submuscular para evitar danos desnecessários a derme e epiderme dos animais, conforme recomendado por (Hillel et al.²², 2012). Foi injetado 0,1 ml de cada produto com auxílio agulha hipodérmica de 27 G1/2" (Misaya, Japan) acoplada a seringa de cada material.

A agulha foi inserida no sentido da cauda para a cabeça do dorso do animal, em ângulo de penetração de 45° e orientação paralela a linha divisória central, com profundidade entre 3 a 4 mm.

O AH foi injetado no tecido pela técnica de retro-injeção, ou seja, a medida que o produto é depositado no tecido a agulha é retirada do mesmo, com taxa de 0,1 ml de AH para cada 13 mm de agulha. Cada implante de AH foi inserido centralmente em sua respectiva áreas demarcada.

Tanto a distribuição dos animais nos grupos experimentais como a na escolha do quadrante para a implantação de cada AH foi realizada de forma randomizada.

4.7.3 Obtenção das peças para análise e eutanásia dos animais

Decorridos os tempos pós intervenção (7, 14, 30, 60 e 120 dias), os animais foram novamente anestesiados e posteriormente submetidos a eutanásia. Após a confirmação da anestesia, o tecido do dorso foi removido com suficiente margem de segurança. Em seguida, os animais foram submetidos a eutanásia por sobredose anestésica intraperitoneal de Cetamin (Cloridrato de Cetamina 10% - Rhobifarma indústria Farmacêutica Ltda - Hortolândia - SP - Brasil). Após a constatação dos sinais clínicos de morte (parada cardio-respiratória e ausência de reflexos), os animais foram descartados de acordo com normas da CEUA da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

4.7.4 Processamento laboratorial e histológico

As peças cirúrgicas obtidas foram esticadas em papel filtro e imersas em formol de Lillie tamponado pH=7,4, permanecendo em processo de fixação por 96 horas. Após, as peças foram lavadas em água corrente durante 24 horas.

A seguir, as peças foram desidratadas em banhos com soluções de concentração crescentes de álcool (70°, 80°, 90°GL e Absoluto), diafanizadas em banhos sequenciais de álcool/xilol e xilol, e incluídas em parafina.

O bloco de parafina contendo as peças de interesse foi inserido em micrótomo rotatório (HM 325-MICROM), no qual foram realizados cortes semi-seriados de 6 micrômetros de espessura.

Os cortes obtidos foram montados em lâminas e coradas com Hematoxilina/Eosina, Tricrômico de Massom conforme rotina de processamento histológico.

4.7.5 Resposta tecidual aos implantes de AH

Os cortes foram fotomicrografados por microscópio de luz - Jenaval (Carl Zeiss) equipado com máquina fotográfica digital (Leica DFC 450). A análise foi realizada com o auxílio do programa de diagnóstico de imagens Image J (National Institutes of Health - USA) de forma objetiva, com contagem do número de células polimorfonucleares, macrófagos, células gigantes. Foi medida a distância da área reacional resultante da interface de contato do material experimental com o tecido subcutâneo conjuntivo até o fim da cápsula reacional. Também foi avaliada a presença ou ausência de necrose tecidual. Os resultados foram interpretados de acordo com a evolução do quadro reacional presente frente aos materiais nos diferentes períodos de análise.

A resposta celular aos produtos foi analisada por um examinador previamente calibrado. O nível de inflamação resultante foi descrito de forma qualitativa. Esta avaliação foi realizada com mascaramento dos produtos e tempos de análise.

A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com a evolução do quadro reacional do tecido em contato com os materiais testados conforme índice apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Escores de acordo com a intensidade dos eventos histológicos observados que caracterizam a resposta tecidual aos implantes de AH no plano intramuscular do dorso de ratos, adaptado de ISO 10993-10 - Araraquara 2017.

Escore	(A) Inflamação
1	Pequena presença de células inflamatórias
2	Moderada presença de células inflamatórias
3	Intensa presença de células inflamatórias
Escore	(B) Fibroblastos / Angiogênese
1	Pequena presença de fibroblastos e angiogênese
2	Moderada presença de fibroblastos e angiogênese
3	Intensa presença de fibroblastos e angiogênese
Escore	(C) Fibra colágena
1	Ausência de fibras colágenas adjacentes ao AH
2	Fibras colágenas desorganizadas adjacentes ao AH
3	Fibras colágenas organizadas adjacentes ao AH
Escore	(D) Degradação de AH
1	Baixa degradação de AH
2	Moderada degradação de AH
3	Intensa degradação de AH

Fonte: Elaboração própria adaptada a partir da ISO 10993-10. International Organization for Standardization²⁵, 2010.

4.8 Análise Estatística

Para estabelecer se existia associação significativa entre os géis utilizados e os eventos histológicos observados foi utilizado o modelo log-linear de efeito em linha ponderado por evento/tempo de análise.

Para estudar se os produtos diferiam entre si em função dos eventos histopatológicos os dados foram agrupados de acordo com a relevância do evento histológico. Para a resposta inflamatória se decidiu agrupar as frequências codificada como 2 (moderada) e 3 (intensa) em uma nova variável denominada moderada/intensa. Os dados da frequência 1 (leve) não foram modificados. Para os

demais eventos histológicos e para a biodegradação se decidiu agrupar os níveis 1(pequena/ausencia/baixa) e 2 (moderada), permanecendo o nível 3 (intensa/organizada) inalterado.

Os dados assim organizados foram utilizados para construir tabelas de contingências 2X2 utilizadas para a realização do teste exato de Fisher. Também foi calculada a dimensão do efeito pelo teste V de Cramer e o risco relativo de causar o evento histopatológico de interesse. A significância estatística para todos os testes foi de 95% ($\alpha=0,05$).

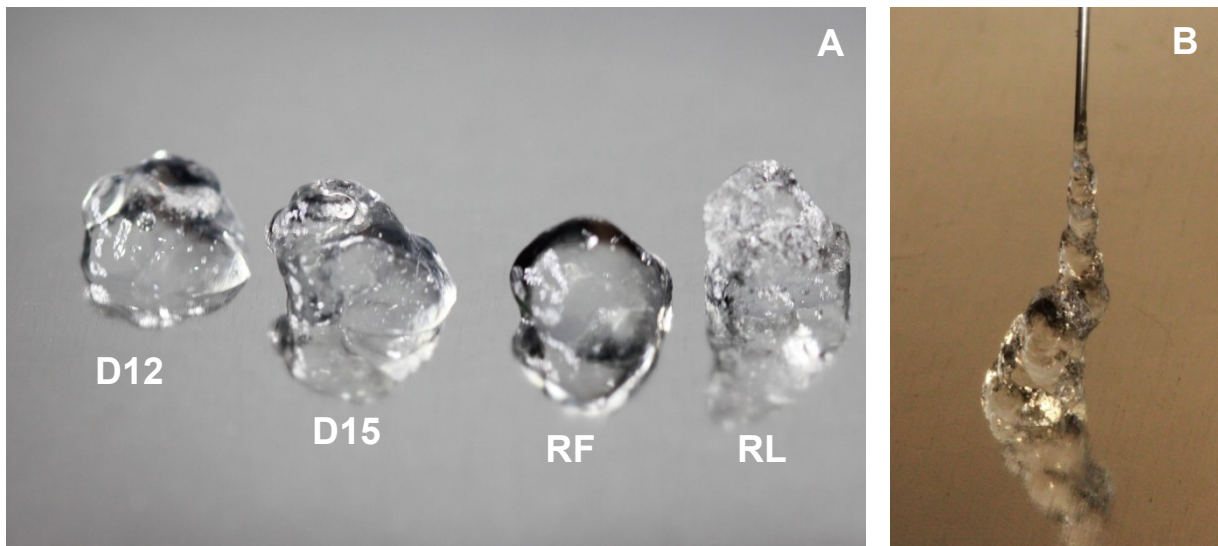
Essas análises foram realizadas no software IBM SPSS Statistics, SPSS Inc e IBM Company, USA - versão 19.00.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação Visual/Táctil das Características Macroscópicas

De acordo com a análise visual/táctil, os géis de AH extruídos através da agulha 27 G1/2" apresentaram aparência densa, de aspecto translúcido, sem presença partículas de carga ou traços de impurezas - Figura 7 (A) . O produto D15, apresentou aspecto grumoso como se sua estrutura tivesse sido fragmentada ao passar agulha - Figura 7 (B).

Figura 7 - Aspecto estrutural dos AHs D12, D15, RF e RL utilizados nesse estudo (destaque A) e detalhe da característica de extrusão do gel D15 (destaque B) - Araraquara 2017.



Fonte: Imagem da autora

No teste de extrusão pode-se perceber diferenças nítidas entre os produtos. Os géis comerciais (RF e RL) fluíram mais facilmente pela agulha, enquanto o gel experimental D15, por várias vezes, causou entupimento da agulha. Esse produto exigiu tanta força para ser extruído pela agulha, que causou tremor na mão, o que não ocorreu com os outros produtos. Cabe destacar que em, alguns momentos, este produto fluiu facilmente pela agulha, sugerindo que ele era composto por duas fases distintas.

Durante a manipulação digital, foi percebido que o gel se comportou como um corpo único estruturado que ofereceu certa resistência inicial aos movimentos de pressão e rotação. A medida que a pressão e a velocidade dos movimentos de

rotação aumentaram este corpo único se desestruturou. Os produtos mais reticulados fragmentaram-se em pequenas vesícula agrumadas enquanto os menos reticulados liquefizeram-se - Figura 8.

Figura 8 - Imagens da avaliação visual/táctil dos géis de AH testados - Araraquara 2017.



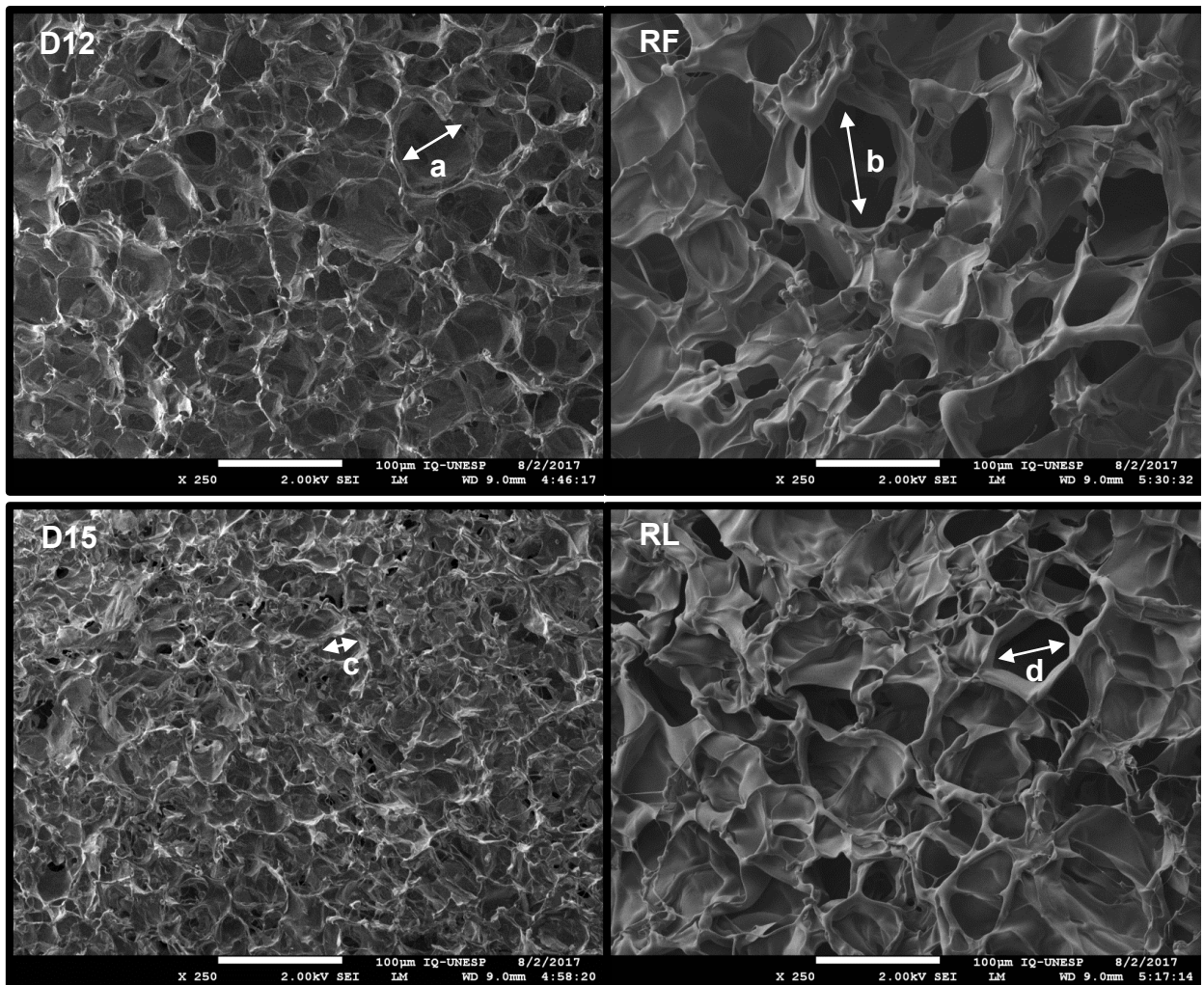
Fonte: Imagem da autora

5.2 Avaliação da Microestrutura e Micromorfologia Externa e Interna por MEV

As fotomicrografias com magnificação de 50X, 250X, 1000X e 2500X das superfícies internas e externas de cada AH são apresentadas nas Figuras 9 e no Apêndice A - Figuras A1 a A8.

Nestas imagens pode-se observar que os AH D12 e D15 apresentam microestrutura e micromorfologia bastante distintas dos materiais RF e RL sendo que, o D12 apresentou grande quantidade de poros, característica de textura esponjosa e uma topografia irregular. Essas características apresentaram-se semelhantes tanto na superfície interna quanto externa não apresentando diferença significativas entre as superfícies

Figura 9 - Fotomicrografias da estrutura interna dos AHs RF, D12, RF e D15, RF e RL com 250X de magnificação - Araraquara 2017.



Fonte: Arquivo da autora

A estrutura mostra a cadeia polimérica interconecta de AH enquanto os poros mostram o espaço ocupado pelo meio aquoso de suporte, que foi removido pelo processo de liofilização.

A morfologia dos géis Rennova é de uma malha estruturada de aspecto derretido (fundido), formada por cadeias poliméricas interconectadas espessas, lisas e de bordas arredondadas.

Os produtos DMC apresentam estrutura formada por câmaras separadas por septos formados por cadeias poliméricas finas e irregulares de bordas afiladas.

Os géis indicados para preenchimento dérmico (D12 e RF) apresentam estrutura frouxa com poros ou câmaras com dimensões maiores (destaque a e b)

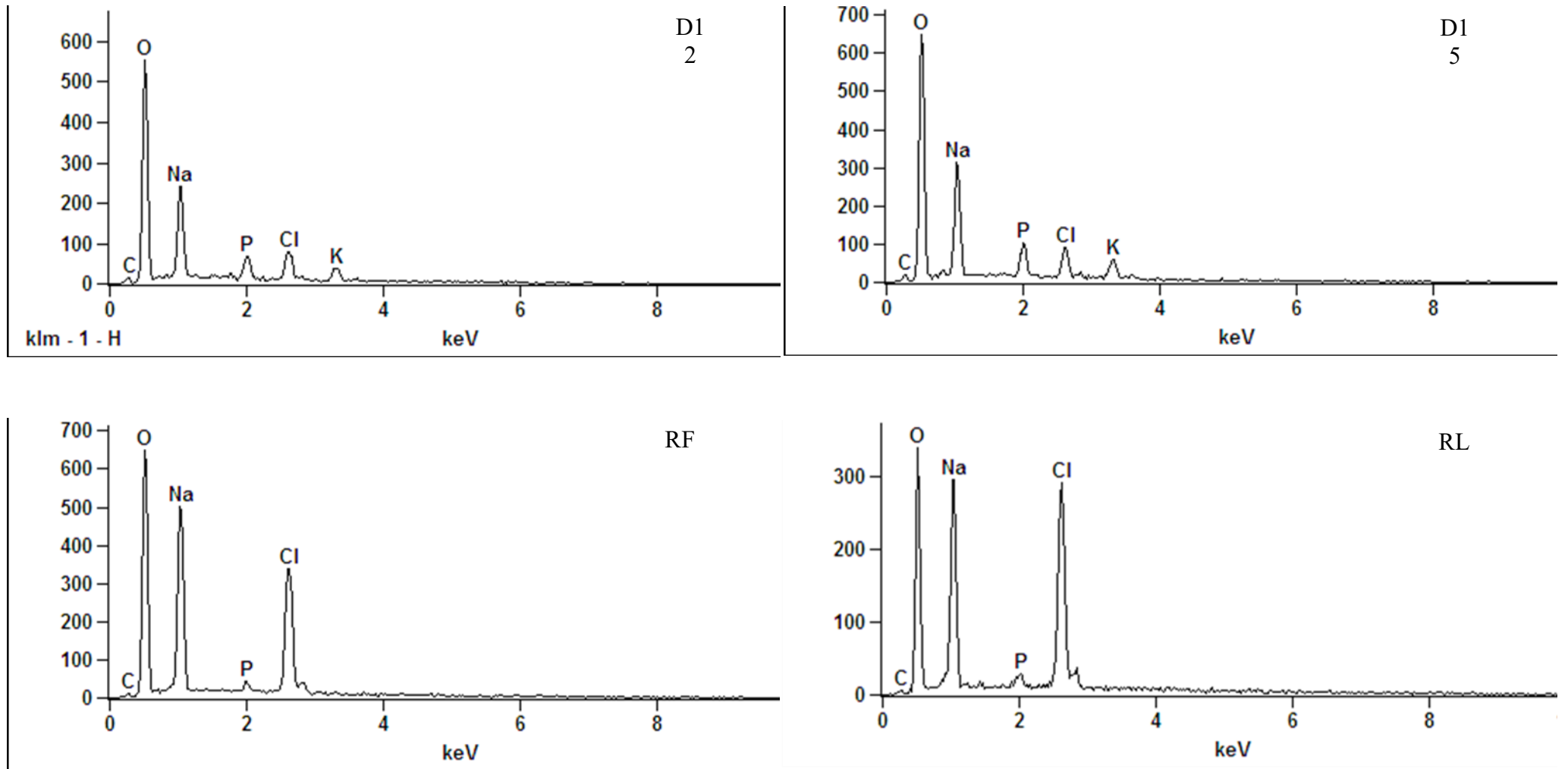
enquanto os géis indicados para aumento volumétrico de tecido (D15 e RL) tem estrutura mais densa com poros ou câmaras menores, que reflete sua maior taxa de reticulação (destaque c e d).

