

DÉBORA ZANUTTO VELASQUES

**EFEITO DA HIDROXIAPATITA DE CORAL
IMPLANTADA NA DERME DE RATOS.**

**CAMPO GRANDE
2006**

DÉBORA ZANUTTO VELASQUES

**EFEITO DA HIDROXIAPATITA DE CORAL
IMPLANTADA NA DERME DE RATOS.**

Dissertação apresentada ao Programa Multiinstitucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – convênio Rede Centro-Oeste – UNB, UFG, UFMS para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Profº Dr. Celso Massaschi Inouye

Pós-graduanda: Débora Zanutto Velasques

**CAMPO GRANDE
2006**

DEDICATÓRIA

À todos os **PACIENTES** que precisam, por diversos motivos, da correção de imperfeições da pele para uma melhora no aspecto físico e até mesmo no aspecto emocional.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À **DEUS**, por me dar força e ânimo para seguir.

À minha mãe, **MAINEIDE**, por seu eterno incentivo pelo crescimento intelectual de seus filhos.

Ao meu pai, **LAERTE**, pelo apoio e exemplo de perseverança.

Aos meus irmãos, **MURILO e RODOLFO**, que sempre estão ao meu lado.

Ao meu marido, **ALESSIO**, pelo apoio e respeito às minhas atividades profissionais.

AGRADECIMENTOS

Ao **PROGRAMA MULTIINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – CONVÊNIO REDE CENTRO-OESTE – UNB, UFG, UFMS**, que possibilitou tornar esse sonho, realidade.

À **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL (UFMS)**, pelo apoio oficial e efetivo na realização desse trabalho.

Ao **Profº Dr. RICARDO DUTRA AYDOS**, coordenador deste programa, professor da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelos ensinamentos e pela organização do curso.

Ao **Profº Dr. CELSO MASSASCHI INOUE**, professor do programa, professor da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, meu orientador, pelos ensinamentos transmitidos sempre de forma gentil e dedicada.

À **Profª Drª. ANDRÉIA CONCEIÇÃO MILAN BROCHADO ANTONIOLLI SILVA**, professora da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo grande incentivo e auxílio na realização do presente trabalho.

À **Profª Drª. DOROTY MESQUITA DOURADO**, professora da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, pelo grande auxílio na realização da análise das lâminas que fazem parte deste trabalho.

Ao **Profº Dr. PAULO DE TARSO CAMILO DE CARVALHO**, professor da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, pelo auxílio na digitalização e análise das imagens quantificadas pelo programa informatizado de análise de imagens.

Ao **Profº Dr. ALBERT SCHIAVETO DE SOUZA**, professor da Universidade Católica Dom Bosco, pela consultoria e auxílio na realização da análise estatística dos dados.

Aos funcionários do biotério da UFMS, especialmente ao senhor **FRANCISCO BEZERRA DA SILVA** pelo tratamento e pelo auxílio na realização dos procedimentos com os animais de experimentação.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 1 - | Organograma ilustrando a distribuição dos grupos | 6 |
| Figura 2 - | Fotografia ilustrando a área do dorso onde foi realizado tricotomia para confecção do implante | 8 |
| Figura 3 - | Fotografia ilustrando local do implante (seta) de um animal do grupo I | 8 |
| Figura 4 - | Fotografia ilustrando a demarcação da área onde foi injetado o material de implante, num animal do grupo II | 9 |
| Figura 5 - | Fotomicrografias das lâminas coradas por Picrosirius Red e a quantificação da área ocupada por colágeno (áreas em azul). A: grupo SF; B: grupo AH; C: grupo HA | 10 |
| Figura 6 - | Fotomicrografias das lâminas coradas por HE, observadas à microscopia óptica, aumento 40 x, de animais dos grupos SF, AH e HA, aos 30 dias de avaliação. Notar que nos grupos AH e HA houve aumento da espessura da derme reticular (setas) quando comparados com o SF | 12 |
| Figura 7 - | Fotomicrografias de lâminas coradas por HE, observadas à microscopia óptica, aumento 40 x, de animais dos grupos SF, AH e HA, aos 90 dias de avaliação. Notar que o grupo HA manteve o aumento de espessura da derme reticular (setas), quando comparado com os grupos AH e SF | 13 |
| Figura 8 - | Fotomicrografias de lâminas coradas pelo Picrosirius Red, observadas à microscopia óptica, aumento de 100 x, de animais dos grupos SF, AH e HA, com período de 30 dias de avaliação | 16 |
| Figura 9 - | Fotomicrografias de lâminas coradas pelo Picrosirius Red, observadas à microscopia óptica, aumento de 100 x, de animais dos grupos SF, AH e HA, com período de 90 dias de avaliação. Foi feita a análise quantitativa das fibras colágenas por meio de programa informatizado de análise de imagens | 17 |
| Figura 10 - | Fotomicrografias de lâminas coradas pelo Picrosirius Red, observadas à microscopia de polarização, aumento de 100 x, de animais dos grupos SF, AH e HA, com período de 30 dias de avaliação. Notar disposição das fibras colágenas coradas em vermelho e verde | 21 |
| Figura 11 - | Fotomicrografias de lâminas coradas pelo Picrosirius Red, observadas à | |

microscopia de polarização, aumento de 100 x, de animais dos grupos SF, AH e HA, com período de 90 dias de avaliação. Notar disposição das fibras colágenas coradas em vermelho e verde..... 22

Figura 12 - Fotomicrografias de lâminas coradas pelo Picrosirius Red, observadas à microscopia de polarização, aumento de 40 x, de animais dos grupos SF 30 e 90 dias, AH 30 e 90 dias e HA 30 e 90 dias, mostrando a espessura da derme reticular..... 23

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|---|----|
| Tabela 1 - | Estatística descritiva da quantificação da área ocupada por colágeno, em programa informatizado de imagens. Animais dos grupos SF, AH e HA, no período de 30 dias de avaliação. Valores expressos em porcentagem | 14 |
| Tabela 2 - | Estatística descritiva da quantificação da área ocupada por colágeno, em programa informatizado de imagens. Animais dos grupos SF, AH e HA, no período de 90 dias de avaliação. Valores expressos em porcentagem | 14 |
| Tabela 3 - | Estatística descritiva da quantificação da área ocupada por colágeno, nos grupos SF, AH e HA, comparando os períodos de 30 e 90 dias. Valores expressos em porcentagem | 15 |
| Tabela 4 - | Estatística descritiva da quantificação da área ocupada por colágeno tipo I, em programa informatizado de imagens. Animais dos grupos SF, AH e HA, no período de 30 dias de avaliação. Valores expressos em porcentagem | 18 |
| Tabela 5 - | Estatística descritiva da quantificação da área ocupada por colágeno tipo III, em programa informatizado de imagens. Animais dos grupos SF, AH e HA, no período de 30 dias de avaliação. Valores expressos em porcentagem | 18 |
| Tabela 6 - | Estatística descritiva da quantificação da área ocupada por colágeno tipo I, em programa informatizado de imagens. Animais dos grupos SF, AH e HA, no período de 90 dias de avaliação. Valores expressos em porcentagem | 18 |
| Tabela 7 - | Estatística descritiva da quantificação da área ocupada por colágeno tipo III, em programa informatizado de imagens. Animais dos grupos SF, AH e HA, no período de 90 dias de avaliação. Valores expressos em porcentagem | 19 |
| Tabela 8 - | Estatística descritiva da quantificação da área ocupada por colágeno do tipo I, nos grupos SF, AH e HA, comparando os períodos de 30 e 90 dias. Valores expressos em porcentagem | 19 |
| Tabela 9 - | Estatística descritiva da quantificação da área ocupada por colágeno do tipo III, nos grupos SF, AH e HA, comparando os períodos de 30 e 90 dias. Valores expressos em porcentagem | 19 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|-------------|---|----|
| Gráfico 1 - | Comparação das áreas ocupadas por colágeno, nos grupos SF, AH e HA, aos 30 e 90 dias de avaliação | 15 |
| Gráfico 2 - | Comparação da quantidade de colágeno do tipo I e III, nos grupos SF, AH e HA, aos 30 e 90 dias de avaliação | 20 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µm: micrômetros

AH: ácido hialurônico

C: controle

cm: centímetros

g: gramas

HA: hidroxiapatita de coral

HE: hematoxilina-eosina

Kg: Kilograma

mg: miligrama

ml: mililitros

mm: milímetros

SF: soro fisiológico

UFG: Universidade Federal de Goiás

UFMS: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

UnB: Universidade de Brasília

RESUMO

Objetivo: Estudar o efeito da Hidroxiapatita de coral (HA) implantada na derme, em ratos. **Métodos:** 48 ratos Wistar distribuídos em três grupos de 16 animais cada, onde animais do grupo I receberam implante de HA, do grupo II, ácido hialurônico (AH), do grupo III, Solução Fisiológica (SF). Cada grupo foi dividido em dois subgrupos de acordo com o período de avaliação de 30 ou 90 dias. A avaliação histológica constou da quantificação de fibras colágenas e da análise qualitativa de processo inflamatório. **Resultados:** Não houve reação inflamatória em nenhum período. Houve aumento da espessura da derme nos grupos onde se injetou AH e HA, aos 30 dias de avaliação, quando comparados com o grupo em que se injetou SF. Aos 90 dias, o grupo HA, ainda mantinha aumento da espessura da derme, quando comparado aos demais. A análise quantitativa das fibras colágenas mostrou que aos 30 dias os grupos AH e HA tinham maior quantidade de fibras colágenas que o grupo SF. Aos 90 dias, o grupo HA apresentou maior quantidade de fibras colágenas que os demais. A análise quantitativa do colágeno tipo I e III mostrou que aos 30 dias o grupo SF manteve as mesmas quantidades e que os grupos AH e HA mostraram prevalência do colágeno tipo I. Aos 90 dias, o grupo SF manteve-se igual, mas os grupos AH e HA mostraram maior quantidade de colágeno tipo III. **Conclusão:** A HA mostrou-se biocompatível e indutora de neoformação de fibras colágenas, quando implantada na derme de ratos, e mantém esse efeito por período maior que o ácido hialurônico.

ABSTRACT

Objective: To study the effect of the calcium hydroxylapatite implanted in derm, rats.

Methods: 48 Wistar rats distributed in three groups of 16 animals each, where the animals of group I had received implantation from calcium hydroxylapatite (HA), of group II, acid hialuronic (AH) and of group III, Physiological Solution (SF). Each group was redistributed in two sub-groups in accordance with the period of evaluation of 30 or 90 days. The histologic evaluation consisted of the collagens staple fibre quantification and of it analyzes qualitative of inflammatory process. **Results:** It did not have inflammatory reaction in period of evaluation. It had increase of the thickness of derm reticular in the groups where if it injected AH and HA, to the 30 days of evaluation, when compared with the group where if it injected SF. To the 90 days, the group where if it injected HA, still kept increase of the thickness of derm reticular, when compared with excessively. The quantitative analysis of collagens staple fibres showed that to the 30 days groups AH and HA had greater amount of collagens staple fibres that group SF. To the 90 days, group HA presented greater amount of collagens staple fibres that excessively. The quantitative analysis of collagens staple fibres of type I and III showed that to the 30 days of comment group SF kept a balance between the amounts and in such a way the group AH how much group HA had presented a prevalence of the collagen of type I. To the 90 days, group SF kept standard the same, but in such a way the group AH how much group HA had shown a bigger amount of collagen of type III. **Conclusion:** The HA revealed biocompatible and inductive of neoformation of collagens staple fibres, when implanted in derm of rats, and keeps this effect for bigger period that the acid hialuronic.

INDICE

| | |
|--------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. OBJETIVOS..... | 5 |
| 3. MÉTODOS..... | 6 |
| 4. RESULTADOS..... | 12 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 24 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 32 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 33 |
| 8. NORMAS ADOTADAS..... | 37 |

1. INTRODUÇÃO

O desgaste natural do organismo, causado pelo passar dos anos, sem a interferência de agentes externos, provoca o envelhecimento de todos os órgãos, inclusive a pele. O envelhecimento cutâneo pode ser causado por fatores intrínsecos (cronológico) e extrínsecos (por exemplo, provocado pelo sol)¹.

Os fatores intrínsecos decorrem da diminuição das secreções endócrinas e estreitamento das arteríolas cutâneas que afetam o metabolismo do colágeno, do tecido elástico dos vasos, do tecido adiposo e dos músculos. A derme reduz a espessura e perde fibras elásticas e colágenas, com conseqüente enrugamento, muito embora grandes sulcos possam decorrer de alterações da hipoderme e da massa muscular. O sistema imunológico se desgasta e um maior número de processo infecciosos, inflamatórios e carcinogênicos podem acontecer. Em outras palavras, estas marcas de maturidade são inevitáveis^{2,3}.

Os fatores extrínsecos ou fotoenvelhecimento são resultados dos danos cumulativos causados pela radiação ultravioleta A e B na pele. Estas radiações produzem alterações nas células, agredindo-as, e em certos casos, provocando mutações que danificam o seu DNA, de modo que conduzem ao aparecimento de manchas e até de neoplasias^{1,4}.

