



UNINGÁ - CENTRO UNIVERSITÁRIO INGÁ

ERMINO JOSÉ SOUZA

AVALIAÇÃO IN VITRO DA INDUÇÃO DA SÍNTESE DE COLÁGENO EM CULTURA DE FIBROBLASTOS POR ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO E POLIDIOXANONA EM PÓ

In vitro evaluation of collagen synthesis induction in fibroblasts culture by poly-L-lactic acid and polydioxanone powder

MARINGÁ

2022



ERMINO JOSÉ SOUZA

AVALIAÇÃO IN VITRO DA INDUÇÃO DA SÍNTESE DE COLÁGENO EM CULTURA DE FIBROBLASTOS POR ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO E POLIDIOXANONA EM PÓ

Dissertação apresentada à UNINGÁ - Centro Universitário Ingá, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Célia Marisa Rizzatti Barbosa

MARINGÁ

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) ou também chamada de Ficha catalográfica



ERMINO JOSÉ SOUZA

AVALIAÇÃO IN VITRO DA INDUÇÃO DA SÍNTESE DE COLÁGENO EM CULTURA DE FIBROBLASTOS POR ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO E POLIDIOXANONA EM PÓ

Dissertação apresentada à UNINGÁ - Centro Universitário Ingá, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.
Orientador: Prof.^a Dr.^a Célia Marisa Rizzatti Barbosa

BANCA EXAMINADORA:

Orientador: Profa. Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa
UNINGÁ

Profa. Dra. Claudia Herrera Tambeli
Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Biologia

Prof. Dr. Giancarlo de La Torre Canales
UNINGÁ

MARINGÁ
2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me permitir concluir este estudo e a minha família pelo apoio sempre incondicional.

À minha orientadora Prof. Célia Marisa Rizzatti-barbosa pela presteza sempre demonstrada e pelos ensinamentos a mim transmitidos.

À Uningá pela oportunidade de compartilhar esse trabalho.

A todos os professores e colegas pelos conhecimentos compartilhados até aqui.

Aos professores Ricardo Albergaria Barbosa, Carlos Amilcar Parada e Cláudia Herrera Tambeli.

RESUMO

Fundamentos: O envelhecimento da pele é acompanhado pela degradação do colágeno e das fibras elásticas, proteínas responsáveis pela resistência à tração e elasticidade da pele. A diminuição delas resulta em aumento da flacidez e enrugamento da pele. Alternativas minimamente invasivas como os bioestimuladores tem se destacado como forma de se retardar os efeitos do envelhecimento. A polidioxanona em pó, surge nesse cenário como uma alternativa eficaz e segura. Sua capacidade de induzir a produção de colágeno numa cultura de fibroblastos humanos foi comparada a do ácido poli-L-láctico (PLLA). **Objetivos:** Verificar, in vitro, a capacidade de um pó de polidioxanona induzir a produção de colágeno em uma cultura de fibroblastos humanos e comparar os resultados com a indução promovida pelo pó de PLLA. **Materiais e Métodos:** O estudo avaliou em cultura aderente de fibroblastos humanos a linhagem celular CCD-1072Sk (ATCC CRL-2088) fornecida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), se a adição de dois bioestimuladores ao meio de cultura - o Ácido poli-L-láctico-PLLA (Renova[®] elleva) e a polidioxanona-PDO em pó (UltraCol – Ultra-V[®] Medical) estimularia um aumento na produção de colágeno pelos fibroblastos. **Resultados:** Os resultados mostraram um aumento significativo na produção de colágeno do momento 24h para o 48h nos quatro grupos analisados (C(S), PLLA(S), PDO(S) e PDO(S)[#]. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos que receberam bioestimulador (PDO ou PLLA) e os grupos controle. **Conclusão:** Segundo os resultados que encontramos nenhum dos bioestimuladores influenciou positivamente a produção de colágeno.

Palavras-chave: Colágeno. Envelhecimento. Fibroblastos. PLLA. Polidioxanona.

ABSTRACT

Backgrounds: Skin aging is accompanied by the degradation of collagen and elastic fibers, proteins responsible for the skin's tensile strength and elasticity. Their decrease results in increased sagging and wrinkling of the skin. Minimally invasive alternatives such as biostimulators have stood out as a way to delay the effects of aging. Polydioxanone powder appears in this scenario as an effective and safe alternative. Its ability to induce collagen production in a human fibroblast culture has been compared to that of poly-L-lactic acid (PLLA). **Objectives:** To verify, in vitro, the ability of a polydioxanone powder to induce collagen production in a culture of human fibroblasts and to compare the results with the induction promoted by the PLLA powder. **Materials and Methods:** The study evaluated in adherent culture of human fibroblasts the cell line CCD-1072Sk (ATCC CRL-2088) provided by the Cell Bank of Rio de Janeiro (BCRJ), if the addition of two biostimulators to the culture medium - the Poly-L-lactic acid-PLLA (Rennova® elleva) and powdered polydioxanone-PDO (UltraCol – Ultra-V® Medical) would stimulate an increase in collagen production by fibroblasts. **Results:** The results showed a significant increase in collagen production from 24h to 48h in the four groups analyzed (C(S), PLLA(S), PDO(S) and PDO(S)#. However, no differences were found significant differences between the groups that received a biostimulator (PDO or PLLA) and the control groups. **Conclusion:** According to the results we found, none of the biostimulators positively influenced collagen production.

Keywords: Collagen. Aging. Fibroblasts. PLLA. Polydioxanone.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 JUSTIFICATIVA	10
3 OBJETIVOS	11
3.1 Geral	11
3.2 Específico.....	11
4 REVISÃO DA LITERATURA	11
4.1 PLLA	11
4.2 Polidioxanona	13
5 METODOLOGIA	16
5.1 Cálculo amostral	17
5.2 Identificação da linhagem celular	17
5.3 Meio de cultura	17
5.4 Preparo inicial da amostra	18
5.5 Subcultura	18
5.6 Criopreservação	19
5.7 Experimento	20
5.8 Coleta para quantificação de citocina (Pro-Collagen I α1)	21
5.9 ELISA	21
5.9.1 Preparação da Placa	22
5.9.2 Ensaio imunoenzimático	22
6 RESULTADOS	24
7 DISCUSSÃO	24
8 CONCLUSÃO	27
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento da pele ocorre devido a diversos fatores intrínsecos e extrínsecos. Com o aumento da expectativa de vida, cresceu o interesse por encontrar formas de retardar os efeitos do envelhecimento na pele. WONG & CHEW (2021) definiram o envelhecimento da pele como uma sobreposição de fenótipos benignos indicativos de alterações histológicas e morfológicas contínuas e inevitáveis, causadas por fatores intrínsecos, como as influências genéticas e cronológicas, e por fatores extrínsecos, como as influências ambientais. Ainda dividiram os fatores de risco para o envelhecimento da pele em não modificáveis, que estão associados ao envelhecimento cutâneo intrínseco e não podem ser alterados, como idade e sexo, e em modificáveis, que influenciam o envelhecimento cutâneo extrínseco, como o tabagismo e a exposição ao sol, que podem ser alterados por meio de intervenções e mudanças no estilo de vida. Estes autores relataram também que o envelhecimento da pele é acompanhado pela degradação do colágeno e das fibras elásticas na derme, afinamento da epiderme, comprometimento da função dos fibroblastos entre outras alterações e que essas mudanças prejudicam a integridade cutânea, a cicatrização de feridas, a função sensorial e imunológica.

Diferentes procedimentos são adotados no sentido de controlar a aparência envelhecida. Estes permeiam desde processos invasivos, como as cirurgias plásticas, até os minimamente invasivos, como a aplicação de implantes artificiais como a hidroxiapatita de cálcio, a policaprolactona, o ácido poli-L-láctico na hipoderme para promover estímulo à formação de colágeno. No entanto, os procedimentos cirúrgicos nem sempre são a opção mais viável para a correção estética de uma aparência envelhecida. Isto ocorre devido ao tempo requerido no procedimento e na recuperação pós-operatória, à necessidade de internação hospitalar e anestesia geral, ao alto custo, aos riscos envolvidos e à imprevisibilidade dos resultados. Tais fatores tem favorecido a escolha de procedimentos minimamente invasivos. A toxina botulínica, os volumizadores, os implantes com fios reabsorvíveis ou não, o ozônio, os agregados plaquetários, a fotobioestimulação, os bioestimuladores de colágeno, dentre outros, têm representado uma crescente parcela de procedimentos com a finalidade de controlar os sinais do envelhecimento. (MOON et al. 2021; CHAUDHARY et al. 2020; RAMOS-E-SILVA; DA SILVA CARNEIRO, 2007)

Estas terapias minimamente invasivas são conduzidas em ambiente ambulatorial, com anestesia local se necessário, não envolvem internação hospitalar, admitem tempo de procedimento e de recuperação relativamente curtos, são seguros, menos onerosos e têm maior previsibilidade em sua condução. (BEYLOT, 2019)

Entre as alternativas minimamente invasivas para se tentar retardar e minimizar os efeitos do envelhecimento da pele está o uso dos bioestimuladores de colágeno como a hidroxiapatita de cálcio, o ácido poli-L-láctico (PLLA) e os fios de polidioxanona (PDO). Estes estimulam a proliferação de fibroblastos na derme que irão se encarregar da síntese de proteínas da matriz extracelular. A hidroxiapatita de cálcio e o PLLA são apresentados em forma de um pó que é misturado a um veículo para administração enquanto a PDO só está disponível no mercado até o momento na forma de fios, podendo ser lisos (mono, bi ou multifilamentar) em forma de espiral (mono e bifilamentar), formato de rede (fio Matrix®) ou farpados. Dentre estes procedimentos, a implantação dérmica de bioestimuladores de última geração parecem capazes de induzir a neocolagênese e tem tido grande aceitação e procura nos últimos anos. (de MELO et al. 2017) Pelas suas características de bioestimulação podem ser indicados na prevenção do aspecto envelhecido da derme, para promover a formação de colágeno, para a reestruturação dos pilares e contornos da face, para reduzir a flacidez tecidual e para diminuir as cicatrizes.

Cerca de 48 implantes bioestimuladores foram aprovados pela FDA e aqueles compostos por hidroxiapatita de cálcio, poliamida, ácido poli láctico (PLLA) e policaprolactona (PCL) são frequentemente empregados com esta finalidade. (LIN; LIN 2021; CHRISTEN; VERCESI, 2020; de MELO et al. 2020; de ALMEIDA et al. 2019; Kim^d 2019)

Atualmente, os implantes de polidioxanona (PDO) também tem sido estudados quanto à sua eficácia e segurança, demonstrando ser um material viável como indutor de colágeno em estudos com animais. MARTINS et al. (2020). HA et al. (2021), em estudo desenvolvido em animais que visava identificar as alterações histológicas e os mecanismos de absorção de fios de PDO e policaprolactona (PCL), concluíram que o fio de PDO estimula a proliferação de fibroblastos através do sistema de sinalização TGF- β . O estudo sugere que a transdução de sinal TGF- β leva à proliferação de fibroblastos, que estimula a formação de colágeno e a remodelação do tecido, e que uma maior área de superfície entre o fio e o tecido induz uma maior resposta tecidual,

resultando em um aumento nas células inflamatórias, miofibroblastos e fibroblastos, fazendo com que o efeito de remodelação e rearranjo dos tecidos seja muito variável e dependente da forma do fio.