5.3 Investigação da Composição Química Elementar por EDX

A análise química elementar (EDX) produziu os espectros de composição química descritos na Figura 10.

Pode-se notar que os AHs estudados tem composição química bastante semelhante, somente se diferenciando pela presença de potássio (K) nas amostras de D12 e D15. Este elemento não está presente nos produtos Rennova (RF e RL). Este elemento químico pode ser proveniente do processo de reticulação ou de contaminantes ou impurezas incluídas no processamento dos produtos.

Figura 10 - Espectrogramas da composição química elementar dos AH D12, D15, RF e RL analisada por EDX - Araraquara 2017.



Fonte: Imagens de arquivo da autora

5.4 Investigação da Composição dos AH por FT-IR

A espectroscopia vibracional no infravermelho permite-nos identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra. Esta técnica, muitas vezes, é chamada de identificação por impressão digital uma vez que cada substância tem uma assinatura molecular unida e distinta.

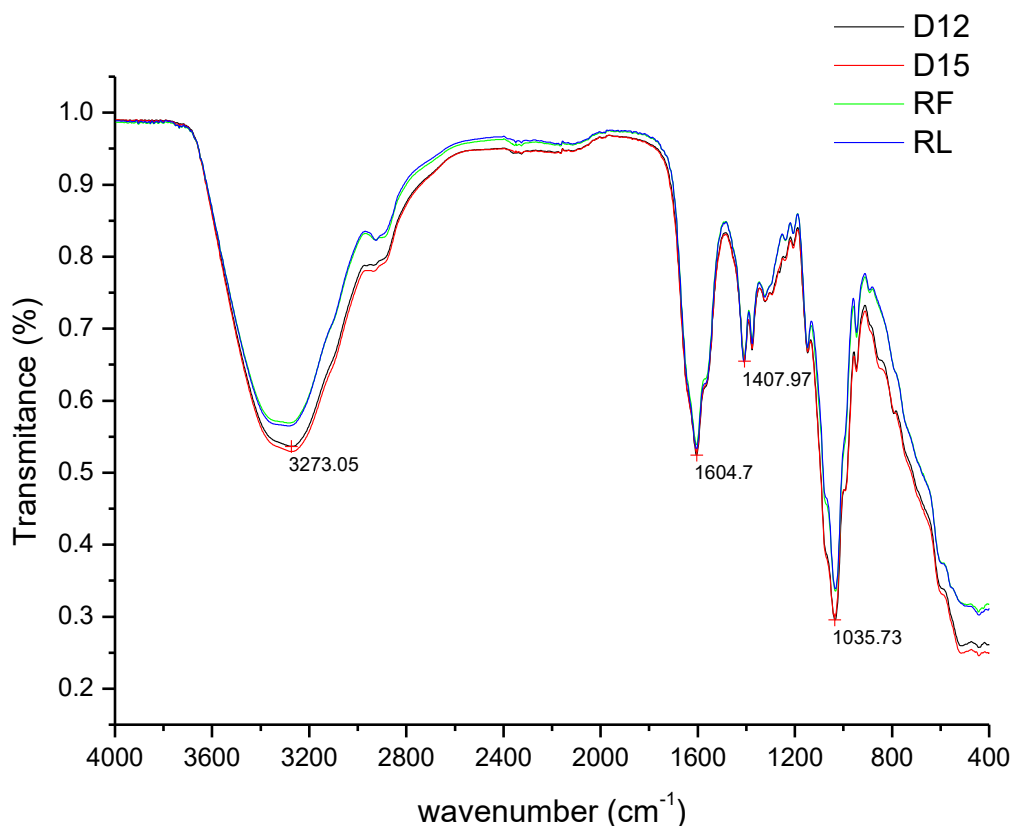
Apesar das diferenças na reticulação e no conteúdo de AH, na microestrutura e no conteúdo químico elementar, os géis D12, D15, RF e RL apresentaram espectrogramas similares, constituídos basicamente pelos grupamentos característicos do HA.

Nessas curvas espectrais, não foram observados outros compostos e/ou presença de contaminantes. O potássio (K) detectado na análise por EDX não apresentou vibração molecular relevante e não foi identificado.

Os resultados obtidos indicam que os quatro produtos testados foram reticulados com os mesmos agentes químicos, e que as diferenças no nível de reticulação não foram significativos ao ponto de resultar em assinaturas vibracionais distintas, ou então porque a concentração dos reticulantes na amostra foi tão baixa que sua vibração acabou sendo obscurecida pelas bandas vibracionais mais intensas do AH.

No espectrograma da Figura 11 pode-se observar esses detalhes e principais bandas vibracionais características das moléculas de AH.

Figura 11 - Espectrograma das amostras liofilizadas dos AH experimentais (D12 e D15) e comerciais (RF e RL) obtidos por ATR FT-IR - Araraquara 2017.



Fonte: Imagens de arquivo da autora

As bandas vibracionais características dos AH identificados no espectrograma estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Interpretação dos picos vibracionais moleculares dos AHs identificados por ATR FTIR - Araraquara - 2017.

Pico Vibracional	Grupamento	Modo vibracional
3273,05	O-H (álcool)	Estiramento
1604,7	C=C (acetona α,β insaturada)	Estiramento
1407,97	O-H (ácido carboxílico)	Oscilação
1035,73	CO-O-CO (anidrido)	Estiramento

Fonte: ASTM International. Standard Guide for Characterization and Testing of Hyaluronan as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue Engineered Medical Product Applications¹².

Esta interpretação pode ser melhor compreendida quando se compara os grupamentos químicos identificados na espectrograma com a estrutura molecular do AH apresentada nas Figuras 4 e 5.

5.5 Propriedades Viscoelásticas Analisadas por Reômetria Dinâmica Oscilatória

Os resultados e interpretação da análise reológica estão descritos nas Figuras 12 a 14 e na Tabela 6.

Na Figura 12, pode-se observar que os módulos de elasticidade (G') e viscosidade (G'') não se cruzam. Além disso, o G' é sempre maior que G'' , estas características indicam, como era esperado, que os produtos podem ser reometricamente classificados como géis viscoelásticos densos.

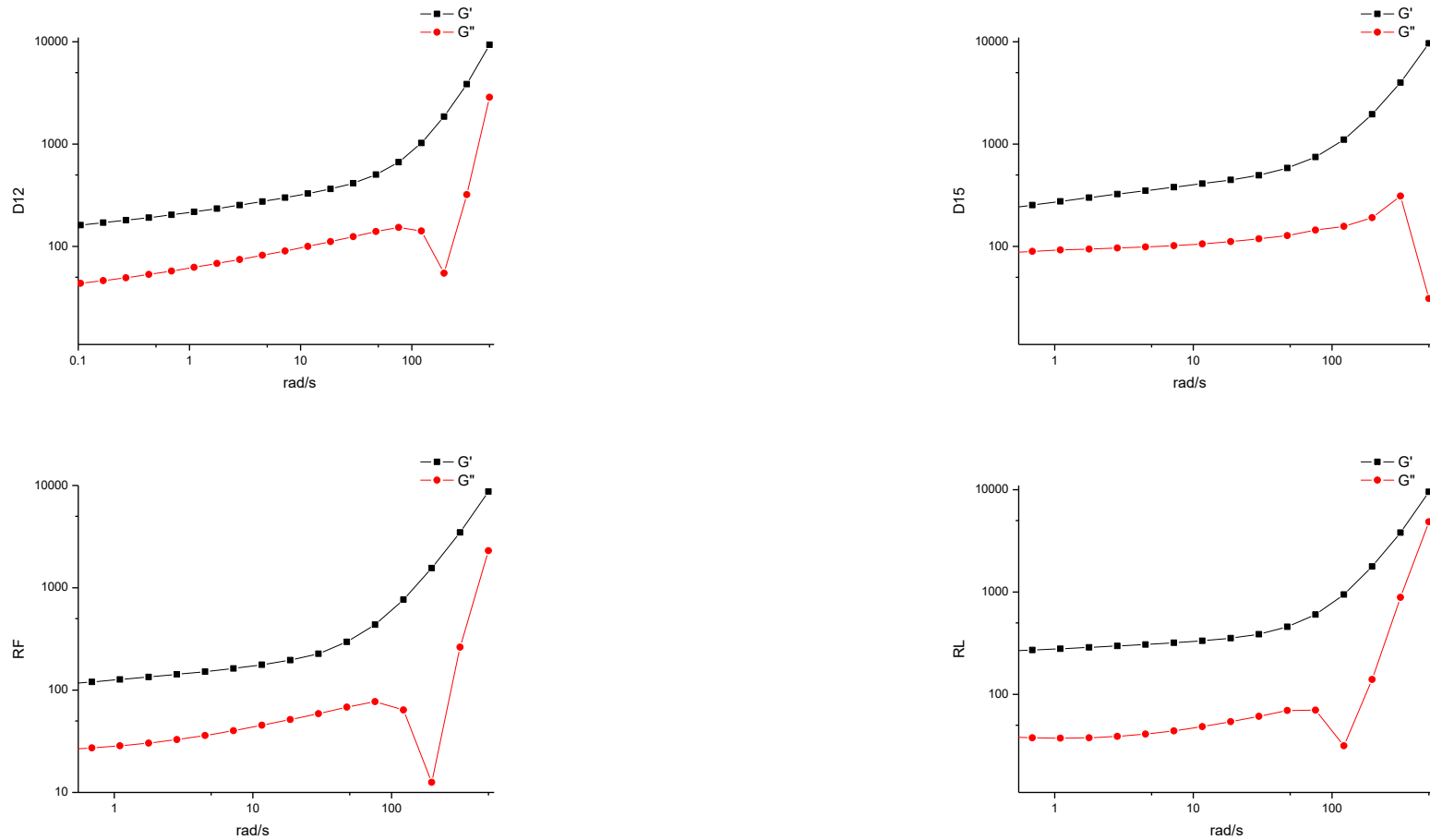
Na Tabela 6, pode-se verificar as várias propriedades reológicas que caracterizam o comportamento dos AHs testados. Estas propriedades indicam que o AH mais denso e resistente, ou seja, que apresenta o maior módulo de elasticidade (G') é o RL (207,41 Pa) e o que apresenta a menor capacidade de resistir a deformação é o D12 (78.63 Pa). O módulo de viscosidade complexa (η^*) indica os produtos que não se expalham e podem ser adequadamente modelados após a aplicação, o gel RL e o produto que apresenta este valor mais elevado (21.765,81 Pa). A dificuldade de extrusão do D15, e porque este produto provoca o entupimento da agulha pode ser explicada pelo elevado valor de sua tangente do ângulo de fase ($\tan\delta$) = 0,53, que o caracteriza de comportamento mais próximo a um sólido Hookeano, enquanto os demais produtos testados comportam-se mais como líquidos Newtonianos.

A Figura 13 mostra o gráfico do módulo de elasticidade (G') e, em escala aproximada, o módulo de elasticidade complexa (G^*) em função da varredura de frequência de 0.01 a 100 rd/s. As variações nas curvas são causadas, provavelmente, pela taxa de reticulação dos materiais. Assim, pode-se afirmar que dos géis testados D15 é, na avaliação dinâmica geral, o mais reticulado, seguido por RL e D12. A diferença na reticulação é evidente nos materiais comerciais mas não tão significativa nos materiais experimentais.

A Figura 14 mostra a evolução da porcentagem de elasticidade observado nesse estudo dinâmico oscilatório. Esses dados mostram que os géis D12, RF e RL modificam seu comportamento de géis densos para fluídos ao serem submetidos a

tensões na faixa de 100 rad/s, facilitando sua extrusão por agulhas de pequenos calibres. Ao contrário, do D15, que tem aumento gradativo da elasticidade

Figura 12 - Módulo de elasticidade (G') e viscosidade (G'') dos géis de AHs experimentais (D12 e D15) e comerciais (RF e RL) obtidos pela reometria dinâmica oscilatória realizada com varredura de frequência de 0.1 a 500 rd/s. - Araraquara 2017.



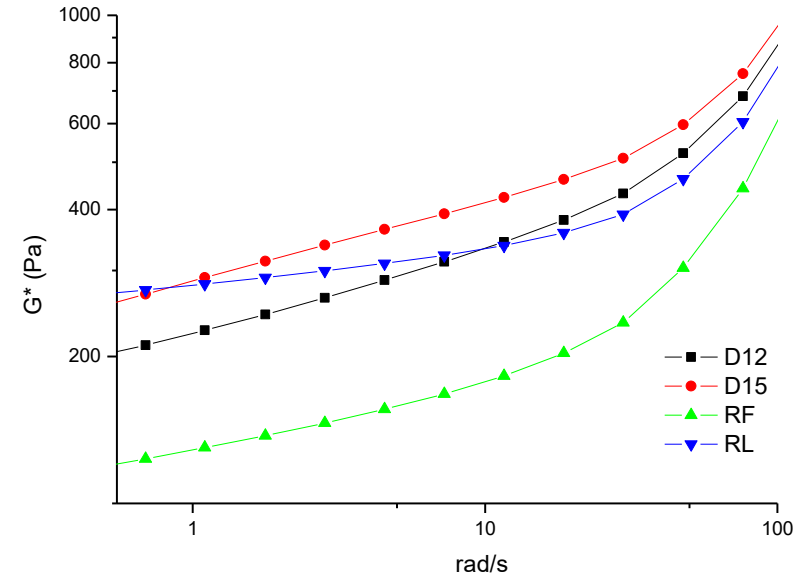
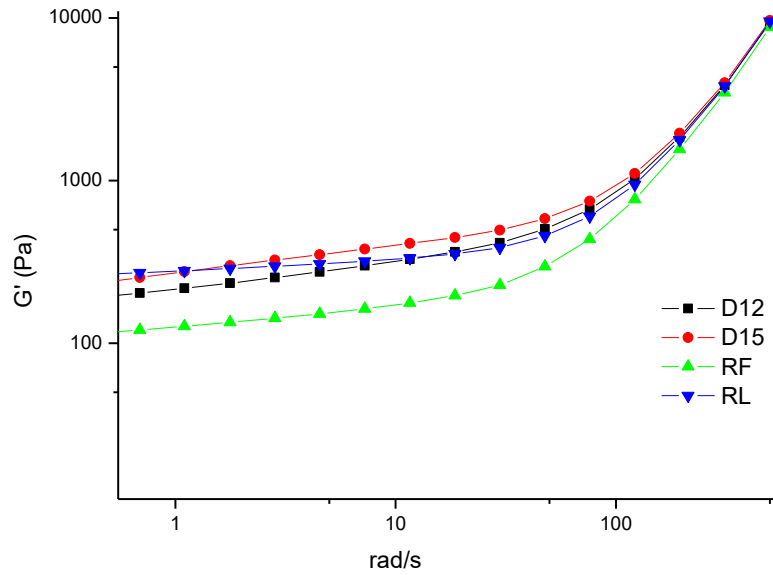
Fonte: Elaboração própria

Tabela 6 - Propriedades reológicas dos AHs de menor (D12, RF) e maior reticulação (D15 e RL), observadas na frequência de 0,01 rad/s em temperatura de 25 °C - Araraquara 2017.

AH	G'	G''	G*	η^*	tan δ	%E
D12	78.63	28.92	83.78	8377.88	0.37	73.11
D15	115.90	60.89	130.92	13092.18	0.53	65.56
RF	78.93	21.86	81.90	8190.07	0.28	78.31
RL	207.41	66.00	217.66	21765.81	0.32	75.86

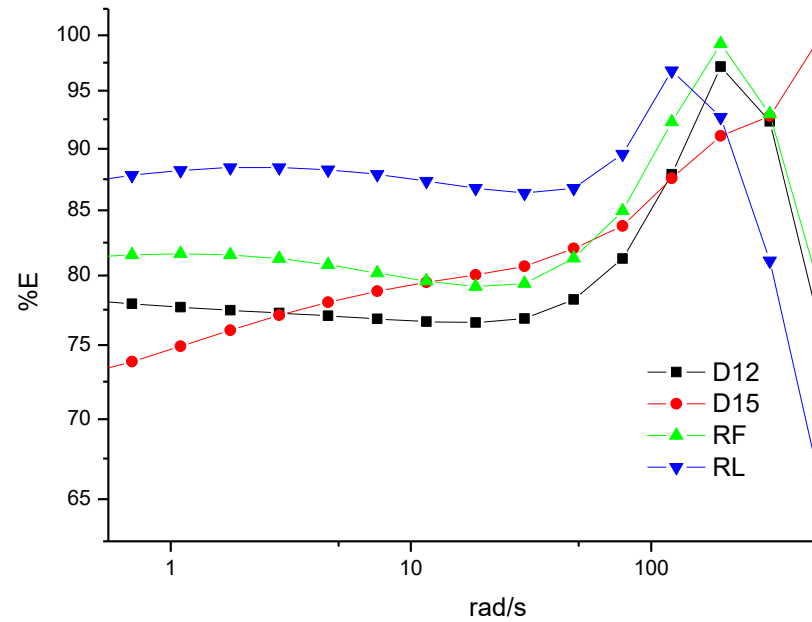
Fonte: Elaboração própria

Figura 13 - Apresentação comparativa do módulo de elasticidade (G') e, em escala aproximada, do módulo de elasticidade complexa (G^*) dos materiais em função da varredura de frequência de 0.01 a 100 rd/s - Araraquara, 2017.