A pele fotoenvelhecida tem como características além da perda da elasticidade e do colágeno, manchas escuras ou claras, rugas finas e profundas e alteração da superfície da pele, que pode se apresentar mais áspera e ressecada, podendo provocar até crostas, que eventualmente evoluem para o câncer de pele^{2,5}.

O conceito de beleza atualmente em vigor e procurado pela grande maioria das pessoas é o da pele jovem, sem manchas ou rugas. A restauração cutânea pode ser alcançada com uma variedade de produtos e procedimentos médicos. Eles incluem cirurgias corretivas, cirurgias para colocação de implante sólido, resurfacing da pele, peelings, formulações para uso tópico e injeção de material de preenchimento, entre outros⁶.

Preenchimento cutâneo é uma denominação genérica aplicada a técnicas que visam corrigir pequenas imperfeições da pele, tais como sulcos, rugas e cicatrizes. Consiste no implante de substâncias compatíveis com a pele sob a área a ser tratada elevando-a e diminuindo sua profundidade, com conseqüente melhora do aspecto. Além do efeito mecânico desses biomateriais, os mesmos devem estimular a produção de colágeno. O preenchimento cutâneo consiste no implante de biomateriais na derme, destinados a fortalecer, repor ou substituir componentes naturais das camadas da pele.

Existem disponível no mercado muitos biomateriais utilizados para preenchimento. Eles podem ter duração temporária (absorvíveis) ou permanente (não absorvíveis), e podem ter origem animal ou sintética. Cada produto apresenta suas vantagens e desvantagens.

Os produtos temporários têm duração previamente definida, pois são naturalmente reabsorvidos pelo corpo, enquanto que os permanentes mantêm-se definitivamente na derme³. Os materiais permanentes têm uma desvantagem em sua utilização, já que dificilmente podem ser retirados, pois com o passar do tempo o produto acaba tornando-se parte do tecido².

A escolha correta do produto preenchedor e a precaução quanto à técnica deve ser rigidamente obedecida, pois qualquer erro pode causar problemas estéticos de difícil correção. Deve-se esclarecer ao paciente que, apesar do produto ser permanente, os resultados obtidos inicialmente não serão eternos, já que o processo de envelhecimento é contínuo. Devido a isso é ideal que os pacientes mais jovens utilizem os preenchedores temporários³.

Geralmente as substâncias que oferecem menor reação imunológica são as de origem sintética ou artificial, que não induzem a respostas do tipo antígeno-anticorpo. Além disso, podem ser produzidos em grande escala. As substâncias de origem animal, podem desenvolver reações alérgicas, e por isso necessitam de testes prévios. Devido a isto e devido à rápida reabsorção sua utilização tem sido menor e alguns produtos até caíram no desuso².

São muitas as substâncias que podem ser utilizadas para substituir ou preencher as imperfeições da pele. Dentre os mais utilizados, o dimetilpolisiloxane (DMPS) é um material de preenchimento permanente e necessita técnica apurada. Como não é reabsorvido pelo organismo, seu resultado é duradouro, sendo mais utilizado para correção de sulcos profundos. O polimetilmetacrilato (PMMA) também é um preenchedor definitivo. É uma substância sintética adicionada a um veículo inerte e reabsorvível ou adicionada a um veículo que contém pequena quantidade de colágeno de origem animal em sua fórmula. Neste último caso necessita de teste prévio. Pode provocar eritema prolongado e granulomas, além de eventual formação de quelóide. Como são materiais permanentes, não podem ser removidos caso ocorram problemas^{7,8}. Estudos mostram que implantes de polimetilmetacrilato produzem uma resposta imune nos seres humanos e são suscetíveis a fagocitose e eliminação⁹.

O colágeno é obtido a partir de animais (boi e porco) e um teste dermatológico prévio é necessário para prevenção de uma possível reação alérgica ao produto. A hipersensibilidade é o efeito colateral mais encontrado¹⁰. É indicado para rugas de expressão e cicatrizes. Precisa ser reaplicado a cada seis meses, pois sofre reabsorção^{7,8}. O auto-enxerto de gordura consiste em retirar gordura de uma área do corpo onde esteja em excesso, por meio de lipoaspiração, e injetá-la sob uma ruga ou sulco. Esta é uma técnica mais trabalhosa que exige

anestesia e cuidados para a obtenção do material gorduroso a ser injetado. Há reabsorção de grande parte da gordura injetada e complicações comuns são infecção e necrose^{7,8}.

O ácido hialurônico (AH) é uma substância natural encontrada em todo o organismo humano. Quando injetado, fortalece a estrutura da pele, hidrata e eleva a área injetada. Ele desencadeia reação tissular discreta, com escassa formação de fibrose e ausência de células gigantes nos tecidos¹¹. Isto mostra uma das suas grandes vantagens que é raríssima capacidade de provocar algum tipo de reação alérgica e, por isso, dispensa teste cutâneo prévio¹².

Pesquisas revelam que, tanto os médicos como os pacientes, avaliam os resultados do uso do ácido hialurônico como satisfatórios. É bem tolerado e efetivo no preenchimento cutâneo. Possui muitas vantagens em comparação com outros produtos¹³.

É capaz de exercer sua função de preenchimento pela manutenção de seu volume. Esse tratamento é efetivo para rugas, linhas de expressão e na correção de cicatrizes. Atualmente, é uma das substâncias mais utilizadas na dermatologia e medicina estética, mas tem como desvantagens ser um material reabsorvível com durabilidade temporária variando de seis a nove meses^{7,8} e ter alto custo.

A hidroxiapatita de coral é um fosfato de cálcio hidratado, componente majoritário da fase mineral dos ossos e dentes humanos (cerca de 95%). É produzida pela conversão química do exoesqueleto de carbonato de cálcio dos corais marinhos *Porites* e *Goniopora*. É considerada, conforme estudos, um biomaterial¹⁴.

Pesquisas realizadas com o implante de micropartículas de hidroxiapatita em tecido subcutâneo de ratos demonstram que a resposta tecidual apresentava uma reação inflamatória rica iniciada por fibroblastos e células inflamatórias. Não foi observada resposta imunológica exacerbada, demonstrando boa tolerância da pele a esse material^{15,16,17}.

A hidroxiapatita de coral já é usada há anos como material de enxerto ósseo. Este material provê uma osteogênese precoce, é indutor da neoformação óssea e forma um arcabouço para reparação tecidual guiada. Sua propriedade de biocompatibilidade e de osteointegração coloca este material entre os mais importantes substitutos do osso humano^{14,18,19,20,21,22}.

Poucos foram os estudos realizados com a hidroxiapatita em tratamentos estéticos. Atualmente tem sido usada de forma empírica. Mesmo assim, evidenciou-se que os resultados obtidos foram satisfatórios, corrigindo sulcos, preenchendo cicatrizes e amenizando as rugas. A vantagem é que apesar de ser um produto reabsorvível e temporário apresenta uma duração de aproximadamente 36 meses^{6,8}.

Considerando a biocompatibilidade demonstrada pelos atuais estudos sobre a hidroxiapatita, sua capacidade de induzir a formação de tecido conjuntivo e colágeno, e a possibilidade de conseguir resultados favoráveis na estética analisou-se como pertinente a realização do estudo, que pretende analisar o efeito deste biomaterial quando implantado na derme de ratos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito da hidroxiapatita de coral na derme.

2.2 Objetivo Específico

Estudo morfológico e morfométrico do efeito da hidroxiapatita de coral, veiculada em gel de metilcelulose, implantada na derme em ratos.

3. MÉTODO

3.1 AMOSTRA

A amostra foi composta por 48 ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, albinos, machos, adultos, com peso que variou entre 250 e 300gramas (g), provenientes do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Esses animais passaram por um período de adaptação de sete dias no laboratório de Cirurgia Experimental da UFMS, quando foram submetidos ao experimento. Os animais foram alojados em gaiolas individuais e receberam ração própria para a espécie com água à vontade. Permaneceram à luz natural e temperatura sempre estável mantida por ar condicionado. Foram distribuídos em três grupos, conforme ilustra a figura 1.

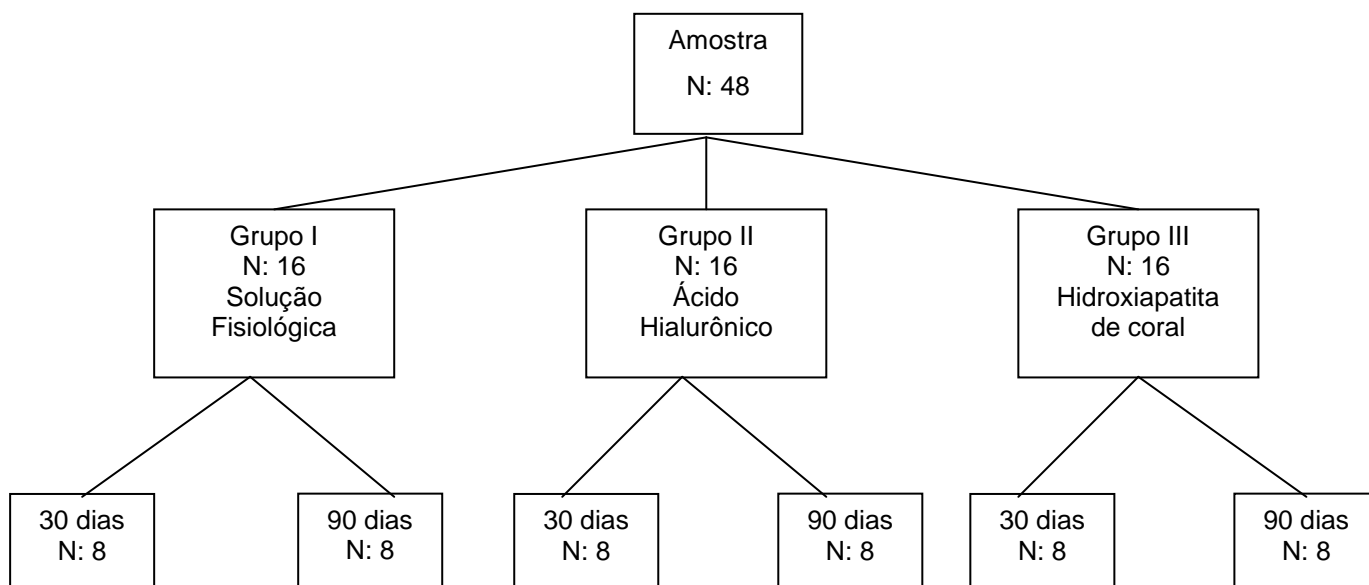


Figura 1: Organograma ilustrando a distribuição dos grupos.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de 16 animais cada, diferenciados pelo tipo de tratamento. Cada grupo foi redistribuído em 2 subgrupos conforme os períodos de avaliação. As avaliações foram feitas com 30 e 90 dias após o implante (figura 1).

Cada grupo recebeu os seguintes tratamentos:

Grupo I (HA) – os 16 animais do grupo receberam implante de solução fisiológica.

Grupo II (AH) – os 16 animais do grupo receberam de implante de ácido hialurônico.

Grupo III (SF) – os 16 animais do grupo receberam implante de hidroxiapatita de coral.

3.2 PROCEDIMENTOS

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo comitê de Ética e Pesquisa em animais de experimentação da UFMS e pela Comissão de Pesquisa da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFMS. Os procedimentos foram realizados no laboratório da Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Clínica Cirúrgica da UFMS.

Os procedimentos descritos a seguir foram comuns a todos os grupos.

Os animais foram pesados, identificados e anestesiados com quetamina, na dose de 25 miligramas por quilograma de peso (mg.kg^{-1}) e xilazida, na dose de 25 miligramas por quilograma de peso (mg.kg^{-1}), via intramuscular. Foi realizada tricotomia da região dorsal (figura 2) e anti-sepsia da área com álcool iodado 2% seguida de colocação de campo cirúrgico esterilizado.

A partir daí, os procedimentos variam conforme o grupo:

GI – Implante de Solução Fisiológica, intradérmico, 0,25 ml, com a técnica de retroinjeção, com seringa de insulina e agulha 26G1/2 de 13 mm.

GII – Implante de Ácido Hialurônico 20mg/ml^{**} (Inderma®), intradérmico, 0,25 ml, com a técnica de retroinjeção, com seringa de insulina e agulha 26G1/2 de 13 mm.

GIII – Implante de Hidroxiapatita de Coral 16%^{*} veiculada em gel de metilcelulose (hidroxiapatita da Magistral®), intradérmico, 0,25 mililitros (ml), com a técnica de retroinjeção, com seringa de insulina e agulha 26G1/2 de 13 mm (figura 3).

A área do implante foi demarcada distal e proximalmente com pontos de tatuagem (figura 4).

^{*}Magistral – Farmácia de manipulação – São Paulo-SP.

^{**}Inderma – Farmácia de manipulação – São Paulo-SP.