Como bioestimulador em pó, os compostos por PDO apresentam qualidade compatível ao de PLLA e PCL na resposta inflamatória e propriedade de formar colágeno. (KWON, 2019)

Um sistema confiável para avaliar a tendência à formação de colágeno induzida por bioestimuladores pode ser conduzida através dos protocolos preconizados em cultura celular. Esta evoca técnicas que simulam as condições naturais, e envolve a distribuição e isolamento de células específicas a uma atividade fisiológica, com o objetivo de compreender os processos bioquímicos envolvidos nesta finalidade. Por se proliferarem rapidamente, a cultura de fibroblastos pode definir um indicativo apropriado para se considerar a formação de colágeno tecidual mediante a inserção de variáveis de estudo, uma vez que admite perceber qual é a tendência fisiológica destas células em resposta aos diferentes estímulos.

Embora esta seja uma proposta importante para investigar a possibilidade de colagênese na pele mediante o estímulo por bioestimuladores, na literatura pesquisada, não se encontraram estudos visando comparar a colagênese promovida por bioestimuladores em pó compostos por PDO ou PLLA através de culturas de fibroblastos. Portanto, a proposta do presente estudo será verificar, *in vitro*, a capacidade de um pó de polidioxanona induzir a produção de colágeno em uma cultura de fibroblastos humanos.

2 JUSTIFICATIVA

Os fibroblastos são células encontradas na derme e são responsáveis pela produção de colágeno e elastina, que são as principais fibras da matriz extracelular. O colágeno é responsável pela resistência à tração da pele e a elastina proporciona elasticidade à pele. A diminuição de ambas proteínas, com o avançar da idade, resulta em aumento da flacidez e enrugamento da pele. Assim, a neoformação de colágeno e elastina pode promover efeito rejuvenescedor na pele envelhecida. Já está bem documentado o efeito bioestimulador na pele através do estímulo da produção de

colágeno por produtos como a hidroxiapatita de cálcio, a policaprolactona e o ácido poli-L-lático. A polidioxanona também pode promover neoformação de colágeno quando utilizada sob a forma de fio de implantação intradérmica, uma apresentação diferente das demais substâncias. A utilização da polidioxanona em pó, entretanto, representará uma alternativa eficaz e segura dentre os produtos já utilizados como alternativa minimamente invasiva para o rejuvenescimento facial.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Verificar se polidioxanona em pó é capaz de induzir a produção de colágeno em uma cultura de fibroblastos humanos.

3.2 Específico

Comparar a indução da produção de colágeno produzida pela polidioxanona em pó e pelo PLLA.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 PLLA

Carey, et al. (2007) e Carey, et al. (2009) concluíram em estudos randomizados multicêntricos e open-label em pacientes apresentando lipoatrofia facial submetidos ao tratamento com PLLA, que aumentos clinicamente modestos avaliados objetivamente no volume facial e na espessura dos tecidos moles foram sustentados por 48 semanas nos planos de injeção e que em contraste os benefícios percebidos pelo paciente foram significativos em termos de melhora estética e aumento do bem-estar, funcionamento social e qualidade de vida.

Courderot-Masuyer, et al. (2012) com o objetivo de avaliar as diferenças de comportamento funcional de fibroblastos humanos de rugas e fibroblastos envelhecidos de pele humana normal, investigaram em cultura de fibroblastos de linhagens celulares estabelecidas a partir de duas amostras de pele diferentes de cada uma de três plásticas femininas (uma de dentro de uma ruga facial e outra de pele envelhecida normal) o potencial do PLLA para compensar a redução da atividade metabólica, restaurar a capacidade de migração e inibir a produção de lactato nos fibroblastos das rugas e nos fibroblastos de pele normal envelhecida. Os autores observaram que O PLLA aumentou a síntese de colágeno I, restaurou a capacidade de migração e tendeu a diminuir a produção de lactato nos fibroblastos das rugas, enquanto somente estimulou a proliferação nos fibroblastos de pele envelhecida e tendeu a melhorar sua migração e concluíram que seus resultados sugerem que o PLLA de Sculptra® agiu como um estímulo para a produção de colágeno nos fibroblastos das rugas e que é adequado para corrigir depressões cutâneas, como as rugas.

Segundo Fitzgerald et al., (2018) o PLLA é um polímero sintético biocompatível e biodegradável que é degradado com segurança ao longo da mesma via metabólica do ácido lático. Quando usado como um implante injetável para volumização de tecidos moles, o PLLA é fornecido como um pó liofilizado que inclui micropartículas de PLLA, carboximetilcelulose e manitol não pirogênico, que deve ser reconstituído com água estéril e após tempo de hidratação adequado ser injetada na área apropriada. As micropartículas de PLLA que medem entre 40 e 63 µm de diâmetro e são capazes de estimular uma inflamação subclínica no hospedeiro, que por sua vez promove a síntese de colágeno.

Kim^a et al. (2019) concluíram em um trabalho cujo objetivo foi avaliar o efeito do PLLA (Sculptra®; Sanofi Aventis, Paris, França) na síntese de colágeno e as vias de sinalização relacionadas, em cultura de fibroblastos dérmicos da linhagem celular Hs68, que o PLLA atua diretamente nos fibroblastos dérmicos levando a um aumento significativo na expressão do gene do colágeno tipo I e na síntese de proteínas. Os autores utilizaram 5mL de água estéril que foram adicionados ao pó seco de Sculptra® e finalmente ajustados para concentração de 0,1% no meio de cultura e ainda ressaltaram que seus resultados forneceram a primeira evidência de que o PLLA estimula diretamente os fibroblastos dérmicos para aumentar a síntese de colágeno

através da ativação das vias de sinalização P38, Akt e JNK, influenciando macrófagos adjacentes, que poderiam servir como um gatilho tardio da síntese de colágeno ou uma limitação da condição *in vitro*.

Baumann et al. (2020), em estudo para avaliar e validar o uso imediato após a reconstituição do PLLA, concluíram que o produto pode ser utilizado logo após sua reconstituição e que a agitação vigorosa por um minuto dissolve os seus excipientes adequadamente. Os autores ainda ressaltaram a viabilidade de se adicionar opcionalmente o cloridrato de lidocaína.

Ray & Ta, (2020) investigaram se nanopartículas de PLLA eram capazes de induzir o mesmo efeito de síntese de colágeno que micropartículas de Sculptra® *in vitro* em cultura de fibroblastos e observaram que as nanopartículas de PLLA não estimulam a produção de colágeno em monocultura de fibroblastos, mas que esse objetivo pode ser alcançado usando uma co-cultura de macrófagos/fibroblastos em uma concentração de cerca de 100 µg/mL de PLLA testada *in vitro*. Os autores creditaram a produção de colágeno observada na co-cultura de macrófagos/fibroblastos a uma reação de corpo estranho em que macrófagos do meio ingeriram partículas de PLLA o que desencadeou a produção de uma citocina (TGFβ) que estimulou a produção de colágeno pelos fibroblastos.

Palm et al. (2021), após um estudo randomizado com 80 indivíduos onde avaliaram o PLLA para correção de sulcos nasolabiais após alterações nos procedimentos de reconstituição e injeção, que o Sculptra Aesthetic® reconstituído com 8 mL de água estéril para injeção + 1 mL de lidocaína a 2% injetado em regiões subdérmicas imediatamente após a reconstituição, demonstrou um efeito de tratamento, alta satisfação e melhora estética comparável ao do grupo controle na redução da gravidade das rugas do sulco nasolabial na semana 48 e que o novo procedimento de reconstituição e injeção foram associados a um perfil de segurança satisfatório.

4.2 Polidioxanona

Kimura, et al. (2003), em estudo randomizado com coelhos onde avaliaram a influência dos locais de implantação e dos diâmetros dos fios na taxa de degradação

de fios de polidioxanona absorvíveis, e demonstraram que os locais de implantação e o diâmetro afetam significativamente a taxa de degradação de fios de polidioxanona. Especificamente, que os fios de polidioxanona implantados no tecido intramedular se deterioram mais rapidamente do que aqueles implantados no subcutâneo e intra-articulares e ainda além disso, que as fibras finas deterioraram-se mais rapidamente do que as fibras grossas.

Amuso et al. (2015) relatam que a bioestimulação é um tratamento que consiste na infiltração na derme de uma substância capaz de favorecer a produção de novo colágeno e tecido conjuntivo. Os objetivos do procedimento são melhorar a elasticidade e o turgor do tecido cutâneo, aumentar a firmeza da pele.

Amuso et al. (2015) após realizarem em cinco pacientes um tratamento de bioestimulação com fios de PDO absorvível, tipo básico, avaliaram as biópsias da pele que foram realizadas pré-tratamento, aos 6 meses, 1 ano e 18 meses após o tratamento e demonstraram, por exame histológico, que a bioestimulação com fios de PDO durante os primeiros 12 meses pós-tratamento determinou uma neocolagênese e fibrinogênese que não foi induzida por transdução mecânica. O novo colágeno sintetizado foi sobretudo inespecífico e predominantemente do tipo I e que, quando a absorção dos fios foi completada, o efeito de estimulação também cessou, e aos 18 meses os autores observaram uma recuperação total com um leve aumento do colágeno fibroso tipo I.

Ko et al. (2016) avaliaram a eficácia e segurança de uma rede de fios de PDO em forma de stent na pele animal e humana, testando a inserção desses fios de PDO em modelos de ratos, mini-porcos e em humanos para correção de ríntides, e identificaram nova síntese de colágeno no exame histológico de ratos e mini-porcos; demonstraram que esses efeitos foram sustentados por 12 semanas após a inserção sendo o novo colágeno tipo III e tipo I, encontrados não apenas em torno da rede de fios em forma de stent, mas também no próprio centro dela. Esses resultados, segundo os autores, demonstraram que a rede de fios de PDO em forma de stent pode facilitar a produção de colágeno dentro e fora dela por pelo menos 12 semanas, e que são uma opção eficaz para a correção de rugas na testa.

Kim^b et al. (2017) em um estudo piloto onde avaliaram as alterações histológicas e moleculares induzidas por fio absorvível para lifting facial farpado em modelo animal, implantaram na pele dorsal de 12 porquinhos-da-Índia Hartley adultos

fragmentos de fio monofilamentar de polidioxanona farpada monodirecional calibre USP 1-0 a 2-0, e os seus resultados forneceram evidências histológicas e análises moleculares quantitativas que suportam os efeitos benéficos do lifting com fios. Também foi observado que a síntese de colágeno induzida pelos fios absorvíveis sintéticos perdurou durante todo o período do estudo de 7 meses, e que os níveis de colágeno tipo 1 foram correlacionados com níveis aumentados de sinalização de TGF- β .