Fonte: Elaboração própria

Figura 14 - Evolução da porcentagem de elasticidade dos géis de AH experimentais e comerciais em função da varredura de frequência de 0.01 a 550 rad/s - Araraquara, 2017.



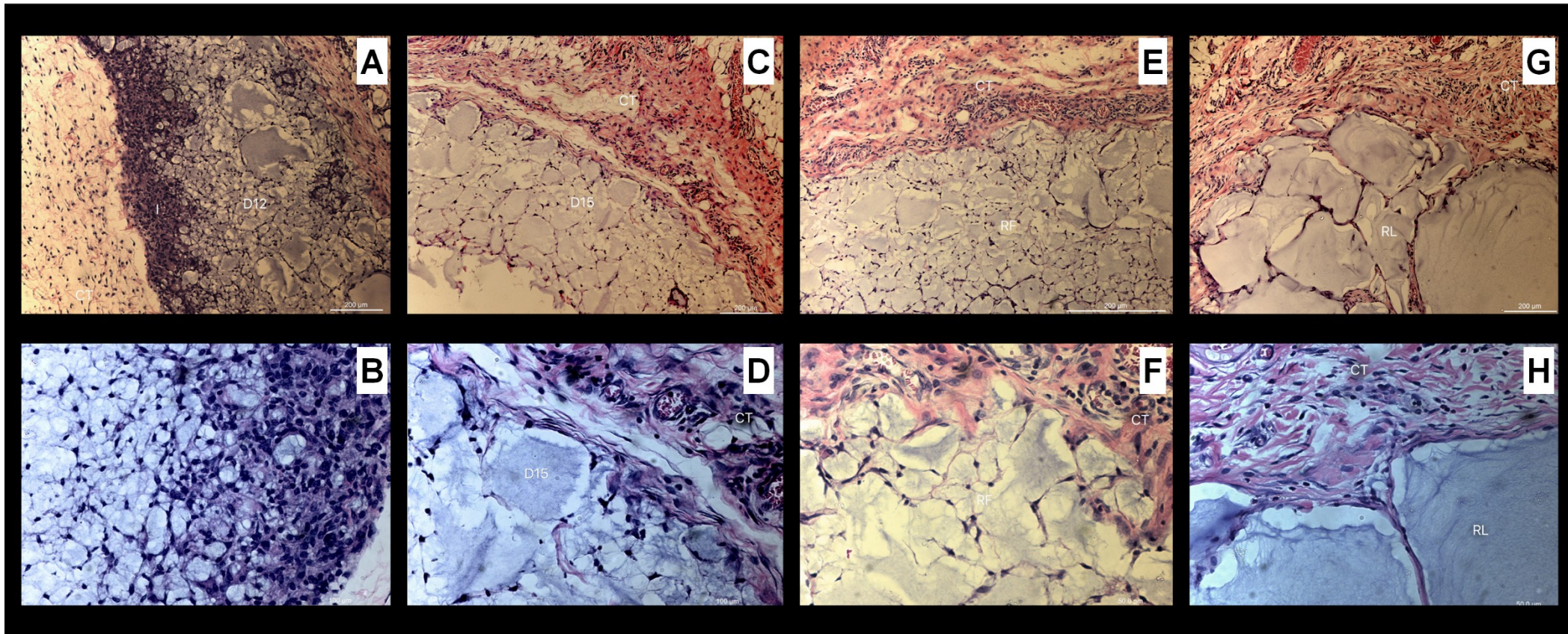
Fonte: Elaboração própria

5.6 Resposta Tecidual aos Implantes de AH e Reabsorção do Biopolímero

A interpretação dos cortes histológicos e os escores atribuídos pelo examinador (HP) aos eventos histopatológicos resultantes da interação dos AHs com o tecido podem ser observados nas Figuras 15 a 19 e B1 e B2 do apêndice B respectivamente.

As Figuras 20 e 21 mostram os resultados da análise estatística da associação entre os eventos histológicos e os AHs. A influência de D12 e RF e D15 sobre a intensidade da resposta inflamatória e o risco relativo (RR) podem ser observados na Figura 22.

Figura 15 - Fotomicrografia após 7 dias ilustra as diferentes respostas aos materiais de AH. Coloração H&E. (A) e (B) D12 - verifica-se intensa resposta inflamatória (I) com predominância de macrófagos, e exudato. O material AH apresenta-se permeado ao tecido conjuntivo (CT). A característica do AH é espumosa com pequenos grânulos. (C) e (D) D15 - Nesse material visualizamos um processo inflamatório mais leve, porém com congestão capilar no tecido conjuntivo (CT). Pode-se visualizar em maior aumento diapedese de células inflamatórias mononucleares. É notório adjacente ao AH grande intensidade de fibroblasto e presença de fibrilas colágenas permeando o material. O AH se apresenta com partículas intermediárias com característica espumosa. (E) e (F) RF - AH com aparência de partículas irregulares permeado por fibroblastos com síntese de colágeno. No tecido conjuntivo verifica-se êxtase vascular com diminuição do fluxo local, diapedese celular e extravasamento de hemácias caracterizando pequeno edema. Em maior aumento, verifica-se característica espumosa do AH. (G) e (H) RL - Presença de AH com maiores tamanhos diminuindo área de superfície. Nota-se presença de células inflamatórias, congestão capilar e fibroblastos ativos em contato com o AH. Em maior aumento presença de angiogênese capilar no tecido conjuntivo (CT).



Fonte: Arquivos da autora

Figura 16 - Fotomicrografia após 14 dias ilustra as diferentes respostas aos materiais de AH. Coloração H&E. (A) e (B) D12 - Nesse período o material apresenta isolado por uma fina rede fibrosa isolando o material. Processo inflamatório no meio e ao redor do AH (I). Característica heterogênea do AH com diferentes tamanhos compactados dentro da capsula fibrosa. (M) músculo. Em maior aumento verifica-se uma partícula com característica diferente do restante aglomerado de celular mononucleares característico de macrófago. (C) e (D) D15 - O AH também apresenta isolado numa fina rede de fibras. Presença de processo inflamatório (I). Em menor aumento verifica-se que o material está condensado como uma massa irregular, sugestivo de perda da estrutura no momento da extrusão. (E) e (F) RF - Nesse corte transversal podemos verificar as camadas da pele. (CT) tecido conjuntivo, (M) músculo e (RF) AH. O AH foi introduzido abaixo do músculo e percebe-se o aumento de volume da região. Em maior aumento verifica-se diminuição de algumas partículas de AH permeadas em tecido conjuntivo com grande presença de fibroblastos. (G) e (H) RL - Imagem em corte transversal mostrando a topografia da pele. (CT) tecido conjuntivo, (M) músculo, (RL) AH. Percebe-se maior volume quando comparado com o (RF), partículas com maior tamanho, e menor degradação do AH. Grande quantidade de fibroblastos e matriz de colágeno ao redor das partículas de AH.

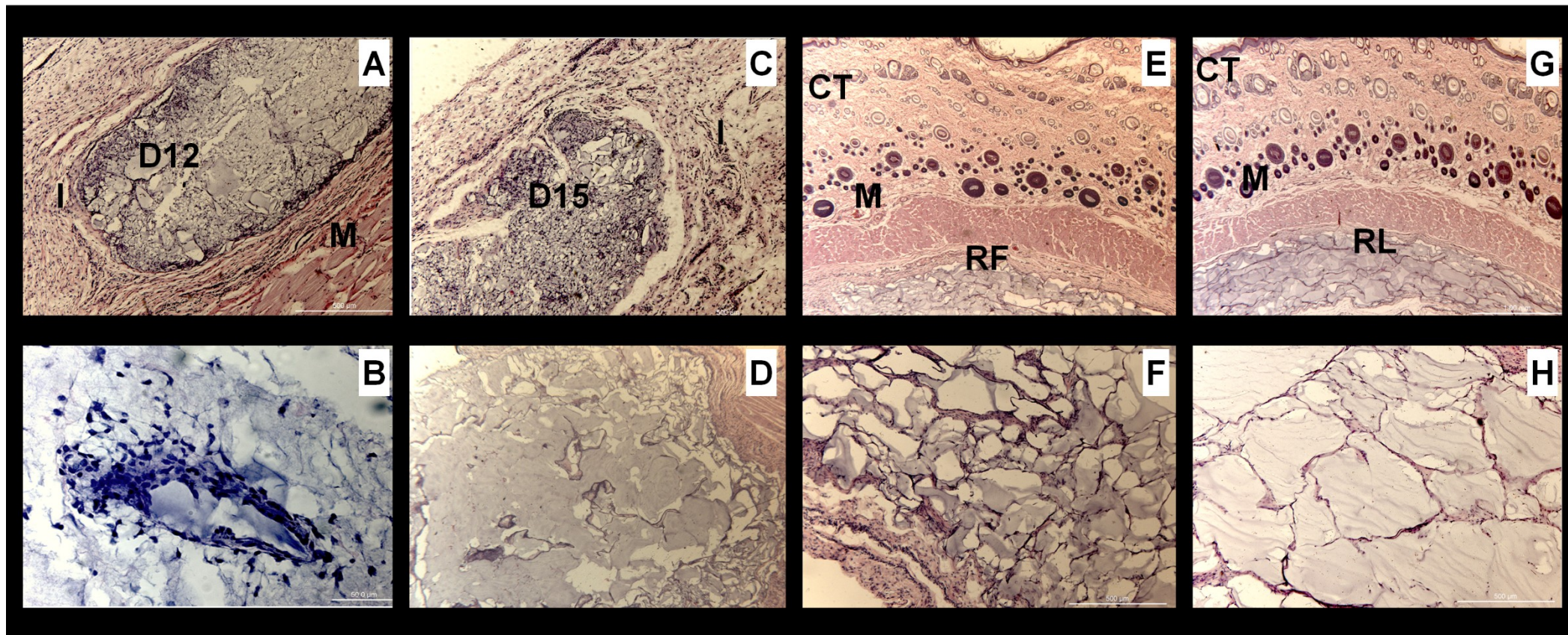
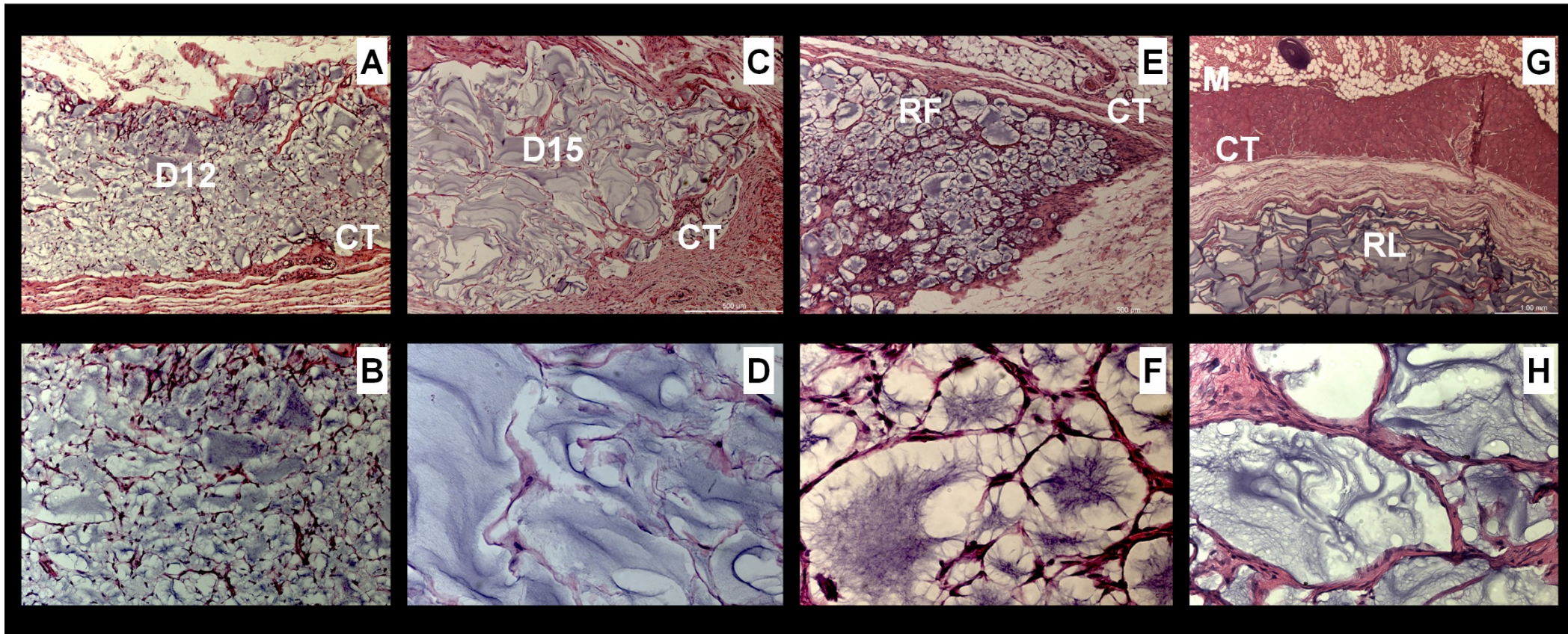


Figura 17 - Fotomicrografia após 30 dias ilustra as diferentes respostas aos materiais de AH. Coloração H&E. (A) e (B) D12 - Diminuição do processo inflamatório com formação de uma rede de colágeno ao redor do AH. Nota-se a presença de AH com característica espumosa e com partículas irregulares predominantemente pequenas. (C) e (D) D15 - Corte longitudinal ilustrando encapsulamento do material com matriz de colágeno mais organizado (CT). Partículas de AH permeadas por matriz de colágeno com fibroblastos ativos. (E) e (F) RF - O AH de baixa reticulação apresenta as partículas sendo encapsuladas por fibra colágena. Nota-se que as partículas estão em estágio de biodegradação. Em maior aumento nota-se que o AH está se degradando, e as partículas permeadas em rede de fibras colágenas. (G) e (H) RL - Corte transversal apresentando o AH promovendo ganho de volume tecidual. (M) músculo, (CT) tecido conjuntivo, (RL) AH. Na imagem aparece tecido conjuntivo formado abaixo do músculo em contato com o AH. Partículas homogêneas com baixa degradação. Em maior aumento as partículas estão rodeadas de tecido conjuntivo organizado com grande quantidade de fibroblasto.



Fonte: Arquivos da autora

Figura 18 - Fotomicrografia após 60 dias ilustra as diferentes respostas aos materiais de AH. Coloração H&E. (A) e (B) D12 - Ausência de inflamação, corte transversal apresentando as camadas da pele, e pequena quantidade de AH, permeado por maiores quantidades de matriz colágena. Em maior aumento ilustra-se as poucas partículas de AH com grande quantidade de colágeno ao redor. O Ah apresenta alta biodegradação. (C) e (D) D15 - Corte longitudinal com grande quantidade de colágeno neoformado permeando o material de AH (CT). Em maior aumento visualiza-se grande quantidade de AH com lenta degradação. As partículas de AH apresenta degradação heterogênea, no qual algumas partículas estão se degradando mais que outras. (E) e (F) RF - Corte transversal ilustrando formação de tecido conjuntivo (CT) abaixo do (M) músculo. Nítida capsula fibrosa permeando o (RF). Em maior aumento percebe-se o AH em contato com matriz de colágeno organizado. (G) e (H) RL - Material de AH em maior tamanho proporcionando aumento de volume tecidual. (M) músculo, (RL) AH, e tecido conjuntivo (TC). Em maior aumento tecido conjuntivo atraído em direção da partícula de AH. Grande quantidade de colágeno, e ausente inflamação.