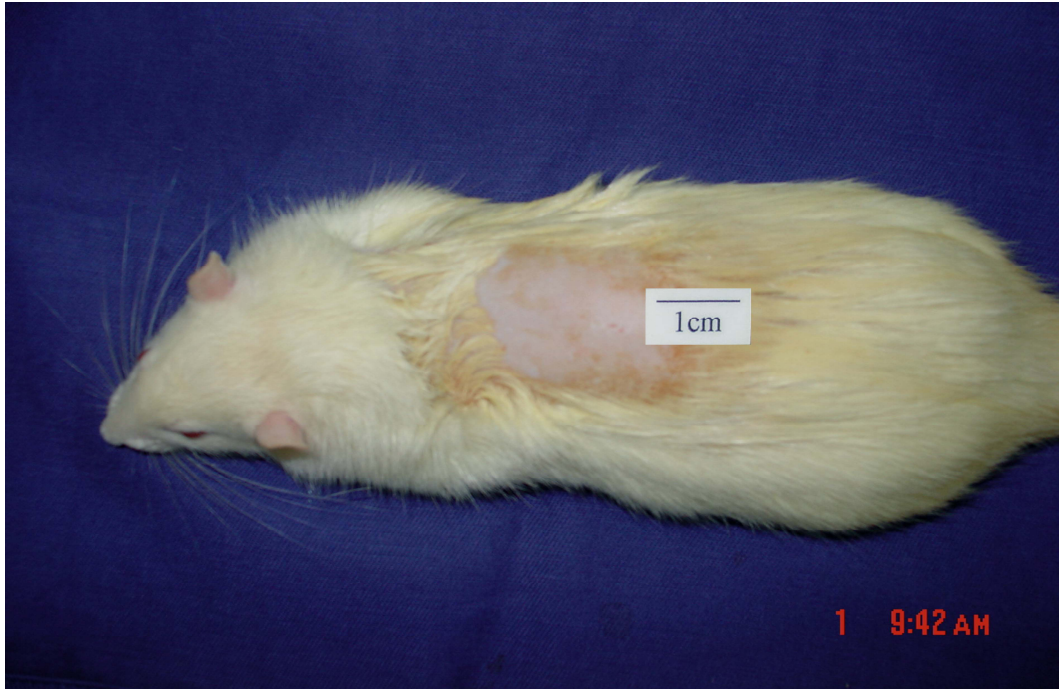


Figura 2: Fotografia ilustrando a área do dorso onde foi realizado tricotomia para confecção do implante.



Figura 3: Fotografia ilustrando local do implante (seta) de um animal do grupo I.



Figura 4: Fotografia ilustrando a demarcação da área onde foi injetado o material de implante, em um animal do grupo II.

No final de cada período de avaliação, os animais foram submetidos à eutanásia colocando o animal em inalação de éter sob campânula e um fragmento da pele onde foi implantado o biomaterial foi retirado com punch de 2 mm e fixado em formol 10%. As peças foram encaminhadas para o serviço de Anatomia Patológica da Universidade Estadual de São Paulo – UNESP – Campus Botucatu para processamento histológico. Para cada fragmento foram confeccionadas duas lâminas, sendo uma corada pela técnica de hematoxilina e eosina (HE), para avaliar qualitativamente o infiltrado inflamatório, procurando células envolvidas na fase aguda de cicatrização, tais como neutrófilos, macrófagos, linfócitos e outra pela técnica de Picrosirius Red, coloração específica para análise do colágeno, o qual se apresenta como estruturas fibrilares de cor avermelhada e fortemente birrefringentes, quando observados em um microscópio óptico comum.

Inicialmente foi realizada a quantificação das fibras colágenas por programa informatizado de análise de imagens* (figura 5), baseado em princípios de espectrofotometria²³, no Serviço de Anatomia Patológica da UFMS.

Para tal, foram captados** campos microscópicos de 422 μ m x 322 μ m, aumento de 100 vezes, com padronização de características de microscópio óptico*** lente**** 20/0.45, condensador em abertura máxima distando 6,5 cm da lâmina, e máxima intensidade da luz. Os campos digitalizados possuíam resolução de 640 pontos na horizontal e 480 pontos na vertical

e 24 bits de cores (16 milhões de cores), e em cada um deles utilizou-se o mesmo intervalo de cor para a área a ser quantificada. O intervalo de cor foi ajustado para isolamento nas áreas representativas de colágeno na imagem.

Posteriormente, utilizando os mesmos campos digitalizados, foi realizada outra análise quantitativa do colágeno, acoplando uma fonte de luz polarizada ao microscópio, para que se pudessem identificar os tipos de colágeno. As fibras colágenas fortemente birrefringentes apresentam-se, neste método, coradas em vermelho-alaranjado e representam o colágeno tipo I e as fibras fracamente birrefringentes apresentam coloração esverdeada, representando o colágeno tipo III^{24,25,26}.

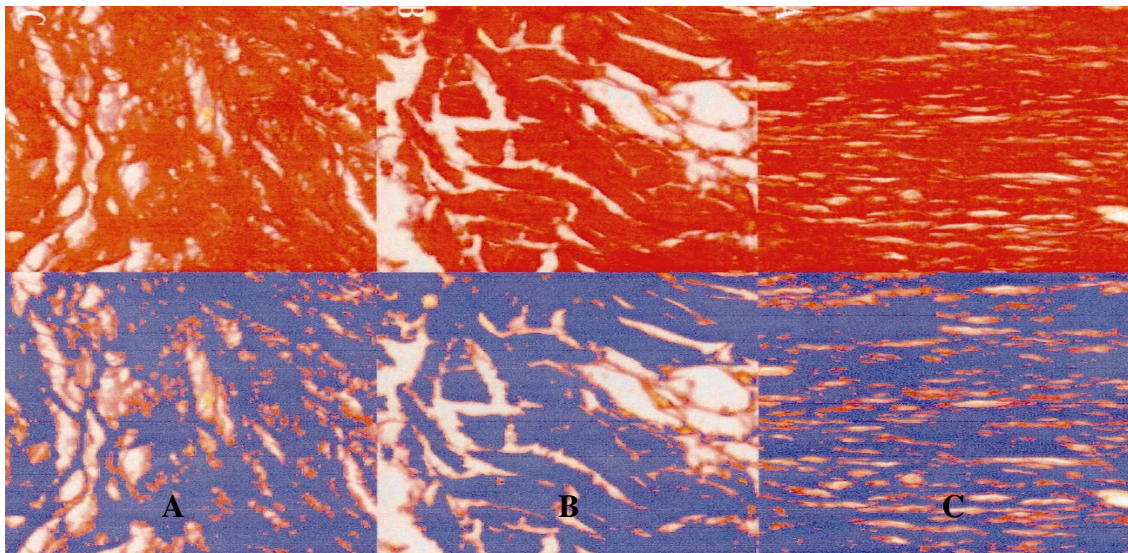


Figura 5: Fotomicrografias das lâminas coradas por Picrosirius Red e a quantificação da área ocupada por colágeno (áreas em azul). A: grupo SF; B: grupo AH; C: grupo HA.

Extraiu-se a média dos valores obtidos nos dois campos analisados em cada lâmina, considerando-se dois parâmetros: a porcentagem de área ocupada por fibras colágenas e a densidade óptica da luz refletida pelas fibras colágenas.

*ImageLab 2.3.

**Câmera JVC Model TK 8700 – Japan.

***Microscópio Leitz Carbelux – Modelo 6MBH.

****Leitz Wetzalar – 160/0.17 Plan.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos resultados da microscopia óptica foram aplicados os seguintes testes:

1. Análise de variância por postos de Kruskal-Wallis para comparar os valores das variáveis, em cada variável e cada período de avaliação separadamente.
2. Teste de Wicoxon, para comparar cada grupo e respectivos períodos de avaliação.

Para análise estatística dos resultados da microscopia de polarização foram aplicados os seguintes testes:

3. Análise de variância por postos de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para comparar os valores das variáveis, em cada variável e cada período de avaliação separadamente.
4. Teste de Mann Whitney, para comparar cada grupo e respectivos períodos de avaliação.

Fixou-se em 0,05 ou 5% ($\alpha \leq 0,05$) o nível de rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com asterisco os valores significantes.

4. RESULTADOS

Nas lâminas coradas pela Hematoxilina e Eosina não foram encontradas células inflamatórias, tais como neutrófilos, macrófagos, linfócitos no período de 30 e 90 dias. Apesar de não ser o objetivo do estudo, observou-se, subjetivamente, aumento da camada reticular da derme nos grupos AH e HA aos 30 dias e no grupo HA aos 90 dias.

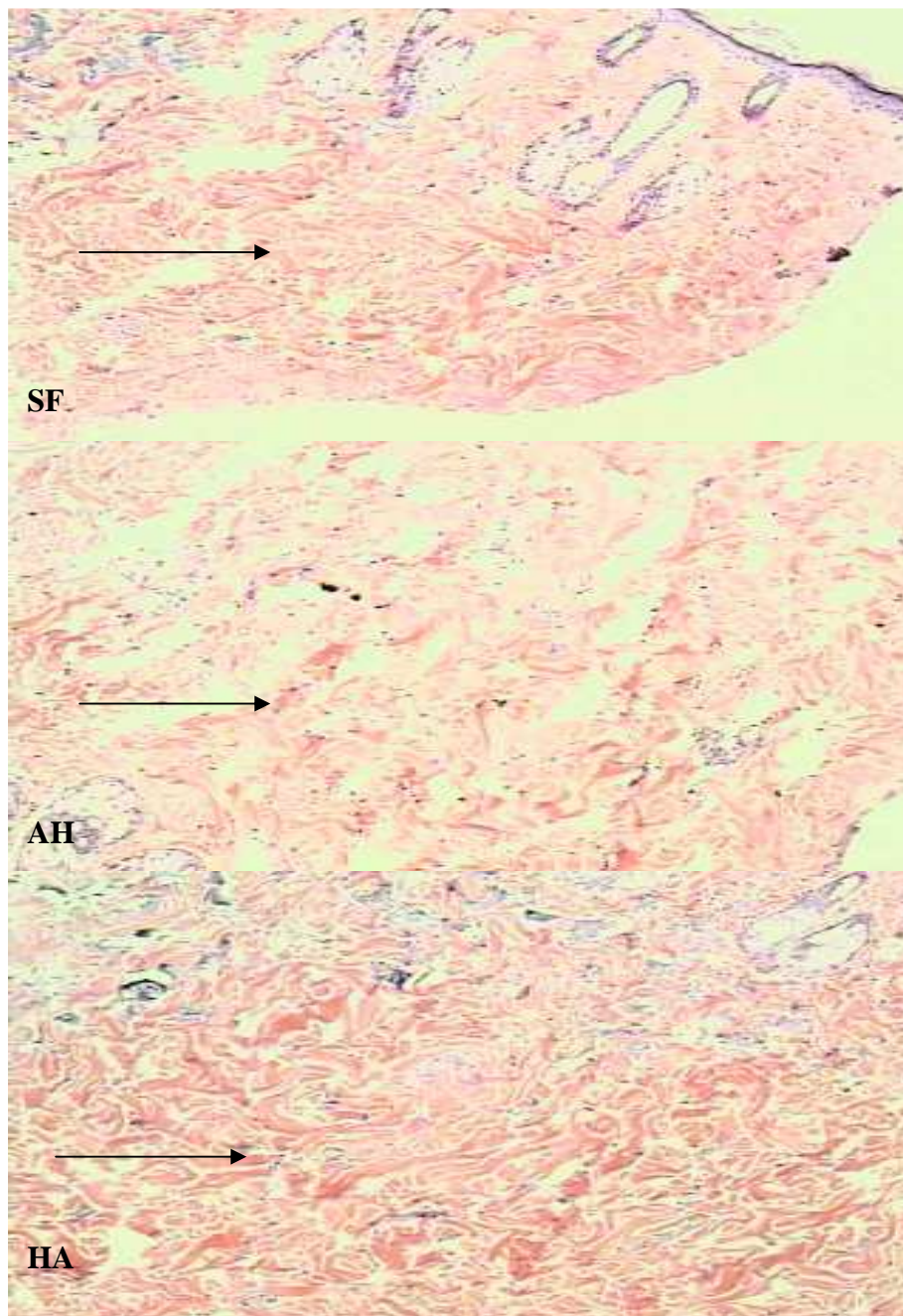


Figura 6: Fotomicrografias das lâminas coradas por HE, observadas à microscopia óptica, aumento 40 x, de animais dos grupos SF, AH e HA, aos 30 dias de avaliação. Notar que nos grupos AH e HA houve aumento da espessura da derme reticular (setas) quando comparados com o SF.