Yoon et al. (2019) com o objetivo de determinar as causas das alterações nos tecidos, respostas fisiológicas e os resultados positivos após a injeção de fios de PDO, realizaram um experimento em que inseriram na pele dorsal de quatro de porcos pigmeus da variedade White Yucatan (3 meses de idade) na camada subcutânea paralelamente à pele em intervalos de 1cm, fios de PDO não farpados USP 4-0 de 9cm em uma agulha de 25G. Os autores removeram a pele e o tecido subcutâneo dos locais de inserção dos fios após 4 semanas, 12 semanas, 24 semanas e 48 semanas, prepararam e realizaram a análise histológica das amostras. Entre outros achados os autores identificaram que a proliferação de fibroblastos ocorre entre 0 e 24 semanas e a relacionaram a um efeito de produção de colágeno que poderá durar mais de 48 semanas. Identificaram também um tecido conjuntivo fibroso recentemente desenvolvido e sua fusão com tecido conjuntivo fibroso existente, contração do tecido pela atividade dos miofibroblastos, aumento do tamanho do vaso capilar e redução da camada de gordura pela desnaturação das células de gordura.

Kim^c et al. (2019) compararam a resposta tecidual do ácido poli-L-lático (PLLA) com o da polidioxanona (PDO) em pó para avaliar se a polidioxanona poderia ser eficaz como estimulador de colágeno mesmo em pó, o que permitiria que ela fosse usada na forma injetável substituinte ao PLLA, e observaram que as injeções de PLLA e PDO em pó induziram reações granulomatosas e mostraram aumento de TGF- β e do colágeno tipo I e III 2 semanas após a injeção, mas que diminuíram 12 semanas após a injeção para ambos os produtos. Os autores relataram que os resultados do seu estudo sugeriram que o PDO em pó afeta o aumento do colágeno da mesma forma que o PLLA mostrando ser uma boa opção para formação de colágeno. Entretanto não investigaram qual tipo de colágeno foi formado.

Kwon, 2019 demonstrou que como bioestimulador em pó, os compostos por PDO apresentam qualidade compatível ao de PLLA e PCL na resposta inflamatória e

propriedade de formar colágeno e que no entanto, que este material apresenta melhor biodegradabilidade e uma substancial diminuição de aspereza na superfície da pele, quando aplicado em animais submetidos ao foto envelhecimento.

Martins, et al. (2020), relatam que a polidioxanona (PDO) é um poliéster incolor sintético e absorvível que foi fabricado pela primeira vez no início da década de 1980. Que é um polímero considerado não antigênico e não pirogênico e induz uma reação tecidual mínima durante a sua absorção após a implantação e que a polidioxanona é degradada por hidrólise sendo completamente metabolizada no organismo. Devido à sua duração de absorção relativamente prolongada e natureza sintética, a PDO é amplamente utilizada em dispositivos médicos para serem implantados onde um material absorvível é desejável.

Khan et al. (2021) avaliaram, em um estudo comparativo prospectivo de centro único randomizado com 30 pacientes, realizado de junho de 2019 a fevereiro 2020, o efeito de dois tipos de fios cog (Nfix®, Ncog®, N-finders Co., Ltda.) Ncog® sozinho e Ncog® e Nfix® combinados, no rejuvenescimento e textura da pele, para estimar o efeito do lifting de fios de PDO. Seus resultados revelaram que os fios de PDO foram eficazes no rejuvenescimento da pele envelhecida, retração de tecidos moles e sustentação apresentando menos complicações e que a combinação de Ncog® e Nfix® mostrou resultados ligeiramente melhores do que Ncog® sozinho.

5 METODOLOGIA

O presente estudo avaliou em cultura aderente de fibroblastos humanos, da linhagem celular CCD-1072Sk (ATCC CRL-2088) obtida do banco de células do Rio de Janeiro, se dois bioestimuladores em pó compostos por polidioxanona -PDO (UltraCol – Ultra-V® Medical) e por ácido poli-L-lático – PLLA (Renнова® elleva) estimulariam um aumento na produção de colágeno pelos fibroblastos, quando adicionados ao meio de cultura.

5.1 Cálculo amostral

O cálculo amostral foi realizado baseando-se em um nível de significância alfa de 5% (0,05) e um beta de de 20% (0,20) para atingir um poder de teste de 80% para detectar uma diferença mínima de 4 com desvio padrão de 2,94 para o colágeno (μg /milhões de células) segundo COURDEROT-MASUYER et al. 2012. Desta forma, o cálculo amostral resultou que houve necessidade de 10 amostras.

5.2 Identificação da linhagem celular

Foi utilizada no experimento a linhagem celular CCD-1072Sk (ATCC CRL-2088) fornecida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) cujo código BCRJ é 0062. A linhagem de fibroblastos normais da pele humana foi estabelecida a partir da pele de prepúcio de um recém-nascido do sexo masculino cujo perfil de DNA é Amelogenina: X, Y CSF1PO: 10,11 D13S317: 12,14 D16S539: 12,13 D5S818: 10,13 D7S820: 8,11 THO1: 7 TPOX: 6,10 vWA: 15,19. O tipo de cultura utilizado foi em monocamada aderente, sendo que as células senesciam após pelo menos 35 duplicações populacionais.

5.3 Meio de cultura

As células foram cultivadas em frascos de 25cm^2 utilizando o meio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) constituído por 4 mM de L-glutamina, 4500 mg/L de glicose e 1500 mg/L de bicarbonato de sódio e soro fetal bovino para uma concentração final de 10%. Também foi utilizado 50 μL de penicilina-estreptomicina para cada 50mL de meio de cultura. As células foram incubadas em atmosfera e temperatura adequadas – umidade do ar a 95%; dióxido de carbono (CO_2) a 5% e temperatura a 37 °C.

5.4 Preparo inicial da amostra

O frasco de cultura, quando recebido do BCRJ com a mostra da linhagem celular que foi utilizada no experimento foi de imediato submetido a tripsinização. O meio de cultura foi removido e descartado do frasco e a camada de células foi enxaguada rapidamente com Tampão Fosfato Salino (PBS) sem cálcio e magnésio para remover todos os vestígios de soro, que contém inibidor de tripsina. Foi adicionado então 2,0 a 3,0 mL de solução de Tripsina-EDTA ao frasco e as células foram observadas em um microscópio invertido até que a camada de células estivesse dispersa (geralmente em 5 a 15 minutos)².

²“NOTA: Para evitar aglomeração, não agitar as células batendo ou sacudindo o frasco enquanto se espera que as células se desprendam. As células que são difíceis de separar podem ser colocadas a 37 °C para facilitar a dispersão.”

Então foram adicionados 6,0 a 8,0 mL de meio de cultura completo ao frasco e aspiradas as células, pipetando suavemente e adicionando alíquotas apropriadas da suspensão de células para novos recipientes de cultura na proporção de 1:3 ou 1:4. A cultura foi incubada então em atmosfera e temperatura adequadas – umidade do ar a 95%; dióxido de carbono (CO₂) a 5% e temperatura a 37 °C³.

³“NOTA: É importante evitar a alcalinidade excessiva do meio durante a recuperação das células. Sugere-se que, antes da adição do conteúdo do frasco, o recipiente de cultura contendo o meio de crescimento seja colocado na incubadora por pelo menos 15 minutos para permitir que o meio atinja seu pH normal (7,0 a 7,6).”

5.5 Subcultura

O meio de cultura foi removido e descartado do frasco e a camada de células foi enxaguada rapidamente com Tampão Fosfato Salino (PBS) sem cálcio e magnésio para remover todos os vestígios de soro, que contém inibidor de tripsina. Foi adicionado então 2,0 a 3,0 mL de solução de Tripsina-EDTA ao frasco e as células

foram observadas em um microscópio invertido até que a camada de células estivesse dispersa (geralmente em 5 a 15 minutos).

Então foram adicionados 6,0 a 8,0 mL de meio de cultura completo ao frasco e aspiradas as células, pipetando suavemente e adicionando alíquotas apropriadas da suspensão de células para novos recipientes de cultura na proporção de 1:3 ou 1:4. A cultura foi incubada então em atmosfera e temperatura adequadas – umidade do ar a 95%; dióxido de carbono (CO²) a 5% e temperatura a 37 °C. O meio de cultura foi substituído sempre a cada três dias, e a subcultura realizada sempre que os frascos atingiam confluência.

5.6 Criopreservação

Após a expansão da linhagem celular recebida do BCRJ, algumas amostras da linhagem foram crio preservadas para posterior utilização.

Foi realizada a tripsinização (tripsina/EDTA 0,25%) das amostras a serem criopreservadas e a inativação da tripsina com meio de cultura e a transferência das células para o tubo cônico de polipropileno estéril tipo Falcon. O conteúdo foi centrifugado a 500 xg por 5 minutos a 25 °C, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em meio de cultura completo (10% de Soro Bovino Fetal - SBF + 1% de penicilina/estreptomicina).

Foi realizada a coloração com azul de Tripán e contagem em câmara de Neubauer para avaliar a viabilidade celular.

Após 24 horas os criotubos foram transferidos para um container de nitrogênio, onde os criotubos foram mantidos imersos no nitrogênio⁴.

⁴NOTA: Se a cultura apresentar ≥ 90% de células viáveis, seguir o procedimento de congelamento transferindo a suspensão celular para um tubo criogênico com 95% FBS + 5% DMSO (Dimetilsulfóxido). Transferir esses crio tubos para o congelador (-20 °C), onde deverão permanecer por 20 a 30 minutos, sendo em seguida transferidos para o freezer -80 °C.”

5.7 Experimento

Foram utilizadas oito placas de cultura de 12 poços para a cultura das amostras de fibroblastos que foram utilizadas no experimento. Para a análise estatística dos resultados foram formados quatro grupos, C(S) (grupo controle negativo), PLLA(S) (grupo controle positivo com 0,033mg de PLLA), PDO(S) (grupo teste com 0,1mg de PDO) e PDO(S)[#] (grupo teste com 0,033mg de PDO), sendo cada grupo constituído por uma placa de 12 poços de cultura. Quatro placas foram identificadas como “Placas A” (que tiveram seu resultado analisado através do teste de ELISA após um período de 24 horas de incubação da cultura na presença dos bioestimuladores) e quatro placas foram identificadas como “Placas B” (que tiveram seu resultado analisado através do teste de ELISA após um período de 48 horas de incubação da cultura na presença dos bioestimuladores).

Para o plaqueamento das amostras que foram utilizadas no experimento, o meio de cultura foi removido e descartado dos frascos de cultura e a camada de células foi enxaguada rapidamente com Tampão Fosfato Salino (PBS) sem cálcio e magnésio para remover todos os vestígios de soro que continha inibidor de tripsina. Foram adicionados 2,0 a 3,0 mL de solução de Tripsina-EDTA aos frascos, e as células foram observadas em um microscópio invertido até que a camada de células estivesse dispersa (geralmente em 5 a 15 minutos). Foram adicionados de 6,0 a 8,0 mL de meio de cultura completo ao frasco e aspiradas as células, que foram então plaqueadas a uma densidade de 40×10^3 células por poço. As placas foram incubadas por 24 horas em atmosfera e temperatura adequadas – umidade do ar a 95%; dióxido de carbono (CO²) a 5% e temperatura a 37 °C.

