



PRISCILLA RUELES FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DO  
POTENCIAL BIOESTIMULADOR DE COLÁGENO  
DA HIDROXIAPATITA CARBONATADA EM  
FIBROBLASTOS HUMANOS DE PELE**

Duque de Caxias

2021



PRISCILLA RUELES FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DO POTENCIAL BIOESTIMULADOR  
DE COLÁGENO DA HIDROXIAPATITA CARBONATADA EM  
FIBROBLASTOS HUMANOS DE PELE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS), como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadores: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Sara Gemini Piperni  
Prof. Dr. Rômulo Sperduto Dezone

Duque de Caxias

2021

PRISCILLA RUELES FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DO POTENCIAL BIOESTIMULADOR  
DE COLÁGENO DA HIDROXIAPATITA CARBONATADA EM  
FIBROBLASTOS HUMANOS DE PELE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS), como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Ciências Biomédicas, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Sara Gemini Piperni e Dr. Rômulo Sperduto Dezone.

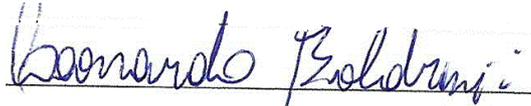
Aprovada em 21 de junho de 2021.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Cabral Bonfim – UFRJ



---

Prof. Dr. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira – INMETRO/BIOTRANS



---

Prof. Dr. Paulo André da Silva - UNIGRANRIO

**Duque de Caxias**

**2021**

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais, Fernando de Souza Figueiredo e Catharina Rueles Figueiredo, que não medem esforços para que eu consiga realizar todos os meus sonhos.

Pai, nunca esquecerei de um momento na vida aonde te comuniquei uma escolha que faria e você me escreveu “Estou contigo e não abro”, eu sempre soube da sua parceria, mas ali você se confirmava como meu maior apoiador.

Mãe, você deu sua vida pela família, vive por nós e para nós, só quem convive perto de você consegue ver que todos os seus passos são calculados pensando no nosso melhor, e eu sou muito grata a tudo que você faz por mim diariamente.

Dedico este trabalho também ao meu irmão Fernando Rueles Figueiredo e a minha cunhada Daniele Mesquita, que foi um presente em nossas vidas, sempre somando em todos os sentidos.

## **Agradecimentos**

Agradeço em primeiro lugar a minha orientadora Sara Gemini Piperni por todo zelo e comprometimento com o qual fui orientada durante o curso do mestrado, preciso dizer que poucas vezes vi alguém com tanto amor ao serviço que desempenha e essa característica sempre me transferiu confiança nos momentos de dificuldade.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Rômulo Sperduto Dezone que sempre se manteve firme, exigente e disponível durante a feitura do trabalho e os experimentos, isso foi imprescindível tanto para a criação do trabalho quanto para com meu comportamento na vida.

Jamais poderia deixar de fazer um agradecimento com muito carinho a minha amiga querida Lorayne Aguiar, que me auxiliou em todos os sentidos, inclusive emocionalmente.

A Ana Beatriz por todos os ensinamentos práticos no laboratório e todos os conselhos de trabalho e de vida.

A todos os colegas do grupo de pesquisa que auxiliaram nas pesquisas e nos treinamentos para as apresentações, certamente a ajuda de vocês contribuiu reduzindo a carga de toda essa trajetória.

E não posso deixar de agradecer a todos os docentes do programa e aos meus professores de todo o curso da minha vida, tudo que tenho e que sou profissionalmente, é graças a vocês, muito obrigada.

“Muitos são os obstinados que se empenham no caminho que escolheram, poucos os que se empenham no objetivo.”

**Friedrich Nietzsche**

## Resumo

A hidroxiapatita é um biomaterial amplamente utilizado na medicina estética como bioestimulador e preenchedor cutâneo, ocupando o terceiro lugar nos procedimentos estéticos não cirúrgicos realizados mundialmente. A Carbonato Hidroxiapatita (CHA) apresenta uma substituição de um grupo fosfato por um grupo carbonato aumentando a característica de solubilidade do biomaterial e consequentemente a sua biocompatibilidade em aplicações na área de medicina regenerativa óssea. Contudo, não existem dados relativos à utilização deste material em medicina estética. O presente estudo busca entender a citotoxicidade e o potencial bioestimulador de colágeno da CHA nanoestruturada em fibroblastos humanos. A CHA foi sintetizada por precipitação por via úmida em três diferentes temperaturas de síntese (5 °C, 37 °C e 90 °C) e caracterizada do ponto de vista físico-químico através das técnicas de: FTIR, DRX e MET, confirmando a eficiência da síntese. As CHA's apresentaram padrão de agregação semelhantes, porém, os tamanhos primários das partículas aumentaram de acordo com o aumento da temperatura de síntese. Todas as CHA's, após exposição ao meio de cultivo, foram capazes de adsorver proteínas oriundas do meio. A exposição, *in vitro*, durante 72h de fibroblastos humanos primários às diferentes CHA's nanoestruturadas, não resultou em citotoxicidade. Em adição, a exposição as CHA's 5 °C e 37 °C resultaram em aumento do número de células. Concluímos que as CHA's não apresentaram efeito citotóxico em fibroblastos de pele humana, tão pouco foram capazes de bioestimular colágeno nos tempos e condições testadas, mas proporcionaram um padrão de síntese de colágeno mais ordenado quando comparado com o controle.

**Palavras-chave:** Materiais nanoestruturados, Carbonato hidroxiapatita, materiais nanoestruturados, fibroblastos de pele e colágeno.

## Abstract

Hydroxyapatite is a biomaterial widely used in aesthetic medicine as a skin biostimulator and filler, occupying third place in non-surgical cosmetic procedures worldwide. Hydroxyapatite Carbonate (CHA) presents a phosphate group substitution with a carbonate group, increasing the solubility characteristic of the biomaterial and, consequently, its biocompatibility. Although this material is largely used in bone regenerative medicine, there are no data regarding the use of this material in aesthetic medicine. The present study seeks to understand the cytotoxicity and collagen biostimulating potential of nanostructured CHA in human fibroblasts. CHA was synthesized by wet precipitation at three different synthesis temperatures (5 °C, 37 °C and 90 °C) and characterized from the physicochemical point of view through the following techniques: FTIR, DRX and MET, confirming the efficiency of the synthesis. The CHA's showed similar aggregation pattern, however, the primary particle sizes increased as the synthesis temperature increased. After exposure to the culture medium, CHA's were able to adsorb proteins from the medium. No cytotoxicity was observed 72h in vitro exposure of primary human fibroblasts to different nanostructured CHAs. In addition, exposure to 5 °C and 37 °C CHA's resulted in increased cell numbers. We also observed by densitometry a significant decrease in collagen levels after CHAs exposition. We conclude that CHA's did not show cytotoxic effect on human skin fibroblasts, nor were they able to biostimulate collagen in the times and conditions tested, but provided a more ordered collagen synthesis pattern when compared to the control.

**Keywords:** Nanostructured materials, Hydroxyapatite carbonate, nanostructured materials, skin fibroblasts and collagen.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Resumo esquemático das estruturas da pele.....	21
<b>Figura 2.</b> O colapso dos fibroblastos.....	23
<b>Figura 3.</b> Histologia da pele jovem e da pele senil.....	24
<b>Figura 4.</b> Imagem histológica comparativa da pele jovem e senil.....	25
<b>Figura 5.</b> Mudanças clínicas relacionadas ao envelhecimento.....	26
<b>Figura 6.</b> Representação da coroa forte ( <i>hard</i> ) e coroa fraca ( <i>soft</i> ).....	32
<b>Figura 7.</b> Etapas da síntese da CHA.....	38
<b>Figura 8.</b> Fotografia do pó de CHA.....	43
<b>Figura 9.</b> Difratoograma de raio X das CHA's-H <sub>2</sub> O.....	44
<b>Figura 10.</b> Distribuição de tamanho do cristalito.....	45
<b>Figura 11.</b> Espectroscopia no infravermelho das CHAs 5°C, 37 °C e 90 °C.....	46
<b>Figura 12.</b> Difratoograma de raio X das CHA's-Meio.....	47
<b>Figura 13.</b> Espectroscopia no infravermelho das CHA's-H <sub>2</sub> O e Meio.....	48
<b>Figura 14.</b> Microscopia eletrônica de transmissão das CHA's-H <sub>2</sub> O e CHA's-Meio.....	49
<b>Figura 15.</b> Cultura de Fibroblastos humanos primários.....	50
<b>Figura 16.</b> Ensaio de viabilidade celular.....	51
<b>Figura 17.</b> Microscopia eletrônica de varredura da cultura de fibroblastos humanos.....	52
<b>Figura 18.</b> Avaliação de colágeno da matriz extracelular.....	53
<b>Figura 19.</b> Padrão da organização de colágeno da MEC.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH: Ácido Hialurônico

BSA: Soro Albumina Bovina

CBPF: Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas

CHA: Carbonato Hidroxiapatita

DMAB: Dimethylamino Benzaldehyde

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DRX: Difração de Raio X

ERO: Espécies reativas de oxigênio

FITC: Isotocianato de fluoresceína

FTIR: Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

HA: Hidroxiapatita

HC: Hidroxiapatita de Cálcio

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ISAPS: *International Society of Aesthetic Plastic Surgery*

MEC: Matriz extracelular

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MMP: Metaloproteinase de matriz

mtDNA: DNA mitocondrial mtDNA

NPs: Nanopartículas

PCL: Policaprolactona

PFA: Paraformaldeído

PI: Iodeto de Propídio

RL: Radicais livres

UEZO: Universidade Estadual da Zona Oeste

UNIGRANRIO: Universidade do Grande Rio

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	15
2.1 PELE.....	15
<b>2.1.1 Epiderme</b> .....	15
<b>2.1.2 Derme</b> .....	18
2.2 ENVELHECIMENTO DA PELE.....	21
<b>2.2.1 Mudanças histológicas relacionadas ao envelhecimento</b> .....	23
<b>2.2.2 Mudanças clínicas relacionadas ao envelhecimento</b> .....	26
2.3 HIDROXIAPATITA.....	27
<b>2.3.1 Carbonato hidroxiapatita</b> .....	28
<b>2.3.2 Métodos de síntese da hidroxiapatita</b> .....	28
2.4 MATERIAIS NANOPARTICULADOS E NANOESTRUTURADOS.....	30
2.5 BIOESTIMULADORES NA ESTÉTICA.....	33
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	36
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	37
4.1 OBJETIVOS GERAL.....	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>5. METODOLOGIA</b> .....	38
5.1 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA CARBONATADA NANOESTRUTURADA.....	38
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CARBONATO HIDROXIAPATITAS.....	39
5.3 DIFRAÇÃO DE RAIO X.....	39
5.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....	40
5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA TRANSMISSÃO.....	40
5.6 INTERAÇÃO DAS CHAS COM FIBROBLASTOS.....	40
<b>5.6.1 Extração de fibroblastos humanos primários</b> .....	40
<b>5.6.2 Ensaio de viabilidade celular (MTT)</b> .....	41

5.6.3 Microscopia Eletronica de Varredura.....	42
5.6.4 Avaliação da matriz de colágeno.....	42
5.6.5 Análises estatísticas.....	43
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
6.1 SÍNTESE DA CHA.....	44
6.2 CARACTERIZAÇÃO DA CHA EM H <sub>2</sub> O.....	44
<b>6.2.1 Análise do padrão cristalográfico das CHAS.....</b>	<b>44</b>
<b>6.2.2 Distribuição de tamanho do cristalito.....</b>	<b>46</b>
<b>6.2.3 Análise dos grupos funcionais característicos das CHA's.....</b>	<b>47</b>
6.3 CARACTERIZAÇÃO EM MEIO DE CULTIVO.....	47
<b>6.3.1 Difractograma de raio x das CHA's-Meio.....</b>	<b>47</b>
<b>6.3.2 Análise dos grupos funcionais das CHA's-Meio.....</b>	<b>48</b>
<b>6.3.3 Avaliação da morfologia das partículas de CHA em H<sub>2</sub>O e meio de cultivo.....</b>	<b>50</b>
6.4 ISOLAMENTO DE FIBROBLASTOS HUMANOS PRIMÁRIOS.....	51
6.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AS CHA'S 5 °C, 37 °C E 90 °C.....	51
6.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOESTIMULADOR.....	52
<b>6.6.1 Exposição das Carbonato Hidroxiapatitas as células...52</b>	<b>52</b>
<b>6.6.2 Avaliação da matriz de colágeno.....53</b>	<b>53</b>
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>8.1 Conclusão geral.....</b>	<b>64</b>
<b>8.2 Conclusões específicas.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica Estética (ISAPS, *Internacional Society of Aesthetic Plastic Surgery*) mostra em sua última pesquisa, realizada no ano de 2019, que os preenchimentos injetáveis a base de Hidroxiapatita (HA) ocuparam o oitavo lugar na lista dos procedimentos estéticos mais realizados no mundo. Dos 212,762 procedimentos mundiais que utilizam a HA como preenchedor cutâneo, o Brasil realizou um total de 29,694 de procedimentos utilizando HA, tendo este procedimento ocupado o terceiro lugar da lista de procedimentos injetáveis no Brasil (ISAPS, 2020). Em vista de sua eficiência, ampla funcionalidade e biocompatibilidade, a HA tem se tornado alvo de muitos estudos (PIRES et al., 2015).

Este biomaterial é amplamente utilizado na medicina regenerativa como importante substituto ósseo bioativo e osteocondutor tanto em implantes ortopédicos quanto dentários, no tratamento de tumores ósseos e também para ação prolongada de drogas anticancerígenas. Além disso, seu uso também se estende a remoção de metais pesados em águas e solos poluídos, e na medicina estética como preenchedor cutâneo (KUMTA et al., 2005).

Atualmente, os métodos de precipitação por via úmida são preferidos para a síntese de HA, em vista de ser de fácil execução, ter um custo relativamente baixo e permitir com que o produto produzido apresente características similares ao material presente no organismo. Contudo, é importante ressaltar que o processo de fabricação do biomaterial faz com que as propriedades da hidroxiapatita e suas características sejam distintas (RIGO et al., 2007).

Considerando a estrutura da HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , podem ser efetuadas substituições introduzindo íons como  $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{CO}_2^-$  respectivamente no lugar dos grupos fosfato e hidroxila, a fim de modificarem as características físico-químicas do próprio material. Particularmente, a introdução do grupo carbonato que pode substituir tanto o grupo hidroxila quanto o grupo fosfato, origina a carbonatação do tipo A e do tipo B, respectivamente. As hidroxiapatitas carbonatadas apresentam melhor solubilidade comparadas à HA não substituída, entre outras características. Na prática clínica a Carbonato Hidroxiapatita (CHA) é amplamente usada como substituto ósseo pelas

melhores características de biocompatibilidade, maior solubilidade e absorção (GUASTALDI et al., 2010).