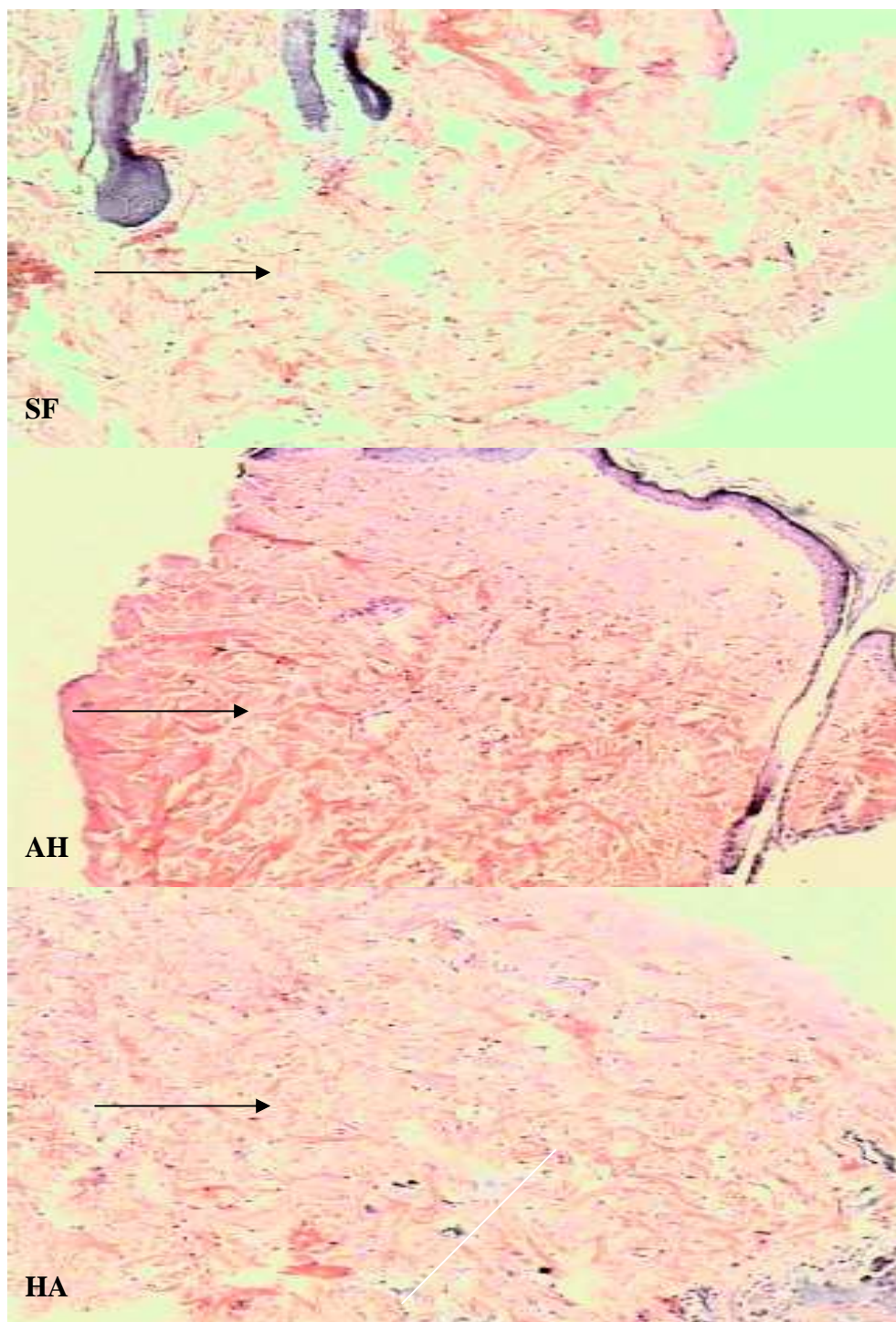


Figura 7: Fotomicrografias de lâminas coradas por HE, observadas à microscopia óptica, aumento 40x, de animais dos grupos SF, AH e HA, aos 90 dias de avaliação. Notar que o grupo HA manteve o aumento de espessura da derme reticular (setas), quando comparado com os grupos AH e SF.

Tabela 1 – Estatística descritiva da quantificação da área ocupada por colágeno, em programa informatizado de imagens. Animais dos grupos SF, AH e HA, no período de 30 dias de avaliação. Valores expressos em porcentagem.

| Grupos | Média | Desvio Padrão | Mediana | Mínimo | Máximo |
|---------------|--------------|----------------------|----------------|---------------|---------------|
| SF | 42.1 | 6.4 | 43.8 | 33.9 | 50.2 |
| AH | 63.6 | 2.6 | 64.5 | 58.2 | 66.2 |
| HÁ | 63.0 | 2.7 | 63.7 | 58.7 | 66.2 |

Análise de Variância por Postos de Kruskal-wallis

$$H_{\text{crítico}} = 15.4.0^*$$

AH e HA > SF

Tabela 2 – Estatística descritiva da quantificação da área ocupada por colágeno, em programa informatizado de imagens. Animais dos grupos SF, AH e HA, no período de 90 dias de avaliação. Valores expressos em porcentagem.

| Grupos | Média | Desvio Padrão | Mediana | Mínimo | Máximo |
|---------------|--------------|----------------------|----------------|---------------|---------------|
| SF | 42.6 | 6.7 | 45.0 | 33.8 | 50.2 |
| AH | 64.3 | 1.8 | 64.8 | 60.7 | 66.3 |
| HA | 73.5 | 3.9 | 73.6 | 68.2 | 78.8 |

Análise de Variância por Postos de Kruskal-wallis

$$H_{\text{crítico}} = 20.4^*$$

HA > AH e SF

AH = SF

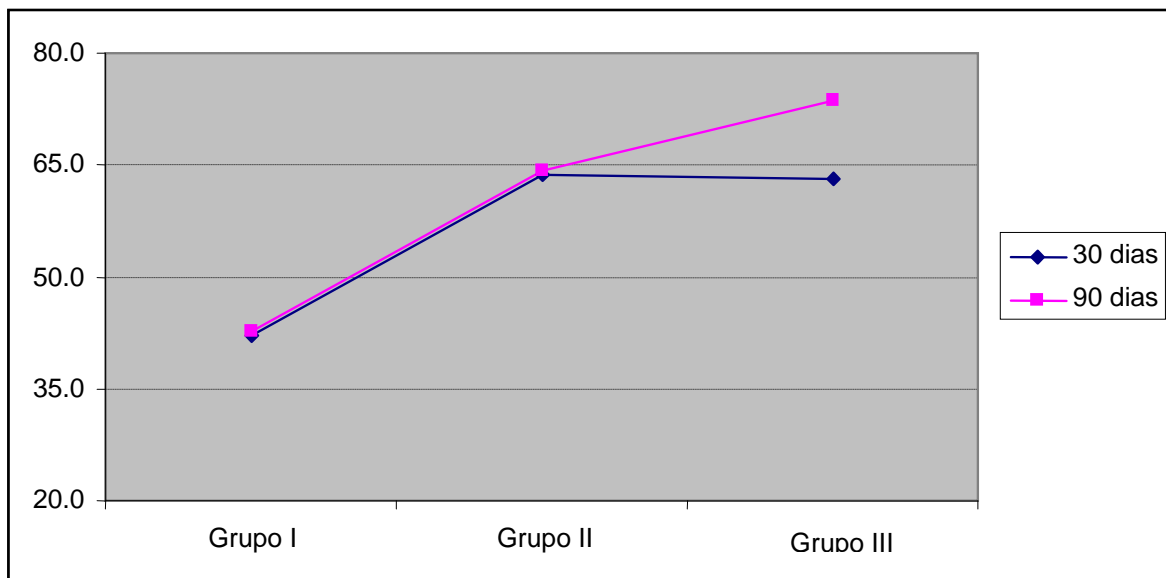
Tabela 3 – Estatística descritiva da quantificação da área ocupada por colágeno, nos grupos SF, AH e HA, comparando os períodos de 30 e 90 dias. Valores expressos em porcentagem.

| | 30 dias | 90 dias |
|-----------|----------------|----------------|
| SF | 42.1 | 42.6 |
| AH | 63.6 | 64.3 |
| HA | 63.0 | 73.6 |

Teste de Wicoxon

SF p=0.092 AH p=0.57 HA p=0.01*

Gráfico 1: Comparação das áreas ocupadas por colágeno, nos grupos SF, AH e HA, aos 30 e 90 dias de avaliação.



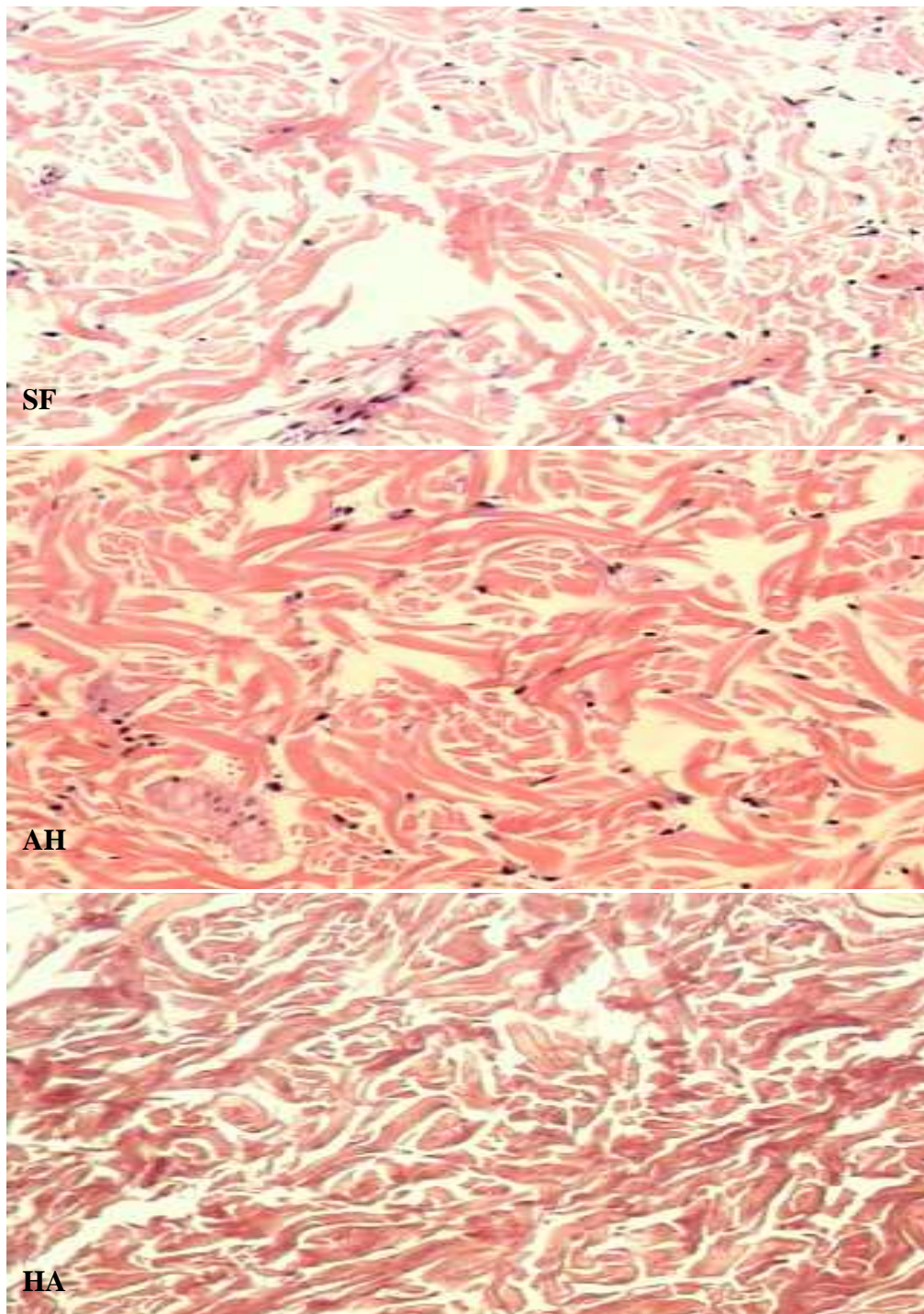


Figura 8: Fotomicrografias de lâminas coradas pelo Picrosirius Red, observadas à microscopia óptica, aumento de 100 x, de animais dos grupos SF, AH e HA, com período de 30 dias de avaliação.

