



CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA DE MATERIAIS BIOESTIMULADORES DE COLÁGENO UTILIZADOS EM PROCEDIMENTOS DE HARMONIZAÇÃO FACIAL

Palavras-Chave: Colágeno. Microscopia eletrônica de varredura. Tamanho de partícula.

Autores(as):

Marina de Moraes Nobre, FOP - UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). Américo Bortolazzo Correr - Orientador, FOP – UNICAMP

May Anny Alves Fraga – Coorientadora, FOP - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O simples tratamento das rugas superficiais é insuficiente para restaurar a juventude facial (Luebberding et al., 2013), afinal, uma aparência natural e mais jovem depende da reversão do efeito cumulativo das mudanças relacionadas à idade, tanto na superfície, quanto nos tecidos mais profundos (Loghem et al., 2015). O foco na revitalização da forma e volume facial para restaurar o equilíbrio, simetria e as proporções de uma aparência mais jovem, levaram ao desenvolvimento e uso clínico mundial de uma lista de preenchedores dérmicos para este tratamento (Loghem et al., 2015). Os preenchedores injetáveis são parte importante dos tratamentos de rejuvenescimento facial atuais (Bass et al., 2015). Eles consistem em uma ampla gama de produtos que diferem significativamente em sua composição química, mecanismo de ação, duração, segurança e interação com os tecidos do paciente (Loghem et al., 2015).

Dentre eles, o preenchedor de hidroxiapatita de cálcio é um bioestimulador de colágeno bem estabelecido. Ele é biocompatível, biodegradável e reabsorvível contendo microesferas de hidroxiapatita que estimulam a produção endógena de colágeno (de Almeida et al., 2019). A composição desses preenchedores consiste em hidroxiapatita suspensa em um gel composto por água, glicerina e carboximetilcelulose de sódio (Bentkover 2009). O aumento de volume inicial é proporcionado pela presença do gel de carboximetilcelulose, (de Almeida AT et al., 2019) já as partículas de CaHa irão estimular a neocolagênese através de um mecanismo inflamatório, produzindo colágeno significativo para substituir o gel, que é absorvido nos primeiros 3 a 4 meses (Bass LS 2015).

A hidroxiapatita é o principal componente mineral dos ossos e dentes, é uma substância natural encontrada no corpo humano, sendo biocompatível, sem propriedades antigênicas, mutantes ou irritantes (Tansavatdi K et al., 2011), pode ser dívida em relação à sua atividade biológica em macroporosa e microporosa. (Berlin AL et al., 2008) Os macroporosos possuem estrutura altamente organizada com poros variando de 10 a 500µm, permitindo osseointegração e crescimento fibrovascular. Já os microporosos, utilizados no preenchedor dérmico, possuem partículas que variam de 20 a 45 µm com poros de 2 a 5 µm sendo pequenos demais para permitir a formação fibrovascular e de osso (Bentkover SH, 2009). O comportamento biológico dessas partículas também é afetado pelo tamanho da partícula e estrutura superficial (Laeschke K., 2004).

O tamanho das partículas é relevante nos quesitos fagocitose e migração (Laeschke K., 2004), formação nodular e granulomas (Kadouch JA., 2017). Não é desejável que as partículas migrem pelo corpo, seja por deslocamento mecânico ou dentro de uma célula, através de fagocitose. Nesse aspecto, é desejável que as partículas tenham tamanho superior a 20µm, já que partículas de tamanho entre 15 e 20µm são passíveis de fagocitose, permitindo deslocamento intracelular. Portanto, partículas presentes em biomateriais preenchedores devem apresentar tamanho entre 20 a 150 µm permitindo a degradação do material e impedindo o deslocamento por fagocitose (Laeschke K., 2004).

Com relação a estrutura superficial das partículas utilizadas para preenchimento, é importante que o material respeite demandas essenciais, entre elas, serem microesferas, ter superfície lisa e homogênea, além de estarem imersas em líquido altamente biocompatível. Uma superfície regular e esférica resultará em tecido fibroso com neocolagênese, sem inflamação crônica, enquanto uma superfície áspera e irregular resultará em reação de corpo estranho e com rápido ataque de macrófagos como resposta biológica a longo prazo (Laeschke K., 2004).