Com o desenvolvimento nanotecnológico o ser humano está cada vez mais em contato com nanomateriais, sendo as três principais vias primárias de exposição a pele humana, trato respiratório, e o trato digestório (MARAMBIO-JONES C & HOEK E.M.V, 2010). Atualmente nanopartículas são aplicadas em diversas áreas tais como a área têxtil, cosmética, alimentar, mapeamento, diagnóstico e tratamento de doenças (TOMA HE, 2005). A literatura internacional evidencia a eficiência e segurança de nanoproductos para uso clínico na forma de nanopartículas (NPs) ou sistemas nanoestruturados. Tal eficiência e segurança dependem dos mecanismos de interação destes dispositivos com células e tecidos, pois esta interação ocorre pela incorporação no interior das células. O processo de internalização e de tráfego depende de características físico-químicas das NPs ou materiais nanoestruturados, tais como: tamanho e topografia de superfície; estequiometria e carga de superfície; associação com moléculas adsorvidas no trânsito celular e a solubilidade (SAHAY et al., 2010; JIANG et al., 2010). Assim, torna-se extremamente importante identificar os mecanismos de nanotoxicidade e biocompatibilidade desses nanomateriais, verificando os efeitos deletérios ou benéficos para saúde humana (LEE JS, 2004).

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 PELE**

A pele é o maior órgão humano, corresponde em média a 15% do peso corporal de um indivíduo. Este órgão é responsável pelo revestimento e delimitação do organismo, protegendo-o do meio exterior através de sua resistência e flexibilidade, além de ser dotado de capacidade renovadora e reparadora (FORE J, 2006). É um órgão cuja maior função é a conservação da homeostasia, através da termorregulação, controle hemodinâmico e a síntese e excreção de metabólitos (KANITAKIS, 2002). Suas funções se estendem a defesa de elementos físicos e químicos, e ainda como função da pele, atribui-se a capacidade de expressar a personalidade de cada indivíduo através da mímica facial (BOER M et al., 2016; MASAYUKI YAGI & YOSHIKAZU YONEI, 2018).

Os folhetos ectodérmico e mesodérmico são a origem embriológica da pele. O ectoderma diferencia-se em ectoderma cutâneo e neuroectoderma. O ectoderma cutâneo dá origem a epiderme e, está mais adiante a anexos cutâneos, como: pelos, unhas e glândulas sebáceas, sudoríparas e mamárias. O neuroectoderma origina o sistema nervoso central e os melanoblastos, a partir das células da crista neural (PAUL A.J et al., 2011). Estes últimos a partir do final do 3º trimestre se diferenciarão em melanócitos, células com importante função de síntese de melanina, um pigmento que confere a pele uma coloração variando de castanho a preto, de acordo com a quantidade deste pigmento (FORE J, 2006). A mesoderme forma o mesenquima, o qual originam os tecidos conjuntivos fibroelásticos (frouxos, densos e os tendões elásticos da musculatura mimica), os tecidos adiposos, as paredes dos vasos sanguíneos, a musculatura lisa e o músculo estriado cutâneo (PAUL A.J et al., 2011; MASAYUKI YAGI & YOSHIKAZU YONEI, 2018). A pele é composta por duas grandes camadas, a epiderme e a derme (FORE J, 2006).

#### **2.1.1 Epiderme**

A epiderme (camada mais externa), de origem ectodérmica, é um epitélio de revestimento estratificado pavimentoso queratinizado. As células deste epitélio têm alta capacidade de renovação devido a sua atividade mitótica

contínua. Este tecido apresenta duas populações celulares, são elas: queratinocítica e não queratinocítica. A população queratinocítica, consiste nos queratinócitos, células responsáveis pela síntese de queratina, proteína fibrosa e maleável, responsável pela impermeabilidade cutânea, que corresponde a cerca de 90% desta camada (FORE J, 2006).

A epiderme pode ser dividida em quatro ou cinco camadas, de acordo com a região onde se encontram e a função a essa associada. Palmas das mãos e plantas dos pés são denominadas como pele espessa e possuem cinco camadas enquanto as demais regiões do corpo possuem apenas quatro camadas, sendo elas (BOER M et al., 2016; BENITEZ MJ & MONTÁNS JF, 2017; MASAYUKI YAGI & YOSHIKAZU YONEI, 2018):

- Camada Basal: se encontra repousando sobre a membrana basal que separa a epiderme da derme. Esta camada, que também é conhecida como camada germinativa, é rica em células tronco e possui grande capacidade proliferativa, se renovando de 15 a 30 dias, de acordo com o local e a idade do indivíduo. As células desta camada possuem filamentos intermediários de queratina que se tornam mais numerosos a medida em que a célula vai maturando e chegando a superfície (KOLARSICK et al., 2011; BENITEZ MJ & MONTÁNS JF, 2017).
- Camada Espinhosa: camada denominada devido ao aspecto celular parecer emitir espinhos. Esse aspecto espinhoso é dado pelos desmossomas, junções celulares simétricas responsáveis pela grande coesão celular dos epitélios que conferem ao tecido resistência a grandes pressões e trações (KOLARSICK et al., 2011; BENITEZ MJ & MONTÁNS JF, 2017).
- Camada Granulosa: A camada granulosa possui células de tamanho superior às células da camada espinhosa. A principal função da camada granulosa se concentra nos “grânulos lamelares”. Estes grânulos se fundem a membrana plasmática e expulsam seu conteúdo para o espaço extracelular da camada granulosa. Neste local, há deposição de material lipídico formando uma barreira contra a penetração de substâncias exógenas e auxiliando também na impermeabilidade à água, impedindo a

desidratação (KOLARSICK et al., 2011; BENITEZ MJ & MONTÁNS JF, 2017).

- Camada Lúcida: a camada lúcida se torna mais evidente na pele espessa. Sua função se assemelha a da camada granulosa. Esta camada serve de barreira entre o meio externo e interno, impedindo a saída de água e a entrada de substâncias do meio externo para o meio interno (KOLARSICK et al., 2011; BENITEZ MJ & MONTÁNS JF, 2017).
- Camada Córnea: é a camada mais externa da pele. Possui espessura variável e é constituída por células achatadas, e anucleadas (KOLARSICK et al., 2011). Estas células são demasiadamente maiores que os queratinócitos basais, porém continuam unidas por desmossomas, com exceção das células mais superficiais que por não estarem mais unidas por desmossomas se desprendem, descamando. O estrato córneo é composto de queratina e lipídios produzidos pelos queratinócitos (BOER M et al., 2016; BENITEZ MJ & MONTÁNS JF, 2017; MASAYUKI YAGI & YOSHIKAZU YONEI, 2018).

A população não queratinocita compreende outros três tipos celulares: Células de Langerhans, Merkel e os melanócitos (**Figura 1**) (KANITAKIS, 2002; BENITEZ MJ & MONTÁNS JF, 2017; MASAYUKI YAGI & YOSHIKAZU YONEI, 2018).

- Melanócitos: células que produzem melanina, um pigmento de cor marrom-escuro. Estas células se originam das cristas neurais do embrião e adentram a pele entre a 12ª e 14ª semana da vida uterina. São encontrados entre os queratinócitos da camada basal da epiderme. Uma vez formados nos melanócitos, os grânulos de melanina migram pelos prolongamentos dos melanócitos até serem injetados no citoplasma dos queratinócitos, onde ficam depositados. Nas células epiteliais, estes grânulos se localizam em posição supranuclear e esta posição confere proteção ao material genético (Ácido Desoxirribonucleico - DNA), contra os efeitos da radiação solar (KANITAKIS J, 2002; KOLARSICK et al., 2011).
- Células de Langerhans: são células dendríticas que estão inseridas na epiderme em um número aproximadamente idêntico ao dos melanócitos,

porém, também podem ser encontradas em algumas mucosas e gânglios. Estas células se originam na medula óssea e se assemelham aos macrófagos quanto a sua capacidade de fagocitar, tendo por isso, grande importância imunológica. Em processos alérgicos de contato, as células de Langerhans tem a capacidade de apresentar o antígeno aos linfócitos T, a fim de desencadear a resposta imunológica contra o agente agressor. As células de Langerhans possuem receptores de superfície para os receptores opsônicos, Fc e componente do complemento C3, participando em diversos processos patológicos como micose fungóide, histiocitoses, dentre outros (KANITAKIS J, 2002; KOLARSICK et al., 2011).

- Células de Merkel: as células de Merkel são células dendríticas que se apresentam em maior número nas palmas e nas plantas dos pés. Residem na base dos cones epidérmicos e estão em contato direto com fibras nervosas da derme. Estão relacionadas a função sensorial, e funcionam como mecanorreceptores, estando em contato frequente com axônios sensoriais dérmicos com os quais eles formam junções sinápticas (KANITAKIS J, 2002; FORE J, 2006; KOLARSICK et al, 2011).

### 2.1.2 Derme

Derivada do mesoderma, a derme é o tecido conjuntivo que se encontra abaixo da epiderme e acima da hipoderme. Este tecido é formado por fibras de colágeno e elásticas e outros componentes da matriz extracelular, ambos produtos produzidos pelos fibroblastos (**Figura 1**) (FORE J, 2006; MASAYUKI YAGI & YOSHIKAZU YONEI, 2018).

Os fibroblastos exibem morfologia clássica em forma de fuso com potencial para polaridade planar (DARBY IA et al, 2014). Em tecidos normais, os fibroblastos são geralmente células únicas presentes no espaço intersticial ou em alguns casos perto de um capilar, sem qualquer associação com uma membrana basal, estão incorporados diretamente no interstício fibrilar da matriz extracelular (MEC) (KALLURI R, 2016). Os fibroblastos são conhecidos por sua plasticidade, pois adipócitos e pericitos podem se diferenciar em fibroblastos (TRACY LE et al, 2016).

Estas células são geralmente consideradas com atividade metabólica muito baixa. (KALLURI R, 2016; DARBY IA et al, 2014). Os fibroblastos são um grupo diversificado de células, que podem apresentar uma grande variedade de funções. Dentro do tegumento, os fibroblastos dérmicos em diferentes porções da derme, desempenham papéis diferentes. A linhagem localizada superficialmente envolve a formação do folículo piloso e é responsável pela reepitelização durante a cicatrização; a linhagem mais profunda é responsável pela geração de MEC (DESJARDINS-PARK HE et al, 2018). Os fibroblastos podem regenerar o tecido funcional. Eles têm envolvimento em todos os três estágios da cicatrização de feridas: inflamação, proliferação celular, deposição de MEC e remodelação (TRACY LE et al, 2016).

O tipo de célula mais comum do tecido conjuntivo, são os fibroblastos. Dentro do citoplasma dos fibroblastos há uma abundância de retículo endoplasmático rugoso e um grande aparelho de Golgi. Essas células sintetizam e reorganizam a MEC encontrada na pele, pulmão, coração, rim, fígado, olho e outros órgãos. Essas células produzem um grupo diversificado de produtos, incluindo: proteoglicanos, elastina, fibronectina, lamininas, glicosaminoglicanos, metaloproteinases, até prostaglandinas e colágeno tipo I, III e IV, (DARBY IA et al, 2014).

A derme é composta majoritariamente por fibras de colágeno, uma proteína estrutural responsável por conferir resistência e elasticidade a este tecido. A matriz extracelular da derme é composta principalmente de colágeno do tipo I. Porém, também são encontrados em menor quantidade o colágeno tipo III, a elastina, proteoglicanos e fibronectina (MASAYUKI YAGI & YOSHIKAZU YONEI 2018; FISHER et al., 1996).

O colágeno do tipo I é sintetizado pelos fibroblastos como um precursor solúvel, o pró-colágeno do tipo I sendo, posteriormente, processado proteoliticamente para formar fibras de colágeno insolúveis (FISHER et al., 2000). O colágeno é responsável por 98% da massa total da derme seca. Do ponto de vista ultraestrutural, as fibras de colágeno têm um diâmetro de 100 nm e mostram em seção longitudinal um estriado cruzado característico com periodicidade de 64 nm. Essas fibras estão dispostas em feixes que estão soltos na derme papilar e tornam-se mais espessas na derme reticular. Outros tipos de

colágenos encontrados na derme incluem colágeno tipo IV e colágeno tipo VII (KANITAKIS J, 2002; BENITEZ MJ & MONTÁNS JF, 2017).

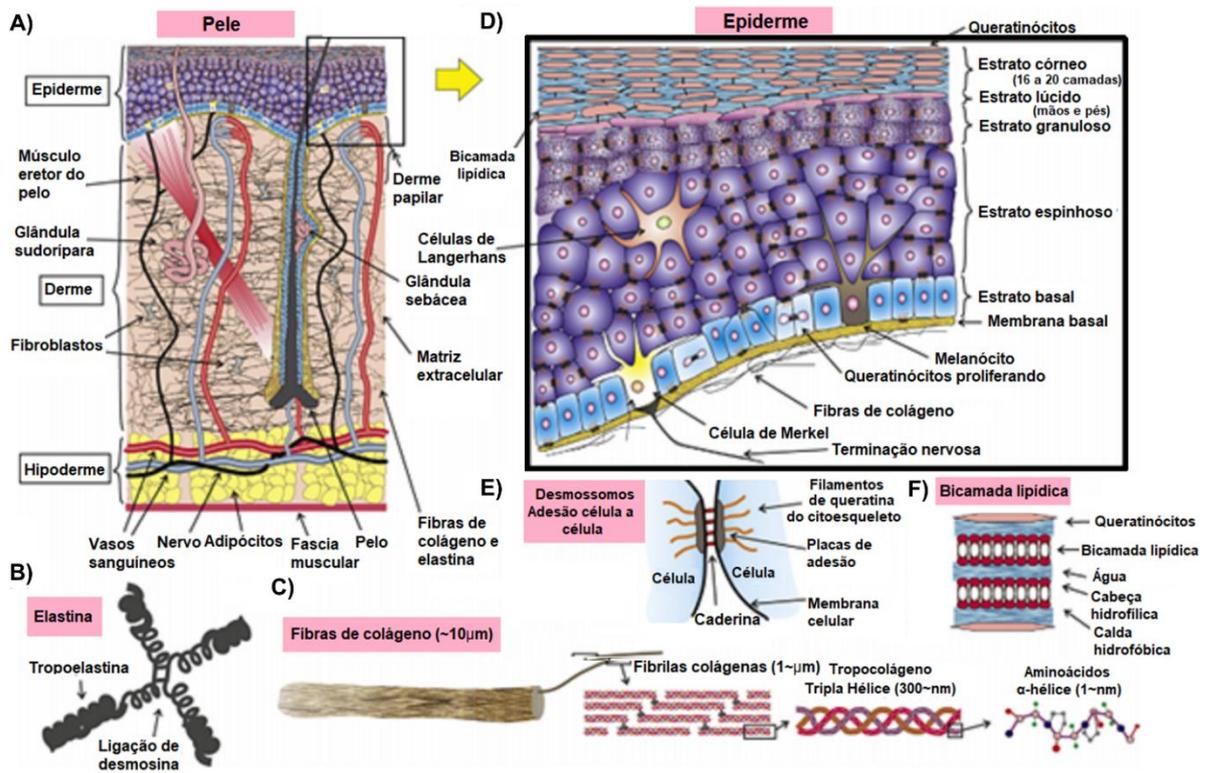
As fibras elásticas são formadas pela elastina, e correspondem a aproximadamente 4% do peso seco e cerca de 1-2% da derme. A elastina é a proteína mais resistente no corpo humano, sendo ela a responsável pela elasticidade tecidual (BENITEZ MJ & MONTÁNS JF, 2017).