Após esse período de 24 horas foi adicionado ao meio de cultura de cada poço das placas o pó bioestimulador. No grupo controle negativo C(S) não foi adicionado nenhum bioestimulador, no grupo controle positivo PLLA(S) 0,033mg/mL de PLLA, e no grupo teste PDO(S) 0,1mg/mL de PDO e no grupo teste PDO(S)[#] 0,033mg/mL de PDO. As “Placas A” foram incubadas por 24 horas e as “Placas B” incubadas por 48 horas. Após esse período o colágeno tipo I formado foi quantificado através do teste de ELISA.

O protocolo de preparo do pó de PLLA foi o indicado pelo fabricante do bioestimulador à base de ácido poli-L-lático Rennova® Elleva. Resumidamente,

consistiu na diluição do conteúdo do frasco do produto em 16ml de água estéril para injeção. Após a adição da água o frasco foi agitado durante 10 minutos e logo em seguida foi deixado repousar por 1 hora para garantir a hidratação completa para que se obtivesse uma suspensão translúcida uniforme. Imediatamente antes do uso a suspensão foi novamente agitada de acordo com instruções do fabricante. O protocolo de preparo do pó de PDO também foi o indicado pelo fabricante do bioestimulador à base de polidioxanona ULTRACOL 200. Resumidamente, consistiu na diluição do conteúdo do frasco do produto em 2mL de água para injeção estéril. Após a adição da água o frasco foi bem agitado para promover a mistura do ULTRACOL a água e a solução obtida foi deixada descansar por 3 horas antes do uso. Logo antes do uso a solução foi novamente agitada para uma melhor suspensão de acordo com o indicado pelo fabricante.

5.8 Coleta para quantificação de citocina (Pro-Collagen I α 1)

Após 24 horas de incubação, o meio de cultura da “Placa A” foi retirado e misturado a inibidores de protease (10mL de EDTA e 20kl/mL de aprotinina) para evitar a degradação das proteínas. Imediatamente após a coleta, o meio foi congelado e estocado a -80°C até o seu uso para a avaliação quantitativa do colágeno. Após 48 horas, o mesmo procedimento foi realizado para a Placa B. Os níveis de colágeno tipo I foram quantificados através do ensaio imunoenzimático de ELISA.

5.9 ELISA

ELISAs (Enzyme Linked Immunosorbent Assays), “Ensaio de Imunoabsorção Enzimática” na tradução, é um tipo de imunoensaio comumente utilizado para detecção e quantificação de diversas moléculas, inclusive peptídeos, proteínas e anticorpos dentro de uma amostra. As amostras usadas rotineiramente em ELISAs incluem soro, plasma, sobrenadantes de cultura de células, lisados celulares, saliva, lisados de tecidos e urina (TIP, 2010; ELISA GUIDE).

Os ELISAs geralmente são executados em microplacas de 96 poços revestidas com um anticorpo de captura específico para a molécula de interesse. Após a

incubação com amostras experimentais, padrões ou controles, a molécula alvo é capturada por este anticorpo. Um anticorpo de detecção conjugado a uma enzima se liga a molécula alvo. Um substrato de detecção é subsequentemente adicionado aos poços da placa e produz uma reação colorimétrica ao reagir com a enzima ligada ao anticorpo de detecção proporcional a quantidade da molécula alvo na amostra analisada. Os quatro principais tipos de ELISAs são o indireto, o direto, o sanduíche e o competitivo. (TIP, 2010; ELISA GUIDE). Em nosso estudo utilizamos o ELISA sanduíche (DuoSet® ELISA - DEVELOPMENT SYSTEM - Human Pro-Collagen I α 1/COLIA1, R&D Systems, Inc.). A análise das amostras de sobrenadante foi realizada de acordo a descrição a seguir:

5.9.1 Preparação da Placa

1. O anticorpo de captura foi diluído para a concentração de trabalho em PBS sem proteína transportadora. Uma microplaca de 96 poços foi revestida imediatamente com 100 μ L por poço do anticorpo de captura diluído. A placa foi selada e incubada durante a noite à temperatura ambiente.
2. Cada poço foi aspirado e lavado com tampão de lavagem, repetindo o processo duas vezes para um total de três lavagens, enchendo cada poço com tampão de lavagem (400 μ L) usando uma garrafa de esguicho. A remoção completa do líquido em cada etapa é essencial para um bom desempenho. Após a última lavagem, todo o tampão de lavagem foi removido invertendo a placa e esfregando-a contra toalhas de papel limpas.
3. As placas foram bloqueadas adicionando 300 μ L de Diluente de Reagente a cada poço e incubadas em temperatura ambiente por 1 hora.
4. Foi repetida a aspiração/lavagem como no passo 2. Após essa etapa as placas ficaram prontas para adição de amostra.

5.9.2 Ensaio imunoenzimático

1. Foi adicionado 100 μ L do sobrenadante coletado das placas de cultura por poço. A placa foi coberta com uma tira adesiva e incubada por 2 horas à temperatura ambiente.

2. Cada poço foi aspirado e lavado com tampão de lavagem, repetindo o processo duas vezes para um total de três lavagens, enchendo cada poço com tampão de lavagem (400 μ L) usando uma garrafa de esguicho. A remoção completa do líquido em cada etapa é essencial para um bom desempenho. Após a última lavagem, todo o tampão de lavagem foi removido invertendo a placa e esfregando-a contra toalhas de papel limpas.
3. Foi adicionada 100 μ L do Anticorpo de Detecção, diluído em Diluente de Reagente, a cada poço e placa foi coberta com uma nova fita adesiva e incubada por 2 horas à temperatura ambiente.
4. Cada poço foi aspirado e lavado com tampão de lavagem, repetindo o processo duas vezes para um total de três lavagens, enchendo cada poço com tampão de lavagem (400 μ L) usando uma garrafa de esguicho. A remoção completa do líquido em cada etapa é essencial para um bom desempenho. Após a última lavagem, todo o tampão de lavagem foi removido invertendo a placa e esfregando-a contra toalhas de papel limpas.
5. Foi adicionado 100 μ L da diluição de trabalho de Estreptavidina-HRP a cada poço e placa foi coberta com uma nova fita adesiva e incubada por 20 minutos em temperatura ambiente evitando contato da placa com luz direta.
6. Cada poço foi aspirado e lavado com tampão de lavagem, repetindo o processo duas vezes para um total de três lavagens, enchendo cada poço com tampão de lavagem (400 μ L) usando uma garrafa de esguicho. A remoção completa do líquido em cada etapa é essencial para um bom desempenho. Após a última lavagem, todo o tampão de lavagem foi removido invertendo a placa e esfregando-a contra toalhas de papel limpas.
7. Foi adicionado 100 μ L de Solução de Substrato a cada poço e a placa foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente evitando contato da placa com luz direta.
8. Foi adicionado 50 μ L de solução de parada a cada poço batendo-se suavemente na placa para garantir uma mistura completa.
9. Foi determinada a densidade óptica de cada poço imediatamente, usando um espectrofotômetro ajustado para 450nm.

6 RESULTADOS

A estatística descritiva foi utilizada para explorar e resumir os dados coletados. As variáveis foram apresentadas em média e desvio padrão (DP). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a normalidade dos dados. Para analisar o efeito do tempo em que foram analisadas as amostras (24h ou 48h) e do grupo (C(S), PLLA(S), PDO(S), PDO(S)# nas concentrações de colágeno, utilizamos o teste de Two-Way ANOVA. Para identificar as diferenças significativas entre os subgrupos, utilizamos o post-hoc de Tukey. Para interpretar a magnitude de efeito dos resultados encontrados, calculamos o *partial eta squared* (η^2) e consideramos valores até 0.01 como sem efeito, até 0.06 como efeito pequeno, até 0.14 como efeito médio e acima desse valor como efeito grande (Cohen, 1988). O nível de significância de 0,05 foi adotado. Todas as análises foram realizadas no programa IBM SPSS Statistics 20.0.

A Tabela 1 apresenta a análise do colágeno em função dos momentos em que foram feitas as análises e dos grupos. Encontramos um efeito significativo do tempo, no qual todas as amostras apresentaram um aumento significativo do colágeno das 24h para 48h. Não encontramos uma diferença significativa entre os grupos e nem de interação.

Tabela 1. Concentração do colágeno (pg/mL) em função do momento de coleta, grupo e tipo de

Grupo	24h	48h	ANOVA Two-Way	F-value	p-value	η^2
C(S)	90740 (52457)	155401 (69717)*	Grupo	1,216	0,305	0,02
PLLA (S)	82512 (38337)	129344 (59221)*	Tempo	9,151	0,003	0,05
PDO (S)	76339 (44655)	141091 (60696)*	Grupo*Tempo	0,330	0,804	0,01
PDO (S)#	118930 (19189)	183781 (38363)*				

amostra.

Legenda: dados apresentados em média (desvio padrão). * diferença estatisticamente significativa em relação ao momento 24h.

7 DISCUSSÃO

Esse estudo tem caráter inovador ao comparar a indução da produção de colágeno in vitro em cultura de fibroblastos após a estimulação das células por pó de

polidioxanona (PDO) e pó de ácido poli-L-láctico (PLLA). Os resultados mostraram um aumento significativo na produção de colágeno do momento 24h para o 48h nos quatro grupos analisados (C(S), PLLA(S), PDO(S) e PDO(S)*. Entretanto, não encontramos diferenças significativas entre os grupos que receberam bioestimulador (PDO ou PLLA) e os grupos controle, indicando que o aumento de colágeno foi possivelmente independente da presença dos bioestimuladores.

No nosso estudo utilizamos uma linhagem celular obtida a partir da pele do prepúcio de um recém-nascido, assim como nos estudos anteriores de Kim^a et al., 2019 e de Ray & Ta, 2020.

Os estudos anteriores fizeram comparações desses bioestimuladores de forma isolada e apresentaram resultados contraditórios indicando a necessidade de mais investigações sobre esse tema. A discussão será desenvolvida para cada bioestimulador seguindo a literatura científica produzida até o momento.

Nosso estudo mostrou um aumento da produção de colágeno a partir da bioestimulação com PLLA nos grupos testes, mas de igual magnitude a apresentada pelo grupo controle. Esses resultados são contraditórios aos apresentados por Kim^a et al. (2019) que mostrou um aumento significativo da produção de colágeno utilizando o pó seco de PLLA na Linhagem de células de fibroblastos humanos (Hs68) do momento 24h para 48h em comparação ao grupo controle. Entretanto, algumas diferenças metodológicas, como a diluição para o PLLA que utilizamos, podem explicar os resultados diferentes encontrados em relação ao nosso estudo.

Respostas de igual magnitude apresentadas pelo grupo controle e grupo teste com PLLA também foram encontradas em estudos anteriores. Courderot-Masuyer et al. (2012) utilizaram o pó seco de PLLA (Sculptra[®]) em culturas de fibroblastos estabelecidas a partir biopsias de rugas e da pele envelhecida normal de pacientes saudáveis submetidas a procedimento de cirurgia plástica, com o objetivo de verificar o potencial do PLLA para compensar a redução da atividade metabólica dos fibroblastos das rugas e observaram que o PLLA promoveu um aumento significativo da produção de colágeno nos fibroblastos de rugas em comparação com os fibroblastos de pele normal e em relação ao controle não exposto ao PLLA. Esse aumento foi verificado mesmo após 42 dias de cultura. Esses resultados indicam que há a necessidade de um maior tempo de cultura de células para encontrar uma diferença significativa de produção de colágeno entre os grupos.