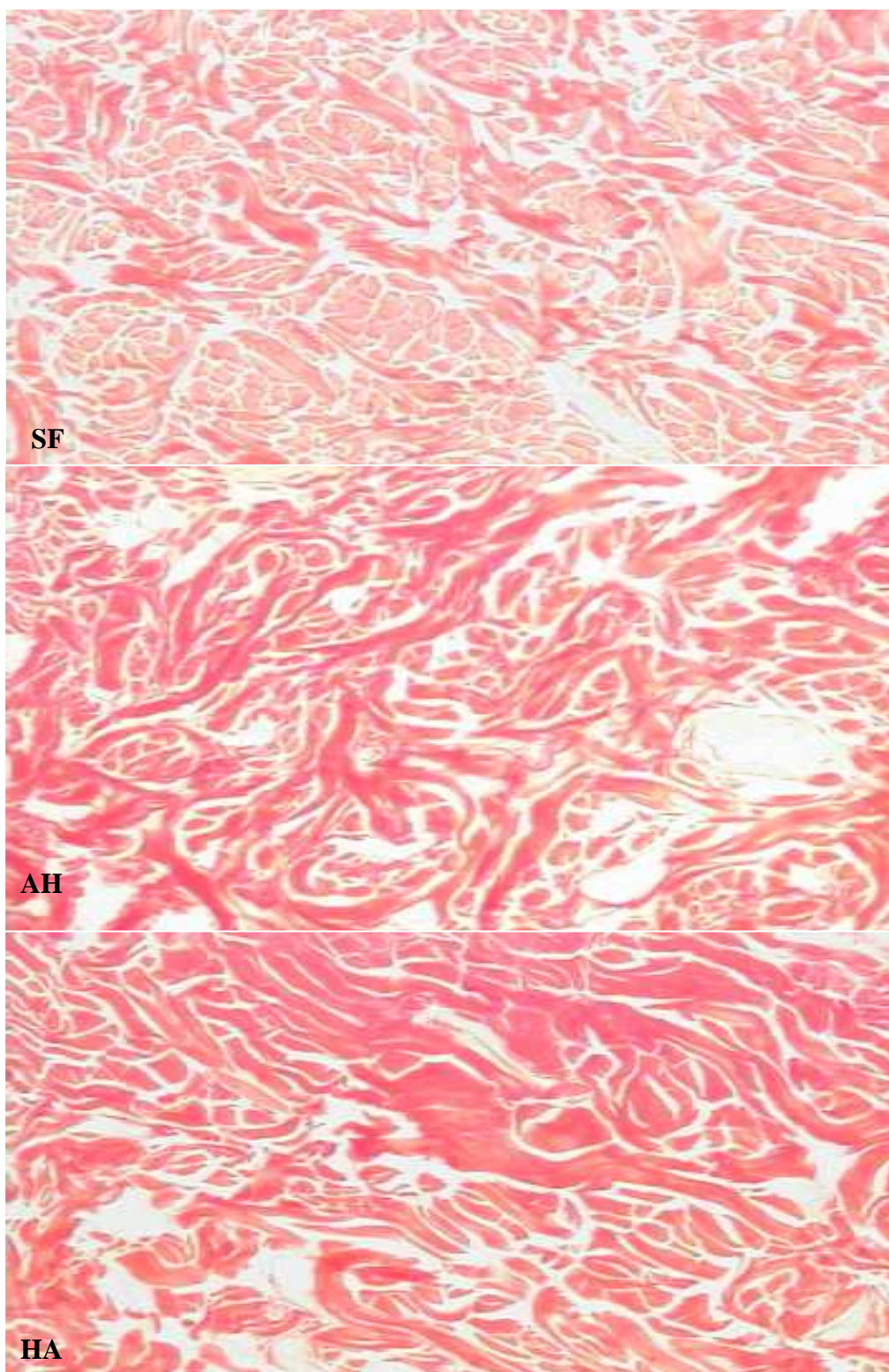


Figura 9: Fotomicrografias de lâminas coradas pelo Picrosirius Red, observadas à microscopia óptica, aumento de 100 x, de animais dos grupos SF, AH e HA, com período de 90 dias de avaliação. Foi feita a análise quantitativa das fibras colágenas por meio de programa informatizado de análise de imagens.

Tabela 4 – Estatística descritiva da quantificação da área ocupada por colágeno tipo I, em programa informatizado de imagens. Animais dos grupos SF, AH e HA, no período de 30 dias de avaliação. Valores expressos em porcentagem.

| | Média | Desvio Padrão | Mediana |
|-----------|--------------|----------------------|----------------|
| SF | 50.4 | 4.4 | 50 |
| AH | 72.7 | 3.5 | 72.8 |
| HA | 55.1 | 20.4 | 57 |

Análise de Variância por Postos de Kruskal-wallis

p = 0,006

AH > SF

Tabela 5 – Estatística descritiva da quantificação da área ocupada por colágeno tipo III, em programa informatizado de imagens. Animais dos grupos SF, AH e HA, no período de 30 dias de avaliação. Valores expressos em porcentagem.

| | Média | Desvio Padrão | Mediana |
|-----------|--------------|----------------------|----------------|
| SF | 49.4 | 4.4 | 49.9 |
| AH | 27.3 | 3.5 | 27.2 |
| HA | 44.8 | 20.4 | 43 |

Análise de Variância por Postos de Kruskal-wallis

p = 0,006

SF > AH

Tabela 6 – Estatística descritiva da quantificação da área ocupada por colágeno tipo I, em programa informatizado de imagens. Animais dos grupos SF, AH e HA, no período de 90 dias de avaliação. Valores expressos em porcentagem.

| | Média | Desvio Padrão | Mediana |
|-----------|--------------|----------------------|----------------|
| SF | 55.6 | 8.8 | 51.6 |
| AH | 55.1 | 26.7 | 59.1 |
| HA | 45.3 | 15 | 46.2 |

Análise de Variância por Postos de Kruskal-wallis

p = 0,74

Tabela 7 – Estatística descritiva da quantificação da área ocupada por colágeno tipo III, em programa informatizado de imagens. Animais dos grupos SF, AH e HA, no período de 90 dias de avaliação. Valores expressos em porcentagem.

| | Média | Desvio Padrão | Mediana |
|-----------|--------------|----------------------|----------------|
| SF | 48.3 | 8.8 | 48.4 |
| AH | 44.8 | 26.7 | 40.8 |
| HA | 54.6 | 15 | 53.7 |

Análise de Variância por Postos de Kruskal-wallis

p = 0,74

Tabela 8 – Estatística descritiva da quantificação da área ocupada por colágeno do tipo I, nos grupos SF, AH e HA, comparando os períodos de 30 e 90 dias. Valores expressos em porcentagem.

| | 30 dias | 90 dias |
|-----------|----------------|----------------|
| SF | 50.3 | 55.6 |
| AH | 72.7 | 55.1 |
| HA | 55.1 | 45.3 |

Teste de Mann Whitney

SF p=0.57 AH p=0.57 HA p=0.23

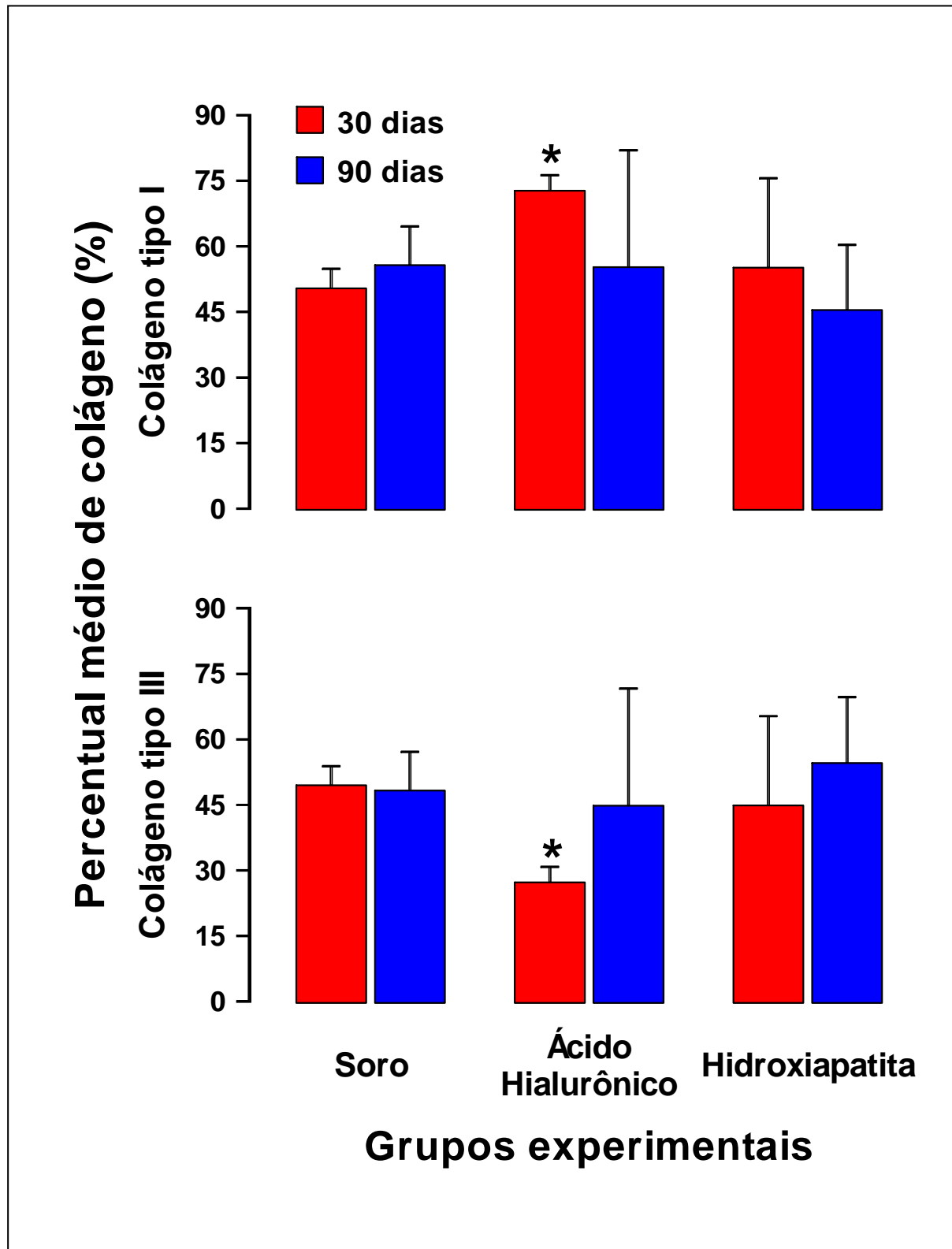
Tabela 9 – Estatística descritiva da quantificação da área ocupada por colágeno do tipo III, nos grupos SF, AH e HA, comparando os períodos de 30 e 90 dias. Valores expressos em porcentagem.

| | 30 dias | 90 dias |
|-----------|----------------|----------------|
| SF | 49.4 | 48.3 |
| AH | 27.3 | 44.8 |
| HA | 44.8 | 54.6 |

Teste Mann Whitney

SF p=0.57 AH p=0.57 HA p=0.23

Gráfico 2: Comparação da quantidade de colágeno do tipo I e III, nos grupos SF, AH e HA, aos 30 e 90 dias de avaliação. * Define significância em relação ao grupo soro.



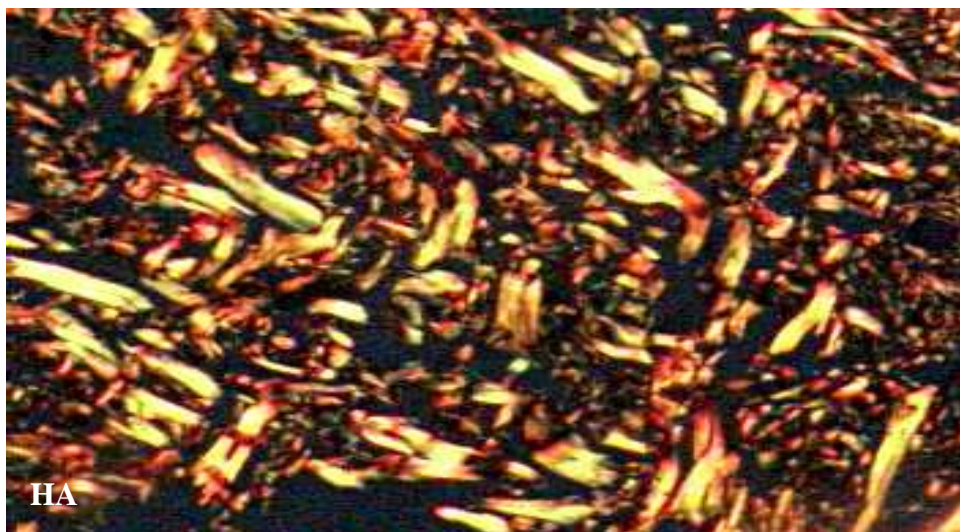
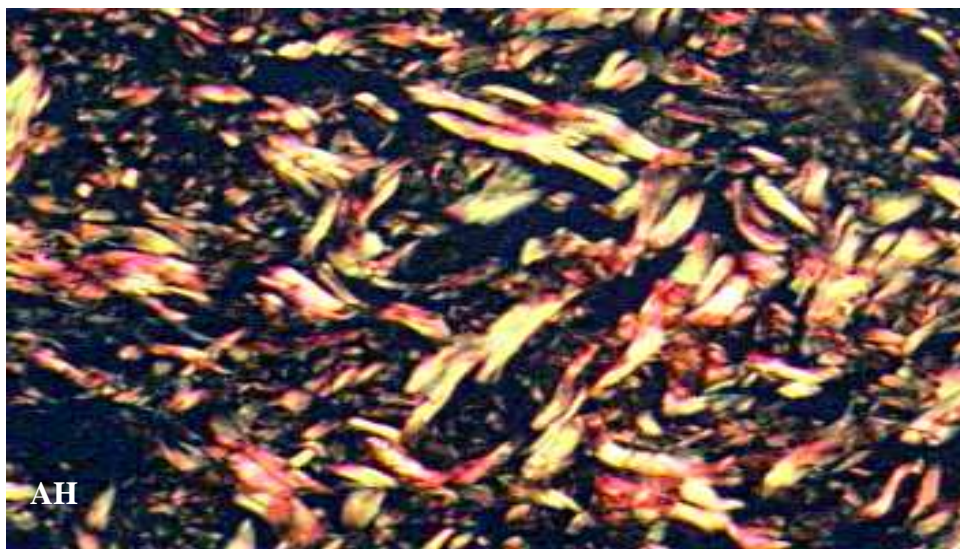
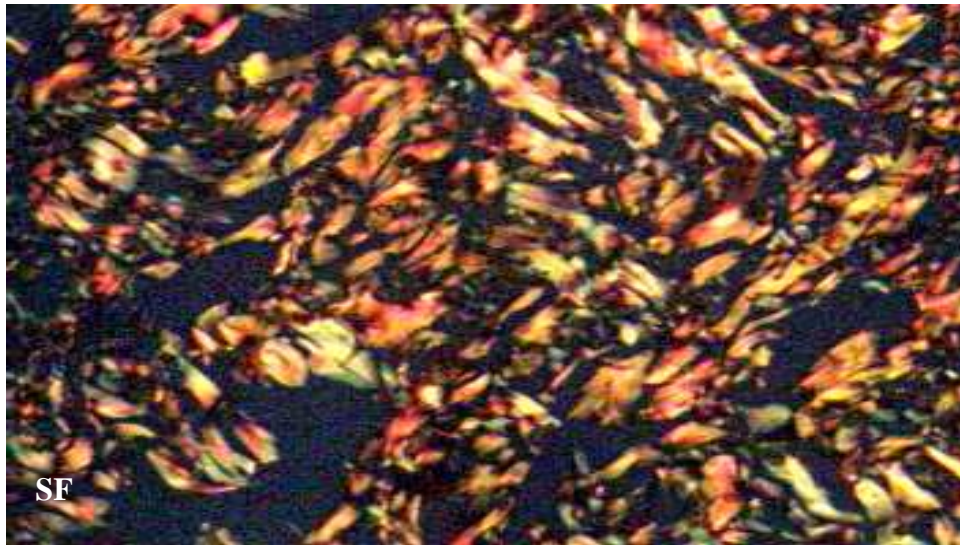