A derme possui sua espessura variável e, na região de contato com a epiderme, se apresenta de forma irregular. Estas irregularidades formam saliências denominadas, “papilas dérmicas”. As papilas dérmicas são responsáveis pelo aumento da área de contato entre a derme e a epiderme, o que faz com que esses tecidos fiquem fortemente ligados. Na derme existem duas regiões com delimitações imprecisas, entre as mesmas, são elas (KANITAKIS J, 2002; KOLARSICK et al., 2011): a região papilar e reticular.

Região papilar é camada mais externa que se encontra abaixo da epiderme de forma contínua com as papilas dérmicas. É compreendida por tecido conjuntivo frouxo, com fibras elásticas e de colágeno responsáveis pela aderência da derme a epiderme. Nesta região, são encontrados pequenos vasos com a função de nutrir e oxigenar a epiderme, que é avascular (KOLARSICK et al., 2011; BENITEZ MJ & MONTÁNS JF, 2017).

Região reticular é camada mais profunda, composta por tecido conjuntivo denso, feixes calibrosos de fibras elásticas e de colágeno, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, folículos pilosos e glândulas sebáceas e sudoríparas (KOLARSICK et al., 2011; BENITEZ MJ & MONTÁNS JF, 2017).

**Figura 1.** Resumo esquemático das estruturas da pele.



**(A)** Esquema representando a pele subdividida em: epiderme, derme (presença de fibroblastos e matriz extracelular) e hipoderme (camada de tecido adiposo, povoada majoritariamente por adipócitos, célula cuja função principal é o armazenamento de triglicerídios). Esta camada é composta de tecido conjuntivo frouxo e outras funções com: unir de maneira pouco firme a derme aos órgãos subjacentes, conferir ao corpo: forma, reserva energética e isolante térmico). Além das camadas da pele, também estão representados os anexos cutâneos (pelos, unhas, glândulas sudoríparas e sebáceas). **(B)** Representação da elastina, proteína de MEC da derme. **(C)** Desenho esquemático das fibras de colágeno (proteína da MEC da derme) e sua conformação estrutural em hélice. **(D)** Esquema da epiderme, suas subdivisões em camadas que se especializam a partir da camada basal e a população residente desta camada (Queratinócitos, Células de Merkel, Células de Langerhans e Melanócitos). **(E)** Junções que mantêm as células da epiderme bem unidas, fazendo com que esta camada atue como uma importante barreira imunológica. **(F)** Representação da bicamada de fosfolípidios das membranas celulares, fazendo com que as mesmas possam fazer contato com a água extracelular e intracelular. Fonte: Adaptado de Benítez JM & Montáns FJ, 2017.

## 2.2 ENVELHECIMENTO DA PELE

A pele humana, assim como todos os outros órgãos, sofre envelhecimento cronológico, porém ao contrário de outros órgãos, a pele está em contato direto com o ambiente e, portanto, sofre também com o envelhecimento gerado através de danos ambientais (FISHER et al., 2002; FORE J, 2006).

O envelhecimento da pele é dividido em dois tipos, o intrínseco (cronológico) e o extrínseco. O envelhecimento intrínseco diz respeito à passagem do tempo. O envelhecimento extrínseco é causado por fatores externos como a poluição do ar, sabonetes agressivos, tratamentos cosméticos

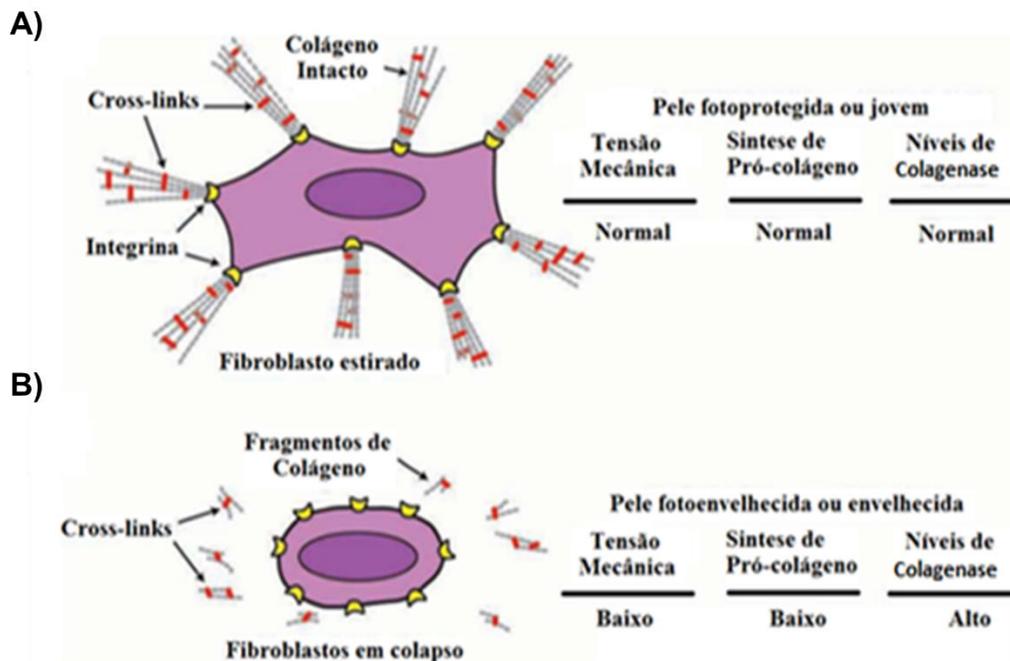
inadequados, doenças e a radiação solar ultravioleta (UV) (FORE J, 2006; FARAGE MA, 2008).

As causas para o envelhecimento interno, são diversas, dentre elas temos: a glicação, a senescência celular, caracterizada pelo encurtamento dos telômeros, comunicação intracelular alterada, instabilidade genômica, degradação da MEC, autofagia, a senescência celular e os radicais livres (RL) (KAMMEYER A & LUITEN RM, 2015). Acredita-se que a causa que mais contribui para o envelhecimento intrínseco sejam os RL provenientes da molécula de oxigênio, denominados como espécies reativas de oxigênio. As espécies reativas de oxigênio são formadas a partir de moléculas de oxigênio que perderam um elétron, se tornaram instáveis e na busca por estabilidade roubam elétrons de outras moléculas estáveis causando a formação de mais RL, radicais estes que são responsáveis por lesões dos componentes celulares. O colágeno é uma proteína altamente susceptível a ação dos RL e a destruição dela auxilia na promoção do envelhecimento da pele (FISHER et al., 2008). Esta causa é dita como a principal, em vista da mesma contribuir para a formação de quase todas as outras que foram mencionadas anteriormente (KAMMEYER A E LUITEN RM., 2015).

O envelhecimento cronológico da pele, clinicamente, é caracterizado por flacidez e rugas finas, além do desenvolvimento de lesões benignas, como queratoses e angiomas seborreicos, mas não está associado ao aumento da pigmentação ou às rugas profundas como as que caracterizam o fotoenvelhecimento (HELFRICH YR et al., 2008).

Os fatores externos que contribuem para o envelhecimento cutâneo também são diversos, porém o maior contribuinte é a radiação solar UV. A exposição crônica à radiação UV perturba a arquitetura normal da pele e provoca o fotoenvelhecimento e o câncer de pele (BERNEBURG et al., 2000; SACHS DL, et al., 2019) (Figura 2).

**Figura 2.** O colapso dos fibroblastos



A ação da tensão mecânica na produção de colágeno. (a) Na pele humana fotoprotetida ou jovens as fibras dérmicas de colágeno fornecem sítios estáveis de ligação para os fibroblastos. Os receptores (integrinas) na superfície dos fibroblastos se unem ao colágeno. Integrinas conectadas ao citoesqueleto dos fibroblastos puxam a matriz do colágeno, que por sua vez oferece resistência mecânica. Essa tensão mecânica promove o estiramento dos fibroblastos. Este estiramento é necessário para que os fibroblastos produzam níveis normais de colágeno e MMPs. (b) Na pele humana fotodanificada ou envelhecida, a ligação dos fibroblastos com as integrinas são perdidas, e as fibras de colágeno fragmentadas deixam de fornecer estabilidade mecânica suficiente para manter a tensão mecânica normal. A redução da tensão mecânica faz com que os fibroblastos entrem em colapso, produzindo menos pró-colágeno e mais colagenase. Fonte: Adaptado de Fisher et al., 2008.

### 2.2.1 Mudanças histológicas relacionadas ao envelhecimento

O envelhecimento tanto cronológico quanto extrínseco ocasiona diversas modificações na anatomia da pele. A epiderme se torna mais fina com o envelhecimento, principalmente devido a uma retração dos cones epidérmicos. A altura vertical dos queratinócitos diminui, a área da superfície dos corneócitos aumenta, a adesão dos queratinócitos diminui e a taxa de renovação epidérmica geralmente diminui. A atividade mitótica na camada basal é reduzida e o tempo de trânsito da camada basal para o estrato córneo é aumentado. (KLIGMAN AM, 1979; GUINOT C et al., 2002; NEERKEN S et al., 2004)

Os queratinócitos senescentes tornam-se resistentes à apoptose e podem sobreviver o tempo suficiente para acumular danos ao DNA e às

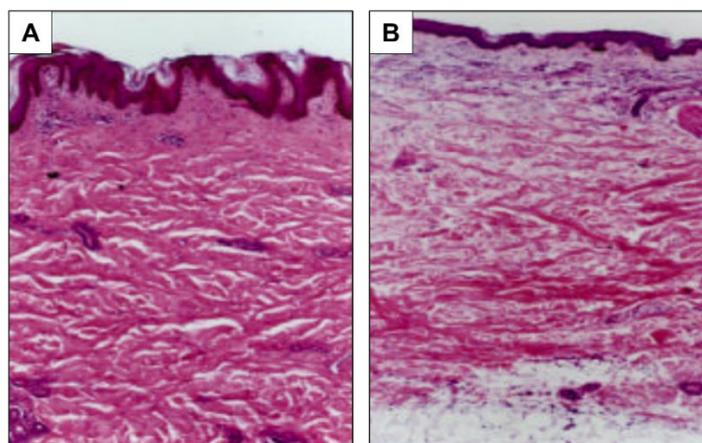
proteínas, podendo culminar em câncer de pele. Aos 80 anos, as células de Langerhans reduzem em 50% sua quantidade e este número fica maior ainda em áreas expostas ao sol (GILCHREST BA et al., 1982).

Os melanócitos diminuem de 8% a 20% a cada década após os 30 anos de idade. A perda de melanócitos é menor em áreas expostas ao sol, mas estas células são funcionalmente comprometidas e espaçadas irregularmente, produzindo uma pigmentação irregular na exposição ao sol (GIBSON SJ, 2004)

As alterações nos nervos cutâneos levam a uma função de alerta precoce prejudicada da dor, com um aumento no limiar da dor e uma mudança generalizada com a queda das terminações nervosas das vias nociceptivas do sistema nervoso central (BESNÉ I et al, 2002).

Os cones epidérmicos se achatam e as papilas dérmicas subjacentes suavizam, produzindo um achatamento da junção dérmico-epidérmica (**Figura 3**) (HUMBERT P et al., 2005). O número de alças capilares que se projetam do plexo subpapilar também diminui com a idade (LI L et al., 2006). Os pericitos dos capilares que sustentam, estabilizam e ajudam a regular o fluxo sanguíneo capilar, diminuem progressivamente com a idade. O papel de suporte da derme à epiderme no que diz respeito à nutrição, suporte estrutural, vascular e reparo quando lesado é prejudicado (HELMBOLD P et al., 2006).

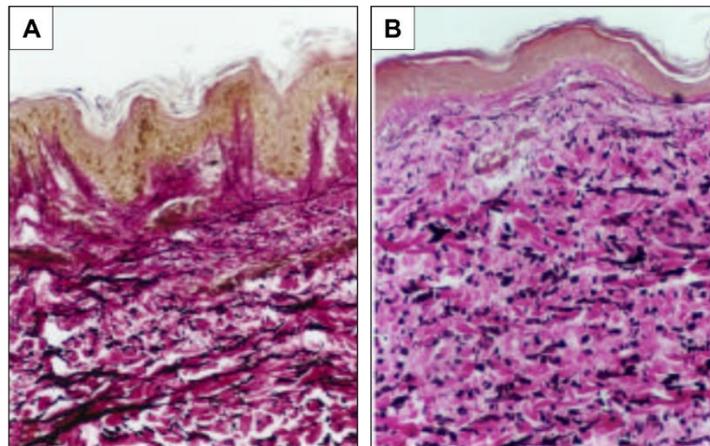
**Figura 3.** Histologia da pele jovem e da pele senil



Avaliações histológicas da pele jovem (**A**) e de idoso (**B**), corados por H&E, com aumento x100. A membrana basal apareceu mais bem definida na pele senil. No grupo senil, os feixes colágenos estavam menos compactados na região média da derme, e as fibras pareciam mais dispersas, refletindo a redução da densidade de fibras colágena. Fonte: Oria RB et al, 2003.

As alterações dérmicas são bastante significativas, tanto nos componentes celulares quanto na matriz celular. A derme se afina. As alterações senescentes dos fibroblastos incluem um aumento na expressão das metaloproteinases de matriz e uma diminuição de seus inibidores (FISHER et al., 2008). O número de fibroblastos e sua capacidade funcional diminuem (GHERSETICH K et al., 1994). A síntese de colágeno diminui e com isso a matriz dérmica diminui. A derme perde turgor, tanto pela perda do conteúdo fibroso quanto pela redução de glicosaminoglicanos, especialmente ácido hialurônico e sulfato de dermatano (PASQUALI-RONCHETTI I & BACCARANI-CONTRI M, 1997). A desorganização das fibras de colágeno e orientação aleatória, espessamento e fragmentação de colágeno levam a uma desorganização dérmica (FISHER et al, 2008). As fibras elásticas sofrem alterações estruturais e composicionais irreversíveis que progridem com a idade, levando a uma substituição das fibras por elastina amorfa com baixa atividade funcional (**Figura 4**) (RITTIÉ L & FISHER GJ, 2015).