Nosso estudo também comparou os efeitos bioestimuladores do PLLA e da PDO na produção de colágeno e não mostrou diferenças significativas entre os grupos. Poucas investigações foram realizadas até o momento com esse objetivo. Nesse sentido, vale citar o estudo de Kwon et al. (2018) que comparou os efeitos bioestimuladores da Polidioxanona-PDO (nome comercial: ULTRACOL. Ultra V Co., Ltd., Seul Coreia), do Ácido poli-L-láctico-PLLA (Sculptra®, Galderma Laboratories, Nestlé SA Suíça) e da Policaprolactona-PCL (Ellansé-M®, Sinclair Pharma, Irvine, CA), em ratos. Os autores mostraram que o preenchimento de PDO demonstrou neocolagênese e resposta inflamatória semelhantes aos outros bioestimuladores de colágeno utilizados no estudo. Os resultados apresentados por esse estudo e nossos achados com culturas de células sugerem um estímulo da produção de colágeno similar entre o PLLA e a PDO.

Ray & Ta, (2020) investigaram se nanopartículas de PLLA eram capazes de induzir o mesmo efeito de síntese de colágeno que micropartículas de Sculptra® *in vitro* em cultura de fibroblastos e observaram que nem as micropartículas de Sculptra® e nem as nanopartículas de PLLA estimularam a produção de colágeno em monocultura de fibroblastos após 24 horas corroborando os resultados encontrados em nosso estudo. Mas Ray & Ta (2020) relataram que esse objetivo pôde ser alcançado usando uma co-cultura de macrófagos/fibroblastos em uma concentração de cerca de 100 µg/mL de PLLA testada *in vitro*. Os autores creditaram a produção de colágeno observada na co-cultura de macrófagos/fibroblastos a uma reação de corpo estranho em que macrófagos do meio ingeriram partículas de PLLA o que desencadeou a produção de uma citocina (TGFβ) que estimulou a produção de colágeno pelos fibroblastos. No entanto o período curto de observação das culturas pelos autores (24 horas) representa uma limitação importante, reconhecida por nós em nosso estudo, sendo períodos maiores de observação recomendados em estudos futuros.

A síntese de colágeno é um evento complexo *in vivo* e envolve uma reação inflamatória, com a participação de várias células, como os macrófagos por exemplo que através de sua atividade fagocítica, liberação de inúmeras citocinas e fatores de crescimento, estimulam a proliferação dos fibroblastos e a síntese de colágeno por essas células. Considerar então estudos *in vitro* com co-culturas de células, fibroblastos/macrófagos como no estudo de Ray & Ta (2020), em vez de culturas

isoladas em estudos futuros seja um caminho mais sensato a se seguir visando simular in vitro o ambiente in vivo.

Nosso estudo também avançou com a literatura atual ao investigar duas concentrações distintas de PDO na produção de colágeno. Um grupo foi recebeu concentrações de 0,1mg/mL e o outro de 0,033mg/mL de PDO. Não encontramos diferenças significativas em relação à produção de colágeno nos dois grupos. A partir desses achados sugerimos que estudos futuros testem outras concentrações ou que realizem um protocolo por um período mais longo com o intuito de comparar os efeitos longitudinais das dosagens de 0,1mg/mL e 0,033mg/mL de PDO na produção de colágeno em cultura de fibroblastos.

Considerando ainda as concentrações dos bioestimuladores utilizados em nosso estudo (0,033mg de PLLA no grupo controle positivo), (0,1mg de PDO em um dos grupos teste), ficou para nós a interrogação de se a concentração do bioestimulador exerce influência no estímulo da síntese de colágeno, pois quantidades semelhantes de colágeno foram encontradas em ambos os grupos.

Embora nosso trabalho tenha apresentado resultados interessantes em relação à produção de colágeno utilizando os biostimuladores em pó (PLLA e PDO), é importante reconhecer as suas limitações. Primeiro, reconhecemos que nossos resultados são limitados ao período de 48h em que as células foram observadas. Sugerimos que estudos futuros testem esse protocolo utilizando períodos maiores de observação. Segundo que até onde sabemos o nosso trabalho foi provavelmente o primeiro a comparar os efeitos de duas concentrações distintas de pó de PDO na síntese de colágeno in vitro. Sugerimos que estudos futuros utilizem outras concentrações nos seus protocolos experimentais. Por fim, esses trabalhos também podem ser complementados com investigações sobre as vias de sinalização relacionadas aos mecanismos moleculares envolvidos na ação bioestimuladora tanto do pó de PDO quanto do pó de PLLA em cultura de células.

8 CONCLUSÃO

Houve um aumento significativo do colágeno de 24h para 48h em todos os grupos, sem, no entanto, haver diferença na síntese de colágeno entre eles. Segundo os resultados que encontramos nenhum dos bioestimuladores influenciou

positivamente a produção de colágeno. Mais estudos são necessários e concentrações diferentes de ambos os bioestimuladores precisam ser definidas e testadas para que se chegue a uma concentração ideal para estímulo dos fibroblastos *in vitro*.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMUSO, Domenico et al. Histological evaluation of a biorevitalisation treatment with PDO wires. **Aesthetic Medicine**, v. 1, n. 3, p. 111-117, 2015.

BAUMANN, Kerstin et al. Immediate Use After Reconstitution of a Biostimulatory Poly-L-Lactic Acid Injectable Implant. **Journal of Drugs in Dermatology: JDD**, v. 19, n. 12, p. 1199-1203, 2020.

BEYLOT, C. Vieillissement cutané–Vieillissement facial global: orientation thérapeutique. In: **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**. Elsevier Masson, 2019. p. 41-74.

CAREY, D. et al. A randomized, multicenter, open-label study of poly-L-lactic acid for HIV-1 facial lipoatrophy. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 46, n. 5, p. 581-589, 2007.

CAREY, D. et al. Poly-l-lactic acid for HIV-1 facial lipoatrophy: 48-week follow-up. **HIV medicine**, v. 10, n. 3, p. 163-172, 2009.

CHAUDHARY, Manupriya; KHAN, Azmi; GUPTA, Madhu. Skin ageing: Pathophysiology and current market treatment approaches. **Current Aging Science**, v. 13, n. 1, p. 22-30, 2020.

CHRISTEN, Marie-Odile; VERCESI, Franco. Polycaprolactone: How a well-known and futuristic polymer has become an innovative collagen-stimulator in esthetics. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 13, p. 31, 2020.

Cohen, J. (1988). **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences**. New York, NY: Routledge Academic.

COURDEROT-MASUYER, Carol et al. Evaluation of the behaviour of wrinkles fibroblasts and normal aged fibroblasts in the presence of poly-L-lactic acid. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 2, n. 1, p. 20-27, 2012.

DE ALMEIDA, Ada Trindade et al. Consensus recommendations for the use of hyperdiluted calcium hydroxyapatite (Radiesse) as a face and body biostimulatory agent. **Plastic and Reconstructive Surgery Global Open**, v. 7, n. 3, 2019.

DE MELO, Francisco et al. Recommendations for volume augmentation and rejuvenation of the face and hands with the new generation polycaprolactone-based

collagen stimulator (Ellansé®). **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 10, p. 431, 2017.

DE MELO, Francisco et al. Minimally invasive aesthetic treatment of the face and neck using combinations of a PCL-based collagen stimulator, PLLA/PLGA suspension sutures, and cross-linked hyaluronic acid. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology**, v. 13, p. 333, 2020.

ELISA GUIDE - A Clear and Easy Guide to ELISAS. **R&D Systems Inc USA, Mineápolis, MN**. Disponível em:

https://resources.rndsystems.com/pdfs/brochures/rndsystems_br_elisa_guide_asdfy20-10071.pdf

FITZGERALD, Rebecca et al. Physiochemical characteristics of poly-L-lactic acid (PLLA). **Aesthetic surgery journal**, v. 38, n. suppl_1, p. S13-S17, 2018.

HA, Young In; KIM, Jun Hyun; PARK, Eun Soo. Histological and molecular biological analysis on the reaction of absorbable thread; Polydioxanone and polycaprolactone in rat model. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 21, n. 7, p. 2774-2782, 2022.

KHAN, Galina et al. Combined press cog type and cog PDO threads in comparison with the cog PDO threads in facial rejuvenation. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 20, n. 10, p. 3294-3298, 2021.

KIMURA, Shoichi et al. Implantation sites and fiber diameters affect the rate of degradation in absorbable polydioxanone fibers. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v. 19, n. 1, p. 68-74, 2003.

KWON, Tae-Rin et al. Biostimulatory effects of polydioxanone, poly-D, L lactic acid, and polycaprolactone fillers in mouse model. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 18, n. 4, p. 1002-1008, 2019.

KIM^d, Jong Seo. Changes in dermal thickness in biopsy study of histologic findings after a single injection of polycaprolactone-based filler into the dermis. **Aesthetic surgery journal**, v. 39, n. 12, p. NP484-NP494, 2019.

KIM^a, Sung-Ae et al. Poly-L-lactic acid increases collagen gene expression and synthesis in cultured dermal fibroblast (Hs68) through the p38 MAPK pathway. **Annals of dermatology**, v. 31, n. 1, p. 97-100, 2019.

KIM^b, Jihee et al. Investigation on the cutaneous change induced by face-lifting monodirectional barbed polydioxanone thread. **Dermatologic Surgery**, v. 43, n. 1, p. 74-80, 2017.

KIM^c, Chang Min et al. The efficacy of powdered polydioxanone in terms of collagen production compared with poly-L-lactic acid in a murine model. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 18, n. 6, p. 1893-1898, 2019.

KO, Hyun Ju et al. Multi-polydioxanone (PDO) scaffold for forehead wrinkle correction: a pilot study. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 18, n. 7, p. 405-408, 2016.

LIN, Jui-Yu; LIN, Chuan-Yuan. Adjusting thickness before injection: a new trend for preparing collagen-stimulating fillers. **Plastic and Reconstructive Surgery Global Open**, v. 9, n. 6, 2021.

MARTINS, Joana A. et al. Polydioxanone implants: a systematic review on safety and performance in patients. **Journal of biomaterials applications**, v. 34, n. 7, p. 902-916, 2020.

MOON, Hyoungjin et al. A review on the combined use of soft tissue filler, suspension threads, and botulinum toxin for facial rejuvenation. **Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery**, v. 14, n. 2, p. 147, 2021.

PALM, Melanie et al. A Randomized Study on PLLA Using Higher Dilution Volume and Immediate Use Following Reconstitution. **Journal of Drugs in Dermatology: JDD**, v. 20, n. 7, p. 760-766, 2021.

RAMOS-E-SILVA, Marcia; DA SILVA CARNEIRO, Sueli Coelho. Elderly skin and its rejuvenation: products and procedures for the aging skin. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 6, n. 1, p. 40-50, 2007.

RAY, Subarna; TA, Hang T. Investigating the Effect of Biomaterials Such as Poly-(L-Lactic Acid) Particles on Collagen Synthesis In Vitro: Method Is Matter. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 11, n. 3, p. 51, 2020.