Figura 10: Fotomicrografias de lâminas coradas pelo Picrosirius Red, observadas à microscopia de polarização, aumento de 100 x, de animais dos grupos SF, AH e HA, com período de 30 dias de avaliação. Notar disposição das fibras colágenas coradas em vermelho (colágeno tipo I) e verde (colágeno tipo III).

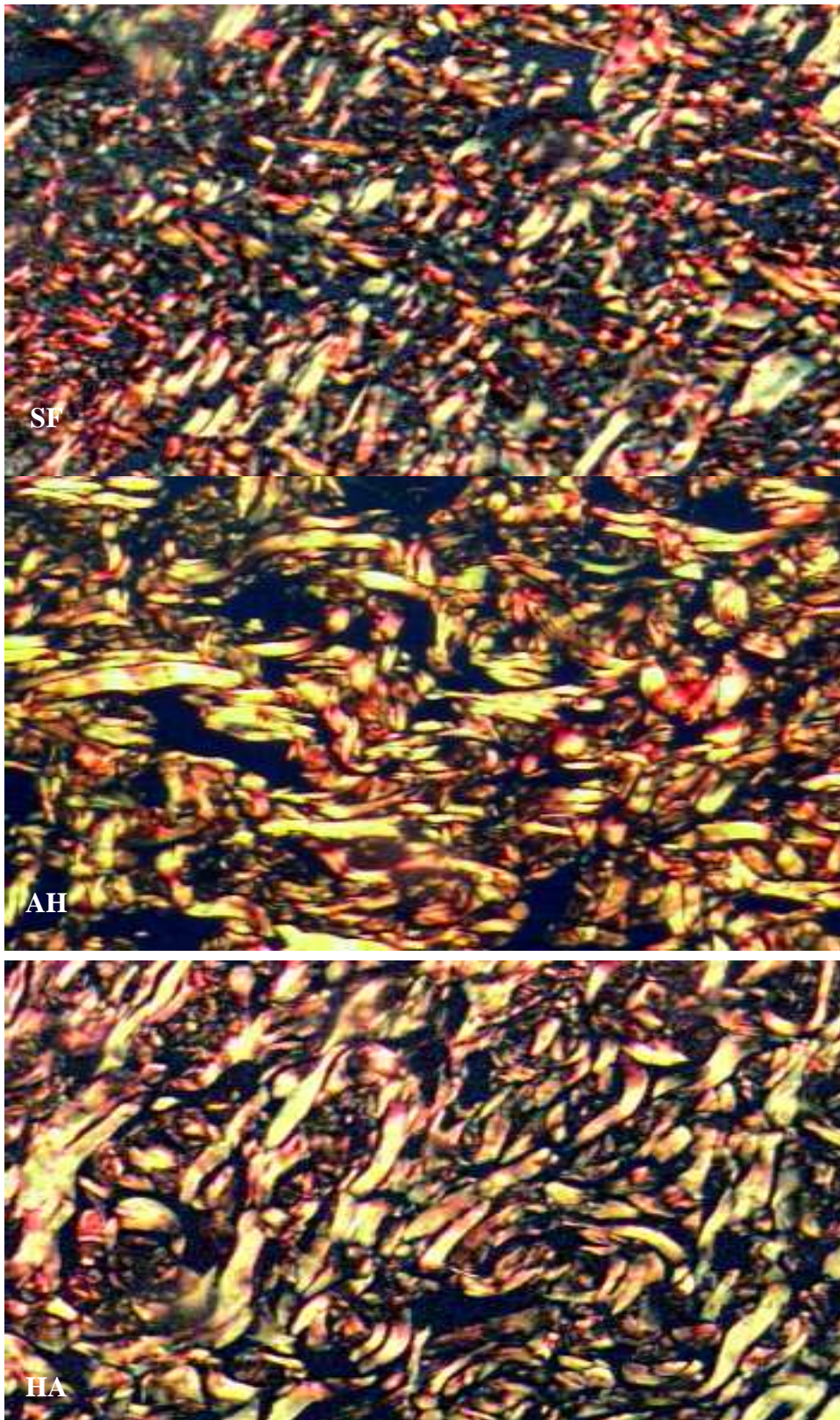


Figura 11: Fotomicrografias de lâminas coradas pelo Picrosirius Red, observadas à microscopia de polarização, aumento de 100 x, de animais dos grupos SF, AH e HA, com período de 90 dias de avaliação. Notar disposição das fibras colágenas coradas em vermelho (colágeno tipo I) e verde (colágeno tipo III).

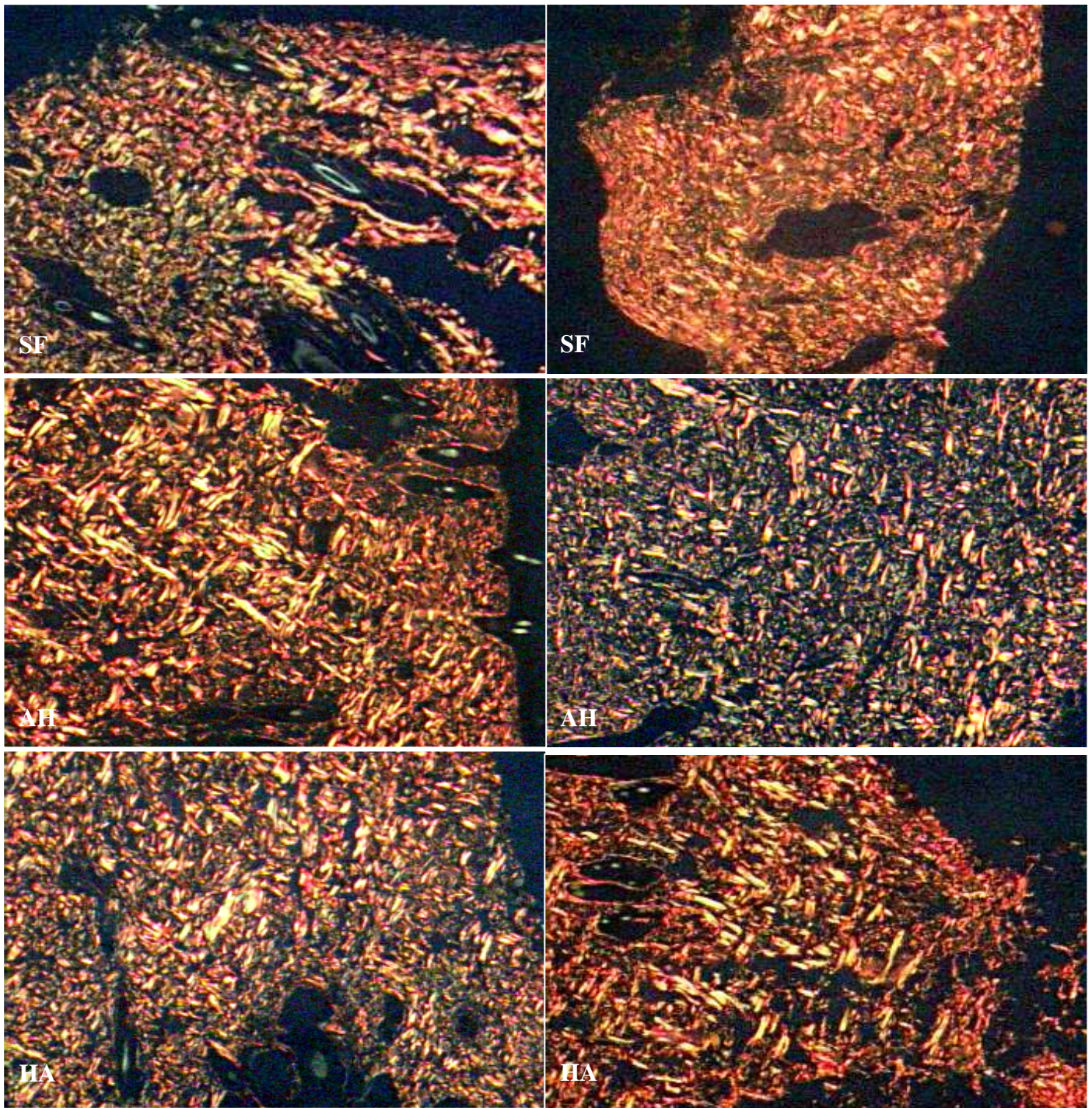


Figura 12: Fotomicrografias de lâminas coradas pelo Picrosirius Red, observadas à microscopia de polarização, aumento de 40x, de animais dos grupos SF 30 e 90 dias, AH 30 e 90 dias e HA 30 e 90 dias, mostrando a espessura da derme reticular.

5. DISCUSSÃO

Envelhecer é um processo fisiológico pertinente à qualquer ser vivo. Ossos, gordura, musculatura, todos os tecidos sofrem perdas. O envelhecimento cutâneo, além do desgaste natural do organismo, é muitas vezes agravado por fatores externos, o principal deles é a ação dos raios ultravioletas, que gera seu fotoenvelhecimento. Este causa danos celulares, no que diz respeito a sua função e morfologia²⁷.

Na epiderme verifica-se o adelgaçamento da mesma, além da diminuição de melanócitos e das células de Langherans, com conseqüente comprometimento da sua imunidade²⁷.

No que diz respeito à derme, o número de fibroblastos diminui e há diminuição das fibras elásticas. O colágeno fica mais espesso e mais resistente às collagenases. Diminui sua irrigação e com isso o número de células também diminui inclusive as responsáveis pela sensibilidade. A diminuição da vascularização torna a pele mais pálida, menos nutrida e mais indefesa. A tela subcutânea também diminui em algumas regiões, principalmente na face^{27,28}.

Todos esses fatores dão um aspecto envelhecido na pele, com perda da luminosidade, sensação tátil de rugosidade, flacidez, aparecimento de manchas, tumorações e teleangectasias². Mas dentre todos os sinais de envelhecimento, os que mais chamam atenção e incomodam os pacientes, são as rugas, os sulcos e as pregas.

Embora o envelhecimento seja inevitável, deve-se levar em consideração o fato que nas últimas décadas a expectativa de vida com qualidade aumentou muito, e as pessoas desejam que o corpo acompanhe a mente ativa. São indivíduos que já entraram no processo de envelhecimento, mas continuam altamente produtivos e dinâmicos, inclusive com vida social ativa.

Com a intenção de amenizar os sinais do envelhecimento, inúmeros procedimentos podem ser realizados. As técnicas de adição, entre elas o implante de biomateriais injetáveis, são tratamento de eleição para sulcos, rugas, depressões e cicatrizes²⁹.

Há disponível no mercado biomateriais que podem ser utilizados para esse fim. Eles podem ser autólogos ou heterólogos, e estes podem ser naturais, sintéticos ou mistos. O material ideal é aquele que é biocompatível com o tecido humano, inerte, durável, fácil de aplicar e não requer correções³⁰.

Atualmente o conceito de biomaterial envolve não só a propriedade de biocompatibilidade, mas também a de biofuncionabilidade. Biocompatibilidade é a aceitação

do biomaterial pelo organismo, quando então desenvolve respostas teciduais adequadas no sistema hospedeiro. Para isso ele não necessariamente tem de ser absolutamente inerte ou inócuo como se acreditava anteriormente. Já a biofuncionabilidade é a habilidade do material desempenhar a função desejada, dadas as suas propriedades mecânicas, químicas, ópticas, elétricas, etc.³¹

Existem atualmente, muitos biomateriais permanentes, não absorvíveis pelo organismo. Um bom exemplo são os grânulos de polimetilmetacrilato, que podem ser veiculados em colágeno (artecoll[®]), e nesse caso demonstra a possibilidade reação alérgica, ou em gel de metilcelulose (PMMA[®]), que oferece a vantagem de não desencadear reação de hipersensibilidade.