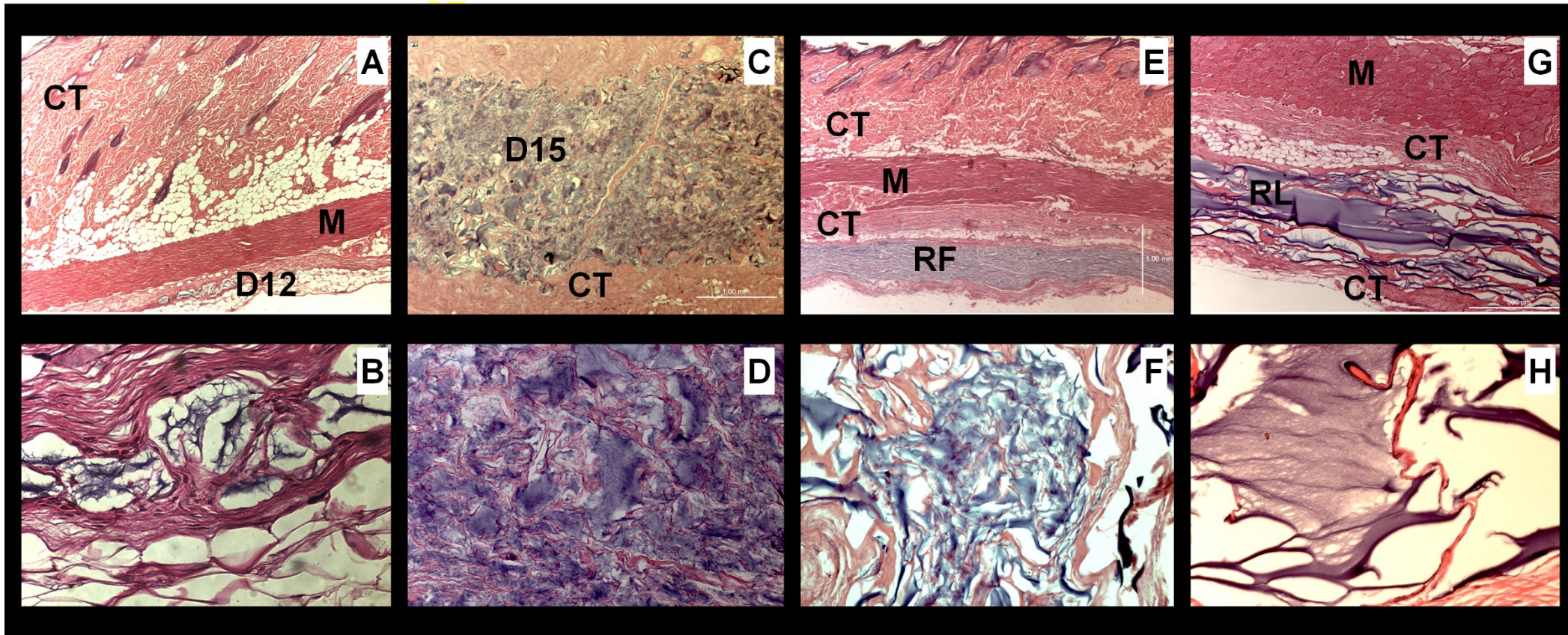
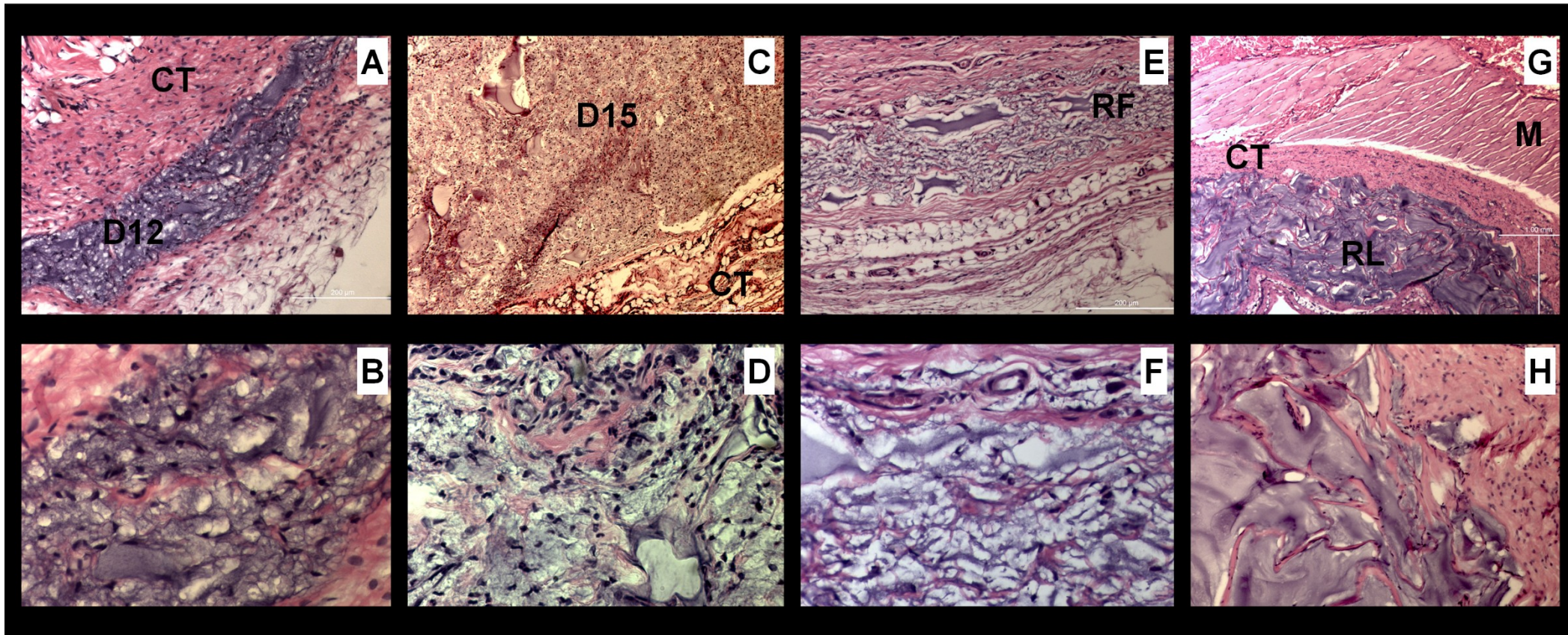


Figura 19 - Fotomicrografia após 120 dias ilustra as diferentes respostas aos materiais de AH. Coloração H&E. (A) e (B) D12 - Nesse período verifica-se continuidade de degradação do AH, e irregularidade no tamanho das partículas. Nota-se pequena quantidade de macrófagos caracterizando inflamação crônica leve, e presença de grande quantidade de fibroblastos. (C) e (D) D15 - AH irregular com presença de grande quantidade de fibroblastos, e tecido conjuntivo (CT) encapsulando material. Em maior aumento verifica-se grande quantidade de fibroblastos em alta atividade de síntese de matriz colágena, e algumas regiões com macrófagos. A característica do AH não aparenta homogeneidade. (E) e (F) RF - Grande quantidade de colágeno ao redor e no meio das partículas de AH. O AH apresenta alta taxa de degradação, porém algumas partículas ainda apresentam maiores tamanhos (RF). Em maior aumento capilares mais maduros, e grande quantidade de fibroblasto com citoplasma grande caracterizando alta síntese de matriz colágena. (G) e (H) - RL - Corte transversal nesse período ainda caracterizado por um grande aumento volumétrico proporcionado pelo AH. (M) Abaixo do músculo, matriz de colágeno organizado (CT) encapsulando o AH. Em maior aumento percebe-se que o AH continua com sua estrutura com baixo índice de degradação, e alta quantidade de fibroblastos e matriz organizada de colágeno. Ocorre biocompatibilidade do AH em íntimo contato com tecido conjuntivo.



5.7 Análise Estatística dos Eventos Histológicos.

O resultado da análise estatística do efeito dos AH sobre os eventos histopatológicos podem ser melhor visualizados nas Figuras 20 e 21.

5.7.1 Intensidade da resposta inflamatória

O modelo log-linear de efeito em linha para os dados da resposta inflamatória após 7 dias da implantação dos géis de AH, ajustou-se convenientemente aos dados observados ($G2(7) = 11,123$; $p = 0,133$).

Todos os AH utilizados causaram resposta inflamatória. ($p < 0,05$). O maior efeito foi observado em RL, que provocou maior frequência de inflamação moderada e leve ($z\lambda_{RL} * Cov_{7D} = 1,314$; $p < 0,001$). O géil D12 causou resposta inflamatória intensa com maior frequência ($z\lambda_{D12} * Cov_{7D} = 0,947$; $p < 0,001$), enquanto o RF causou a menor frequência ($z\lambda_{RF} * Cov_{7D} = 0,760$; $p = 0,002$). O D15 provocou frequência de inflamação intensa e mediana de mesma magnitude ($z\lambda_{D15} * Cov_{7D} = 0,092$; $p < 0,001$).

Os dados também se ajustaram adequadamente ao modelo aos 14D ($G2(7) = 6,849$; $p = 0,445$). Todos os AH continuam causando a resposta inflamatória observada ($p < 0,05$). O efeito mais significativo foi observado para D15 ($z\lambda_{D15} * Cov_{14D} = 1,497$; $p < 0,001$), que causou maior frequência de inflamação classificada como mediana. A maior taxa de resposta inflamatória leve foi induzida por RF e RL que apresentaram os mesmos resultados estatísticos ($z\lambda_{RF} * Cov_{14D}$ e $z\lambda_{RL} * Cov_{14D} = 1,266$; $p = 0,001$). Resposta inflamatória intensa só foi observada para D12 ($z\lambda_{D12} * Cov_{14D} = 1,070$; $p < 0,001$).

Aos 30 dias, o ajuste dos dados também foi adequado ($G2(3) = 6,727$; $p = 0,081$). Nesse período, a resposta tecidual observada não pode ser associada a nenhum dos géis de AH testados ($p > 0,05$).

Nos períodos 60D e 120D os dados não se ajustaram adequadamente ao modelo ($G2(3) = 9,047$; $p = 0,029$) e ($G2(3) = 9,047$; $p = 0,029$).

5.7.2 Presença de fibroblasto/angiogênese

Os dados obtidos após 7D da implantação dos produtos mostraram-se adequadamente ajustados ao modelo ($G2(3) = 4,291$; $p = 0,232$). A associação entre

o estímulo de formação de fibroblasto/angiogênese e os géis de AH utilizados foi estatisticamente comprovada ($p < 0,05$). Os maiores efeitos foram dos produtos RF ($z\lambda_{RF} * Cov_{7D} = 1,375$; $p < 0,001$) e RL ($z\lambda_{RL} * Cov_{7D} = 1,375$; $p < 0,001$) que produziram fibroblasto/angiogênese moderada de igual magnitude. O efeito de D12 ($z\lambda_{D12} * Cov_{7D} = 0,991$; $p = 0,024$) e D15 ($z\lambda_{D15} * Cov_{7D} = 0,991$; $p = 0,024$) foi menos intenso, com observações de quantidades semelhantes de pequenas e moderadas presença de fibroblasto/angiogênese.

No segundo período de avaliação (14D) os dados também mostraram-se adequadamente ajustados ao modelo ($G2(3) = 2,817$; $p = 0,421$). Todos os produtos afetaram a presença de fibroblastos/angiogênese ($p < 0,05$). Nesse período de avaliação o maior efeito foi de RF ($z\lambda_{RF} * Cov_{14D} = 1,532$; $p < 0,001$) que estimulou moderada produção de fibroblasto/angiogênese, seguido de RL ($z\lambda_{RL} * Cov_{14D} = 1,392$; $p = 0,002$) para o qual foi observada a menor frequência de pequena presença de células de resposta, D15 ($z\lambda_{D15} * Cov_{14D} = 1,289$; $p = 0,005$) e D12 ($z\lambda_{D12} * Cov_{14D} = 1,160$; $p = 0,014$) que induziram quantidades crescentes de pequena presença de fibroblasto/angiogênese.

Aos 30 dias, os dados não se ajustaram adequadamente ao modelo ($G2(3) = 11,292$; $p = 0,010$).

Os dados do período 60D mostraram adequado ajuste ao modelo ($G2(3) = 1,984$; $p = 0,576$). O efeito dos géis de AH sobre a resposta tecidual foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) e bastante semelhante, com maior frequência de observação de intensa presença de fibroblasto/angiogênese e menor frequência de quantidade moderada destas células. D12 e RL induziram resposta mais intensa ($z\lambda_{D12} * Cov_{60D}$ e $z\lambda_{RL} * Cov_{60D} = 1,275$; $p < 0,001$) enquanto RF e D15 mostraram efeito menos intenso ($z\lambda_{RF} * Cov_{60D}$ e $z\lambda_{D15} * Cov_{60D} = 1,228$; $p < 0,001$).

No final da dessa avaliação (120D) os dados também estavam adequadamente ajustados ao modelo ($G2(3) = 1,640$; $p = 0,650$) e todos os géis de AH afetaram a formação de fibroblasto/angiogênese. O efeito mais positivo foi do gel RL ($z\lambda_{RL} * Cov_{120D} = 1,576$; $p < 0,001$), para o qual todas as lâminas mostraram intensa presença de fibroblastos/angiogênese. RF e D15 apresentaram tanto frequência de intensa como moderada presença de fibroblastos/angiogênese ($z\lambda_{RF} * Cov_{120D}$ e $z\lambda_{D15} * Cov_{120D} = 1,490$; $p < 0,001$). O menor efeito foi do gel D12 ($z\lambda_{D12} * Cov_{120D} = 1,444$; $p < 0,001$).

5.7.3 Presença e organização de fibra colágena

Os dados referentes ao primeiro período de avaliação (7D) ajustaram-se adequadamente ao modelo ($G2(3) = 6,359$; $p = 0,095$). Somente o uso dos géis RF ($z\lambda_{RF} * Cov_{7D} = 1,209$; $p = 0.001$) e RL ($z\lambda_{RL} * Cov_{7D} = 1,047$; $p = 0.009$) estimulou a produção de fibras colágenas adjacente aos produtos, sendo RF ligeiramente superior a RL. Apesar disso, estas fibras mostraram-se desorganizadas. Os demais produtos não tiveram efeito estatisticamente significativo nem sobre a produção nem sobre a organização do colágeno ($p > 0,05$).

Aos 14 dias os dados também se ajustaram adequadamente ao modelo ($G2(3) = 1,338$; $p = 0,720$). Todos os produtos tiveram efeito estatisticamente significativo sobre produção de colágeno. Aumentos mais significativos foram produzidos por D15 ($z\lambda_{D15} * Cov_{14D} = 1,730$; $p < 0.001$) e RL ($z\lambda_{RL} * Cov_{14D} = 1,601$; $p = 0.001$) respectivamente. D12 e RF apresentaram a mesma capacidade de estimular a formação de colágeno neste período de avaliação ($z\lambda_{D12} * Cov_{14D}$ e $z\lambda_{RF} * Cov_{14D} = 1,499$; $p = 0.002$).

Os dados também se ajustaram adequadamente ao modelo 30 dias após a implantação dos produtos ($G2(3) = 4,693$; $p = 0,196$). Os produtos RL ($z\lambda_{RL} * Cov_{30D} = 0,665$; $p = 0.011$), e RF ($z\lambda_{RF} * Cov_{30D} = 0,609$; $p = 0.022$), e D15 ($z\lambda_{D15} * Cov_{30D} = 0,609$; $p = 0.022$) estimularam a organização do colágeno adjacente aos produtos, enquanto D12 só estimula produção, mas não a organização desta fibra ($z\lambda_{D12} * Cov_{30D} = 1,068$; $p = 0.003$).

Os dados de 60 dias também estavam adequadamente distribuídos ($G2(7) = 3,729$; $p = 0,810$). Os produtos RL ($z\lambda_{RL} * Cov_{60D} = 1,447$; $p < 0.001$) e D12 ($z\lambda_{D12} * Cov_{60D} = 1,447$; $p < 0.001$), estimularam significativamente a organização do colágeno adjacente aos produtos, enquanto D15 só estimulou a produção de colágeno mas não a sua organização ($z\lambda_{D15} * Cov_{60D} = 2,138$; $p < 0.001$).

Finalmente, os dados de 120D também mostraram-se adequados ao modelo ($G2(3) = 0,198$; $p = 0,978$). Nesse período, todos os produtos puderam ser associados a maior organização das fibras colágenas adjacentes aos AH testados. Os produtos que produziram maior organização foram RL e D12 com a mesma capacidade de estímulo ($z\lambda_{RL} * Cov_{120D}$ e $z\lambda_{D12} * Cov_{120D} = 1,940$; $p < 0.001$).

5.7.4 Degradação do gel

Os dados do primeiro período de avaliação (7D) mostraram-se adequadamente ajustados ao modelo ($G2(3) = 6,164$; $p = 0,104$). Para D15 e RL foi observado o mesmo efeito estatístico elevado e de proteção com todas as observações classificadas como de baixa degradação do AH ($z\lambda D15 * Cov_7D$ e $z\lambda RL * Cov_7D = 2,049$; $p = 0.013$). As observações para D12 ($z\lambda D12 * Cov_7D = 1,117$; $p = 0.008$) mostraram que este gel apresenta maior frequência de degradação moderada, indicando que sua degradação já se inicia após 7 dias de implantação. O RF não pode ser associado com o padrão de degradação observado ($p > 0,05$).