TIP, TECH. ELISA technical guide and protocols. **Thermo Fisher Scientific Inc USA, Bartlesville, OK**, 2010.

WONG, Qi Yi Ambrose; CHEW, Fook Tim. Defining skin aging and its risk factors: A systematic review and meta-analysis. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2021.

YOON, Jung Hyun et al. Tissue changes over time after polydioxanone thread insertion: an animal study with pigs. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 18, n. 3, p. 885-891, 2019.

Artigo Científico

Os resultados obtidos com este estudo foram utilizados para elaboração do seguinte artigo:

“Avaliação in vitro da indução da síntese de colágeno em cultura de fibroblastos por ácido poli-L-lático e polidioxanona em pó”

Este artigo será submetido a publicação e será apresentado nas páginas seguintes.

AVALIAÇÃO IN VITRO DA INDUÇÃO DA SÍNTESE DE COLÁGENO EM CULTURA DE FIBROBLASTOS POR ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO E POLIDIOXANONA EM PÓ

In vitro evaluation of collagen synthesis induction in fibroblasts culture by poly-L-lactic acid and polydioxanone powder

Ermino José **Souza**^{1*}, José Ricardo de Albergaria **Barbosa**², Claudia **Herrera Tambeli**³ Carlos Amilcar **Parada**⁴ Celia Marisa **Rizzatti-Barbosa**⁵

¹Centro Universitário Ingá – Uningá, Maringá, PR, Brasil.

²Centro Universitário Ingá – Uningá, Maringá, PR, Brasil.

³Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas, SP, Brasil.

³Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas, SP, Brasil.

⁵Centro Universitário Ingá – Uningá, Maringá, PR, Brasil.

*Rua Efigênia Brasilina, n.º 30, Barreiro, Santa Efigênia de Minas/MG. E-mail: drerminosouza@gmail.com

RESUMO

Fundamentos: O envelhecimento da pele é acompanhado pela degradação do colágeno e das fibras elásticas, proteínas responsáveis pela resistência à tração e elasticidade da pele. A diminuição delas resulta em aumento da flacidez e enrugamento da pele. Alternativas minimamente invasivas como os bioestimuladores tem se destacado como forma de se retardar os efeitos do envelhecimento. A polidioxanona em pó, surge nesse cenário como uma alternativa eficaz e segura. Sua capacidade de induzir a produção de colágeno numa cultura de fibroblastos humanos foi comparada a do ácido poli-L-láctico (PLLA).

Objetivos: Verificar, in vitro, a capacidade de um pó de polidioxanona induzir a produção de colágeno em uma cultura de fibroblastos humanos e comparar os resultados com a indução promovida pelo pó de PLLA.

Materiais e Métodos: O estudo avaliou em cultura aderente de fibroblastos humanos a linhagem celular CCD-1072Sk (ATCC CRL-2088) fornecida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), se a adição de dois bioestimuladores ao meio de cultura - o Ácido poli-L-láctico-PLLA (Renova[®] elleva) e a polidioxanona-PDO em pó (UltraCol – Ultra-V[®] Medical) estimularia um aumento na produção de colágeno pelos fibroblastos.

Resultados: Os resultados mostraram um aumento significativo na produção de colágeno do momento 24h para o 48h nos quatro grupos analisados (C(S), PLLA(S), PDO(S) e PDO(S)*. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos que receberam bioestimulador (PDO ou PLLA) e os grupos controle.

Conclusão: Segundo os resultados que encontramos nenhum dos bioestimuladores influenciou positivamente a produção de colágeno.

Palavras-chave: Colágeno. Envelhecimento. Fibroblastos. PLLA. Polidioxanona.

Introdução

O envelhecimento da pele ocorre devido a diversos fatores intrínsecos e extrínsecos. Com o aumento da expectativa de vida, cresceu o interesse por encontrar formas de retardar os efeitos do envelhecimento na pele. WONG & CHEW (2021)¹ definiram o envelhecimento da pele como uma sobreposição de fenótipos benignos indicativos de alterações histológicas e morfológicas contínuas e inevitáveis, causadas por fatores intrínsecos, como as influências genéticas e cronológicas, e por fatores extrínsecos, como as influências ambientais. Estes autores relataram também que o envelhecimento da pele é acompanhado pela degradação do colágeno e das fibras elásticas na derme, afinamento da epiderme, comprometimento da função dos fibroblastos entre outras alterações e que essas mudanças prejudicam a integridade cutânea, a cicatrização de feridas, a função sensorial e imunológica.

Diferentes procedimentos são adotados no sentido de controlar a aparência envelhecida. Estes permeiam desde processos invasivos, como as cirurgias plásticas, até os minimamente invasivos, como a aplicação de implantes artificiais na hipoderme para promover estímulo à formação de colágeno. Os procedimentos cirúrgicos nem sempre são a opção mais viável para a correção estética de uma aparência envelhecida. Isto devido ao tempo requerido no procedimento e na recuperação pós-operatória, a necessidade de internação hospitalar e anestesia geral, ao alto custo, aos riscos envolvidos e à imprevisibilidade dos resultados. Isto tem favorecido a opção pelos procedimentos minimamente invasivos. A toxina botulínica, os volumizadores, os implantes com fios reabsorvíveis ou não, o ozônio, os agregados plaquetários, a fotobioestimulação, os bioestimuladores de colágeno, dentre outros, têm representado uma crescente parcela de procedimentos com a finalidade de controlar os sinais do envelhecimento. (RAMOS-E-SILVA, DA SILVA CARNEIRO 2007²; CHAUDHARY et al. 2020³; MOON et al. 2021⁴)

Entre as alternativas minimamente invasivas para se tentar retardar e minimizar os efeitos do envelhecimento da pele está o uso dos bioestimuladores de colágeno como a hidroxiapatita de cálcio, o ácido poli-L-láctico (PLLA) e os fios de polidioxanona (PDO). Estes estimulam a proliferação de fibroblastos na derme que irão se

encarregar da síntese de proteínas da matriz extracelular. A hidroxiapatita de cálcio e o PLLA são apresentados em forma de um pó que é misturado a um veículo para administração enquanto a PDO só está disponível no mercado até o momento na forma de fios, podendo ser lisos (mono, bi ou multifilamentar) em forma de espiral (mono e bifilamentar), formato de rede (fio Matrix®) ou farpados. Dentre estes procedimentos, a implantação dérmica de bioestimuladores de última geração parecem capazes de induzir a neocolagênese e tem tido grande aceitação e procura nos últimos anos. (de MELO et al. 2017⁵) Pelas suas características de bioestimulação podem ser indicados na prevenção do aspecto envelhecido da derme, para promover a formação de colágeno, para a reestruturação dos pilares e contornos da face, para reduzir a flacidez tecidual e para diminuir as cicatrizes.

Cerca de 48 implantes bioestimuladores foram aprovados pela FDA e aqueles compostos por hidroxiapatita de cálcio, poliamida, ácido poli láctico (PLLA) e policaprolactona (PCL) são frequentemente empregados com esta finalidade. (de ALMEIDA et al. 2019⁶; Kim 2019⁷; CHRISTEN; VERCESI, 2020⁸; de MELO et al. 2020⁹; LIN, LIN 2021¹⁰)

Atualmente, os implantes de polidioxanona (PDO) também tem sido estudados quanto à sua eficácia e segurança, demonstrando ser um material viável como indutor de colágeno em estudos com animais. MARTINS et al. (2020)¹¹. HA et al. (2021)¹², em estudo desenvolvido em animais que visava identificar as alterações histológicas e os mecanismos de absorção de fios de PDO e policaprolactona (PCL), concluíram que o fio de PDO estimula a proliferação de fibroblastos através do sistema de sinalização TGF- β . O estudo sugere que a transdução de sinal TGF- β leva à proliferação de fibroblastos, que estimula a formação de colágeno e a remodelação do tecido, e que uma maior área de superfície entre o fio e o tecido induz uma maior resposta tecidual, resultando em um aumento nas células inflamatórias, miofibroblastos e fibroblastos, fazendo com que o efeito de remodelação e rearranjo dos tecidos seja muito variável e dependente da forma do fio.

Como bioestimulador em pó, os compostos por PDO apresentam qualidade compatível ao de PLLA e PCL na resposta inflamatória e propriedade de formar colágeno. Demonstrou-se, no entanto, que este material apresenta melhor biodegradabilidade e uma substancial diminuição de aspereza na superfície da pele, quando aplicado em animais submetidos ao foto envelhecimento. (KWON, 2019)¹³

Courderot-Masuyer, et al. (2012)¹⁴ com o objetivo de avaliar as diferenças de comportamento funcional de fibroblastos humanos de rugas e fibroblastos envelhecidos de pele humana normal, investigaram em cultura de fibroblastos de linhagens celulares estabelecidas a partir de duas amostras de pele diferentes de cada uma de três plásticas femininas (uma de dentro de uma ruga facial e outra de pele envelhecida normal) o potencial do PLLA para compensar a redução da atividade metabólica, restaurar a capacidade de migração e inibir a produção de lactato nos fibroblastos das rugas e nos fibroblastos de pele normal envelhecida. Os autores observaram que O PLLA aumentou a síntese de colágeno I, restaurou a capacidade de migração e tendeu a diminuir a produção de lactato nos fibroblastos das rugas, enquanto somente estimulou a proliferação nos fibroblastos de pele envelhecida e tendeu a melhorar sua migração e concluíram que seus resultados sugerem que o PLLA de Sculptra® agiu como um estímulo para a produção de colágeno nos fibroblastos das rugas e que é adequado para corrigir depressões cutâneas, como as rugas.

Amuso et al. (2015)¹⁵ após realizarem em cinco pacientes um tratamento de bioestimulação com fios de PDO absorvível, tipo básico, avaliaram as biópsias da pele que foram realizadas pré-tratamento, aos 6 meses, 1 ano e 18 meses após o tratamento e demonstraram, por exame histológico, que a bioestimulação com fios de PDO durante os primeiros 12 meses pós-tratamento determinou uma neocolagênese e fibrinogênese que não foi induzida por transdução mecânica. O novo colágeno sintetizado foi sobretudo inespecífico e predominantemente do tipo I e que, quando a absorção dos fios foi completada, o efeito de estimulação também cessou, e aos 18 meses os autores observaram uma recuperação total com um leve aumento do colágeno fibroso tipo I.

Yoon et al. (2019)¹⁶ com o objetivo de determinar as causas das alterações nos tecidos, respostas fisiológicas e os resultados positivos após a injeção de fios de PDO, realizaram um experimento em que inseriram na pele dorsal de quatro de porcos pigmeus da variedade White Yucatan (3 meses de idade) na camada subcutânea paralelamente à pele em intervalos de 1cm, fios de PDO não farpados USP 4-0 de 9cm em uma agulha de 25G. Os autores removeram a pele e o tecido subcutâneo dos locais de inserção dos fios após 4 semanas, 12 semanas, 24 semanas e 48 semanas, prepararam e realizaram a análise histológica das amostras. Entre outros achados os

autores identificaram que a proliferação de fibroblastos ocorre entre 0 e 24 semanas e a relacionaram a um efeito de produção de colágeno que poderá durar mais de 48 semanas. Identificaram também um tecido conjuntivo fibroso recentemente desenvolvido e sua fusão com tecido conjuntivo fibroso existente, contração do tecido pela atividade dos miofibroblastos, aumento do tamanho do vaso capilar e redução da camada de gordura pela desnaturação das células de gordura.