**Figura 4.** Imagem histológica comparativa da pele jovem e senil



Avaliações histológicas da pele jovem (**A**) e de idoso (**B**), corados por H&E e Tricromico de Van Gieson com aumento x100. As imagens comparativas demonstram acentuada redução da espessura da epiderme na pele senil envelhecimento e redução da acidofilia na derme média, refletindo a redução da densidade de fibras colágenas. Pode se observar a fragmentação das fibras elásticas ao longo da derme com o envelhecimento. Na derme superficial, o aparelho elástico perdeu quase completamente sua disposição vertical na pele senil. Fonte: Oria RB et al., 2003.

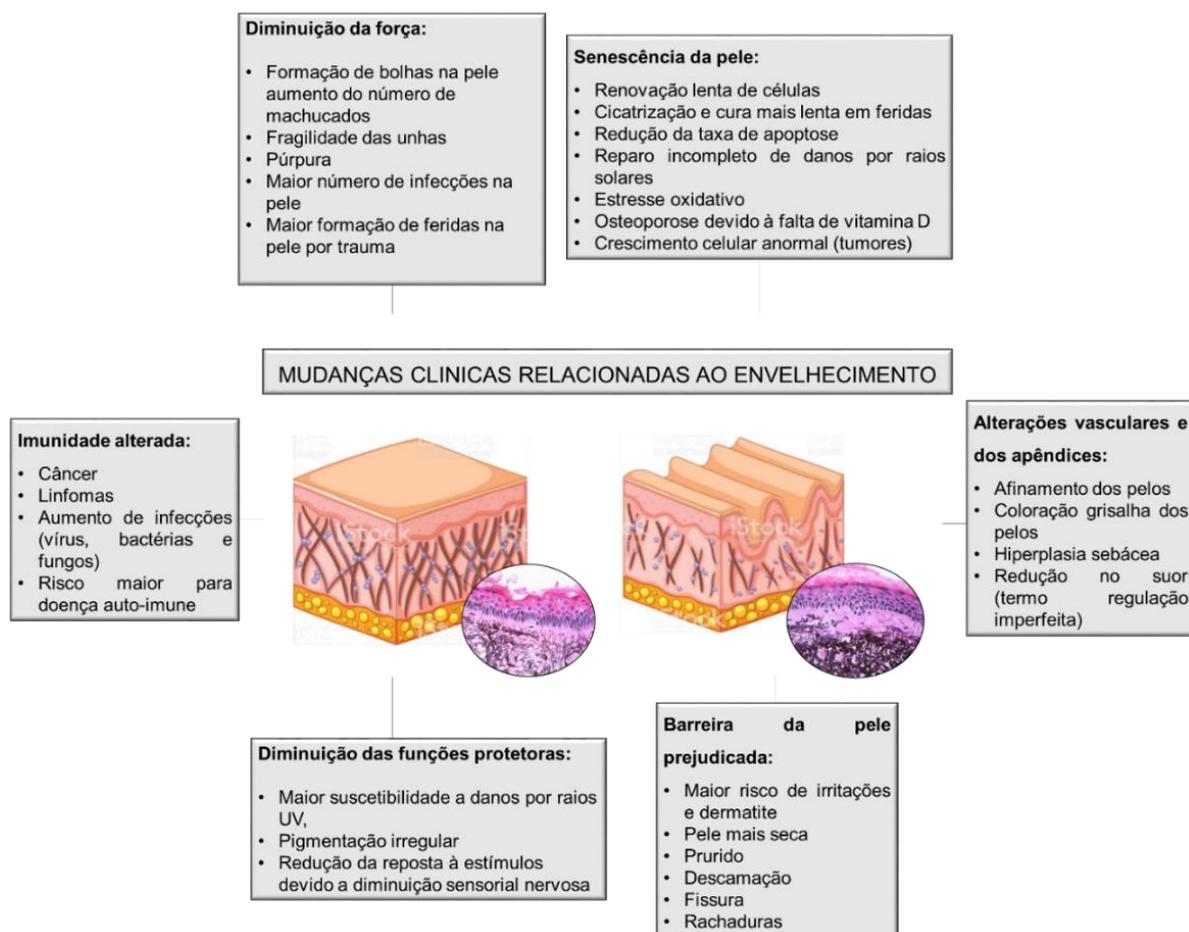
O número de glândulas sebáceas permanece o mesmo, mas a produção sebácea diminui e as glândulas sebáceas se tornam hipertróficas (ZOUBOULIS CC & BOSCHNAKOW A, 2001). As glândulas sudoríparas écrinas e apócrinas

diminuem em número e apresentam degeneração celular (Foster KG & Ellis FP, 1976). O fluxo sanguíneo capilar da pele em resposta ao calor diminui parcialmente devido a um declínio na função do nervo sensitivo (KELLY RI et al., 1995).

### 2.2.2 Mudanças clínicas relacionadas ao envelhecimento

As alterações anatômicas gerais da pele associadas ao envelhecimento resultam em atrofia, flacidez, rugas, flacidez, secura, desenvolvimento de pigmentos e manchas, neoplasias e alterações nas unhas e cabelos e a pele se torna mais pálida (FISHER et al., 2008). As categorias de alterações clínicas do envelhecimento incluem diminuição da força, senescência da pele, imunidade alterada, alterações vasculares e dos apêndices, diminuição das funções protetoras e a barreira da pele prejudicada. (**Figura 5**) (FORE J, 2006).

**Figura 5.** Mudanças clínicas relacionadas ao envelhecimento



Esquema representando as principais alterações causadas pelo envelhecimento cutâneo e suas consequências na saúde do indivíduo. Fonte: Adaptado de FORE J, 2006.

Observadas as alterações anatômicas e clínicas do envelhecimento, podemos perceber que o tratamento da pele de um indivíduo envolve muito mais do que características inestéticas insatisfatórias e sim a saúde total do mesmo, devolver componentes estruturais da pele, como o colágeno por exemplo, poderia ser um auxiliar no tratamento de doenças de pele associadas a falta de integridade da *cútis*.

Atualmente, na área da estética, existem diversas técnicas com a finalidade de reparar os efeitos do envelhecimento, como: *peeling* químico e físico (PELLETIER-LOUIS ML, 2017), aplicação de laser (BEIGVAND H.H et al, 2020), radiofrequência (ARAÚJO A.R.D et al, 2015), ultrassom de alta potência (PARK H et al, 2015) e bioestimuladores. Os bioestimuladores tem ganhado destaque em vista do seu potencial terapêutico visar melhorias de longo prazo. Atualmente o bioestimulador mais bem estudado é a hidroxiapatita (YUTSKOVSKAYA YA & KOGAN EA., 2017).

### 2.3 HIDROXIAPATITA

A Hidroxiapatita (HA) é um fosfato de cálcio bioativo e bioabsorvível que constitui a maior parte do componente inorgânico do tecido ósseo, representando cerca de 70% deste tecido e fica depositada entre a parte orgânica constituída majoritariamente por fibras colágenas do tipo I, representando aproximadamente 20%, e os 10% restantes são constituídos por água (MURUGAN, 2005; SHEIKH Z, 2015).

A fórmula química da HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , com razão Ca/P igual a 1,67 é considerado o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos e é encontrado raramente na natureza, porém sua estrutura é similar a fluorapatita (com o grupo  $\text{OH}^-$  ocupando os sítios do  $\text{F}^-$ ), que é mais facilmente encontrada (FULMER MT, 1992; TAN L et al., 2013). Estes minerais advêm de calcários cristalinos e rochas ígneas e metamórficas (ELLIOT JC, 1994).

Em princípio, acredita-se que as apatitas estavam presentes apenas em rochas ígneas, porém, com o passar dos anos, a intensa lixiviação dessas rochas pelas águas tem sido uma fonte para a criação de fosfato de cálcio biológico, na forma de apatita (MAVROPOULOS, 1999).

A HA sintética é considerada biocompatível além de ter alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas, características essas que conferem a este biomaterial grande potencial terapêutico como: agente para entrega de medicamentos; aumento da ação de drogas anticancerígenas; enxerto ósseo; tratamento de tumores ósseos; remoção de metais pesados em águas e solos poluídos (MA QY, 1995; MAVROPOULOS, 1999); seu uso também se estende a medicina estética como bioestimulador e preenchedor cutâneo (LEE JC e LORENC ZP, 2006). Tanto a HA natural quanto a sintética estão disponíveis em pastas, massas, matrizes sólidas e grãos (PEPLA et al., 2015).

A estrutura da hidroxiapatita, permite a incorporação em todos os seus sítios,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{OH}^-$ , e a substituição desses íons causa alterações consideráveis em sua estrutura. Na classe dos mamíferos, a principal forma mineral é deficiente em hidroxila e rica em carbonato (Carbonato Hidroxiapatita - CHA) (KUMTA et al., 2005; SADAT-SHOJAI M, 2013). A carbonatação da HA é reconhecida por desestabilizar a estrutura da hidroxiapatita e torná-la mais solúvel (LEGEROS, 1991).

### **2.3.1 Carbonato hidroxiapatita**

Podemos considerar duas formas de carbonatação da hidroxiapatita, a carbonatação do tipo A cuja substituição feita é a dos íons  $\text{OH}^-$  pelos íons  $\text{CO}_3^{2-}$  e a carbonatação do tipo B, aonde a substituição é a dos íons  $\text{PO}_4^{3-}$  pelos íons  $\text{CO}_3^{2-}$ . As CHAs do tipo A são preparadas em altas temperaturas (~ 900 °C) e em condições secas, com fluxo de  $\text{CO}_2$  que reage com a HA, resultando em  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}(\text{CO}_3)_x$  (LEGEROS, 1991; ELLIOT, 1994). A carbonatação do tipo B acontece por via úmida e em baixas temperaturas (GIBSON IR & BONFIELD W., 2002).

### **2.3.2 Métodos de síntese da hidroxiapatita**

Com diversas aplicações a serem exploradas, a padronização da técnica de síntese e caracterização se fazem extremamente necessárias. Segundo Santos, et al 2005, o controle da síntese precisa ser rigoroso para que se consiga o produto final desejado, na íntegra. O uso de biomaterias, em especial a hidroxiapatita sintética, que é o biomaterial cerâmico a base de fosfato de cálcio

mais estudado pra aplicações clínicas (BALASUNDARAM, 2006), fez com que fossem exploradas diversas formas de síntese, são elas via seca e via úmida.

A síntese por via seca é feita em altas temperaturas (em torno de 900 °C) e o produto final é um pó de alta cristalinidade, o que diminui a compatibilidade com os tecidos biológicos. Diferente dos métodos úmidos, os métodos secos não usam solvente. De acordo com a literatura, as características de um pó sintetizado por um método a seco não são fortemente influenciadas pelos parâmetros de processamento e, portanto, a maioria dos métodos a seco não requerem condições controladas com precisão, tornando-os adequados para a produção em massa (COSTA ACFM, 2009; SADAT-SHOJAI M, 2013).

Para a obtenção da CHA em forma de pó, utiliza-se a técnica de precipitação, que envolve reações por via úmida entre precursores de cálcio e fósforo com controle rigoroso de temperatura e pH da solução. Esta técnica é uma das técnicas mais utilizadas em vista de seu baixo custo, sua fácil execução e a simplicidade na eliminação dos rejeitos (LASIC´ S et al., 1996). O produto final é um pó nanoestruturado com partículas menores que 10 µm e baixa cristalinidade (similar aos tecidos naturais) (SALEH J et al., 2004; RIGO ECS et al., 2007).

A técnica de precipitação apresenta diversas variáveis, como: controle de potencial hidrogeniônico (pH), temperatura, taxa de adição, tempo de envelhecimento, concentração dos reagentes e tempo de agitação. A temperatura de processamento da precipitação é importante na fase obtida, no tamanho e na morfologia da partícula (KUMAR R et al., 2004). Os pós mais cristalinos são sintetizados em temperaturas mais altas. O tempo de envelhecimento e a cinética da reação também são variáveis que influenciam na pureza e no padrão cristalográfico do material obtido (TADIC D et al., 2002; KOUTSOPOULOS S, 2002; AFSHAR A et al., 2003; SAERI MR et al., 2003).

A pureza do material é definida pela: composição dos reagentes utilizados, que fará com que surjam ou não íons inesperados na rede cristalina e definirá características morfológicas e cristalográficas. A taxa de adição dos reagentes (tempo de gotejamento) está ligada a nucleação dos cristais. (KOUTSOPOULOS S, 2002)

A velocidade no gotejamento está intimamente relacionada a cinética da reação, adições lentas de íons fosfato proporcionam uma menor taxa de nucleação e maior taxa de crescimento, obtendo como produto final, partículas maiores enquanto, taxas altas de adição, culminam com números maiores de núcleos e partículas menores (TADIC D et al, 2002; KOUTSOPOULOS S, 2002).

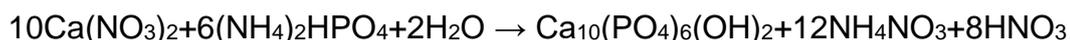
A formação de um produto sólido é obtida pela precipitação de uma solução e cristalização da mesma, e essas duas etapas acontecem de maneira simultânea na formação de precipitados cristalinos, e nos casos de produtos não cristalinos as etapas não acontecem de maneira concomitante. Estas propriedades podem ser controladas pela variação da saturação da solução e pelo tempo médio de cristalização, que serão monitorados pela temperatura e a taxa de gotejamento (TADIC D et al, 2002).

A reação de precipitação por via úmida pode ser feita de duas maneiras, são elas (COSTA ACFM, 2009):

Reação ácido-base:



Reação entre sais de fosfato:



A composição do precipitado depende fortemente dos parâmetros de processamento e é necessário um controle preciso das condições de síntese para garantir uma boa reprodutibilidade (RAYNAUD S et al., 2002). A atuação *in vivo* de materiais sintéticos para uso biomédico depende da morfologia composição química e biodegradabilidade, propriedades estas que são analisadas através de múltiplas técnicas de caracterização, tais como: DRX, FTIR, Potencial Zeta, MET, entre outras.