Desta forma, a caracterização estrutural e morfológica desses materiais é importante para prever o comportamento biológico in vivo.

METODOLOGIA:

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Radiesse, Rennova Diamond, HarmonyCa, Bioestimulador Victalab e Bioestimulador Optimus são os materiais que foram avaliados quanto a morfologia das partículas e estrutura cristalina.

EXTRAÇÃO DAS PARTÍCULAS

A separação das partículas de hidroxiapatita do material preenchedor foi realizada de acordo com o estudo de Torso et al. (2021).

Aproximadamente 1 g de material preenchedor foi misturado com 3 ml de água destilada, agitada em vortex (Phoenix, AP56) até sua homogeneização e posteriormente centrifugado (Excelsa baby I, modelo 206, FANEM, São Paulo, Brasil) a 10000 rpm por 1 min. Este procedimento foi repetido até que todo o conteúdo orgânico fosse dissolvido, como evidenciado pela clareza do fluido sobrenadante.

As partículas foram secas a 37 °C em estufa (FANEM São Paulo, Brasil) por 24 h.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As partículas de carga foram colocadas em *stubs* e revestidas com ouro (MED 010 Baltec) antes da observação no MEV.

Para caracterização morfológica das partículas de hidroxiapatita os espécimes foram examinados usando o MEV (tensão 15 kV, largura do feixe 25-30 nm, trabalho distância 10–15 mm) em ampliações de 100, 500 e 2500 vezes.

Três imagens representativas das diferentes ampliações foram obtidas para cada material e foram utilizadas para análise qualitativa e comparação do tamanho das partículas por um software de análise de imagens (ImageJ, 1.6.0_24, Institutos Nacionais de Saúde, Bethesda, MD, EUA).

MICROANÁLISE DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDX)

A geração de imagens de raios X por dispersão de energia (EDX) nos forneceu a composição elementar semi quantitativa da amostra com alta resolução espacial (~ 10 nm) em seções ultrafinas.

ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os espectros no infravermelho das amostras requeridas foram obtidos por reflectância total atenuada (ATR), utilizando-se um espectrômetro da marca Thermo, modelo Nicolet iS50 FT-IR, na região espectral de 4000-400 cm⁻¹, a 100 scans e resolução de 4 cm⁻¹. A aquisição dos dados foi realizada através do software OMNIC. Como pré-tratamento, as amostras foram secas a 40 °C por 24 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Este foi o primeiro estudo que caracterizou as partículas de diferentes materiais preenchedores a base de CaHA. Este possui diversas indicações por se tratar de um material biocompatível, biodegradável e reabsorvível, conferindo efeito volumizador e com propriedades de neocolagênese (de Almeida et al., 2019). Os materiais avaliados neste estudo apresentaram diferenças na morfologia de superfície, tamanho e forma.

Os bioestimuladores Radiesse e Victalab apresentaram partículas estritamente texturizadas, enquanto os bioestimuladores Rennova Diamond, HarmonyCa e Optimus revelaram partículas texturizadas e lisas. A análise da morfologia de superfície das partículas nos revela informações sobre o comportamento tecidual circundante, sendo um importante fator para a biocompatibilidade (Laeschke K., 2004). Neste sentido, partículas com morfologia de superfície texturizada promovem maior adesão de celular (Taylor, SR et al., 1983). Além disso, a morfologia de superfície também influencia na cinética de formação da cápsula fibrosa formada ao redor do material. Em 8 semanas, em superfície rugosa ocorre a diminuição da espessura da cápsula de colágeno associada à superfície, sendo uma redução 30% maior que quando comparado a superfície lisa (Taylor, SR et al., 1983).

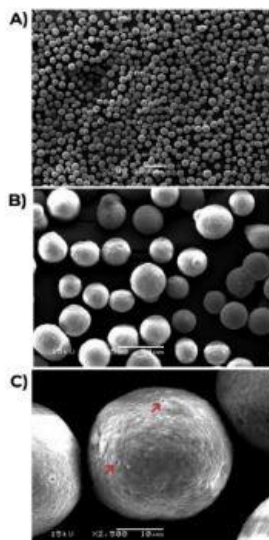


Figura 1. Material Radiesse. (A) Aumento de 100x. (B) Aumento de 500x. (C) Aumento de 2500x. Microporos (2 - 3 μ m) estão evidenciados com setas vermelhas.