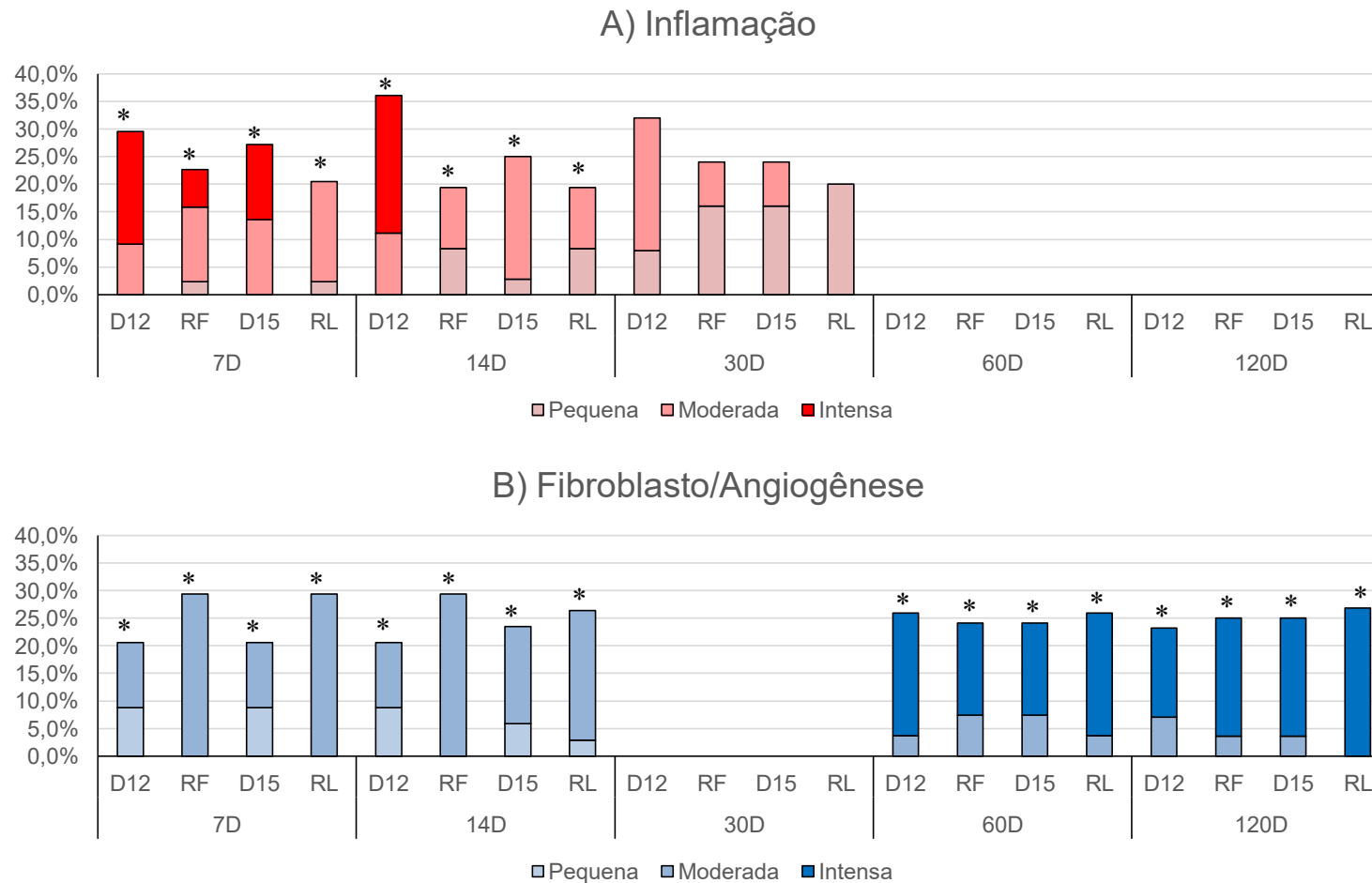
Duas semanas após a implantação (14D) os dados também mostram-se adequadamente ajustados ao modelo ($G2(3) = 6,842$; $p = 0,077$). Nesse período o efeito protetor de RL fica mais evidente, com todas as observações sendo classificadas como de baixa degradação ($z\lambda RL * Cov_14D = 1,773$; $p = 0.022$). Todas as observações relacionadas com o gel D12 foram classificadas como moderada indicando que este produto é o que apresenta o pior desempenho aos 14 dias ($z\lambda D12 * Cov_14D = 1,233$; $p < 0.001$) seguido de D15 ($z\lambda D15 * Cov_14D = 0,836$; $p < 0.043$). A frequência de degradação observada para RF não pode ser associada a este gel de AH ($p > 0,05$).

Os dados de 30 dias (30D) não se ajustaram adequadamente ao modelo ($G2(7) = 23,210$; $p = 0,002$).

Falta de ajuste dos dados também foi observado no 60D ($G2(7) = 23,556$; $p = 0,001$).

No último período de avaliação os dados mostraram adequado ajuste ao modelo ($G2(7) = 0,681$; $p = 0,998$). Os produtos para preenchimento dérmico (D12 e RF) mostram intensa degradação ($z\lambda D12 * Cov_120D$ e $z\lambda RF * Cov_120D = 1,840$; $p < 0,001$) enquanto nos produtos para aumento volumétrico de tecido somente observa-se degradação moderada - D15 ($z\lambda D15 * Cov_120D = 2,666$; $p < 0,001$) e moderada e baixa - RL ($z\lambda RL * Cov_120D = 2,566$; $p < 0,001$).

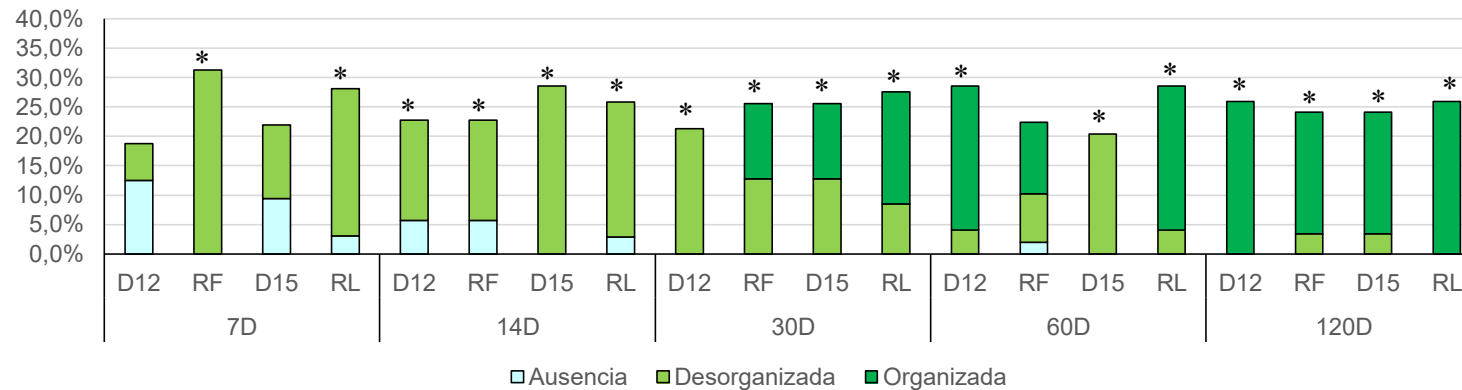
Figura 20 – Porcentagem da frequência ponderada da intensidade da resposta inflamatória (A) e da presença de fibroblasto/angiogênese (B) em função de gel de AH e tempo de avaliação. O (*) indica associação estatisticamente significativa entre o produto e o evento histológico avaliado para $p < 0,05$. Nos períodos 60D e 120D de (A) e 30D de (B) os resultados não foram mostrados porque os dados não se ajustaram adequadamente ao modelo loglinear ($p < 0,05$).



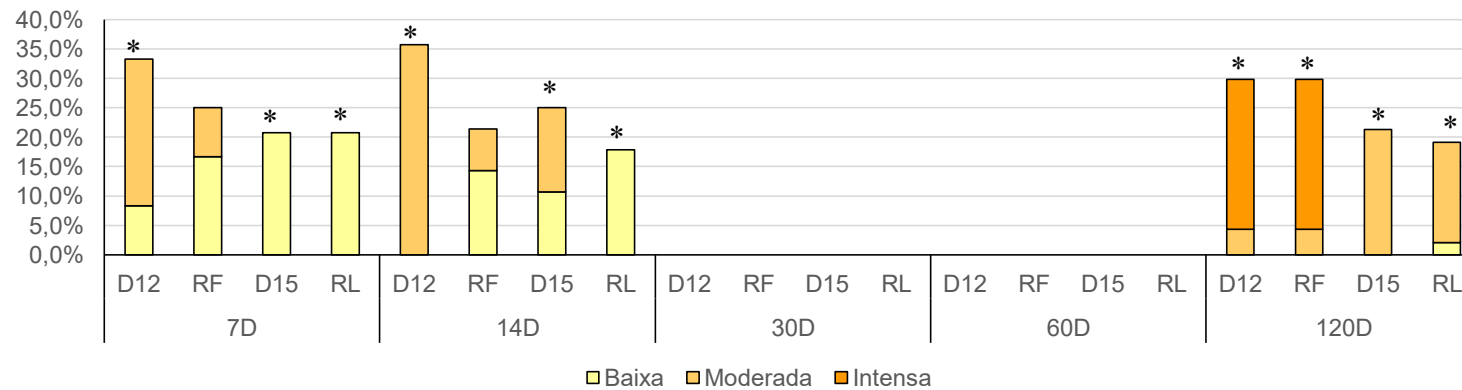
Fonte: Elaboração própria

Figura 21 – Porcentagem da frequência ponderada da presença e organização da fibra colágena (C) e o nível de degradação do AH (D) em função de gel de AH e tempo de avaliação. O (*) indica associação estatisticamente significativa entre o produto e o evento histológico avaliado para $p < 0,05$. Nos períodos 30D e 60D de (D) os resultados não foram mostrados porque os dados não se ajustaram adequadamente ao modelo loglinear ($p < 0,05$).

C) Fibras Colágenas



D) Degradação de AH



Fonte: Elaboração própria

5.8 Diferença entre Produtos

Para os produtos indicados para preenchimento dérmico foi observada diferença estatística significativa ($X^2(1) = 5.400$; $p=0,05$), indicando que o uso do gel D12 causa maior porcentagem inflamação moderada/severa do que RF. Esta diferença é de dimensão moderada (V de Cramer = 0.425) e o risco relativo da ocorrência de inflamação de maior intensidade com o uso de D12 é 7,42 vezes maior do que o causado por RF – Figura 22.

Para os produtos indicados para aumento volumético de tecido não foi observada diferença estatística significativa entre D15 e RL ($X^2(1) = 2,143$; $p=0,272$).

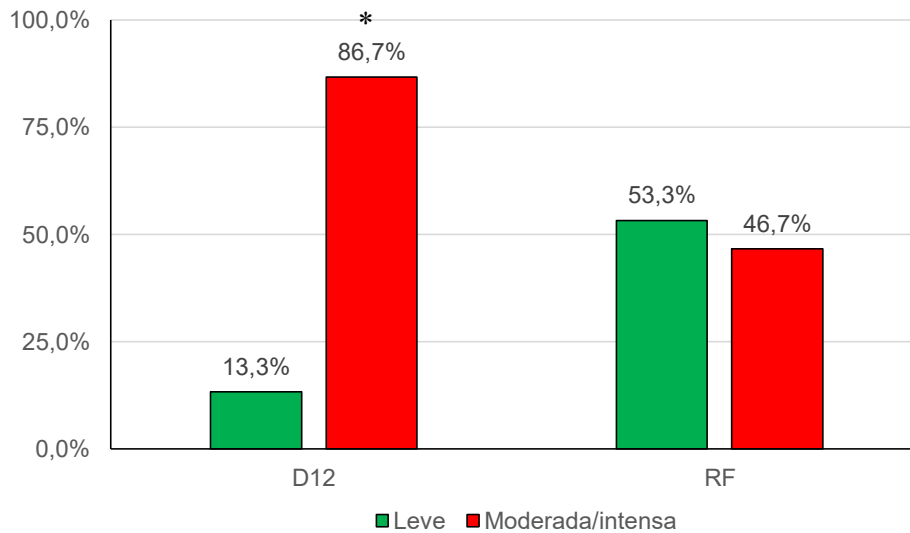
Para os demais eventos histológicos foram considerados os períodos 30D, 60D e 120D, pois nos períodos iniciais 7D e 14D não ocorreu variabilidade entre os dados. Nesses eventos os níveis pequena/ausente ou baixa foram agrupados com o moderado, e receberam o escore 0 = pequena/ausente ou baixa.

Para o evento presença de fibroblasto/angiogênese não foram observadas diferenças estatísticas nem entre os géis D12 e RF ($X^2(1) = 0,136$; $p = 1,000$), nem entre D15 e RL ($X^2(1) = 3,968$; $p = 0,109$).

Para estímulo a formação e organização de colágeno também não foram encontradas diferenças estatísticas nem entre os géis D12 e RF ($X^2(1) = 1,36$; $p = 1,000$), nem entre D15 e RL ($X^2(1) = 5,000$; $p = 0,060$).

Os produtos também não diferiram quanto a taxa de biodegradação. A estatística X^2 para D12XRL foi ($X^2(1) = 1,200$; $p = 0,466$) e para D15XRL ($X^2(1) = 1,034$; $p = 1,000$).

Figura 22 – Frequência das observações classificadas como inflamação intensa em função dos géis indicados para preenchimento dérmico expressas em porcentagem. O (*) destaca diferença estatística significativa para $\alpha = 0,05$ indicando que D12 causa maior taxa de resposta inflamatória intensa do que RF, com um RR=7,42.



Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

Esse estudo, realizado para comparar as características químicas, estruturais, reológicas e de resposta tecidual e biodegradação ao implante intramuscular de AH no dorso de ratos, encontrou diferenças estatisticamente significativas entre géis indicados para preenchimento dérmico mas não para os AH indicados para aumento volumétrico de tecido. Também foi encontrada associação estatisticamente significativa entre os produtos e grau de inflamação, estímulo a produção de fibroblasto/angiogênese, organização de colágeno e a biodegradação. Em função disso a hipótese nula (H0) foi rejeitada.

A falta de explicações plausíveis para a diferença de desempenho e longevidade observada entre géis de AH indicados para a mesma aplicação clínica motivaram a realização desse estudo que comparou géis de AH monofásicos de origem não animal, obtidos por fermentação bacteriana, que apresentavam concentração de AH no gel semelhantes, (22 mg/mL produtos DMC e 23 mg/mL produtos Rennova), com níveis de reticulação próprias para preenchimento dérmico (D12 – 12,5% e RF não informada) e aumento volumétrico de tecido (D15 – 15% e RL não informada). Todos os produtos utilizaram o BDDE como agente reticulante - Tabela 1.

Apesar de apresentarem constituição semelhantes, os produtos testados mostraram diferenças na morfologia e estruturação das cadeias poliméricas, composição química, propriedades reológicas, resposta histopatológica e grau de biodegradação.

A resposta histopatológica aos implantes e a taxa de biodegradação dos mesmos foram utilizadas com parâmetros de comparação para entender a importância destas diferenças e também para obter subsídios sobre o desempenho e longevidade dos tratamentos realizados com esses AHs.

Fernández-Cossío et al.¹⁹ (2006), Kablik et al.²⁷ (2009), Jones²⁶ (2011), e De Boule et al.¹⁴ (2013) afirmam que existe relação direta entre o grau de reticulação e a intensidade de inflamação causadas pela implantação do AH nos tecidos, ou seja, produtos mais reticulados causam maior resposta inflamatória, hematomas e inchaço, devido a distensão e rompimento dos tecidos e a maior resistência dos produtos a biodegradação.

Contrariamente ao esperado, no presente estudo foi observado que o gel D12, menos reticulado, provocou maior resposta inflamatória, seguido pelo D15, mais reticulado. O fato de dois produtos com reticulações e indicações distintas causarem altas taxas de inflamação, associado a mínima resposta tecidual causada pelo produto de maior reticulação (RL) - Figura 20. sugere que a resposta inflamatória não depende unicamente do nível de reticulação dos produtos, mas sim de um conjunto de características próprias de cada AH que envolvem sua composição, tipo de agente reticulante utilizado e eficácia do processo de reticulação.

A presença de potássio (K), identificada por EDX somente nos produtos D12 e D15, pode explicar o maior efeito inflamatório desses produtos, uma vez que Maioli et al.³⁴ (2015) observaram que o superóxido de potássio (KO₂) induziu resposta inflamatória em ratos.

A possível presença de BDDE residual, decorrentes de falhas no processo de reticulação, também poderia explicar a ocorrência da maior resposta inflamatória para os géis D12 e D15. (Yeom et al.⁵¹, 2010) e (De Boulle et al.¹⁴, 2013). No entanto, as curvas espectrais obtidas por FTIR e o mapeamento químico por EDS não evidenciaram presença de resíduos desse agente reticulante para nenhum dos produtos testados.

A morfologia estrutural é outro fator que poderia explicar a resposta inflamatória observada. A avaliação por MEV evidenciou que os produtos D12 e D15 tem malha polimérica formada por camaras irregulares separadas por septos finos com bordas vivas e serrilhadas - Figura 9. De acordo com La Gatta et al.²⁸, 2013, géis de AH com taxa de reticulação menor de 22% apresenta esta característica estrutural “irritante” com maior potencial de causar resposta inflamatória. Os geis RF e RL tem estrutura formada por uma malha polimérica interconectada espessa, de bordas arredondadas e lisas que se mostrou mais biocompatível. Essas diferenças morfológicas podem explicar o padrão de resposta inflamatória observada após 7 e 14 dias da implatação dos géis no dorso dos animais - Figuras 9 e 20, e demonstram a importância da morfologia estrutural dos géis para o desempenho dos tratamentos (Segura et al.⁴⁴, 2005) e (Flynn et al.²⁰, 2011).

Assim, acreditamos que a presença de K e a morfologia estrutural mais “irritante” dos géis de AH de menor concentração foram os fatores determinantes

para a resposta inflamatória observada. No entanto, para estabelecer a real contribuição destes fatores são necessários mais estudos comparativos específicos, com adição de K em produtos com outros tipos de malha estrutural.

Tanto a formação de fibroblastos/angiogênese como organização das fibras colágenas também apresentaram dependência direta dos produtos utilizados (modelos loglinear com $p < 0,05$) – Figuras 20 e 21, mas não mostraram diferenças ($p > 0,05$) entre os géis indicados para preenchimento dérmico (D12 X RF) e os utilizados para aumento volumétrico de tecido (D5 X RL). Também não foi observada relação entre o nível de inflamação e esses outros eventos histológicos ($p > 0,05$).

É interessante destacar que a partir dos 60 dias da implantação dos géis de AH todos os AHs promoveram intensa formação de fibroblasto/angiogênese, bem como intensa organização das fibras colágenas demonstrando que os resultados estéticos/funcionais obtidos pelo uso de géis injetáveis de AH não depende exclusivamente de seu desempenho físico/mecânico, mas também de sua capacidade de estimular neo-formação e rejuvenescimento tecidual – Figura 20 e 21. Também é interessante destacar que esses eventos histopatológicos não são afetados pela variação da taxa de biodegradação dos produtos – Figura 20 e 21.

Como esperado, os produtos para preenchimento dérmico (D12 e RF), são mais rapidamente biodegradados porque sua malha molecular menos densa é mais propensa a ação da hialuronidase (Lemperle et al.³³, 2003), (Park et al.⁴², 2014) (Al-Sibani et al.¹, 2015). Além disso, o aumento local e transitório dos radicais livres devido a maior inflamação causada por estes produtos pode ser um co-fator que potencializa a degradação de sua malha molecular, afetando a efetividade e a longevidade dos tratamentos realizados com estes géis (Nobuhiko et al.⁴⁰, 1992), (Volpi et al.⁴⁸, 2009), (Yang et al.⁵⁰, 2015) e (De Boule et al.¹⁴, 2013).