## 2.4 MATERIAIS NANOPARTICULADOS E NANOESTRUTURADOS

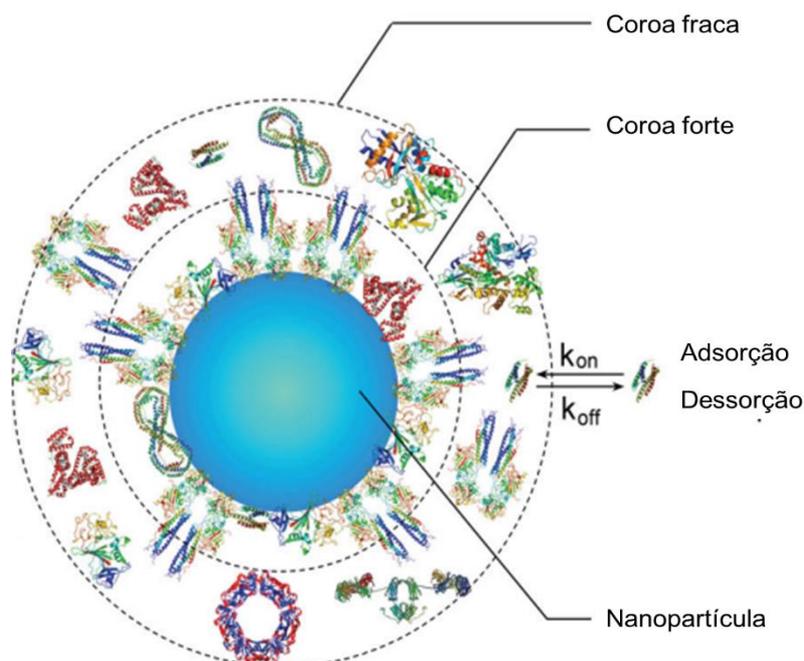
O contato de partículas nanoestruturadas e nanopartículas com fluidos biológicos como o sangue e o plasma sanguíneo, ocasiona algumas modificações na superfície dessas partículas. Os termos "coroa proteica" e

“proteína corona” são utilizados para definir a interação de proteínas, peptídeos e glicolipídeos que ficam adsorvidos na superfície dessas partículas. Estudos demonstram que este recobrimento influencia diretamente nas interações das NPs com o organismo, determinando seu destino intracorpóreo (LIU et al., 2013; BARRÁN-BERDÓN et al., 2013; SCHÄFFLER et al., 2013).

O uso de biomateriais nanoestruturados tem sido descrito em diversas aplicações, conforme mencionado anteriormente, e a compreensão dos mecanismos de internalização dos mesmos também devem ser visualizados através do entendimento da formação desse recobrimento que é feito sobre elas após contato com os fluidos biológicos (SAFI et al., 2011; PAULA et al., 2013). Estudos revelaram que ao interagir com estes fluidos as NPs interagem com taxas significativas de proteínas que as recobrem de maneira instantânea, formando um recobrimento que altera completamente sua identidade e seu comportamento em respostas fisiológicas e por consequência terapêuticas, nos levando a repensar na eficácia, biodistribuição, segurança e bioeliminação desses produtos do organismo (LÜCK et al., 1998; MONOPOLI et al., 2012; CARACCILO et al., 2016; O'BRIEN & SHEA, 2016).

Esse complexo NPs e proteínas é o que as biosistemas passam a ver e a responder e, portanto, entender essa interação das NPs com as proteínas é crucial para as aplicações biológicas e a biossegurança dos biomateriais nanoestruturados. A estrutura da coroa proteica é basicamente dividida em coroa forte (*hard*), cujas proteínas tem grande afinidade as partículas nano estruturadas e por isso permanecem ligadas à sua superfície, e a coroa fraca (*soft*), em que as proteínas são adsorvidas e desadsorvidas (essas mudanças na adsorção e desadsorção das proteínas recebem o nome de “efeito Vroman”) de acordo com sua afinidade e concentração, o que faz com que a proteína corona não seja uma estrutura estável, ou seja a composição da mesma é dinâmica (**Figura 6**) (CEDERVALL et al., 2007b; CASALS et al., 2011; MILANI et al., 2012).

**Figura 6.** Representação da coroa forte (*hard*) e coroa fraca (*soft*)



Desenho esquemático representando ao centro uma nanopartícula e em seu entorno as ligações proteicas *hard* e *soft* que ocorrem mediante a afinidade da proteína pela partícula, as proteínas *hard* ficam fortemente ligadas por apresentarem grande afinidade, enquanto as proteínas *soft* que possuem menos afinidade e por isso sofrem interferência de diversos fatores para se manterem adsorvidas ou desadsorvidas. Fonte: Yang et al., 2013.

Muitas interações podem contribuir para a adsorção de proteínas nas nanopartículas, como interações de van der Waals (VDW) ligações de Hidrogênio (H), interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e interações de empilhamento  $\pi - \pi$  (YANG et al., 2013). Embora os fluidos biológicos contenham uma enorme gama de proteínas, os componentes da coroa proteica são exclusivos de cada nanomaterial e sofre influência das características do ambiente e das propriedades físico-químicas das nanopartículas (tamanho, forma, carga, pH e etc). A adsorção desta mistura complexa de proteínas a superfície das nanopartículas pode levar de minutos a horas. (BARRÁN-BERDÓN et al., 2013; FOROOZANDEH & AZIZ, 2015; TREUEL, 2015). Na maioria dos casos, as proteínas em maior concentração plasmática são adsorvidas mais rapidamente a superfície nas NPs e com o passar do tempo são substituídas por proteínas de menor concentração, porém que apresentam maior afinidade (RAHMAN et al., 2013).

Diferente do que acontece *in vivo*, nos estudos *in vitro* se torna mais fácil controlar fatores como: temperatura, concentração, tipo de plasma e soro, tempo de incubação e ambiente, o que faz com que o dinamismo do complexo nanopartícula e coroa proteica seja parcialmente controlado, e pareça equivocadamente estar bem elucidado, porém o que ocorre *in vivo* é bem diferente. *In vivo*, as partículas migrarão pelo sistema fazendo contato com diversos meios o que poderá modificar completamente seu comportamento (BRAUN et al., 2016, CARACCILO, FAROKHZAD & MAHMOUDI, 2016).

Sabendo que o comportamento das nanopartículas *in vivo* é influenciado pela coroa proteica, entender essas interações se torna fundamental para compreender a toxicidade, reconhecimento imunológico, mecanismos de biodistribuição, absorção celular e liberação de fármacos. É importante ainda, destacar que talvez não seja possível estabelecer um padrão de regras sobre o comportamento de NPs no plasma, visto que a relação de uma NPs e sua coroa proteica poderá ser demasiadamente diferenciada quando comparada a outras NPs (FLEISCHER & PAYNE, 2014; WOLFRAM et al., 2014; ESCAMILLA-RIVERA et al., 2016).

## 2.5 BIOESTIMULADORES NA ESTÉTICA

A bioestimulação é uma técnica estética na qual diferentes drogas são injetadas na derme para induzir a reconstrução de um ambiente fisiológico ideal, o aumento da atividade celular, a hidratação, a síntese de colágeno, elastina e Ácido Hialurônico (AH) (AVANTAGGIATO A et al., 2015)

O efeito desejado pode ser alcançado através das microinjeções na derme superficial de produtos que contêm apenas um ingrediente ativo ou coquetéis de diferentes compostos biocompatíveis e absorvíveis, tais como: hidroxiapatita, ácido hialurônico, vitaminas, minerais, nutrientes, hormônios, aminoácidos, culturas autólogas de fibroblastos, produtos homeopáticos, entre outros (IORIOZZO M et al., 2008; LACARRUBBA F et al., 2008).

Na última década, houve uma crescente conscientização de que a perda de volume facial é um fator importante na manifestação clínica do

envelhecimento (DONATH AS et al., 2007; FITZGERALD R et al., 2010). Como resultado disto, o uso de procedimentos não cirúrgicos aumentou e vários produtos com diferentes mecanismos de ação estão atualmente disponíveis, com a finalidade de reestruturar a arquitetura histológica da face, o que culminará com a redução da perda de volume facial (GOLDBERG D et al., 2013).

Atualmente o mercado conta com algumas substâncias utilizadas como bioestimuladores. O ácido poli-L-láctico injetável é um polímero sintético biocompatível e biodegradável da família dos alfa-hidroxiácidos. Este material é injetável e sua forma comercial é composta por micropartículas de ácido poli-láctico cristalinas e de tamanho irregular. O ácido poli-L-láctico é usado há vários anos em material de sutura solúvel e outros dispositivos médicos, incluindo selantes absorvíveis, sistemas de fixação de parafusos e na regeneração tecidual (VLEGGAR D, 2006). O produto também contém carboximetilcelulose de sódio como agente de suspensão para manter a distribuição uniforme de partículas de ácido poli-L-láctico. Os polímeros de ácido poli-L-láctico degradam-se por hidrólise não enzimática em monômeros de ácido láctico, que por sua vez são metabolizados em dióxido de carbono ou incorporados na glicose. O mecanismo pelo qual o ácido poli-L-láctico injetável gera expansão facial volumétrica está relacionado a uma reação de células gigantes de corpo estranho que ocorre após várias semanas e meses. Além disso, a produção de colágeno que ocorre à medida que o produto se degrada produz as alterações de volume que são observadas e os benefícios estéticos (LAM SM et al., 2006).

O Policaprolactona (PCL) é um polímero biocompatível, biodegradável e bioabsorvível, um poliéster alifático pertencente ao grupo poli- $\alpha$ -hidroxiácido, no mesmo grupo químico dos ácidos polilático e poliglicólico. O PCL é constituído por uma cadeia de uma sequência unitária repetida de  $\epsilon$ -caprolactona (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>)<sub>n</sub> (WOODRUFF MA & HUTMACHER DW., 2010). A PCL é um polímero hidrofóbico e semi-cristalino e sua degradação é feita por hidrólise. O preenchimento a base de PCL tem um efeito duplo, um efeito imediato, relacionado ao gel de carboximetil celulose e um efeito a longo prazo. O efeito imediato está relacionado ao volume injetado e a capacidade hidrocópica do gel de carboximetil celulose. O gel a base de carboximetil celulose é reabsorvido em 2 a 3 meses (LABET M & THIELEMANS, 2009). O efeito imediato é seguido

por um efeito a longo prazo dado pela indução da síntese de colágeno (CHRISTEN MO & VERCESI F, 2020).

A Hidroxiapatita de Calcio (HC) é um material utilizado tanto para reposição de volume quanto para a bioestimulação do colágeno como mecanismo de ação primário (KADOUCH JA et al., 2017). Trata-se de um material biocompatível, biodegradável e reabsorvível, que contém microesferas de HC que podem estimular a produção endógena de colágeno (LOGHEM JV et al., 2015). O aumento inicial é proporcionado pela presença do gel transportador de carboximetilcelulose com o próprio implante, mas após aproximadamente 9 a 12 meses, as partículas de HC são degradadas em cálcio e fosfato e são eliminadas pelo sistema renal. A HC é altamente viscoelástica e usada de forma não diluída ou levemente diluída fornecendo correção de volume imediata que será seguida por nova formação de tecido gradual através de neocolagênese, produção de elastina, angiogênese e proliferação celular dérmica e é adequado para a injeção nos planos supraperiosteal e subdérmico (SILVERS SL et al., 2006). O resultado é uma melhoria estética duradoura por  $\geq 18$  meses com pele esticada e elástica e aumento da espessura da pele. Quando usado em forma hiperdiluída, tem um efeito de volume imediato mínimo ou ausente, gerando apenas remodelação tecidual a longo prazo pelas microesferas de HC e permitindo sua injeção mais superficial para rejuvenescimento dérmico e tratamento de áreas maiores (YUTSKOVSKAYA YA & KOGAN EA., 2017).

### 3. JUSTIFICATIVA

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2060 o Brasil terá 8,36% de sua população composta por idosos, um aumento significativo quando comparado com a projeção de 2020 que previa um percentual de 2,1% de idosos. Com o aumento do número de idosos aumenta a preocupação com o desenvolvimento de novos biomateriais com um investimento mundial que é previsto alcançar o teto de 200 bilhões de RS até 2024 (IBGE, 2018). O envelhecimento do sistema tegumentar, particularmente, vem acompanhado por diversas alterações anatômicas e clínicas, que fazem com que as funções desempenhadas por ele fiquem prejudicadas e, por isso, o tratamento da pele de um indivíduo envolve muito mais do que características inestéticas insatisfatórias e sim a saúde total do mesmo.

A saúde estética é uma área que está em constante crescimento devido ao desenvolvimento de novas técnicas, novas substâncias e a crescente demanda. Segundo a ISAPS, o Brasil ocupa o segundo lugar no ranking de países que mais executam procedimentos estéticos do mundo, e os preenchimentos a base de hidroxapatita são o oitavo procedimento não cirúrgico mais executado no mundo todo.

Este estudo propõe a utilização de CHA nanoestruturada, um biomaterial que é já amplamente utilizado na medicina regenerativa óssea como importante substituto ósseo bioativo e osteocondutor pelas suas características de biocompatibilidade e propriedades de maior solubilidade e adsorção comparada a HA não substituída pelo carbonato. Portanto, este projeto pretende compreender os mecanismos de citotoxicidade e potencial bioestimulador da hidroxapatita carbonatada nanoestruturada em fibroblastos, a fim de entender como melhorar a qualidade dos produtos baseados nestes materiais nanoestruturados em aplicações estéticas clínicas.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Este projeto tem como objetivo estudar a citotoxicidade e o potencial bioestimulador de colágeno de carbonato hidroxiapatitas nanoestruturadas, em fibroblastos humanos de pele.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntetizar a CHA nanoestruturada em três diferentes temperaturas de síntese (5 °C, 37 °C e 90 °C);
- Caracterizar a CHA nanoestruturada sintetizada nas diferentes temperaturas do ponto de vista físico-químico, antes e após o contato com meio de cultivo;
- Analisar a citotoxicidade das CHA's nanoestruturadas nas diferentes temperaturas de síntese, em fibroblastos humanos de pele;
- Avaliar o potencial bioestimulador através da análise de deposição de colágeno na matriz extracelular.