Esses produtos são biocompatíveis e indutores da neocolagênese. São materiais permanentes; entretanto, a ação da gravidade e o processo de envelhecimento continuam agindo sobre as estruturas dérmicas, e com o passar de alguns anos, os sulcos e rugas voltam a aparecer, e há a necessidade de preenchê-los novamente. Muitas vezes a sobreposição de produtos de preenchimento sobre um local onde já foi preenchido anteriormente, eleva o tecido de uma forma inestética conferindo um aspecto não natural à face.

O ideal então, para algumas situações, seria a utilização de um produto absorvível, acompanhando o processo natural do envelhecimento. Desta forma, quando houvesse necessidade de novo preenchimento, o produto já teria sido absorvido e aquele espaço vazio poderia ser preenchido novamente.

Um dos produtos absorvíveis mais utilizados, desde 1970, é o ácido hialurônico. É composto por glucosamina e ácido glucorônico e obtido por processo biotecnológico²⁷ que assegura suas características de pureza, viscosidade e peso molecular. Sua viscosidade assegura a coesão das células conjuntivas da pele.

É importante lembrar que o ácido hialurônico (AH) é uma substância natural encontrada em todo o organismo humano. É um componente extracelular importante da pele².

Como preenchedor é um produto biocompatível, reabsorvível e não desenvolve alergias¹³. Estudos demonstram que o ácido hialurônico apresenta baixo número de reações adversas, entre elas, edema e eritema locais^{29,32,33}. Entretanto, é um material absorvível e mantém o seu efeito por seis a nove meses¹³, quando se faz necessário nova aplicação.

Um estudo que utilizou o ácido hialurônico para o preenchimento cutâneo avaliou sua eficácia e segurança para correção estética. Um total de cinquenta e sete pacientes foi tratado com injeção intradérmica do produto e após 1, 3, 6, 9, e 12 meses avaliaram, os pacientes e

médicos, subjetivamente a melhora estética local. Em três meses houve melhora de 96,4% e 100%, respectivamente, mostrando que o produto produz bons resultados³⁴.

Outro estudo comparou os resultados do ácido hialurônico e do colágeno bovino no preenchimento de pele. Ao todo, sessenta e oito pacientes foram tratados com os dois produtos em lados contralaterais do sulco nasolabial. A avaliação do nível de enrugamento foi feita pelos próprios pacientes e pelo investigador por seis meses e indicaram que o ácido hialurônico foi mais eficaz que o colágeno bovino³⁵.

Um estudo interessante avaliou a incidência de reações adversas e a segurança com o uso do ácido hialurônico para preencher a pele de 1997 a 2001, na Europa. De 12.344 seringas vendidas foram avaliadas 4.320 e em apenas 34 casos a hipersensibilidade foi relatada. Isso demonstra que o risco de ocorrer a hipersensibilidade é de 0,8% dos casos. Não foi encontrada infecção bacteriana e nem reações sistêmicas. Pode-se concluir então que o ácido hialurônico é muito útil e seguro³⁶.

Estudos histológicos demonstram grande biocompatibilidade e tolerância do AH pela pele, entretanto não foi encontrada na literatura a verificação de sua implicação na neocolagênese¹³.

O ácido hialurônico é um produto com bons resultados, conforme observado nos estudos acima, mas estes resultados duram em média de 6 a 9 meses, quando se encontrará praticamente todo reabsorvido. Além disso, é um produto de alto custo. Busca-se, então, um produto que proporcione os mesmos resultados do ácido hialurônico, mas com uma durabilidade mais prolongada.

A hidroxiapatita é um fosfato de cálcio hidratado, componente majoritário da fase mineral dos ossos e dentes humanos (cerca de 30-70%). A fórmula química da Hidroxiapatita é representada por $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. É produzida pela conversão química do exoesqueleto de carbonato de cálcio de corais marinhos *Porites* e *Geniopora*^{14,30}.

A hidroxiapatita de coral (HA) é um biomaterial utilizado há muitos anos como material de enxerto ósseo. Provê uma osteogênese precoce, é indutor de neoformação óssea e forma um arcabouço para a reparação tecidual guiada. Favorece o crescimento ósseo para os locais em que ela é implantada, estabelecendo ligações de natureza química entre a hidroxiapatita e o tecido ósseo (bioativo), permitindo a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas. Suas propriedades de biocompatibilidade e osteointegração colocam este material como um dos mais importantes substitutos do osso humano^{14,18,19,20,21,22,30}.

No caso dos enxertos ósseos, é utilizado na sua forma sólida. Para ser utilizado como material de implante injetável, microesferas de hidroxiapatita de cálcio são veiculadas em gel de polissacarídeos (polímeros naturais), que é inerte e não desencadeia reação de hipersensibilidade.

Embora a hidroxiapatita de coral tenha sido vastamente estudada no tecido ósseo, recentemente alguns estudos vêm abordando como seriam seus resultados quando implantada no tecido subcutâneo.

Pesquisas mostram que a resposta tecidual as micropartículas de hidroxiapatita, quando implantadas em tecido subcutâneo de ratos, foi uma inflamação crônica granulomatosa com células inflamatórias envolvendo as partículas. Não foi observada resposta imunológica exacerbada, o que indica que não houve rejeição do material¹⁵.

Alguns estudos demonstram que o implante de HA no tecido conjuntivo subcutâneo produz uma reação inflamatória rica em fibroblastos, e que após 60 dias tornou-se uma espessa faixa de tecido conjuntivo com fibras colágenas¹⁶.

Segundo alguns autores, que estudaram o efeito da hidroxiapatita quando infiltrada no tecido subcutâneo de porcos, houve envolvimento do material injetado por uma pseudocápsula e uma reação iniciada por fibroblastos e células inflamatórias. O material manteve seu volume e se mostrou inerte e tolerável aos animais do estudo¹⁷.

Um importante estudo avaliou pela primeira vez o comportamento da hidroxiapatita de coral na pele humana. O biomaterial foi injetado na região pós-auricular de três pacientes e foi realizada uma biopsia no local após 1 e 6 meses. Ao mesmo tempo, foi injetada no sulco nasolabial bilateral e após 6 meses as pacientes deram parecer de muito satisfeito, satisfação moderada, satisfação mínima ou insatisfeito. Todas as pacientes relataram estar muito satisfeitas. Não foi observada reação inflamatória exacerbada, ossificação, fibrose ou infecção. No estudo histológico observou-se que as partículas de hidroxiapatita no primeiro mês encontravam-se cercadas de um colágeno novo, tipo III que se mantiveram presentes na avaliação do sexto mês³⁰.

Conforme alguns autores, que avaliaram a eficácia clínica e a satisfação do paciente com o uso da hidroxiapatita de coral para o preenchimento cutâneo, noventa pacientes submetem-se a injeção intradérmica de sulcos, cicatrizes, rugas e foram avaliadas logo após o tratamento e seis meses depois quanto à dor, nódulos, eritema da pele, aparência e satisfação. Em termos de eficácia e satisfação dos pacientes após 6 meses, eram bons ou excelentes em 74% e 88%, respectivamente. Sete pacientes apresentaram nódulos, mas foram

tratados. Isso mostrou que a hidroxiapatita de coral é eficaz e bem tolerada quando usada para preencher as imperfeições da pele³⁷.

Um estudo recente avaliou a eficácia em longo prazo e a segurança do uso da hidroxiapatita de coral como preenchedor cutâneo. Um total de 609 pacientes recebeu injeções do hidroxiapatita de coral em diversas áreas da face e foram avaliados em seis, doze e vinte e quatro meses. Em cada uma das avaliações os pacientes definiam a satisfação com o tratamento baseado numa escala que ia de zero (insatisfeito) a cinco (totalmente satisfeito). Também foi perguntado se utilizariam novamente o tratamento. Do número total, 155 pacientes forneceram dados após seis meses; a média de satisfação foi de 3,94 e 89% deles utilizariam novamente a hidroxiapatita de coral. Após 12 e 24 meses, 112 pacientes foram reavaliadas e 74% faria um novo tratamento³⁸.

Este estudo avaliou a satisfação e a duração do uso do preenchedor de pele de hidroxiapatita de coral para linhas, bordos e sulcos da face. O produto foi injetado com agulha fina na área a ser tratada em 40 pacientes que tinha idade entre 25 e 60 anos. Todos foram observados por um período de 18 meses e nenhum efeito sistêmico ou resposta imunológica foi encontrada. No exame de satisfação, 87% dos pacientes avaliaram estar bom ou aceitável³⁹.

São vários os estudos clínicos que avaliam os resultados da hidroxiapatita de coral implantada no tecido subcutâneo quanto sua biocompatibilidade, biofuncionabilidade e também quanto à satisfação dos pacientes. Em sua maioria apresentam estudos subjetivos, com características tendenciosas ou de propaganda. Somente um destes estudos avaliou histologicamente os resultados da hidroxiapatita de coral quando inserida na derme, porém com uma amostra pequena.

Por essas razões, considerou-se pertinente investigar o efeito da HA na derme. Optou-se por um estudo envolvendo animais de experimentação, tendo em vista a importância do estudo histológico para analisar as variáveis em questão.

O rato foi escolhido como modelo animal pelo seu rápido crescimento, atingindo a idade adulta em cerca de 90 dias. Para homogeneidade da amostra utilizaram-se apenas ratos machos, evitando-se o ciclo estral inerente às fêmeas.

O tipo de anestesia empregada já está bem descrito e estabelecido em muitos trabalhos.

O presente trabalho constou de três grupos: o grupo experimento, onde foi implantado hidroxiapatita de coral (HA). O grupo controle, no qual foi implantado ácido hialurônico (AH) e o grupo procedimento simulado (sham), onde foi injetado soro fisiológico (SF). O

ácido hialurônico foi escolhido como controle por ser um produto amplamente utilizado, há mais de 30 anos, com efeitos bem estabelecidos^{13,27,29,32, 33, 34, 35, 36}.

Durante a implantação do biomaterial, a introdução da agulha e a colocação do produto no tecido desencadeiam uma seqüência de eventos naturais dos tecidos com a intenção de cicatrizar o local. Esse processo é dividido em três fases. Após a lesão e a partir da formação de um coágulo começa a fase inflamatória aguda. Sua duração é de aproximadamente 7 dias. Mediadores químicos provocam vasodilatação, aumentam a permeabilidade dos vasos e favorecem a quimiotaxia dos neutrófilos, que combatem os agentes invasores, dos linfócitos e dos macrófagos, que realizam a fagocitose^{40,41}.

Na próxima fase, a fase proliferativa, os fibroblastos migram para o local da ferida e são ativados para estimular a síntese de colágeno. O colágeno é responsável pela força e integridade dos tecidos. Esta fase tem a duração de 12 a 14 dias^{40,41}.

Finalizando a cicatrização, na fase de maturação ou remodelagem, o colágeno depositado se organiza e se espessa, adquirindo maior força tênsil. Essa fase é considerada a mais importante, pois a velocidade, a qualidade e a quantidade total de deposição da matriz determinam a resistência da cicatriz. O processo de remodelamento da ferida implica no equilíbrio entre a síntese e a degradação de colágeno. Esta última fase é uma fase tardia, podendo durar de meses a anos^{40,41}.

A derme normal é formada por uma maioria de colágeno tipo I (80 a 90%) e por colágeno tipo III (10 a 20%). No início da cicatrização a quantidade de colágeno III, que é um colágeno novo, aumenta e conforme passa o tempo, as fibras ficam mais firmes e organizadas. Neste momento já não deve ser considerado colágeno tipo III, assim, a proporção de colágeno I e III fica mais próxima à derme intacta. A síntese global de colágeno aumenta por pelo menos 4 a 5 semanas após um ferimento⁴¹.

Foi utilizada a coloração por Hematoxilina e Eosina (HE)⁴², para fazer uma análise qualitativa do processo inflamatório agudo. Não foram encontradas células da fase aguda da cicatrização, tais como neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, em nenhum dos grupos analisados. Esse achado é esperado, por se tratar de estudo de uma fase tardia da cicatrização, e se houvessem células inflamatórias nessa fase, estas estariam demonstrando um processo inflamatório exacerbado ou retardado.

A literatura evidencia que o AH é muito bem tolerado pela pele, com mínimo processo inflamatório. Os nossos achados vão de encontro com esses dados e apontam ainda que a HA também não desencadeou processo inflamatório exacerbado ou prolongado.

Mesmo não sendo objetivo do estudo, a observação destas mesmas lâminas sugeriu subjetivamente que, aos 30 dias, houve aumento da espessura da derme reticular nos grupos HA e AH, e aos 90 dias, apenas o grupo HA manteve essa característica. Isso levou a pensar que a HA pode apresentar características de biocompatibilidade semelhantes à do AH, entretanto com maior potencial da manutenção de indução da neocolagênese. Isso talvez se deva ao fato de que uma vez implantado na derme, a HA leva cerca 3-4 anos para ser completamente reabsorvido, e nesse período em que está presente na derme, mantém o estímulo à formação de fibras colágenas¹⁴.