Quanto as propriedades reológicas e características de uso, os géis de AH devem possuir módulo de elasticidade (G') compatível com sua indicação de uso, ou seja, géis para preenchimento dérmico devem ter G' menor do que os indicados para aumento volumétrico de tecido. Os géis de AH também devem possuir módulo de viscosidade (G'') baixo, para que possam fluir pela agulha sem dificuldade e promover a expansão dos tecidos com mínimo desconforto. Além disso, é desejável que tenham módulo de viscosidade complexo (η^*) de moderado a elevado, para que possam ser modelados e não se espalhem após implantados. Também é importante que tenham tangente do ângulo de fase ($\tan\delta$) próximo de zero e porcentagem de

elasticidade (%E) que reduza com o aumento da frequência, para que possam fluir por agulhas de pequeno calibre sem entupi-las e serem facilmente injetados nos tecidos com pouca aplicação de força digito-palmar. (Falcone et al.¹⁷, 2008) (Kablik et al.²⁷, 2009) (Daar et al.¹², 2010) (Iannitti et al.²³, 2013) (Iannitti et al.²⁴, 2016).

Uma dificuldade encontrada no presente estudo, foi decidir em qual frequência relatar os valores absolutos de reologia, pois não existe consenso na literatura sobre isso. Em seu estudo (Falcone et al.¹⁷, 2008) relataram esses valores na frequência de 0,628 rad/s (0,1 Hz) pois, segundo eles, as diferenças nas propriedades reológicas são mais evidentes na menor frequência utilizada para a análise. Por outro lado, Sundaram et al.⁴⁵, 2003 defendem o uso da frequência de 4,40 rad/s (0.7 Hz) justificando que "resultados mais reprodutíveis e fisiologicamente mais relevantes para os estresses comuns à pele" são observados nessa frequência. Nos estudos de Lee et al.³⁰, 2015) e (Kablik et al.²⁷, 2009) os valores absolutos de reologia foram relatados em 31,43 rad/s (5 Hz) sem justificativa para o uso desta frequência. No presente estudo, os valores absolutos das propriedades reológicas foram descritas na menor frequência utilizada (0,01 rad/s ou 0,0016 Hz), na qual as diferenças entre produtos pode ser melhor observada (Falcone et al.¹⁷, 2008).

Considerando os valores absolutos de reologia obtidos para os produtos estudados, bem como os eventos histológicos já descritos – Tabela 6 e Figuras 12 a 15, pode-se afirmar que o tanto D12 como RF apresentam características de uso e capacidade de preenchimento dérmico semelhante. D12 é um pouco mais modelável e tem menor potencial de espalhar/migrar após a implantação ($>\eta^*$), enquanto RF é injetado com mais facilidade ($< \tan\delta$) nos tecidos.

Diferença mais significativa foi observada entre os produtos para aumento volumétrico de tecido. O gel com as melhores características foi o RL, que apresenta a maior capacidade de sustentação ($>G'$), é mais modelável e tem menor potencial de espalhar/migrar após a implantação ($>\eta^*$) e é facilmente injetado nos tecidos ($< \tan\delta$), enquanto D15 é difícil de ser injetado e causa frequente entupimento da agulha pois é o único dos produtos testados que não apresenta a inversão da porcentagem de elasticidade com o aumento da frequência - Figura 14. (Falcone et al.¹⁷, 2008).

Por estes resultados fica claro que os produtos testados diferem tanto na taxa como na tecnologia de reticulação utilizadas, uma vez que apresentam

concentrações de AH similares e foram reticulados pelo mesmo agente reticulante, (Chun et al.¹¹, 2016) e (De Boulle et al.¹⁴, 2013).

As diferenças observadas em nossos resultados demonstram a importância de se conhecer as diversas características físico-química e reológicas dos AHs, uma vez que, elas influenciaram diretamente na resposta tecidual, nas características de uso e no desempenho dos produtos. e (Edwards et al.¹⁵, 2007), (Tezel et al.⁴⁶, 2008), (Noh et al.⁴¹, 2006) (Berkó et al.⁵, 2013) e (Falcone et al.¹⁷, 2008)

Assim, pode-se estimar que o uso do gel D15 causaria maior inflamação, dor e desconforto aos pacientes, por apresentar morfologia estrutural mais “agressiva” que o produto RL. Além disso, este AH também tenderia a ter maior deformação e/ou migração quando submetido a forças excessivas, pois tem módulo de viscosidade complexa cerca de 60% menor que RL. Evidentemente, estas estimativas precisam ser comprovadas por estudos clínicos randomizados controlados mas, como destacado por (Tezel et al.⁴⁶, 2008) e (Kablik et al.²⁷, 2009), demonstram a relevância da caracterização morfo-físicoquímica e avaliação da resposta histopatológica e da biodegradação para a correta escolha e indicação dos géis de AH para preenchimento dérmico, e aumento volumétrico dos tecidos. Esses dados científicos também podem direcionar o desenvolvimento de novas formulações de géis de AH ou a melhoria dos produtos já disponíveis.

7 CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos se pode concluir que:

1) AH com a mesma indicação clínica diferem tanto nas características morfo-físicoquímicas com na resposta inflamatória provocada e no padrão de biodegradação.

2) O nível de resposta histopatológica depende do AH utilizado.

3) A morfologia estrutural de D12 e D15, formada por câmaras separadas por septos finos, com bordas afiladas e irregulares, provoca maior resposta inflamatória,

4) Todos os AH testados estimularam a neo-formação de fibroblasto e colágeno.

5) A biodegradação dos AH é inversamente proporcional a taxa de reticulação.

REFERÊNCIAS*

- 1 Al-Sibani M, Al-Harrasi A, Neubert R. Evaluation of in-vitro degradation rate of hyaluronic acid-based hydrogel cross-linked with 1, 4-butanediol diglycidyl ether (BDDE) using RP-HPLC and UVeVis spectroscopy. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2015; 29: 24-30.
- 2 ASTM International. Standard Guide for Characterization and Testing of Hyaluronan as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue Engineered Medical Product Applications¹. ASTM Committee F04 on Medical and Surgical Materials and Devices and is the direct responsibility of Subcommittee F04.42 on Biomaterials and Biomolecules for TEMP. West Conshohocken.2003. Designation: F 2347 – 03.
- 3 Baumann LS, Shamban AT, Lupo MP, Monheit GD, Thomas JA, Murphy DK, et al. Comparison of smooth-gel hyaluronic acid dermal fillers with cross-linked bovine collagen: a multicenter, double-masked, randomized, within-subject study. *Dermatol Surg.* 2007; 33 Suppl 2: S128-35.
- 4 Becker W, Gabitov I, Stepanov M, Kois J, Smidt A, Becker BE. Minimally invasive treatment for papillae deficiencies in the esthetic zone: a pilot study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2010; 12(1): 1-8.
- 5 Berkó S, Mónika M, Magdolna B, Gábor E, Petra H, Kinga S, et al. Advantages of cross-linked versus linear hyaluronic acid for semisolid skin delivery systems. *Eur Polym J.* 2013; 49: 2511-7.
- 6 Bertl K, Bruckmann C, Isberg PE, Klinge B, Gotfredsen K, Stavropoulos A. Hyaluronan in non-surgical and surgical periodontal therapy: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2015; 42(3): 236-46.
- 7 Bogović A, Nižetić J, Galić N, Zelježić D, Micek V, Mladinić M. The effects of hyaluronic acid, calcium hydroxide, and dentin adhesive on rat odontoblasts and fibroblasts. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2011; 62(2): 155-61.
- 8 Cena RB, Park JG, Kim HJ, Son KY, Kim DS, Kang MI, et al. Effects of crosslinked dextran in hydroxylpropyl methylcellulose on soft tissue augmentation in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014; 102(1): 131-40.
- 9 Chemistry, Libretexts. Infrared spectroscopy absorption table. [acesso em 2017 Jul 04]. Disponível em: [https://chem.libretexts.org/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Parameters/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table].

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

- 10 Chen CH, Chen SH, Mao SH, Tsai MJ, Chou PY, Liao CH, et al. Injectable thermosensitive hydrogel containing hyaluronic acid and chitosan as a barrier for prevention of postoperative peritoneal adhesion. *Carbohydr Polym.* 2017; 173: 721-31.
- 11 Chun C, Lee DY, Kim JT, Kwon MK, Kim YZ, Kim SS. Effect of molecular weight of hyaluronic acid (HA) on viscoelasticity and particle texturing feel of HA dermal biphasic fillers. *Biomater Res.* 2016; 20 (24): 1-7.
- 12 Daar E, King L, Nisbet A, Thorpe RB, Bradley DA. Viscosity changes in hyaluronic acid: Irradiation and rheological studies. *Appl Radiat Isot.* 2010; 68(4-5): 746–50.
- 13 Dahiya P, Kamal R. Hyaluronic acid: a boon in periodontal therapy. *N Am J Med Sci.* 2013; 5(5): 309–15.
- 14 De Boulle K, Richard G, Taro K, Myooran N, Ahmet T, Jean-Xavier R, et al. A review of the metabolism of 1,4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatol Surg.* 2013; 39(12): 1758-66.
- 15 Edwards PC, Fantasia JE. Review of long-term adverse effects associated with the use of chemically-modified animal and nonanimal source hyaluronic acid dermal fillers. *Clin Interv Aging.* 2007; 2(4): 509-19.
- 16 Faga A, Nicoletti G, Brenta F, Scevola S, Abatangelo G, Brun P. Hyaluronic acid three-dimensional scaffold for surgical revision of retracting scars: a human experimental study. *Int Wound J.* 2013; 10(3): 329-35.
- 17 Falcone SJ, Berg RA. Crosslinked hyaluronic acid dermal fillers: a comparison of rheological properties. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 87(1): 264-71.
- 18 Fan D, Wu B, Xu Z, Gu Q. Determination of hyaluronan by spectroscopic methods. *J Wuhan Univ Tech.* 2006; 21(3): 32-4.
- 19 Fernández-Cossío S, Castaño-Oreja MT. Biocompatibility of two novel dermal fillers: histological evaluation of implants of a hyaluronic acid filler and a polyacrylamide filler. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 117(6): 1789-96.
- 20 Flynn TC, Sarazin D, Bezzola A, Terrani C, Micheels P. Comparative histology of intradermal implantation of mono and biphasic hyaluronic acid fillers. *Dermatol Surg.* 2011; 37(5): 637–43.
- 21 Friedman PM, Mafong EA, Kauvar AN, Geronemus RG. Safety data of injectable nonanimal stabilized hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation. *Dermatol Surg.* 2002; 28(6): 491-4.

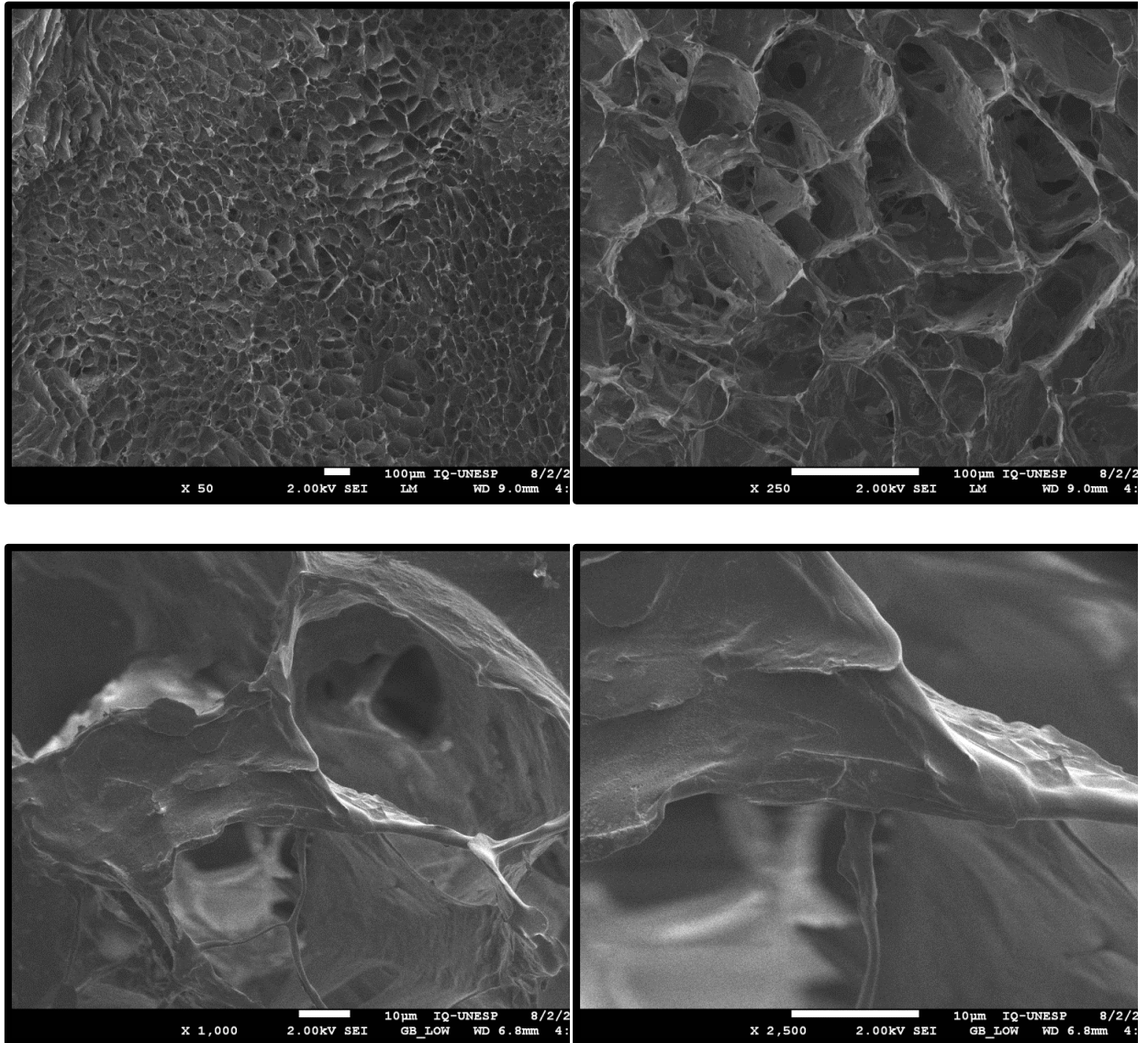
- 22 Hillel AT, Nahas Z, Unterman S, Reid B, Axelman J, Sutton D, et al. Validation of a small animal model for soft tissue filler characterization. *Dermatol Surg.* 2012; 38 (3): 471-8.
- 23 Iannitti T, Bingöl AÖ, Rottigni V, Palmieri B. A new highly viscoelastic hyaluronic acid gel: rheological properties, biocompatibility and clinical investigation in esthetic and restorative surgery. *Int J Pharm.* 2013; 456(2): 583-92.
- 24 Iannitti T, Julio CM, Alessandro C, Beniamino P. Experimental and clinical efficacy of two hyaluronic acid-based compounds of different cross-linkage and composition in the rejuvenation of the skin. *Pharm Res.* 2016; 33(12): 2879-90.
- 25 International Organization for Standardization, ISO 10993-10: biological evaluation of medical device part 10: Tests for irritation and skin sensitization. Zurich: ISO; 2010.
- 26 Jones D. Volumizing the face with soft tissue fillers. *Clin Plast Surg.* 2011; 38(3): 379-90.
- 27 Kablik J, Monheit GD, Yu L, Chang G, Gershkovich J. Comparative physical properties of hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatol Surg.* 2009; 35 (S1): 302-12.
- 28 La Gatta A, Schiraldi C, Papa A, D'Agostino A, Cammarota M, De Rosa A, et al. Hyaluronan scaffolds via diglycidyl ether crosslinking: toward improvements in composition and performance. *Carbohydr Polym.* 2013; 96(2): 536-44.
- 29 Lee D, Lu Q, Sommerfeld SD, Chan A, Menon NG, Schmidt TA, et al. Targeted delivery of hyaluronic acid to the ocular surface by a polymer-peptide conjugate system for dry eye disease. *Acta Biomater.* 2017; 55: 163-71.
- 30 Lee DY, Kim JT, Kwon MK, Kim YZ, Kim SS. Influence of molecular weight on swelling and elastic modulus of hyaluronic acid dermal fillers. *Polymer(Korea).* 2015; 39(6): 976-80.
- 31 Lee WP, Kim HJ, Yu SJ, Kim BO. Six month clinical evaluation of interdental papilla reconstruction with injectable hyaluronic acid gel using an image analysis system. *J Esthet Restor Dent.* 2016; 28(4): 221-30.
- 32 Legré-Boyer V. Viscosupplementation: techniques, indications, results. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2015; 101(1 Suppl 1): S101-8.
- 33 Lemperle G, Morhenn V, Charrier U. Human histology and persistence of various injectable filler substances for soft tissue augmentation. *Aesthetic Plast Surg.* 2003; 27(5): 354-66.