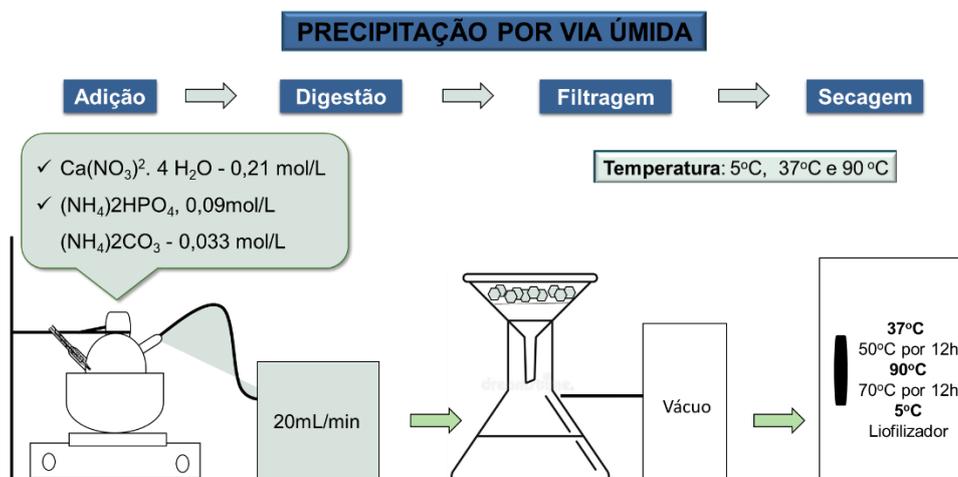
## 5. METODOLOGIA

Este trabalho é realizado no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas (LAMP) da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), em parceria com o Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) e o Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

### 5.1 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA CARBONATADA NANOESTRUTURADA

Para elaboração deste trabalho, foram sintetizadas hidroxiapatitas carbonatadas (CHA) em três temperaturas diferentes de síntese (5 °C, 37 °C e 90 °C). As hidroxiapatitas carbonatadas nanoestruturadas foram sintetizadas por precipitação por via úmida utilizando soluções aquosas de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0,21 mol/L ( $\text{NH}_4$ ) $_2$ HPO $_4$ , 0,09 mol/L e ( $\text{NH}_4$ ) $_2$ CO $_3$ , 0,033 mol/L (Merck ACS). A solução fosfato/carbonato foi adicionada sob fluxo de 20 mL/min à solução de cálcio. As condições de síntese foram rigorosamente controladas em pH 12 e temperatura de 5 °C, 37 °C, e 90 °C, respectivamente. Depois da adição, a suspensão de CHA ficou em agitação: as CHA sintetizadas a 37 °C e 90 °C por 2 horas, enquanto a CHA sintetizada a 5 °C por 3 horas. Em seguida, o material foi lavado, filtrado a vácuo e seco em estufa de secagem a 50 °C por 12 horas para a CHA sintetizada a 37 °C e a 70 °C para a CHA sintetizada a 90 °C. No caso da CHA sintetizada a 5 °C, o processo de secagem é feito no liofilizador. Após seco o material foi peneirado em uma peneira de 75 µm (**Figura 7**).

**Figura 7.** Etapas da síntese da CHA



A síntese de precipitação por via úmida da CHA, em três temperaturas (5°C, 37°C e 90°C), foi realizada em quatro etapas: adição, digestão, filtragem e secagem, como descrito de forma mais detalhada na metodologia.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CARBONATO HIDROXIAPATITAS

As CHAs produzidas foram caracterizadas por técnicas físicas e químicas antes e após contato com o meio de cultivo. A caracterização foi executada por meio de testes como: Difração de Raio X (DRX), Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Os ensaios de caracterização foram realizados no CBPF. Para a caracterização em H<sub>2</sub>O foram colocados em agitação um tubo de centrifuga contendo 75mg de CHA em 15 ml de água (5 mg/ml), e para a caracterização em meio de cultivo, foram colocados em agitação um tubo de centrifuga contendo 75mg de CHA em 15 ml de meio de cultivo (DMEM *High* suplementado com 10% de Soro Fetal bovino e 1% de Penicilina e Estreptomicina (P/S), ambos os tubos com água ou meio ficaram em agitação por 24 horas e em seguida passaram por 3 lavagens com H<sub>2</sub>O e em seguida foram secas em estufa a 37° por 3 dias.

## 5.3 DIFRAÇÃO DE RAIO X

Para verificar a especificidade e o grau de cristalinidade do material sintetizado foi utilizada a técnica de DRX. O material em pó foi colocado de maneira que se obtenha uma superfície lisa e os raios X consigam incidir de maneira uniforme. O difratograma foi gerado individualmente para cada temperatura de síntese. A varredura angular (2θ) foi de 5° a 60° com passo de 0,008°, gerando dados que correspondem ao nível de cristalinidade e especificidade das amostras.

A média de tamanho dos cristalitos foram calculados a partir da equação de Scherrer:

$$L_m = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta}$$

Onde  $L_m$  é o diâmetro médio do cristalito calculado em referência aos picos de maior intensidade pelos correspondentes índices de Miller (que definem a orientação de um plano de átomos na célula unitária pela intersecção desse plano com os eixos do sistema de coordenadas da célula),  $k$  é uma constante de proporcionalidade (foi admitida a ocorrência de partículas esféricas, adotando  $k$

= 0,9),  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação (0,154056 nm para Cu K $\alpha$ ),  $\theta$  é o ângulo de difração e  $\beta$  é a largura medida na metade dos picos analisados (calculado por aproximação do pico através de uma Gaussiana).

#### 5.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Para identificar a composição dos grupos funcionais presentes na amostra, as amostras foram preparadas para análise de FTIR prensando o pó, em forma de pastilhas, na presença do Brometo de potássio (KBr). O interferograma foi gerado analisando as vibrações das moléculas em uma faixa de comprimento de onda de 500 a 4000 cm<sup>-1</sup>, com um espectrofotômetro de infravermelho *IR Prestige 21, Shimadzu*.

#### 5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA TRANSMISSÃO

Para verificar a morfologia, o tamanho, a organização estrutural e as características nanoestruturais do material foi utilizada a técnica MET. As amostras foram processadas preparando uma solução de 10mg/ml das CHAs em etanol 1% e, após homogeneização, a solução foi gotejada em grades de cobre (200 *mesh*), cobertas com película de filme de carbono (*Formvar*). Após secas, as grades foram analisadas no MET JEOL 2100F 200kV, do Laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia do CBPF (LABNANO).

#### 5.6 INTERAÇÃO DAS CHAS COM FIBROBLASTOS

##### 5.6.1 Extração de fibroblastos humanos primários

Fibroblastos humanos foram obtidos a partir de fragmentos cirúrgicos de mastopexia, gentilmente cedidos pelo Dr. André Mattos, médico, especialista em cirurgia plástica. O projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Unigranrio (nº de parecer 3.525.362). Os fragmentos foram incubados em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) High Glucose acrescidos dos antibióticos penicilina e estreptomicina 2 a 3 vezes concentrados. O protocolo de extração foi executado dentro dos padrões de biossegurança e antissepsia. Os fragmentos de tecido foram lavados três vezes com PBS contendo 2 a 3 vezes a concentração de penicilina/estreptomicina. Após a lavagem, os fragmentos foram transferidos para uma placa de Petri e cortados,

com o auxílio de um bisturi cirúrgico, em pedaços de aproximadamente 0,3 cm<sup>2</sup>. O material foi transferido para um tubo de centrífuga contendo DMEM-*high Glucose* com colagenase (2mg/ml) e os mesmos antibióticos, nas mesmas concentrações. Os fragmentos foram incubados em agitação a 37° C por três horas. Em seguida foi realizada uma dissociação mecânica com pipeta graduada. Após a precipitação, o sobrenadante foi recolhido e adicionado um igual volume de DMEM-*High Glucose* com 10% de soro fetal bovino acrescido dos mesmos antibióticos, nas mesmas concentrações. O sobrenadante foi centrifugado por 10 min a 400g. As células foram ressuspensas em DMEM-*High Glucose* suplementado com 10% de soro fetal bovino acrescido dos mesmos antibióticos, nas mesmas concentrações. A densidade de cultivo utilizada foi de 4x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. As células foram mantidas a 37°C e em atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), sendo o meio renovado a cada dois dias. Para os experimentos as células foram utilizadas a partir da terceira passagem.

#### **5.6.2 Ensaio de viabilidade celular (MTT)**

Para avaliar a viabilidade dos fibroblastos humanos primários após exposição das CHA's foi utilizado o ensaio de MTT (*3-(4,5-dimethylthiazolyl-2) - 2, 5-diphenyltetrazolium bromide*) (Sigma Aldrich, N° M2128). O MTT mostra a viabilidade celular proporcional à conversão do sal de tetrazólio (MTT) em cristais de formazan, passando da cor amarelada para violeta quando as células se mostram viáveis. Tais sais são dissolvidos em DMSO (Dimetilsulfóxido). Para realização do ensaio de viabilidade, as células foram plaqueadas em monocamada no dia 0 do experimento e após 24 horas foram expostas a 50µg/ml (dados ainda não publicados pelo grupo, mostram que essa é melhor dose resposta em experimentos anteriores feitos pelo grupo com células osseas) das CHA's nas temperaturas de 5 C° 37 C° e 90 C°. As células ficaram expostas as CHA's por um tempo experimental de três dias. Após os tempos de cultivo mencionados acima, as mesmas foram incubadas com o MTT (0,5 mg/ml) por 4 h a 37 °C em atmosfera umedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A absorbância gerada após a incubação do MTT foi medida através do espectrofotômetro (Epoch, BioTek Instruments) do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas (LAMP) da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), com um comprimento de onda (λ) de 570 nm. O controle positivo (+), células inviáveis, foi realizado acrescentando

10% de SDS (Dodecil sulfato de sódio) na cultura. Todos os testes com MTT foram realizados em uma triplicata experimental.

### **5.6.3 Microscopia Eletronica de Varredura**

Para avaliação da MEC, cultivamos as células em contato com as CHA's por um período de 30 dias, concluído este período, lavamos as células com PBS pH 7,4 não estéril a 37°C (2 vezes) e fixamos com 500µl do fixador Karnosky por 1 hora em temperatura ambiente. Em sequência retiramos o fixador Karnovsky e lavamos as células por três vezes com tampão Cacodilato. Em seguida, fixamos com o fixador Tetróxido de ósmio em solução (1:1) em tampão Cacodilato por trinta minutos. Após a fixação com Tetróxido de ósmio, lavamos as células com tampão Cacodilato por três vezes e trocamos a placa para seguir com o protocolo de desidratação. Para desidratação das células preparamos soluções aquosas de etanol absoluto numa escala crescente de (50%,70%,80%,90%,95% e 100%. Com uma pipeta Pasteur adicionamos 1 ml de álcool a 50%,70%,80% por 5min por duas vezes cada lavagem. Continuando as etapas de desidratação na concentração de 90%,95% e 100% o tempo do banho mudo para dez minutos por duas vezes. Ao finalizar as desidratações com etanol adicionamos a solução 1:1de (etanol+HMDS) por 10min e retirar a solução de etanol+HMDS para colocar a solução HMDS a 100% (puro) por 10min. Feito isso, retiramos o HMDS e deixamos as amostras na câmara de exaustão durante toda a noite (mínimo de 12h) para secagem completa das amostras. Após a secagem as amostras foram Metalizadas e observadas no MEV.

### **5.6.4 Avaliação da matriz de colágeno**

Para analisar os níveis e a deposição de colágeno na MEC sintetizado pelos fibroblastos humanos, plaqueamos as células sobre lamínulas de vidro estéreis e aguardamos o período de adesão de 24 horas, em seguida expomos as CHA's 5 °C , 37 °C e 90 °C, por um período de 7 dias, a cada dois dias, tanto o controle (células não tratadas), quanto as células em tratamento, receberam 50 µg/ml de ácido ascórbico. A técnica adotada para a análise, foi a de microscopia de fluorescência. O preparo da amostra foi feito fixando as células com paraformaldeído (PFA) 4% por 5 minutos após o período estipulado de

exposição (7 dias). Após a fixação as lamínulas de vidro com as células fixadas foram lavadas com PBS (Gibco™, N° 10010023) pH 7,4 e foram adicionados 500µl de NH<sub>4</sub>Cl (Sigma-Aldrich, N° A9434) 20 Mm por 10 minutos, em seguida foi lavado novamente com PBS pH 7,4. O bloqueio foi realizado com BSA 5% por 30 minutos. A marcação de colágeno foi feita com anticorpo anti-colágeno tipo I, produzido em rato (Sigma-Aldrich, N° C2456; 1:1000) em PBS/BSA 1%, foram adicionados 75 µl da solução as amostras e as mesmas foram incubadas *overnight* em geladeira. Após período de incubação as amostras foram lavadas com PBS pH 7,4. O anticorpo secundário utilizado para a marcação de colágeno Alexa flúor™ 488 (Invitrogen™, N° A-11001; 1:500 diluído em 500µl de PBS + BSA 1%, foram adicionados 15µl as amostras e aguardou se o tempo de 1 hora. Para a marcação de microfilamentos de actina com faloidina foi utilizada a diluição de 1:80 faloidina Alexa Fluor™ 546 (Invitrogen™, N° A22283) em Triton™ x-100/BSA 1%, e para cada amostra foi utilizado 20µl da solução, por uma hora, em sequência as amostras foram lavadas com PBS pH 7,4. Em seguida as amostras seladas com *fluorshield* com DAPI (Sigma Aldrich, N° D9542) para a visualização em microscópio *Zeiss AXIO observer A1 axi*, do laboratório de células do CBPF. As densitometrias das imagens foram analisadas com o programa ImageJ.

#### **5.6.5 Análises estatísticas**

As Diferenças significativas dos parâmetros analisados foram avaliadas pelos testes de Kruskal-Wallis, no programa estatístico GraphPad Prisma versão 6.0. Serão consideradas significativos os valores de  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 SÍNTESE DA CHA

O processo de síntese foi realizado seguindo os parâmetros indicados e ocorreu de maneira eficiente originando um pó de cor branca com características físico-químicas compatíveis com as de uma carbonato-hidroxiapatita, como foi confirmado pela sucessiva caracterização do material através de técnicas físico-químicas (**Figura 8**).