Kim et al. (2019)¹⁷ compararam a resposta tecidual do ácido poli-L-lático (PLLA) com o da polidioxanona (PDO) em pó para avaliar se a polidioxanona poderia ser eficaz como estimulador de colágeno mesmo em pó, o que permitiria que ela fosse usada na forma injetável substituinte ao PLLA, e observaram que as injeções de PLLA e PDO em pó induziram reações granulomatosas e mostraram aumento de TGF- β e do colágeno tipo I e III 2 semanas após a injeção, mas que diminuíram 12 semanas após a injeção para ambos os produtos. Os autores relataram que os resultados do seu estudo sugeriram que o PDO em pó afeta o aumento do colágeno da mesma forma que o PLLA mostrando ser uma boa opção para formação de colágeno. Entretanto não investigaram qual tipo de colágeno foi formado.

Kim et al. (2019)¹⁸ concluíram em um trabalho cujo objetivo foi avaliar o efeito do PLLA (Sculptra®; Sanofi Aventis, Paris, França) na síntese de colágeno e as vias de sinalização relacionadas, em cultura de fibroblastos dérmicos da linhagem celular Hs68, que o PLLA atua diretamente nos fibroblastos dérmicos levando a um aumento significativo na expressão do gene do colágeno tipo I e na síntese de proteínas. Os autores utilizaram 5mL de água estéril que foram adicionados ao pó seco de Sculptra® e finalmente ajustados para concentração de 0,1% no meio de cultura e ainda ressaltaram que seus resultados forneceram a primeira evidência de que o PLLA estimula diretamente os fibroblastos dérmicos para aumentar a síntese de colágeno através da ativação das vias de sinalização P38, Akt e JNK, influenciando macrófagos adjacentes, que poderiam servir como um gatilho tardio da síntese de colágeno ou uma limitação da condição in vitro.

Ray & Ta, (2020)¹⁹ investigaram se nanopartículas de PLLA eram capazes de induzir o mesmo efeito de síntese de colágeno que micropartículas de Sculptra® in vitro em cultura de fibroblastos e observaram que as nanopartículas de PLLA não estimulam a produção de colágeno em monocultura de fibroblastos, mas que esse objetivo pode ser alcançado usando uma co-cultura de macrófagos/fibroblastos em

uma concentração de cerca de 100 µg/mL de PLLA testada in vitro. Os autores creditaram a produção de colágeno observada na co-cultura de macrófagos/fibroblastos a uma reação de corpo estranho em que macrófagos do meio ingeriram partículas de PLLA o que desencadeou a produção de uma citocina (TGFβ) que estimulou a produção de colágeno pelos fibroblastos.

Um sistema confiável para avaliar a tendência à formação de colágeno induzida por bioestimuladores pode ser conduzida através dos protocolos preconizados em cultura celular. Esta evoca técnicas que simulam as condições naturais, e envolve a distribuição e isolamento de células específicas a uma atividade fisiológica, com o objetivo de compreender os processos bioquímicos envolvidos nesta finalidade. Por se proliferarem rapidamente, a cultura de fibroblastos pode definir um indicativo apropriado para se considerar a formação de colágeno tecidual mediante a inserção de variáveis de estudo, uma vez que admite perceber qual é a tendência fisiológica destas células em resposta aos diferentes estímulos.

Os fibroblastos são células encontradas na derme e são responsáveis pela produção de colágeno e elastina, que são as principais fibras da matriz extracelular. O colágeno é responsável pela resistência à tração da pele e a elastina proporciona elasticidade à pele. A diminuição de ambas proteínas, com o avançar da idade, resulta em aumento da flacidez e enrugamento da pele. Assim, a neoformação de colágeno e elastina pode promover efeito rejuvenescedor na pele envelhecida. Já está bem documentado o efeito bioestimulador na pele através do estímulo da produção de colágeno por produtos como a hidroxiapatita de cálcio, a policaprolactona e o ácido poli-L-lático. A polidioxanona também pode promover neoformação de colágeno quando utilizada sob a forma de fio de implantação intradérmica, uma apresentação diferente das demais substâncias. A utilização da polidioxanona em pó, entretanto, representará uma alternativa eficaz e segura dentre os produtos já utilizados como alternativa minimamente invasiva para o rejuvenescimento facial.

Embora esta seja uma proposta importante para investigar a possibilidade de colagênese na pele mediante o estímulo por bioestimuladores, na literatura pesquisada, não se encontraram estudos visando comparar a colagênese promovida por bioestimuladores em pó compostos por PDO ou PLLA através de culturas de fibroblastos. Portanto, a proposta do presente estudo foi verificar, in vitro, a capacidade de um pó de polidioxanona induzir a produção de colágeno em uma

cultura de fibroblastos humanos e comparar os resultados com a indução promovida pelo pó de PLLA.

Materiais e Métodos

O presente estudo avaliou em cultura aderente de fibroblastos humanos, da linhagem celular CCD-1072Sk (ATCC CRL-2088) obtida do banco de células do Rio de Janeiro, se dois bioestimuladores em pó compostos por polidioxanona -PDO (UltraCol – Ultra-V[®] Medical) e por ácido poli-L-lático – PLLA (Renнова[®] elleva) estimulariam um aumento na produção de colágeno pelos fibroblastos, quando adicionados ao meio de cultura.

O cálculo amostral foi realizado baseando-se em um nível de significância alfa de 5% (0,05) e um beta de 20% (0,20) para atingir um poder de teste de 80% para detectar uma diferença mínima de 4 com desvio padrão de 2,94 para o colágeno ($\mu\text{g}/\text{milhões de células}$) segundo (COURDEROT-MASUYER et al.,2012) Desta forma, o cálculo amostral resultou que houve necessidade de 10 amostras.

Foi utilizada no experimento a linhagem celular CCD-1072Sk (ATCC CRL-2088) fornecida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem de fibroblastos normais da pele humana foi estabelecida a partir da pele de prepúcio de um recém-nascido do sexo masculino. As células foram cultivadas em frascos de 25cm² utilizando o meio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) constituído por 4 mM de L-glutamina, 4500 mg/L de glicose e 1500 mg/L de bicarbonato de sódio e soro fetal bovino para uma concentração final de 10%. Também foi utilizado 50 μL de penicilina-estreptomicina para cada 50mL de meio de cultura. As células foram incubadas em atmosfera e temperatura adequadas – umidade do ar a 95%; dióxido de carbono (CO₂) a 5% e temperatura a 37 °C. O meio de cultura foi substituído sempre a cada três dias, e a subcultura realizada sempre que os frascos atingiam confluência.

Foram utilizadas oito placas de cultura de 12 poços para a cultura das amostras de fibroblastos que foram utilizadas no experimento. Para a análise estatística dos resultados foram formados quatro grupos, C(S) (grupo controle negativo), PLLA(S) (grupo controle positivo com PLLA), PDO(S) (grupo teste com 0,1mg de PDO) e PDO(S)* (grupo teste com 0,033mg de PDO), sendo cada grupo constituído por uma

placa de 12 poços de cultura. Quatro placas foram identificadas como “Placas A” (que tiveram seu resultado analisado através do teste de ELISA após um período de 24 horas de incubação da cultura na presença dos bioestimuladores) e quatro placas foram identificadas como “Placas B” (que tiveram seu resultado analisado através do teste de ELISA após um período de 48 horas de incubação da cultura na presença dos bioestimuladores).

Para o plaqueamento das amostras que foram utilizadas no experimento, os frascos de cultura foram submetidos a tripsinização com o meio de cultura sendo removido e descartado dos frascos de cultura e a camada de células sendo enxaguada rapidamente com Tampão Fosfato Salino (PBS) sem cálcio e magnésio para remover todos os vestígios de soro que continha inibidor de tripsina. Foram adicionados 2,0 a 3,0 mL de solução de Tripsina-EDTA aos frascos, e as células foram observadas em um microscópio invertido até que a camada de células estivesse dispersa (geralmente em 5 a 15 minutos). Foram adicionados de 6,0 a 8,0 mL de meio de crescimento completo ao frasco e aspiradas as células, que foram então plaqueadas a uma densidade de 40×10^3 células por poço. As placas foram incubadas por 24 horas em atmosfera e temperatura adequadas – umidade do ar a 95%; dióxido de carbono (CO_2) a 5% e temperatura a 37°C .

Após esse período de 24 horas foi adicionado ao meio de cultura de cada poço das placas o pó bioestimulador. No grupo controle negativo C(S) não foi adicionado nenhum bioestimulador, no grupo controle positivo PLLA(S) 0,033mg/mL de PLLA, e no grupo teste PDO(S) 0,1mg/mL de PDO e no grupo teste PDO(S)* 0,033mg/mL de PDO. As “Placas A” foram incubadas por 24 horas e as “Placas B” incubadas por 48 horas. Após esse período o colágeno tipo I formado foi quantificado através do teste de ELISA.

O protocolo de preparo do pó de PLLA foi o indicado pelo fabricante do bioestimulador à base de ácido poli-L-lático Rennova® Elleva. Resumidamente, consistiu na diluição do conteúdo do frasco do produto em 16ml de água estéril para injeção. Após a adição da água o frasco foi agitado durante 10 minutos e logo em seguida foi deixado repousar por 1 hora para garantir a hidratação completa para que se obtivesse uma suspensão translúcida uniforme. Imediatamente antes do uso a suspensão foi novamente agitada de acordo com instruções do fabricante. O protocolo de preparo do pó de PDO também foi o indicado pelo fabricante do bioestimulador à

base de polidioxanona ULTRACOL 200. Resumidamente, consistiu na diluição do conteúdo do frasco do produto em 2mL de água para injeção estéril. Após a adição da água o frasco foi bem agitado para promover a mistura do ULTRACOL a água e a solução obtida foi deixada descansar por 3 horas antes do uso. Logo antes do uso a solução foi novamente agitada para uma melhor suspensão de acordo com o indicado pelo fabricante.

Após 24 horas de incubação, o meio de cultura da “Placa A” foi retirado e misturado a inibidores de protease (10mL de EDTA e 20kl/mL de aprotinina) para evitar a degradação das proteínas. Imediatamente após a coleta, o meio foi congelado e estocado a -80 °C até o seu uso para a avaliação quantitativa do colágeno. Após 48 horas, o mesmo procedimento foi realizado para a Placa B. Os níveis de colágeno tipo I foram quantificados de acordo com as instruções do fabricante do kit ELISA.