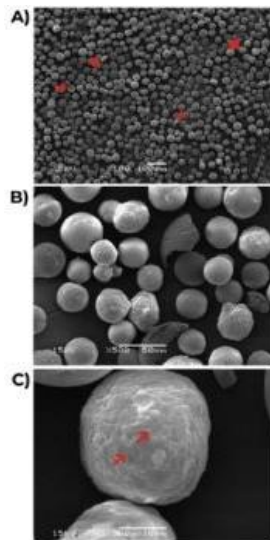


Figura 2. Material Rennova Diamond. (A) Aumento de 100x. Observa-se fragmentos de partículas em diversos formatos evidenciados por círculo vermelho, quadrado vermelho, seta vermelha e estrela vermelha. (B) Aumento de 500x. (C) Aumento de 2500x. Observa-se a presença de microporos (0,32 - 0,39 μ m) (setas

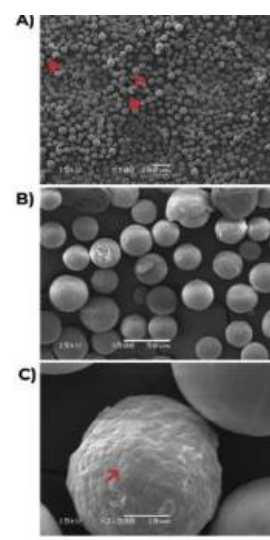


Figura 3. Material HarmonyCa. (A) Aumento de 100x. Observa-se fragmentos de partículas em diversos formatos evidenciados por seta vermelha, quadrado vermelho e círculo vermelho. (B) Aumento de 500x. (C) Aumento de 2500x. Observa-se a presença de microporos (0,32 - 0,44 μ m) (setas vermelhas).

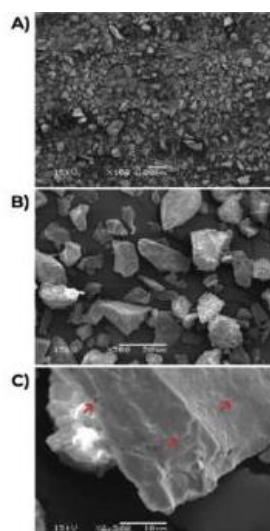


Figura 4 . Material Optimus. (A) Aumento de 100x. (B) Aumento de 500x. (C) Aumento de 2500x. Observa-se a presença de microporos (0,32 - 1,26 μ m) (setas vermelhas).

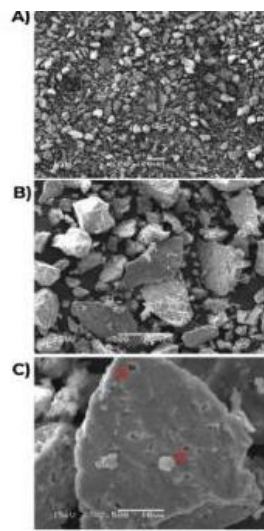


Figura 5. Material Victalab. (A) Aumento de 100x. (B) Aumento de 500x. (C) Aumento de 2500x. Observa-se a presença de microporos (1,46 - 2,17 μ m) (setas vermelhas).

O tamanho das partículas observadas em cada material variou de acordo com as amostras. Os bioestimuladores Radiesse e HarmonyCa foram os únicos que apresentaram partículas de tamanho dentro dos parâmetros de referência desejadas (partículas entre 20 - 150 μ m) com pico de predominância de partículas de 30 μ m em ambas amostras. Os outros bioestimuladores, Rennova Diamond, Victalab e Optimus não respeitaram as medidas desejadas, apresentando partículas de 12 μ m a 62 μ m, de 3 μ m a 93 μ m e de 4 μ m a 57 μ m, respectivamente, nem apresentaram padrão de distribuição. No gráfico abaixo é possível analisar a dispersão do tamanho das partículas (μ m) encontradas nos respectivos materiais.