**Figura 8.** Fotografia do pó de CHA

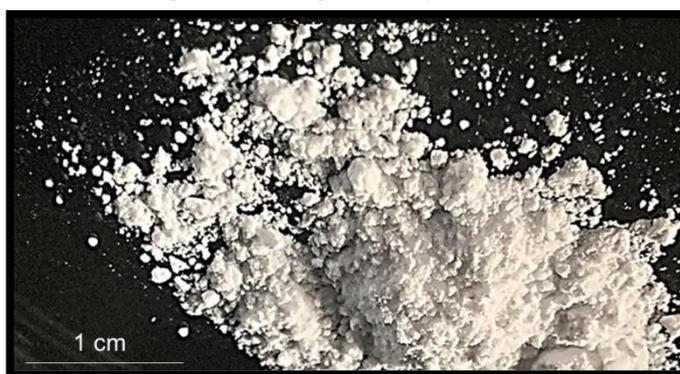


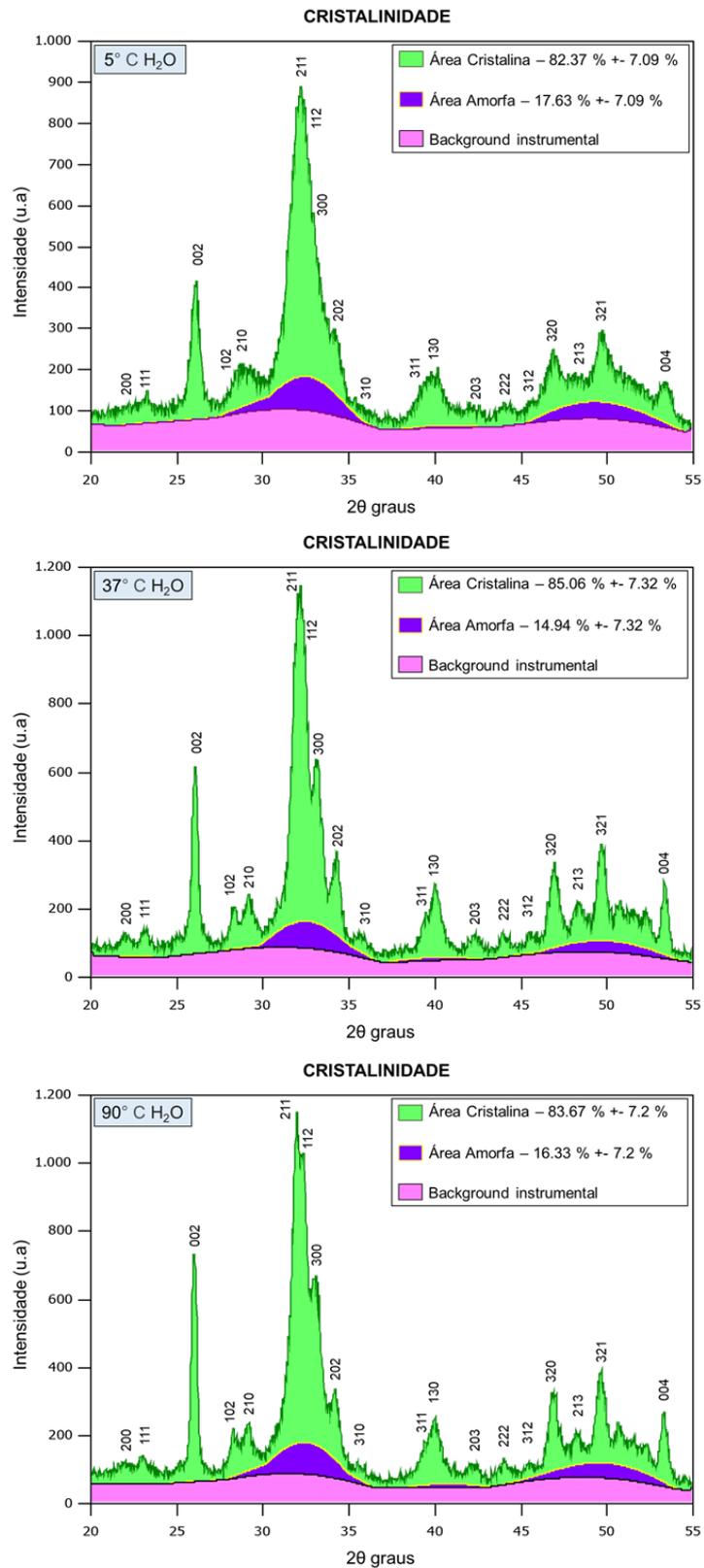
Imagem do pó de CHA após secagem. O biomaterial apresenta-se como um pó bastante fino e de coloração branca.

### 6.2 CARACTERIZAÇÃO DA CHA

#### 6.2.1 Análise do padrão cristalográfico das CHAs

Para analisar se as diferentes temperaturas de síntese alteram o padrão de cristalinidade das CHAs utilizamos a técnica de DRX. A análise de DRX confirmou que o produto da síntese era compatível com uma CHA em vista de seu padrão gráfico de cristalinidade. As análises por DRX mostraram que as hidroxiapatitas sintetizadas a 5° C, 37° C e 90° C possuem graus de cristalinidade semelhantes (**Figura 9**).

**Figura 9.** Difratoograma de raio X das CHA's-H<sub>2</sub>O



Difratoograma de raio X das CHAS que foram expostas a H<sub>2</sub>O e secas em estufa (37° C) sintetizadas nas temperaturas de 5°C, 37°C e 90°C. Conforme observado no difratograma a CHA's apresentam graus semelhantes de cristalinidade. Essa análise foi realizada em triplicata de lotes.

## 6.2.2 Distribuição de tamanho do cristalito

Os resultados das análises de tamanho médio dos cristalitos indicam que o tamanho médio dos cristais da CHA sintetizada a 5 °C apresenta um tamanho de aproximadamente  $7,33 \pm 3,49$  nm, sendo menor do que o das CHA's sintetizadas a 37 °C ( $13,9 \pm 5,16$  nm) e 90 °C ( $13,6 \pm 6,4$  nm), sem alteração significativa no tamanho dos cristais após o contato com o meio de cultura (Figura 10).

Figura 10. Distribuição de tamanho do cristalito

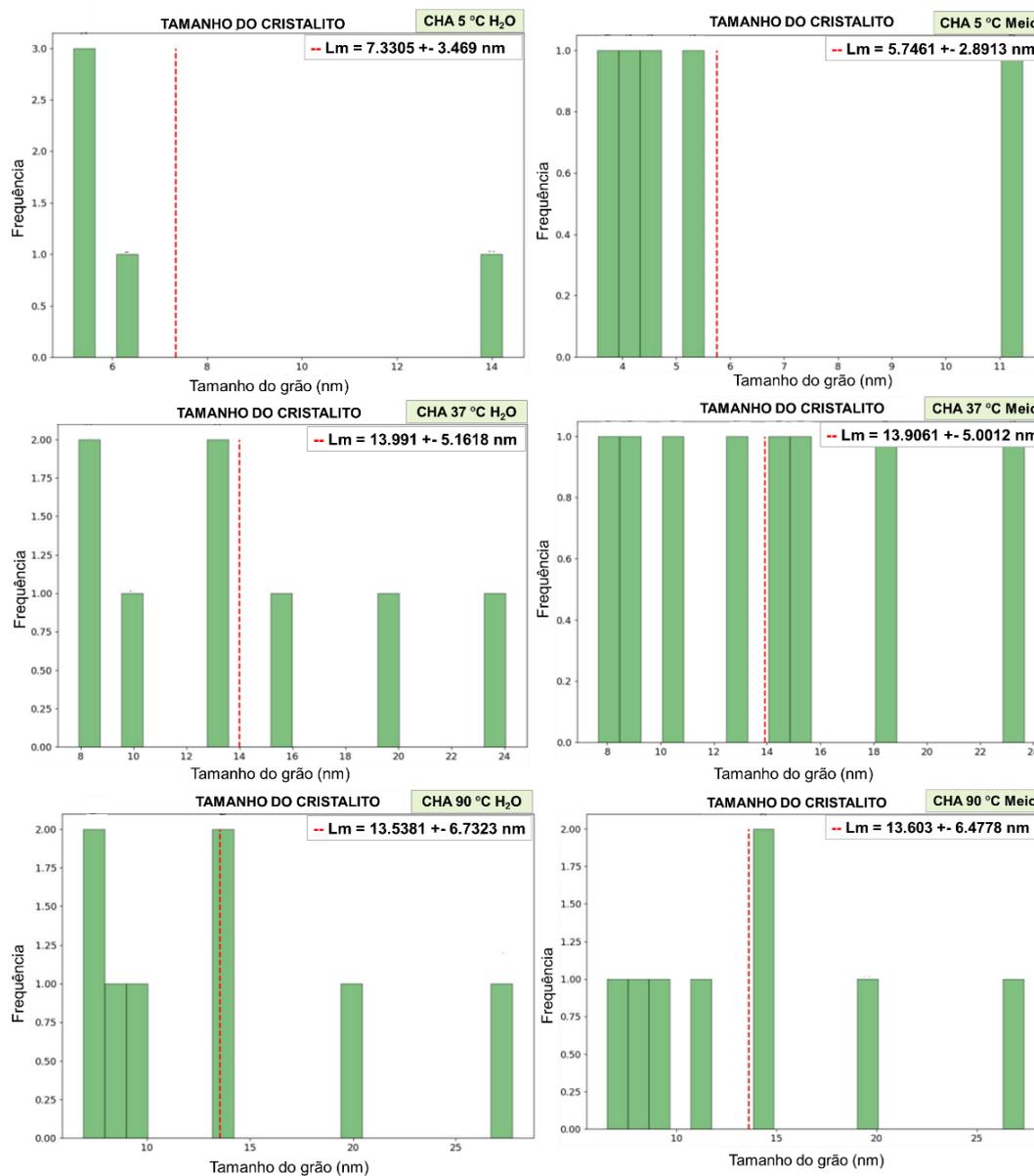
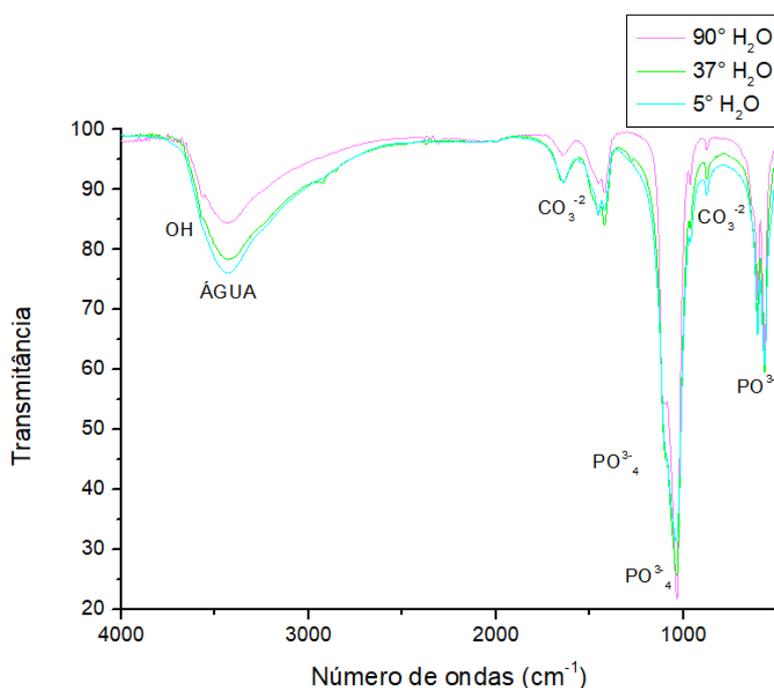


Gráfico representando a distribuição de tamanho dos cristais e apontando a média de tamanho dos cristalitos em cada temperatura e condição (H<sub>2</sub>O e Meio de cultura). Análise feita em triplicada.

### 6.2.3 Análise dos grupos funcionais característicos das CHA's

Através da análise com infravermelho por transformada de Fourier foi possível identificar os grupos funcionais hidroxila e fosfato, característicos da hidroxiapatita. As análises evidenciaram também presença do grupo carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), através das bandas de absorção situadas em 875 e 1400-1500  $\text{cm}^{-1}$ . Também foi possível verificar a presença de grupos substitucionais, como os grupos carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), nas bandas 1420 $\text{cm}^{-1}$  e 1450 $\text{cm}^{-1}$  relacionadas à substituição no sítio B, confirmando que os materiais são hidroxiapatitas carbonatadas (**Figura 11**).

**Figura 11.** Espectroscopia no infravermelho das CHAs 5°C, 37 °C e 90 °C



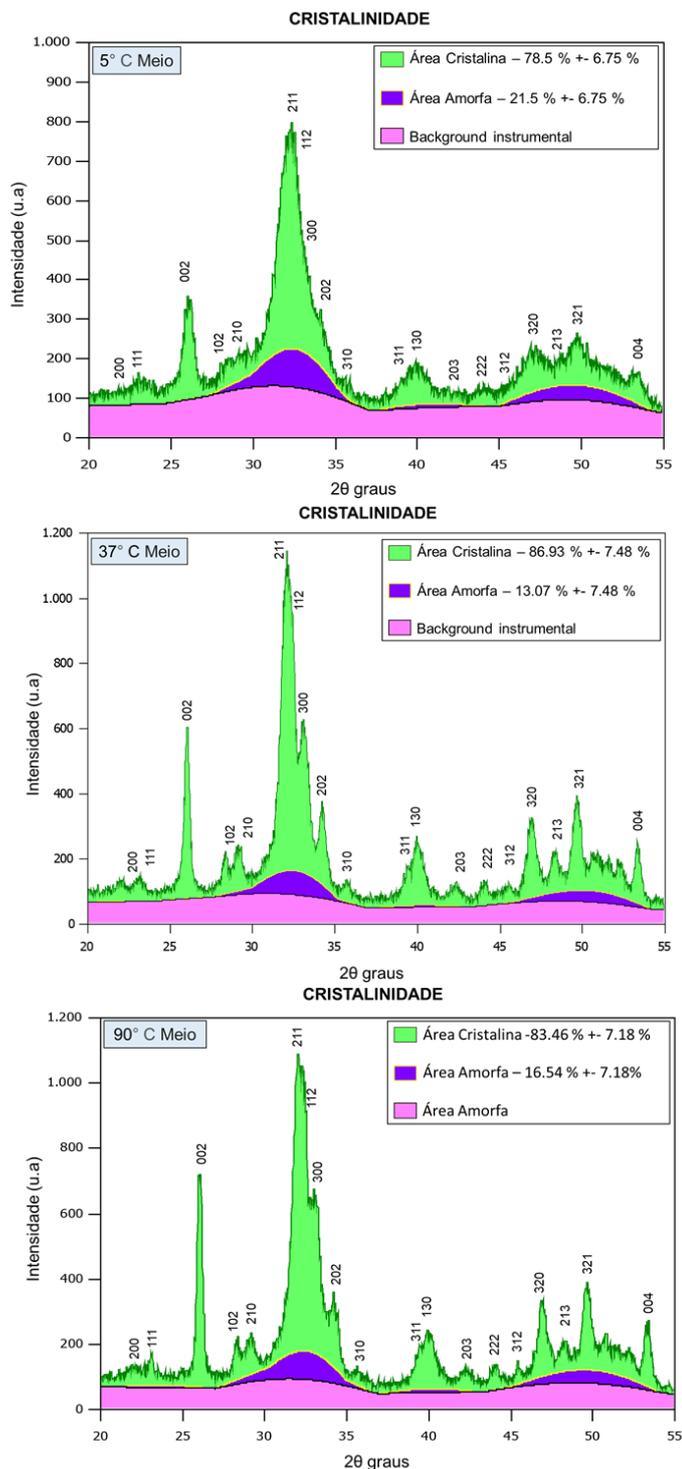
Espectroscopia no infravermelho das CHA que foram expostas a  $\text{H}_2\text{O}$  e secas em estufa, nas temperaturas de síntese 5° C (azul), 37° C (verde) e 90° C (magenta), mostrando as bandas vibracionais dos grupos funcionais da CHA ( $\text{OH}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ ). Essa análise foi feita em triplicata.