Este último achado não foi considerado como resultado, pois para tal seria necessário realizar a medida da derme reticular, porém, achou-se importante comentar estas observações nesta discussão, para que em um próximo trabalho essa variável possa fazer parte da metodologia.

Para a investigação do efeito desses materiais de implante sobre a neocolagênese, utilizou-se uma coloração específica para colágeno, o Picrosirius Red^{41,43,44}. A lâmina corada pelo Picrosirius Red quando submetida à polarização do microscópio é um procedimento específico para detectar colágeno, porque esse método mostra diferentes interferências de cor e intensidades de birrefringências. Além disso, esse método é utilizado, também, para se estudar a distribuição e a orientação dos tipos de colágenos nos tecidos. Por essa técnica, pôde-se observar que as fibras colágenas mais espessas coram-se em vermelho-alaranjado, exibindo birrefringência acentuada – colágeno tipo I. As fibras colágenas mais finas são pouco birrefringentes e mostram cor esverdeada – colágeno tipo III^{24,25}.

Para a quantificação das fibras colágenas valeu-se de um programa informatizado de análise de imagens, que já está bem demonstrado e estabelecido em diversos estudos⁴⁵. Verificou-se que aos 30 dias de observação, tanto o AH quanto a HA promoveram neocolagênese em quantidade semelhante. Aos 90 dias, apenas o grupo HA mantinha o efeito de neocolagênese. Isso corrobora com os achados da literatura, que demonstram que a HA quando implantada no tecido celular subcutâneo, induz a formação de colágeno, principalmente após 60 dias.

Quando se comparou os tipos de colágeno (I e III) presentes na derme, verificou-se que aos 30 dias de observação o grupo SF manteve um equilíbrio entre as quantidades, o que demonstra uma atividade normal da pele. Tanto o grupo AH quanto o grupo HA apresentaram uma prevalência do colágeno do tipo I.

Aos 90 dias de observação o grupo SF manteve o mesmo padrão, mas tanto o grupo AH quanto o grupo HA mostraram uma maior quantidade de colágeno do tipo III, considerado imaturo, mostrando que ainda estava presente a neocolagênese no tecido.

Quando se realiza um preenchimento de pele, os resultados obtidos inicialmente são, em grande parte, em decorrência da presença física do produto (efeito mecânico). Com o tempo a presença do biomaterial induz a uma formação natural de colágeno que passa a preencher o espaço. Isso leva a pensar que o colágeno tipo III que estava presente aos 90 dias nos grupos AH e HA se deva ao efeito indutor de neocolagênese dos produtos.

Considerando que na contagem global da quantidade de colágeno o grupo HA apresentou maior número aos 90 dias, leva a pensar que este grupo induz a uma maior neocolagênese e por um tempo mais prolongado.

Certamente há necessidade de mais ensaios experimentais e clínicos para que se possam transpor esses resultados para a prática clínica diária.

Entretanto, a contribuição dessa pesquisa foi demonstrar a possibilidade do uso da HA como implante dérmico absorvível, com biocompatibilidade e biofuncionabilidade comparável à do AH e com maior durabilidade que o mesmo.

6. CONCLUSÕES

1. A hidroxiapatita de coral demonstrou ser biocompatível e biofuncional.
2. A hidroxiapatita de coral demonstrou-se indutora de neocolagênese, sendo que manteve este efeito por maior período de tempo.

7. REFERÊNCIAS

1. Gonçalves AP. Envelhecimento cutâneo: introdução. An. bras. Dermatol 1991; 66(5A): 2s, 3s.
2. Maio M. Tratado de Medicina Estética. São Paulo (SP): Ed. Roca; 2004.
3. Kede MPV, Sabatovich O. Dermatologia Estética. São Paulo(SP): Ed. Atheneu; 2004.
4. Accursio WJ, Bedin V, Oliveira AP, Souza AF. Princípios Básicos da Medicina Estética. Rio de Janeiro(RJ): Ed. Letracapital; 2002.
5. Bar N. A Ameaça das Radiações Ultravioletas. [periódico da internet]. 2000. Disponível em: <http://www.bibliomed.com.br>.
6. Facial Augmentation. [periódico da internet]. 2004. Disponível em: <http://www.bioforminc.com/International/radiesse>.
7. Odo MEY, Chichierchio AL. Práticas em Cosmiatria e Medicina Estética. Procedimentos Cirúrgicos de Pequeno Porte. 3ª ed. São Paulo(SP): Ed Tecnopress; 2002.
8. Formula. Treatment. [periódico da internet]. 2004. Disponível em: <http://www.radiancetreatment.com>.
9. McClelland M; Egbert B; Hanco V; Berg RA; DeLustro F. Evaluation of artecoll polymethylmethacrylate implant for soft-tissue augmentation: biocompatibility and chemical characterization. Plast Reconstr Surg 1997; 100(6): 1466-74.
10. Toman PD; Egbert BM; Thomas JA; DeLustro FA. Development of a novel nonantigenic dermal implant composed of human placental collagen. Plast Reconstr Surg 2004; 113(3): 1015-20.
11. Rosa SC. Estudo experimental da reação tissular frente a substâncias remodeladoras cutâneas utilizadas em cirurgia plástica estética reparadora [Tese de Doutorado]. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2001.
12. Lowe NJ; Maxwell CA; Lowe P; Duick MG; Shah K. Hyaluronic acid skin fillers: adverse reactions and skin testing. J Am Acad Dermatol 2001; 45(6): 930-3.
13. Duranti F; Salti G; Bovani B; Calandra M; Rosati ML. Injectable hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation. A clinical and histological study. Dermatol Surg 1998; 24(12): 1317-25.
14. Figueiredo AS. Estudo morfológico comparativo entre implantes de osso bovino desvitalizado, hidroxiapatita porosa de coral, poliuretana de mamona e enxerto ósseo autógeno, em coelhos [Tese de Doutorado]. São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2001.

15. Oliveira DT, Granjeiro JM, Maeda L, Chacon M, Fonseca MA, Taga EM, Taga MSL. Hidroxiapatita microgranular: comportamento biológico em tecido subcutâneo de ratos. Rev. Odontol. UNESP 1993; 22(2): 197-202.
16. Pescinini LM, Abi Rached RSG, Milanezi LA, Okamoto T. Reação do tecido conjuntivo subcutâneo ao implante de hidroxiapatita, pasta de Walkhoff e associação hidroxiapatita/pasta de Walkhoff. Estudo histológico em ratos. Rev. Odontol. UNESP 1996; 25: 103-12.
17. Xavier AP, Schellini SA, Aragon FF, Padovani CR, Taga EM. Short-term evaluation of non-absorbable microgranular hydroxyapatite infiltration in the guinea pig subepidermal abdominal region. Braz J Med Biol Res 2002; 35(1): 69-73.
18. Tay BKB, Lê AX, Heilman M, Lotz J, Bradford DS. Use of a collagen-hydroxyapatite matrix in spinal fusion: a rabbit model. Spine 1998; 23: 2276-81.
19. Ripamonti U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. Biomaterials 1996; 17: 31-35.
20. Figueiredo AS, Takita LC, Goldenberg S. Comparação entre a hidroxiapatita porosa de coral e o enxerto ósseo autógeno em coelhos. Acta Cir Bras 1998; 12 (2): 84-8.
21. Martín RB, Chapman MW, Sharkey NA, Zissimos SL, Bay B, Shors EC. Bone ingrowth and mechanical properties of coralline hydroxyapatite 1 yr after implantation. Biomaterials 1993; 14 (5): 341-8.
22. Defino HLA, DeConti O, Velludo MASL. Estudo experimental da integração óssea da hidroxiapatita. Rev. Bras. Ortop 1998; 33(9): 713-8.
23. Novelli MD, Barreto E, Matos D, Saad SS, Borra RC. Aplicação do processamento de imagens por computador na quantificação das variáveis histopatológicas da reparação tecidual de anastomoses colocólicas em cães. Ver Ass Méd Brás 1997; 43:277-82.
24. Junqueira LCU; Bignolas G; Brentani R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. Histochemical Journal, 1979; 11: 447-455.
25. Junqueira LCU; Cossermelli NS; Brentani R. Differential staining of collagen type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy . Arch Histol Jap, 1978; 41: 267-274.
26. Simões MLPB, Pante ML, Macedo VL, Garcia RF, Boell P, Moraes THC. O hormônio de crescimento e a concentração de colágeno na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. Acta Cir Brás, 2000; 15(3).
27. Bousquet M-TH. Resultats esthétiques du traitement de la lèvre au hyaluronato stabilise. J Men Esth et Chir Derm 1998; 15:115-119.

28. Guirro ECO, Guirro RRJ. *Fisioterapia Dermato-Funcional. Fundamentos, Recursos, Patologias*. São Paulo (SP): Ed. Manole; 2002.
29. Zbeli M. Expérience personnelle dans le comblement des rides et le remodelage des lèvres avec acido hyaluronique. *J Méd Esth et Chir Derm* 2002; 241-246.
30. Marmur ES, Phelps R, Goldberg DJ. Clinical, histologic and electron microscopic findings after injection of a calcium hydroxylapatite filler. *J Cosmet Laser Ther*, 2004; 6: 223-226.
31. Silva RA, Fagundes DJ, Silva ACMA, Figueiredo AS, Cantero WB. Estudo comparativo entre os fios de polidioxanona e poliamida na tenorrafia de coelhos. *Acta cir. bras*, 2002; 17(1): 36-45.
32. Fridman P, Mafong E, Kauvar A, Geronemus R. Safety data of injectable nonanimal stabilized hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation. *Dermatologic Surgery* 2002; 28: 491-95.
33. Sánchez LO, Guillermo LM, Valdés GC. Efecto del acido hialurônico em la cicatrización de heridas em ratas. VI Congreso virtual hispanoamericano de anatomia patológica 2004.
34. DeLorenzi C, Weinberg M, Solish N, Swift A. Multicenter study of the efficacy and safety of subcutaneous non-animal-stabilized hyaluronic acid in aesthetic facial contouring: interim report. *Dermatol Ther*, 2006; 19(3):141-50.
35. Lindqvist C, Tveten S, Bondevik BE, Fagrell D. A randomized, evaluator-blind, multicenter comparison of the efficacy and tolerability of Perlane versus Zyplast in the correction of nasolabial folds. *Plast Reconstr Surg*, 2005; 115(1):282-9.
36. André P. Evaluation of the safety of a non-animal stabilized hyaluronic acid (NASHA -- Q-Medical, Sweden) in European countries: a retrospective study from 1997 to 2001. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2004; 18(4):422-5.
37. Tzikas TL. Evaluation of the Radiesse FN soft tissue filler for facial soft tissue augmentation. *Arch Facial Plast Surg*, 2004; 6(4):234-9.
38. Jansen DA, Graivier MH. Evaluation of a calcium hydroxylapatite-based implant (Radiesse) for facial soft-tissue augmentation. *Plast Reconstr Surg*, 2006;118(3 Suppl):22S-30S, discussion 31S-33S.
39. Jacovella PF; Peiretti CB; Cunille D; Salzamendi M; Schechtel SA. Long-lasting results with hydroxylapatite (Radiesse) facial filler. *Plast Reconstr Surg*, 2006;118(3 Suppl):15-21S.
40. Candido LC. Nova abordagem no tratamento de feridas. São Paulo. Editora SENAC-SP, 2001.
41. Witte MB, Barbul A. Princípios gerais da cicatrização das feridas. *Clin Cir Am Norte* 1997; 77:509-27.

42. Oliveira DT, Granjeiro JM, Maeda L, Chacon M, Fonseca MA, Taga EM, Taga MSL. Histologic evaluation of tissue response to microparticles of hydroxyapatite subcutaneously implanted in rats. *Ver Odontol UNESP* 1993; 22(2):197-102.
43. Loureiro VM. Estudo Morfológico comparativo entre dois tipos de suturas contínuas na síntese da parede abdominal de ratos. Tese de Mestrado 1999. UNIFESP- EPM, São Paulo.
44. Silva ACMBA. Estudo Morfológico e Biomecânico do Reparo da Parede Abdominal com Prótese, em organismo em crescimento e desenvolvimento. Tese de Doutorado 2001. UNIFESP – EPM, São Paulo.
45. Jevon M, Hiiroyama T, Brown MA, Wass JÁ, Sabokbar A, Ostelere S. Osteoclast formation from circulating precursors in osteoporosis. *Scand J Rheumatol* 2003; 32(2): 95-100.

8. NORMAS ADOTADAS

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE – Resolução nº01/88: Normas de Pesquisa em saúde. Bioética 1995; 3:137-54

DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. 3 ed. São Paulo, Bireme, 1996. 1146p

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY ANATOMICAL NOMENCLATURE – Nomina Anatomica Veterinária.

UNIFORM REQUERIMENTS FOR MANUSCRIPTS SUBMITTED TO BIOMEDICAL JOURNALS. INTERNATIONAL COMMITTEE OF MEDICAL JOURNAL EDITORS. Ann Intern Med; 1997:36-47.