O gráfico de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) nos evidenciou bandas características à hidroxiapatita em todas as amostras estudadas, sendo em 3639cm⁻¹ o pico referente ao grupamento OH (círculo preto) em 3565cm⁻¹ referente ao grupamento H₂O (seta preta), em 1455cm⁻¹ referente ao grupamento CO₃²⁻ (seta vermelha) e em 1039cm⁻¹ e 565cm⁻¹ referentes ao grupamento PO₄³⁻ (círculos vermelhos), como pode-se observar na figura 7.

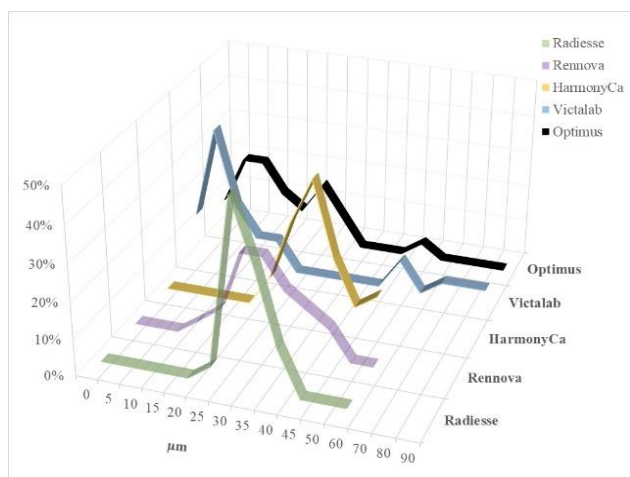


Figura 6. Gráfico de dispersão do tamanho das partículas (µm) encontradas nos respectivos materiais.

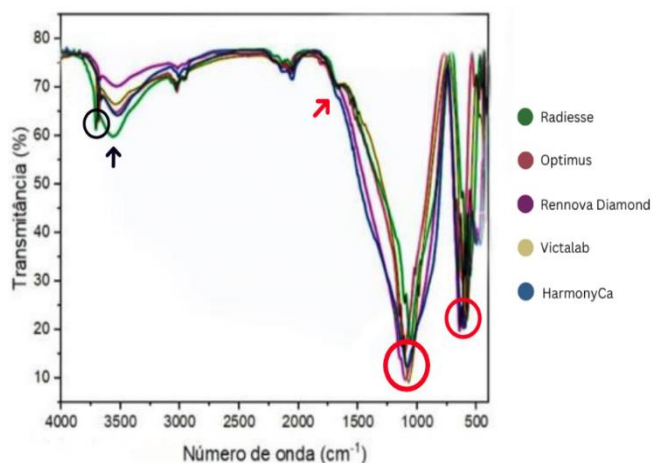


Figura 7: Gráfico referentes à espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier das amostras estudadas.

CONCLUSÃO:

Pode-se concluir que os bioestimuladores de colágeno estudados apresentam conteúdo inorgânico diferentes em termos de tamanho e morfologia, e semelhantes em composição, sendo a hidroxiapatita de cálcio.

BIBLIOGRAFIA

- Bass LS. **Injectable Filler Techniques for Facial Rejuvenation, Volumization, and Augmentation**. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2015 Nov;23(4):479-88. doi: 10.1016/j.fsc.2015.07.004
- Bentkover SH. **The biology of facial fillers**. *Facial Plast Surg*. 2009 May;25(2):73-85. doi: 10.1055/s-0029-1220646
- Berlin AL, Hussain M, Goldberg DJ. **Calcium hydroxylapatite filler for facial rejuvenation: a histologic and immunohistochemical analysis**. *Dermatol Surg*. 2008 Jun;34 Suppl 1:S64-7. doi: 10.1111/j.1524-4725.2008.34245.x
- Boehm LM, Morgan A, Hettinger P, Matloub HS. **Facial Aging: A Quantitative Analysis of Midface Volume Changes over 11 Years**. *Plast Reconstr Surg*. 2021 Feb 1;147(2):319-327. doi: 10.1097/PRS.00000000000007518
- Bunaciu AA, Udriştioiu EG, Aboul-Enein HY. **X-ray diffraction: instrumentation and applications**. *Crit Rev Anal Chem*. 2015;45(4):289-99. doi: 10.1080/10408347.2014.949616
- de Almeida AT, Figueredo V, da Cunha ALG, Casabona G, Costa de Faria JR, Alves EV, Sato M, Branco A, Guarnieri C, Palermo E. **Consensus Recommendations for the Use of Hyperdiluted Calcium Hydroxyapatite (Radiesse) as a Face and Body Biostimulatory Agent**. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2019 Mar 14;7(3):e2160. doi: 10.1097/GOX.00000000000002160
- Gomes, L.C., Di Lello, B.C., Campos, J.B., & Sampaio, M.. (2012). **Synthesis and characterization of calcium phosphates from chicken eggshell**. *Cerâmica*, 58(Cerâmica, 2012 58(348)). <https://doi.org/10.1590/S0366-69132012000400005>
- Havlik RJ; PSEF DATA Committee. **Hydroxyapatite**. *Plast Reconstr Surg*. 2002 Sep 15;110(4):1176-9. doi: 10.1097/01.PRS.0000020998.55126.10
- Hubbard W. **Injectable Calcium Hydroxylapatite Implants: Biocompatibility**. San Mateo. 2012.