Resultados

A estatística descritiva foi utilizada para explorar e resumir os dados coletados. As variáveis foram apresentadas em média e desvio padrão (DP). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a normalidade dos dados. Para analisar o efeito do tempo em que foram analisadas as amostras (24h ou 48h) e do grupo (C(S), PLLA(S), PDO(S), PDO(S)* nas concentrações de colágeno, utilizamos o teste de Two-Way ANOVA. Para identificar as diferenças significativas entre os subgrupos, utilizamos o post-hoc de Tukey. Para interpretar a magnitude de efeito dos resultados encontrados, calculamos o *partial eta squared* (η^2) e consideramos valores até 0.1 como sem efeito, até 0.6 como efeito pequeno, até 0.14 como efeito médio e acima desse valor como efeito grande (Cohen, 1988)²⁰. O nível de significância de 0,05 foi adotado. Todas as análises foram realizadas no programa IBM SPSS Statistics 20.0.

A Tabela 1 e a Figura 1 apresentam a análise do colágeno em função dos momentos em que foram feitas as análises e do grupos. Encontramos um efeito significativo do tempo, no qual todas as amostras apresentaram um aumento significativo do colágeno das 24h para 48h. Não encontramos uma diferença significativa entre os grupos e nem de interação.

Tabela 2. Concentração do colágeno em função do momento de coleta, grupo e tipo de amostra.

Grupo	24h	48h	ANOVA Two-Way	F-value	p-value	np ²
C(S)	90740 (52457)	155401 (69717)*	Grupo	1,216	0,305	0,02
PLLA (S)	82512 (38337)	129344 (59221)*	Tempo	9,151	0,003	0,05
PDO (S)	76339 (44655)	141091 (60696)*	Grupo*Tempo	0,330	0,804	0,01
PDO (S)*	118930 (19189)	183781 (38363)*				

Legenda: dados apresentados em média (desvio padrão). * diferença estatisticamente significativa em relação ao momento 24h.

DISCUSSÃO

Esse estudo tem caráter inovador ao comparar a indução da produção de colágeno in vitro em cultura de fibroblastos após a estimulação das células por pó de polidioxanona (PDO) e pó de ácido poli-L-láctico (PLLA). Os resultados mostraram um aumento significativo na produção de colágeno do momento 24h para o 48h nos quatro grupos analisados (C(S), PLLA(S), PDO(S) e PDO(S)*. Entretanto, não encontramos diferenças significativas entre os grupos que receberam bioestimulador (PDO ou PLLA) e os grupos controle, indicando que o aumento de colágeno foi independente da presença dos bioestimuladores.

No nosso estudo utilizamos uma linhagem celular obtida a partir da pele do prepúcio de um recém-nascido saudável do sexo masculino, assim como nos estudos anteriores. Os estudos anteriores fizeram comparações desses bioestimuladores de forma isolada e apresentaram resultados contraditórios indicando a necessidade de mais investigações sobre esse tema. A discussão será desenvolvida para cada bioestimulador seguindo a literatura científica produzida até o momento.

Nosso estudo mostrou um aumento da produção de colágeno a partir da bioestimulação com PLLA nos grupos testes, mas de igual magnitude a apresentada pelo grupo controle. Esses resultados são contraditórios aos apresentados por Kim et al. (2019) que mostrou um aumento significativo da produção de colágeno utilizando o pó seco de PLLA na Linhagem de células de fibroblastos humanos (Hs68) do momento 24h para 48h em comparação ao grupo controle. Entretanto, algumas diferenças metodológicas podem explicar os resultados diferentes encontrados em relação ao nosso estudo.

Respostas de igual magnitude apresentadas pelo grupo controle e grupo teste com PLLA também foram encontradas em estudos anteriores. Courderot-Masuyer et al. (2012) utilizaram o pó seco de PLLA (Sculptra®) em culturas de fibroblastos estabelecidas a partir biopsias de rugas e da pele envelhecida normal de pacientes saudáveis submetidas a procedimento de cirurgia plástica, com o objetivo de verificar o potencial do PLLA para compensar a redução da atividade metabólica dos fibroblastos das rugas e observaram que o PLLA promoveu um aumento significativo da produção de colágeno nos fibroblastos de rugas em comparação com os fibroblastos de pele normal e em relação ao controle não exposto ao PLLA. Esse aumento foi verificado mesmo após 42 dias de cultura. Esses resultados indicam que talvez haja a necessidade de um maior tempo de cultura de células para encontrar uma diferença significativa de produção de colágeno entre os grupos.

Nosso estudo também comparou os efeitos bioestimuladores do PLLA e da PDO na produção de colágeno e não mostrou diferenças significativas entre os grupos. Poucas investigações foram realizadas até o momento com esse objetivo. Nesse sentido, vale citar o estudo de Kwon et al. (2018) que comparou os efeitos bioestimuladores da Polidioxanona-PDO (nome comercial: ULTRACOL. Ultra V Co., Ltd., Seul Coreia), do Ácido poli-L-láctico-PLLA (Sculptra®, Galderma Laboratories, Nestlé SA Suíça) e da Policaprolactona-PCL (Ellansé-M®, Sinclair Pharma, Irvine, CA), em ratos. Os autores mostraram que o preenchimento de PDO demonstrou neocolagênese e resposta inflamatória semelhantes aos outros bioestimuladores de colágeno utilizados no estudo. Os resultados apresentados por esse estudo e nossos achados com culturas de células sugerem um estímulo da produção de colágeno similar entre o PLLA e a PDO.

Nosso estudo também avançou com a literatura atual ao investigar duas concentrações distintas de PDO na produção de colágeno. Um grupo foi recebeu concentrações de 0,1mg/mL e o outro de 0,033mg/mL de PDO. Não encontramos diferenças significativas em relação à produção de colágeno nos dois grupos. A partir desses achados sugerimos que estudos futuros testem outras concentrações ou que realizem um protocolo por um período mais longo com o intuito de comparar os efeitos longitudinais das dosagens de 0,1mg/mL e 0,033mg/mL de PDO na produção de colágeno em cultura de fibroblastos.

Embora nosso trabalho tenha apresentado resultados interessantes em relação à produção de colágeno utilizando os biostimuladores em pó (PLLA e PDO), é

importante reconhecer as suas limitações. Primeiro, reconhecemos que nossos resultados são limitados ao período de 48h em que as células foram observadas. Sugerimos que estudos futuros testem esse protocolo utilizando períodos maiores de observação. Segundo que até onde sabemos o nosso trabalho foi provavelmente o primeiro a comparar os efeitos de duas concentrações distintas de pó de PDO na síntese de colágeno in vitro. Sugerimos que estudos futuros utilizem outras concentrações nos seus protocolos experimentais. Por fim, esses trabalhos também podem ser complementados com investigações sobre as vias de sinalização relacionadas aos mecanismos moleculares envolvidos na ação bioestimuladora tanto do pó de PDO quanto do pó de PLLA em cultura de células.

CONCLUSÃO

Houve um aumento significativo do colágeno de 24h para 48h em todos os grupos, sem, no entanto, haver diferença na síntese de colágeno entre eles. Segundo os resultados que encontramos nenhum dos bioestimuladores influenciou positivamente a produção de colágeno. Mais estudos são necessários e concentrações diferentes de ambos os bioestimuladores precisam ser definidas e testadas para que se chegue a uma concentração ideal para estímulo dos fibroblastos in vitro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WONG, Qi Yi Ambrose; CHEW, Fook Tim. Defining skin aging and its risk factors: A systematic review and meta-analysis. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2021.
2. RAMOS-E-SILVA, Marcia; DA SILVA CARNEIRO, Sueli Coelho. Elderly skin and its rejuvenation: products and procedures for the aging skin. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 6, n. 1, p. 40-50, 2007.
3. CHAUDHARY, Manupriya; KHAN, Azmi; GUPTA, Madhu. Skin ageing: Pathophysiology and current market treatment approaches. **Current Aging Science**, v. 13, n. 1, p. 22-30, 2020.
4. MOON, Hyoungjin et al. A review on the combined use of soft tissue filler, suspension threads, and botulinum toxin for facial rejuvenation. **Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery**, v. 14, n. 2, p. 147, 2021.

5. DE MELO, Francisco et al. Recommendations for volume augmentation and rejuvenation of the face and hands with the new generation polycaprolactone-based collagen stimulator (Ellansé®). **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 10, p. 431, 2017.
6. DE ALMEIDA, Ada Trindade et al. Consensus recommendations for the use of hyperdiluted calcium hydroxyapatite (Radiesse) as a face and body biostimulatory agent. **Plastic and Reconstructive Surgery Global Open**, v. 7, n. 3, 2019.
7. KIM, Jong Seo. Changes in dermal thickness in biopsy study of histologic findings after a single injection of polycaprolactone-based filler into the dermis. **Aesthetic surgery journal**, v. 39, n. 12, p. NP484-NP494, 2019.
8. CHRISTEN, Marie-Odile; VERCESI, Franco. Polycaprolactone: How a well-known and futuristic polymer has become an innovative collagen-stimulator in esthetics. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 13, p. 31, 2020.
9. DE MELO, Francisco et al. Minimally invasive aesthetic treatment of the face and neck using combinations of a PCL-based collagen stimulator, PLLA/PLGA suspension sutures, and cross-linked hyaluronic acid. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology**, v. 13, p. 333, 2020.
10. LIN, Jui-Yu; LIN, Chuan-Yuan. Adjusting thickness before injection: a new trend for preparing collagen-stimulating fillers. **Plastic and Reconstructive Surgery Global Open**, v. 9, n. 6, 2021.
11. MARTINS, Joana A. et al. Polydioxanone implants: a systematic review on safety and performance in patients. **Journal of biomaterials applications**, v. 34, n. 7, p. 902-916, 2020.
12. HA, Young In; KIM, Jun Hyun; PARK, Eun Soo. Histological and molecular biological analysis on the reaction of absorbable thread; Polydioxanone and polycaprolactone in rat model. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 21, n. 7, p. 2774-2782, 2022.
13. KWON, Tae-Rin et al. Biostimulatory effects of polydioxanone, poly-d, l lactic acid, and polycaprolactone fillers in mouse model. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 18, n. 4, p. 1002-1008, 2019.
14. COURDEROT-MASUYER, Carol et al. Evaluation of the behaviour of wrinkles fibroblasts and normal aged fibroblasts in the presence of poly-L-lactic acid. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 2, n. 1, p. 20-27, 2012.
15. AMUSO, Domenico et al. Histological evaluation of a biorevitalisation treatment with PDO wires. **Aesthetic Medicine**, v. 1, n. 3, p. 111-117, 2015.
16. YOON, Jung Hyun et al. Tissue changes over time after polydioxanone thread insertion: an animal study with pigs. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 18, n. 3, p. 885-891, 2019.

17. KIM, Chang Min et al. The efficacy of powdered polydioxanone in terms of collagen production compared with poly-L-lactic acid in a murine model. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 18, n. 6, p. 1893-1898, 2019.

18. KIM, Sung-Ae et al. Poly-L-lactic acid increases collagen gene expression and synthesis in cultured dermal fibroblast (Hs68) through the p38 MAPK pathway. **Annals of dermatology**, v. 31, n. 1, p. 97-100, 2019.

19. RAY, Subarna; TA, Hang T. Investigating the Effect of Biomaterials Such as Poly-(L-Lactic Acid) Particles on Collagen Synthesis In Vitro: Method Is Matter. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 11, n. 3, p. 51, 2020.

20. COHEN, J. (1988). **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences**. New York, NY: Routledge Academic.