- 34 Maioli NA, Zarpelon AC, Mizokami SS, Calixto-Campos C, Guazelli CFS, Hohmann SN, et al. Superoxide anion donor, potassium superoxide, induces pain and inflammation in mice through production of reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *Braz J Med Biol Res.* 2015; 48(4): 321-31.
- 35 Matarasso SL, Carruthers JD, Jewell ML. Consensus recommendations for soft-tissue augmentation with nonanimal stabilized hyaluronic acid (Restylane). *Plast Reconstr Surg.* 2006; 117(3): 3-34.
- 36 Micheels P. Human anti-hyaluronic acid antibodies: is it possible? *Dermatol Surg.* 2001; 27(2): 185-91.
- 37 Micheels P, Sarazin D, Tran C, Salomon D. Effect of different crosslinking technologies on hyaluronic acid behavior: a visual and microscopic study of seven hyaluronic acid gels. *J Drugs Dermatol.* 2016; 15 (5): 600-6.
- 38 Narins RS, Welf P, Mark GR, Ernest AM, Andreas N. Nonanimal sourced hyaluronic acid-based dermal filler using a cohesive polydensified matrix technology is superior to bovine collagen in the correction of moderate to severe nasolabial folds: results from a 6-month, randomized, blinded, controlled, Multicent. *Dermat Surg.* 2010; 3 (6): 730-40.
- 39 Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluran) a review. *J Vet Med.* 2008; 54 (8): 397-411.
- 40 Nobuhiko Y, Terou O, Sakurai Y. Inflammation responsive degradation of crosslinked hyaluronic acid gels. *J Control Release.* 1992; 22 (2): 105-16.
- 41 Noh I, Kim GW, Choi YJ, Kim MS, Park Y, Lee KB, et al. Effects of cross-linking molecular weights in a hyaluronic acid-poly(ethylene oxide) hydrogel network on its properties. *Biomed Mater.* 2006; 1 (3): 116-23.
- 42 Park S, Park KY, Yeo IK, Cho SY, Chang Y, Koh HJ, et al. Investigation of the degradation-retarding effect caused by the low swelling capacity of a novel hyaluronic acid filler developed by solid-phase crosslinking technology. *Ann Dermatol.* 2014; 26(3): 357-62.
- 43 Romanò CL, De Vecchi E, Bortolin M, Morelli I, Drago L. Hyaluronic acid and its composites as a local antimicrobial/antiadhesive barrier. *J Bone Jt Infect.* 2017; 2(1): 63-72.
- 44 Segura T, Anderson BC, Chung PH, Webber RE, Shull KR, Shea LD. Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern. *Biomaterials.* 2005; 26(4): 359-71.

- 45 Sundaram H, Voigts B, Beer K, Meland M. Comparison of the rheological properties of viscosity and elasticity in two categories of soft tissue fillers: calcium hydroxylapatite and hyaluronic acid. *Dermatol Surg.* 2003; 36(3): 859-65.
- 46 Tezel A, Fredrickson GH. The science of hyaluronic acid dermal fillers. *J Cosmet Laser Ther.* 2008; 10(1): 35-42.
- 47 Voigt J, Driver VR. Hyaluronic acid derivatives and their healing effect on burns, epithelial surgical wounds, and chronic wounds: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Wound Repair Regen.* 2012; 20(3): 317-31.
- 48 Volpi N, Schiller J, Stern R, Soltés L. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Curr Med Chem.* 2009; 16(14): 1718-45.
- 49 Yamada Y, Nakamura S, Ueda M, Ito K. Papilla regeneration by injectable stem cell therapy with regenerative medicine: long-term clinical prognosis. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015; 9(3): 305-9.
- 50 Yang B, Guo X, Zang H, Liu J. Determination of modification degree in BDDE-modified hyaluronic acid hydrogel by SEC/MS. *Carbohydr Polym.* 2015; 131: 233-9.
- 51 Yeom J, Bhang SH, Kim BS, Seo MS, Hwang EJ, Cho IH, et al. Effect of cross-linking reagents for hyaluronic acid hydrogel dermal fillers on tissue augmentation and regeneration. *Bioconjug Chem.* 2010; 21: 240–7.

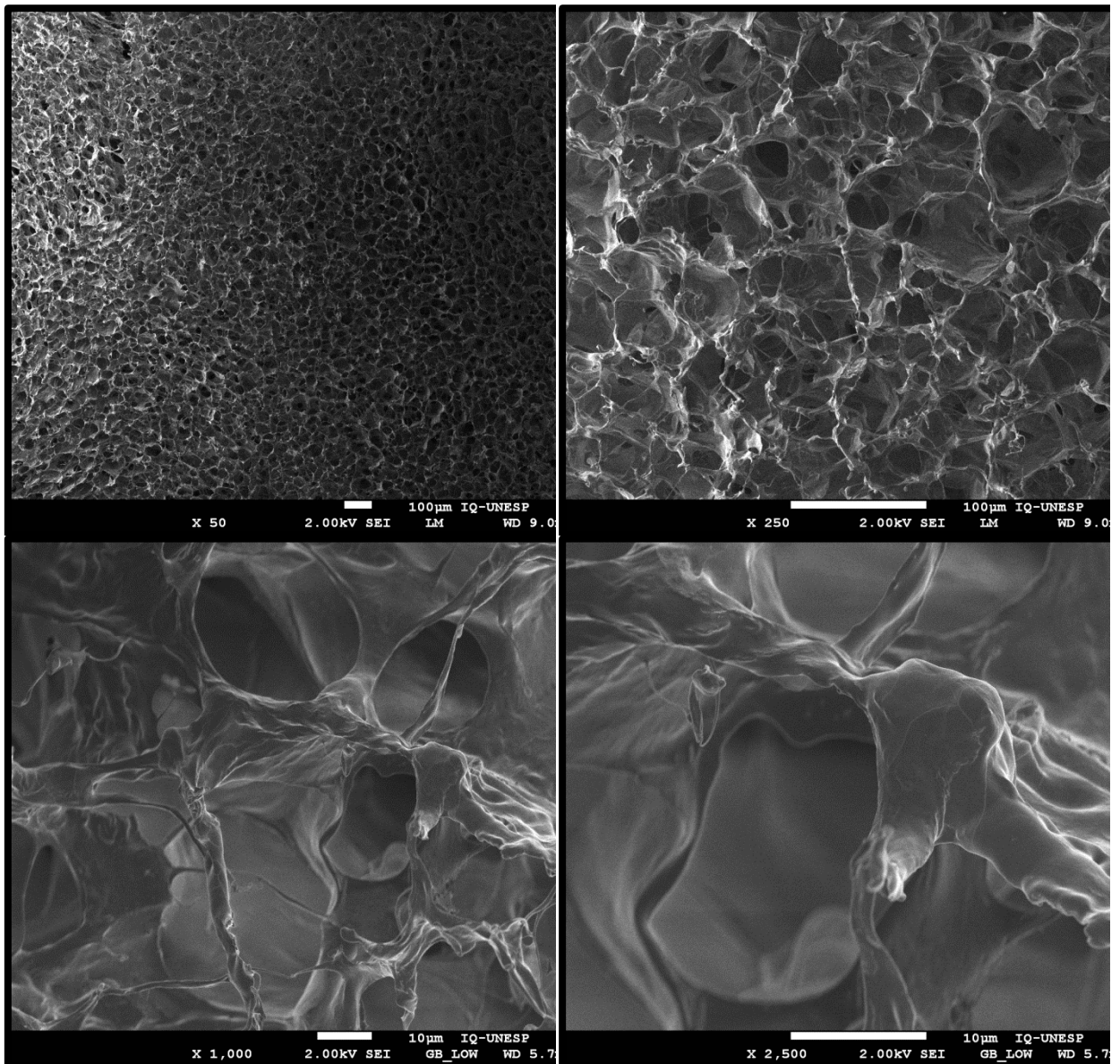
APÊNDICE A - ANÁLISE MORFOLOGICA POR MEV

Figura A1 - Fotomicrografias da micromorfologia e microestrutura interna do AH D12, com 50X, 250X, 1000X e 2500X de magnificação - Araraquara - 2017.



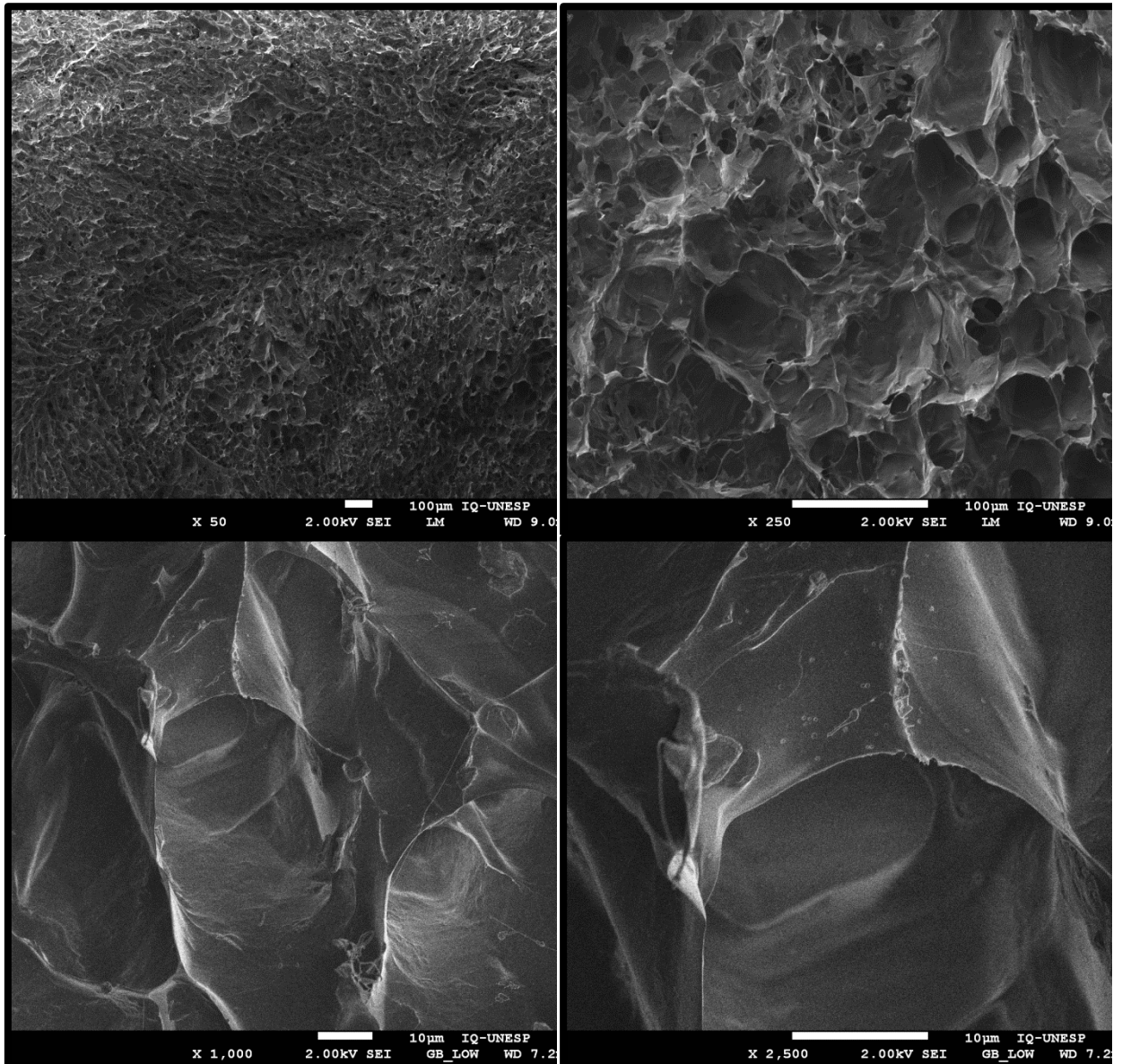
Fonte: Imagens de arquivo da autora

Figura A2 - Fotomicrografias micromorfologia e microestrutura externa do AH D12, com 50X, 250X, 1000X e 2500X de magnificação - Araraquara 2017.



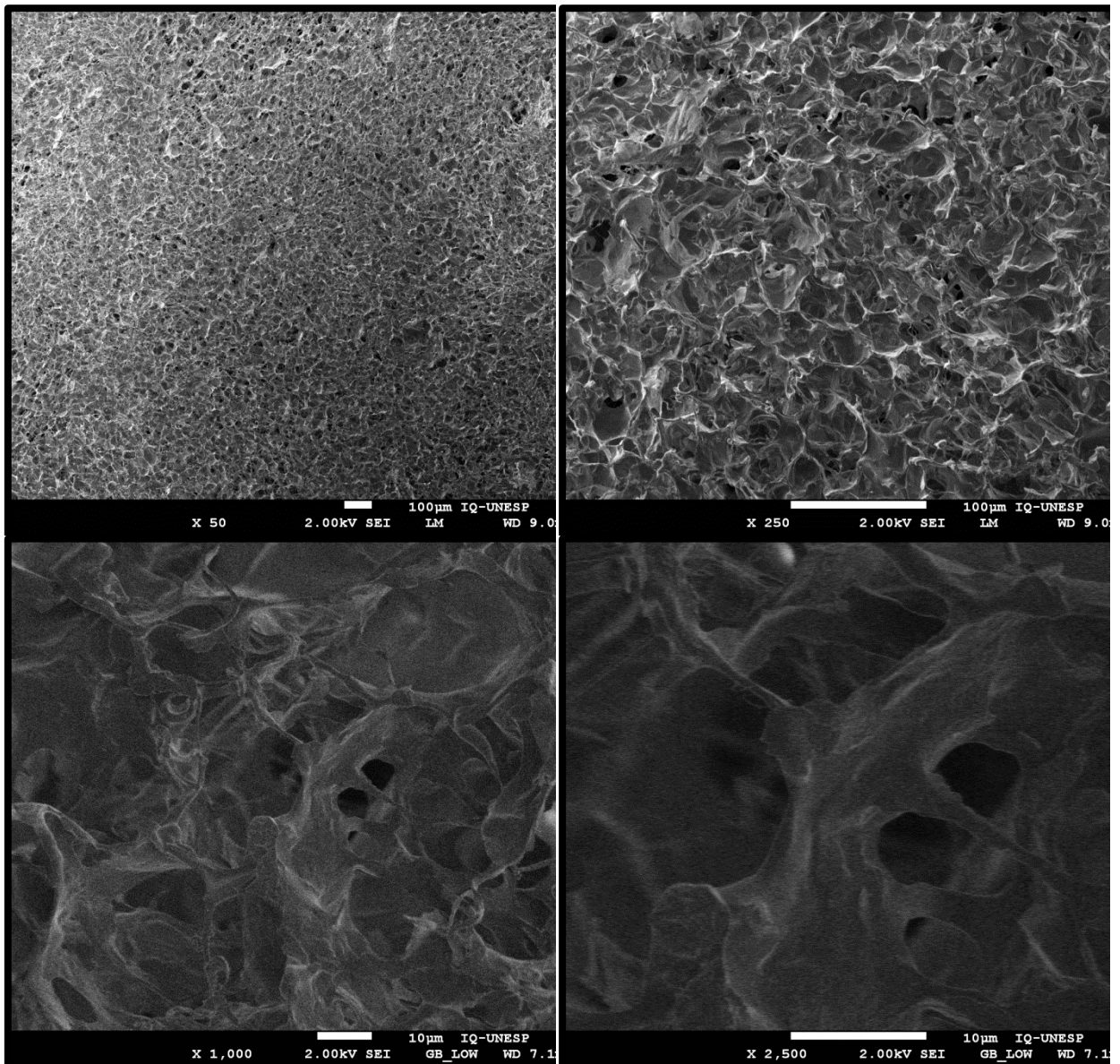
Fonte: Imagens de arquivo da autora

Figura A3 - Fotomicrografias da micromorfologia e microestrutura interna do AH D15, com 50X, 250X, 1000X e 2500X de magnificação - Araraquara 2017.



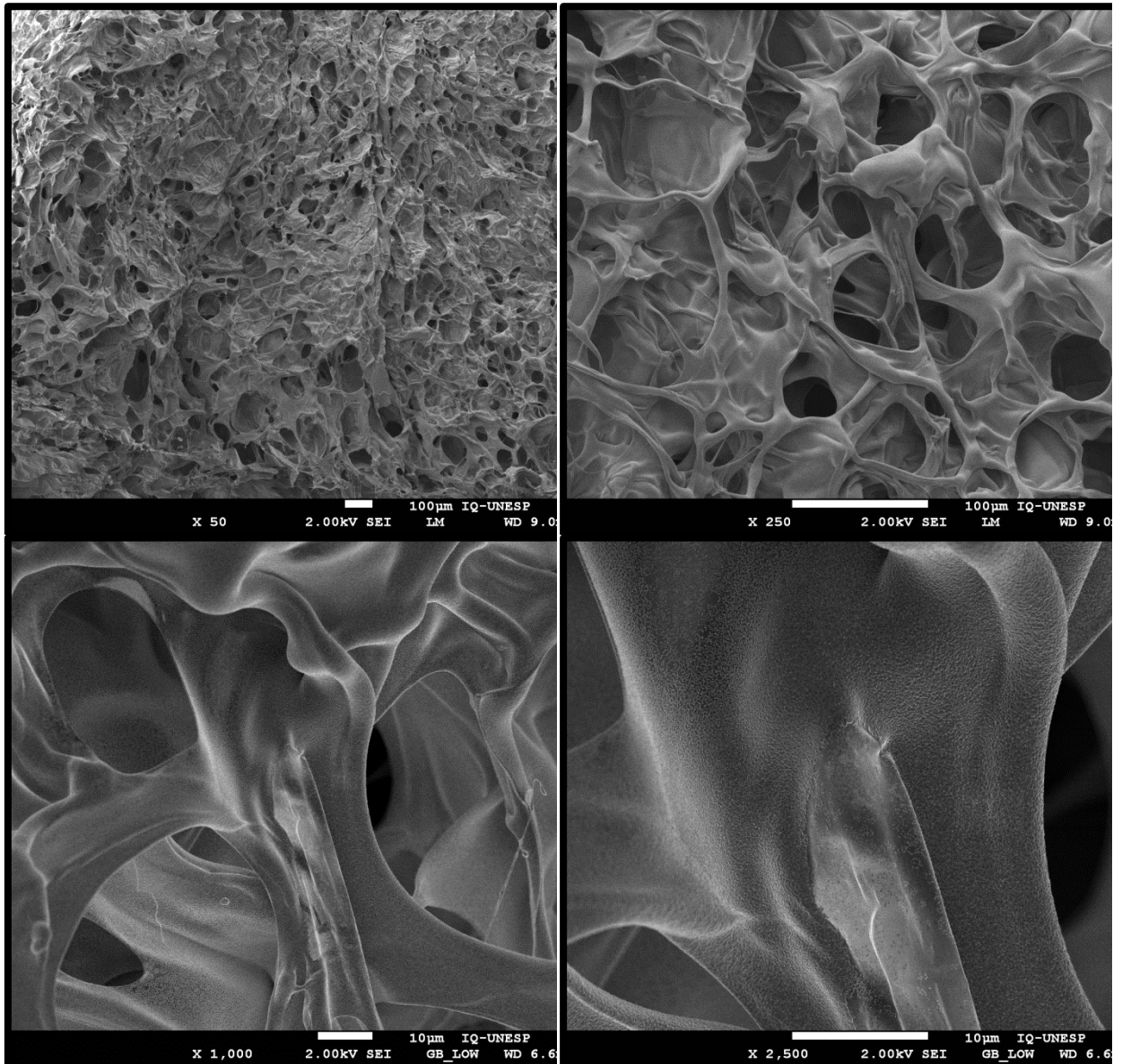
Fonte: Imagens de arquivo da autora

Figura A4 - Fotomicrografias da micromorfologia e microestrutura externa do AH D15, com 50X, 250X, 1000X e 2500X de magnificação - Araraquara 2017.