- Kadouch JA. **Calcium hydroxylapatite: A review on safety and complications.** J Cosmet Dermatol. 2017 Jun;16(2):152-161. doi: 10.1111/jocd.12326
- Laeschke K. **Biocompatibility of microparticles into soft tissue fillers.** Semin Cutan Med Surg. 2004 Dec;23(4):214-7. doi: 10.1016/j.sder.2004.09.005
- Lemperle, G., Morhenn, V. B., Pestonjamas, V., & Gallo, R. L. (2004). **Migration Studies and Histology of Injectable Microspheres of Different Sizes in Mice.** Plastic and Reconstructive Surgery, 113(5), 1380–1390. doi:10.1097/01.prs.0000112764.22839.7a
- Liu MH, Beynet DP, Gharavi NM. **Overview of Deep Dermal Fillers.** Facial Plast Surg. 2019 Jun;35(3):224-229. doi: 10.1055/s-0039-1688843
- Loghem JV, Yutskovskaya YA, Philip Werschler W. **Calcium hydroxylapatite: over a decade of clinical experience.** J Clin Aesthet Dermatol. 2015 Jan;8(1):38-49
- Luebberding S, Alexiades-Armenakas M. **Facial volume augmentation in 2014: overview of different filler options.** J Drugs Dermatol. 2013 Dec;12(12):1339-44
- Misiek, D. J., Kent, J. N., & Carr, R. F. (1984). **Soft tissue responses to hydroxylapatite particles of different shapes.** Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 42(3), 150–160. doi:10.1016/s0278-2391(84)80025-7
- Neves, J. G., Navarro da Rocha, D., Lopes, C. C., Prado da Silva, M. H., Sinhoreti, M. A. C., Correr-Sobrinho, L., Fraga, M. A. A., & Correr, A. B.. (2021). **Effect of pH level and calcination on the production of calcium phosphates by acidic route of wet precipitation.** Cerâmica, 67(Cerâmica, 2021 67(382)), 236–243. doi: 10.1590/0366-69132021673822965
- Nicolau, Pierre J. M.D.. **Long-Lasting and Permanent Fillers: Biomaterial Influence over Host Tissue Response.** Plastic and Reconstructive Surgery 119(7):p 2271-2286, June 2007. | DOI: 10.1097/01.prs.0000260710.30934.a1
- S.M. Best, A.E. Porter, E.S. Thian, J. Huang, **Bioceramics: Past, present and for the future,** Journal of the European Ceramic Society, Volume 28, Issue 7, 2008, Pages 1319-1327, ISSN 0955-2219, <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2007.12.001>.
- Tansavatdi K, Mangat DS. **Calcium hydroxyapatite fillers.** Facial Plast Surg. 2011 Dec;27(6):510-6. doi: 10.1055/s-0031-1298783
- Taylor, S. R., & Gibbons, D. F. (1983). **Effect of surface texture on the soft tissue response to polymer implants.** Journal of Biomedical Materials Research, 17(2), 205–227. doi:10.1002/jbm.820170202
- Misiek, D. J., Kent, J. N., & Carr, R. F. (1984). **Soft tissue responses to hydroxylapatite particles of different shapes.** Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 42(3), 150–160. doi:10.1016/s0278-2391(84)80025-7