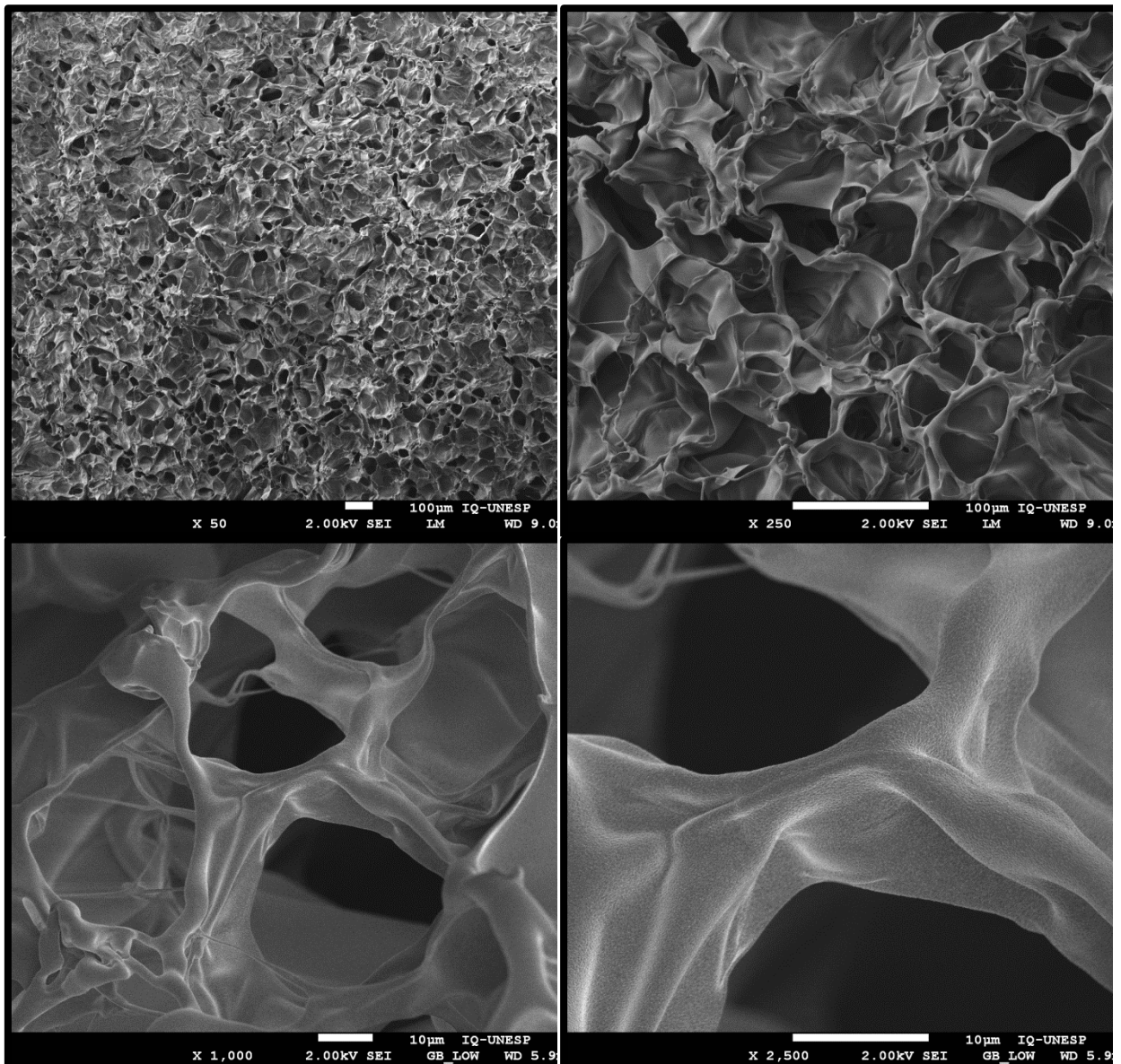
Fonte: Imagens de arquivo da autora

Figura A5 - Fotomicrografias da micromorfologia e microestrutura interna do AH RF, com 50X, 250X, 1000X e 2500X de magnificação - Araraquara 2017.



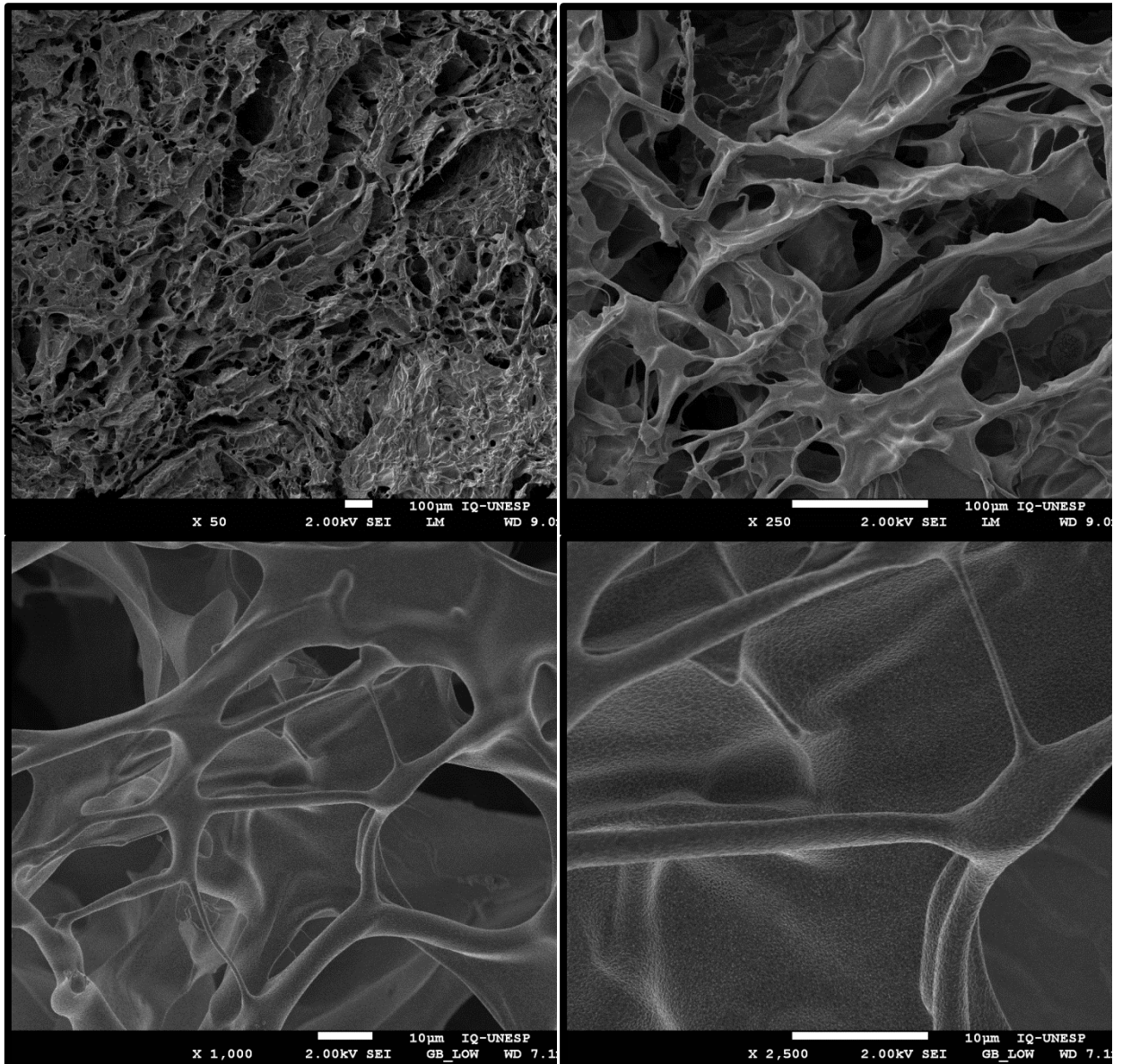
Fonte: Imagens de arquivo da autora

Figura A6 - Fotomicrografias da micromorfologia e microestrutura externa do AH RF, com 50X, 250X, 1000X e 2500X de magnificação - Araraquara 2017.



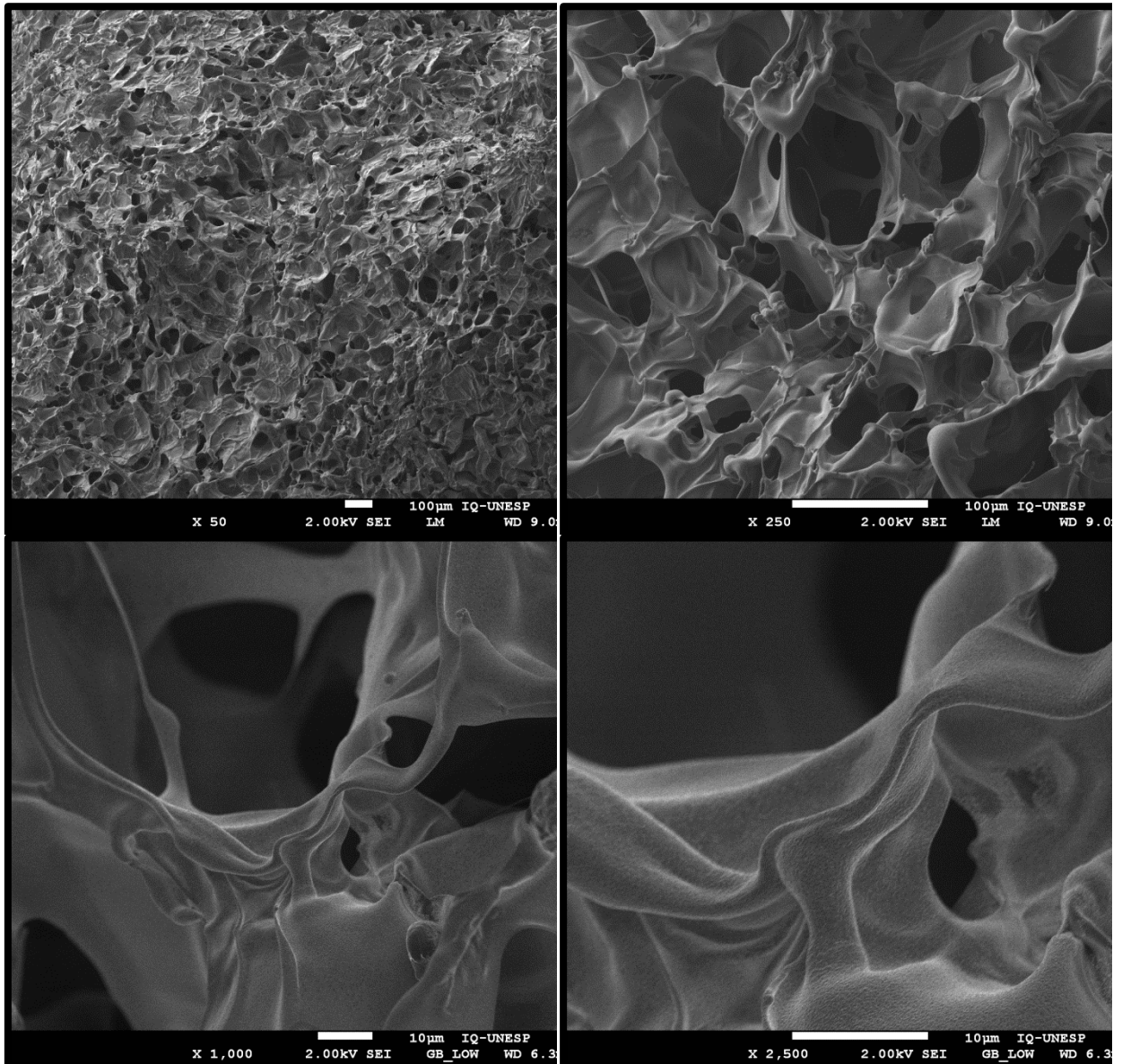
Fonte: Imagens de arquivo da autora

Figura A7 - Fotomicrografias da micromorfologia e microestrutura interna do AH RL, com 50X, 250X, 1000X e 2500X de magnificação - Araraquara - 2017.



Fonte: Imagens de arquivo da autora

Figura A8 - Fotomicrografias da micromorfologia e microestrutura externa do AH RL, com 50X, 250X, 1000X e 2500X de magnificação - Araraquara 2017.



Fonte: Imagens de arquivo da autora

APÊNDICE B - TABELA DE FREQUÊNCIAS DA RESPOSTA TECIDUAL

Figura B1 - Frequência da classificação atribuída ao grau de inflamação e a presença de fibroblasto/angiogênese observada nos cortes histológicos do plano submuscular do dorso de ratos em resposta aos implantes de 0,1 mg de D12, D15, RF e RL - Araraquara 2017.

PRESENÇA DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS																					
Nível de inflamação	D12					D15					RF					RL					Total
	T7	T14	T30	T60	T120	T7	T14	T30	T60	T120	T7	T14	T30	T60	T120	T7	T14	T30	T60	T120	
leve	0	0	2	4	5	0	1	4	5	4	1	3	4	5	4	1	3	5	5	5	61
moderada	2	2	3	1	0	3	4	1	0	1	3	2	1	0	1	4	2	0	0	0	30
severa	3	3	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100

PRESENÇA DE FIBROBLASTO/ANGIOGÊNESE																					
Quantidade de Fibroblasto	D12					D15					RF					RL					Total
	T7	T14	T30	T60	T120	T7	T14	T30	T60	T120	T7	T14	T30	T60	T120	T7	T14	T30	T60	T120	
pouco	3	3	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	12
moderado	2	2	3	1	2	2	3	4	2	1	5	5	4	2	1	5	4	1	1	0	50
muito	0	0	2	4	3	0	0	1	3	4	0	0	1	3	4	0	0	4	4	5	38
Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100

Fonte: Elaborado pelos autores

Figura B2 - Frequência da classificação atribuída a presença e organização de fibra colágena e ao nível de degradação do AH observada nos cortes histológicos do plano submuscular do dorso de ratos em resposta aos implantes de 0,1 mg de D12, D15, RF e RL - Araraquara 2017.

PRESENÇA E ORGANIZAÇÃO DE FIBRA COLAGENA																						
Organização do colágeno	D12					D15					RF					RL					Total	
	T7	T14	T30	T60	T120	T7	T14	T30	T60	T120	T7	T14	T30	T60	T120	T7	T14	T30	T60	T120		
ausente	4	2	0	0	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1	1	0	0	0	14	
desorganizado	1	3	5	1	0	2	5	3	5	1	5	3	3	2	1	4	4	2	1	0	51	
organizado	0	0	0	4	5	0	0	2	0	4	0	0	2	2	4	0	0	3	4	5	35	
Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100	

NIVEL DEGRADAÇÃO DOS AHs																						
Degradação da matriz do biopolímero	D12					D15					RF					RI					Total	
	T7	T14	T30	T60	T120	T7	T14	T30	T60	T120	T7	T14	T30	T60	T120	T7	T14	T30	T60	T120		
baixa	2	0	0	0	0	5	3	0	0	0	4	4	0	0	0	5	5	3	1	1	33	
média	3	5	4	1	1	0	2	5	4	5	1	1	4	4	1	0	0	2	4	4	51	
alta	0	0	1	4	4	0	0	0	1	0	0	0	1	1	4	0	0	0	0	0	16	
Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100	

Fonte: Elaborado pelos autores

ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E EFEITO DA TAXA DE RETICULAÇÃO SOBRE A BIOCOMPATIBILIDADE E BIODEGRADAÇÃO DE ÁCIDOS HIALURÔNICOS EXPERIMENTAIS DE USO EM ODONTOLOGIA"**, protocolo nº 22/2015, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Osmir Batista de Oliveira Junior** – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 08/12/2015.

Vigência do Projeto	Fevereiro/2017
Espécie/linhagem	Rato – Holtzmann
Nº de animais	25
Peso/Idade	350g – 90 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara

p/ Elisa Maria Ap. Qiro
Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 20 de setembro de 2019
(Direitos de publicação reservados ao autor)
Araraquara, 20 de setembro de 2017.
Morgana Regina Mendonça de Oliveira

|