## 6.3 CARACTERIZAÇÃO EM MEIO DE CULTIVO

### 6.3.1 Difrátograma de raio x das CHA's-Meio

A análise de DRX confirmou que as CHAs mantiveram seu padrão gráfico de cristalinidade mesmo após a exposição ao meio de cultivo (**Figura 12**).

**Figura 12.** Difratoograma de raio X das CHA's-Meio



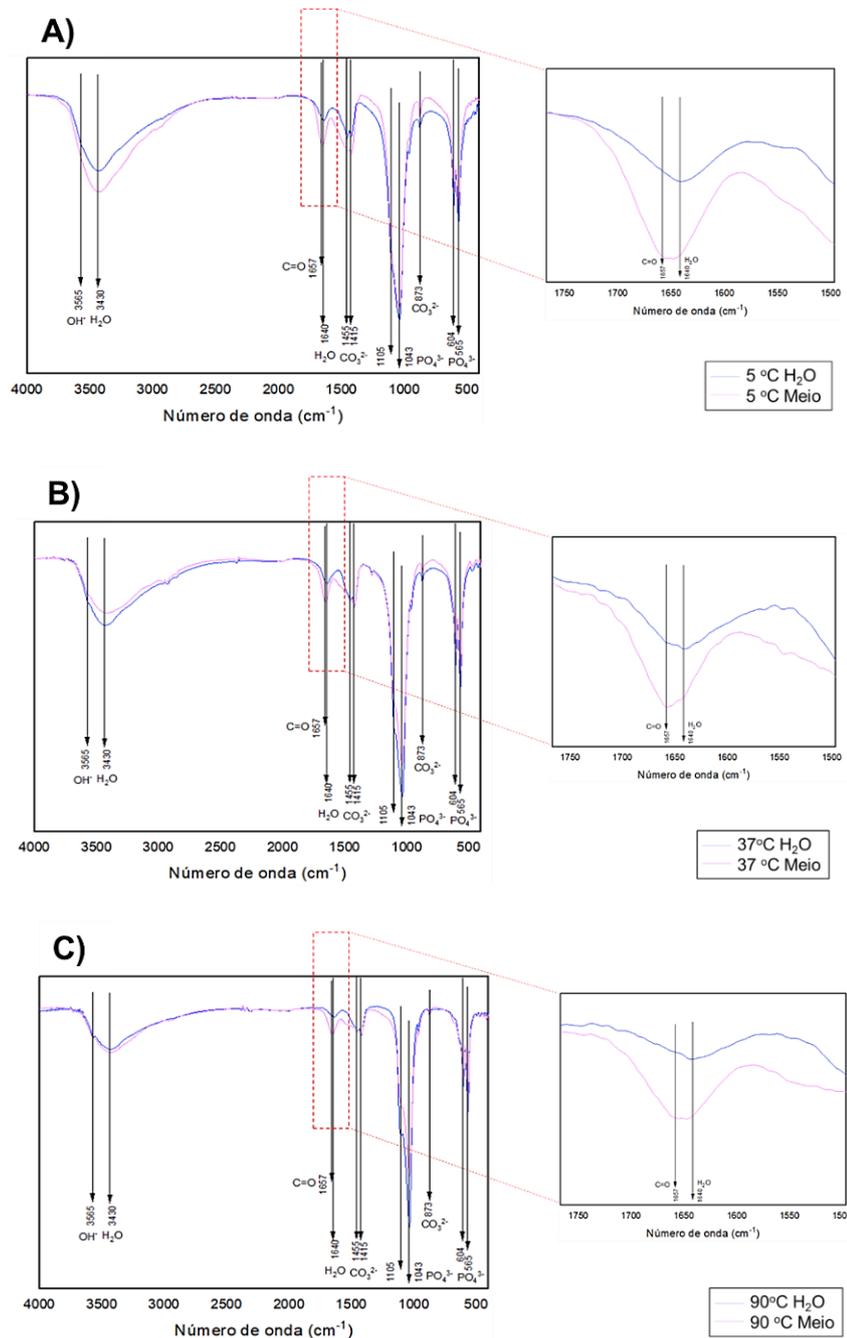
DRX representativo das CHA's que foram expostas e ao meio de cultivo e secas em estufa (37° C). Os gráficos mostram que o padrão de cristalinidade das CHA's não foi alterado após contato com meio de cultivo. Essa análise foi realizada em triplicata de lotes.

### 6.3.2 Análise dos grupos funcionais das CHA's-Meio

Através da análise da técnica de FTIR foi possível identificar que após a exposição das CHA's ao meio de cultivo os grupos funcionais hidroxila e fosfato, característicos da hidroxiapatita se mantiveram. Além disso, foi possível

visualizar a presença da banda na porção do espectro de  $1657\text{ cm}^{-1}$  correspondente a ligação C=O (parte do grupo amida), típica da estrutura de proteínas (**Figura 13**).

**Figura 13.** Espectroscopia no infravermelho das CHA's-H<sub>2</sub>O e Meio



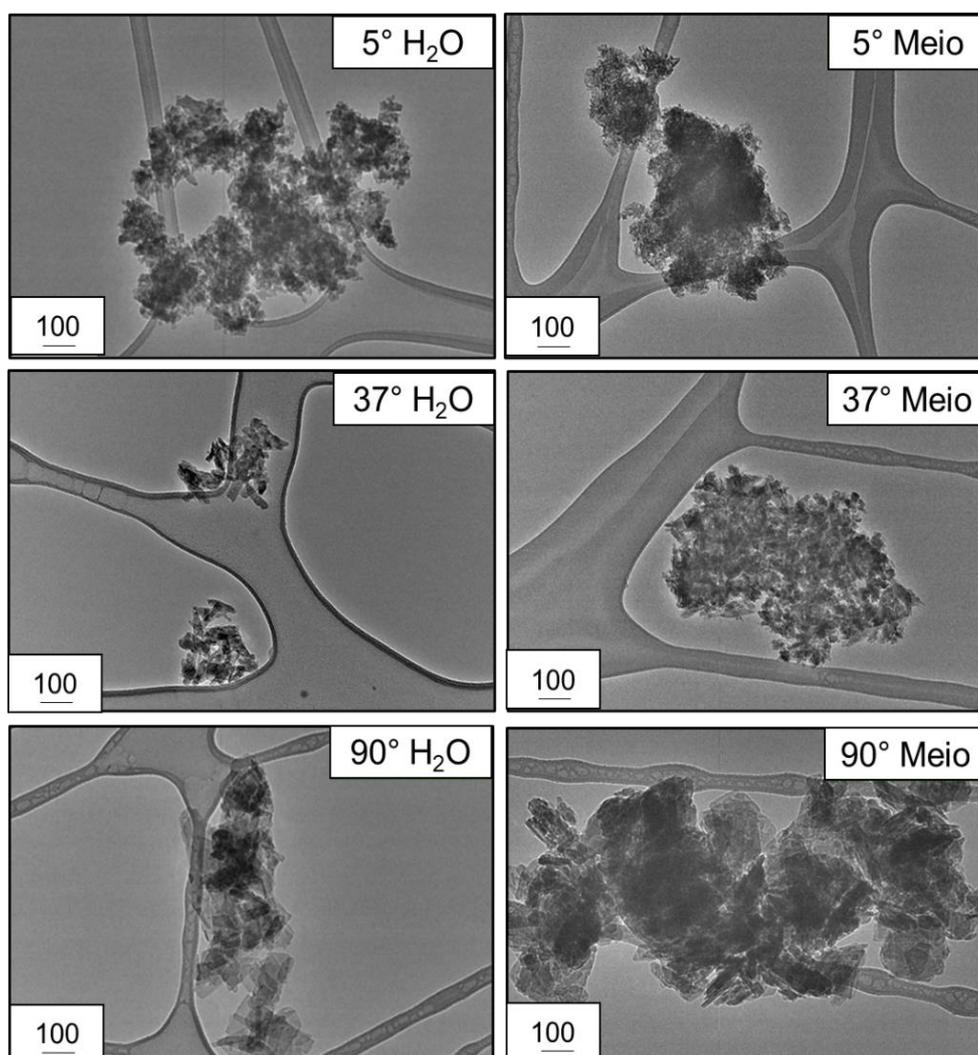
Espectroscopia no infravermelho das CHA's em contato com H<sub>2</sub>O e meio de cultivo e secas em estufa. **(A)** Comparativo da Espectroscopia no infravermelho da CHA 5<sup>o</sup> exposta a H<sub>2</sub>O e meio. **(B)** Comparativo da Espectroscopia no infravermelho da CHA 37<sup>o</sup> exposta a H<sub>2</sub>O e meio. **(C)** Comparativo da Espectroscopia no infravermelho da CHA 90<sup>o</sup> exposta a H<sub>2</sub>O e meio. Os gráficos mostram a presença dos grupos funcionais da CHA (OH, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). Os destaques pontilhados em vermelho apresentam a porção do espectro que indica a presença na banda  $1657\text{ cm}^{-1}$  de C=O (parte do grupo amida), presente em proteínas. Analisado em triplicata.

### 6.3.3 Avaliação da morfologia das partículas de CHA em H<sub>2</sub>O e meio de cultivo

Para avaliar se a temperatura de síntese e a presença de meio de cultivo influencia suas morfologias, as partículas de CHAs foram analisadas por MET confirmando a natureza mais amorfa da CHA 5° C, intermediária para a CHA 37° C e mais cristalina para CHA 90° C (**Figura 14**).

As micrografias mostraram também que a morfologia das CHA's se manteve a mesma depois da exposição ao meio de cultivo, porém em algumas imagens podemos observar um sombreado nas partículas, provavelmente devido á adsorção dos componentes do meio em sua superfície (**Figura 14**).

**Figura 14.** Microscopia eletrônica de transmissão das CHA's-H<sub>2</sub>O e CHA's-Meio

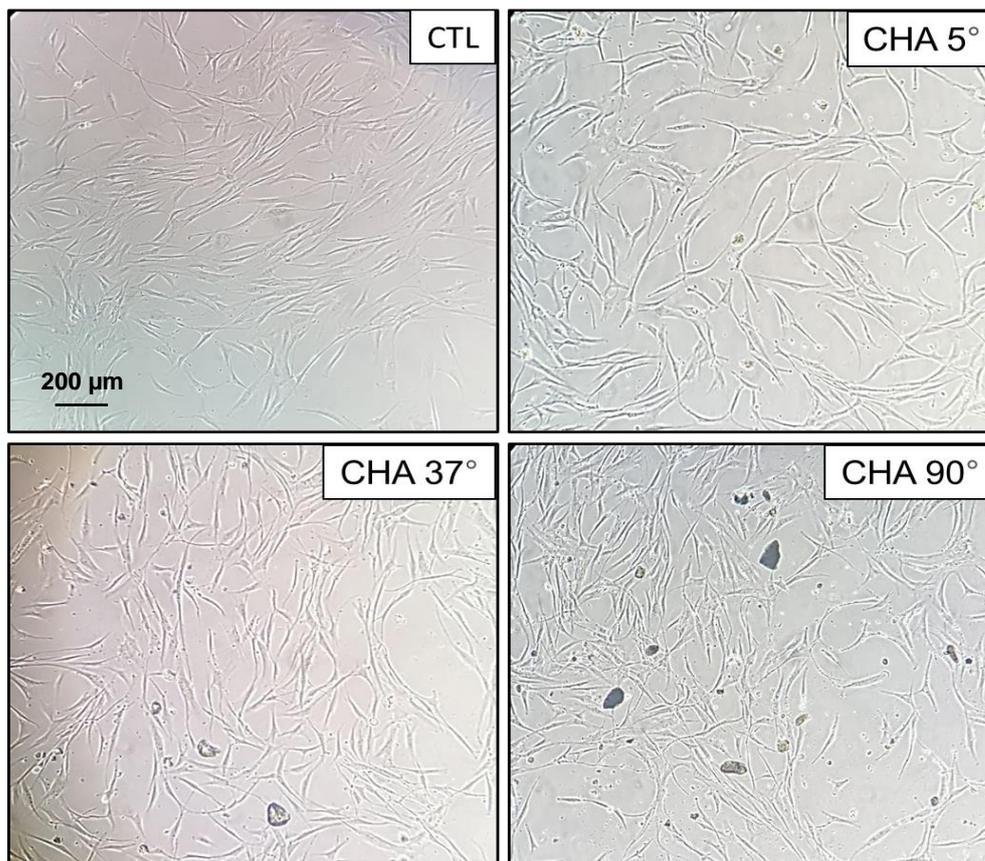


Morfologia da CHA após a exposição a H<sub>2</sub>O e meio de cultura nas temperaturas de síntese (5° C, 37° C e 90° C). Conforme visualizado nas imagens, as partículas se tornam menos amorfas conforme se aumentam as temperaturas de síntese e as mesmas conservaram sua morfologia após o contato com o meio de cultivo (N = 3). Análise feita em triplicata.

## 6.4 ISOLAMENTO DE FIBROBLASTOS HUMANOS PRIMÁRIOS

Os fibroblastos humanos primários foram extraídos e cultivados em meio DMEM *High Glucose* com 10% de soro fetal bovino e 2% de antibiótico (**Figura 15**). Os mesmos foram utilizados nos experimentos a partir da terceira passagem.

**Figura 15.** Cultura de Fibroblastos humanos primários

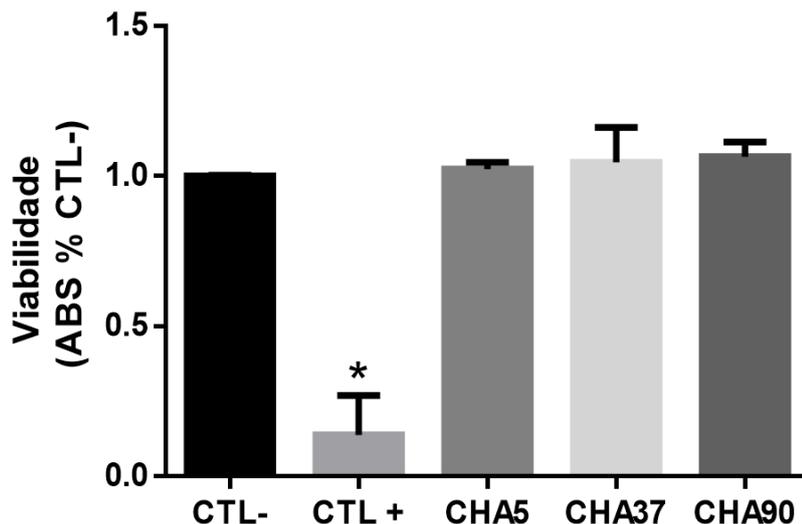


Imagens de fibroblastos humanos primários em semi confluência (Média 80%), cultivados em meio DMEM *High Glucose* com 10% de soro fetal bovino e 2% de antibiótico e expostos a partículas nanoestruturadas de CHA's sintetizadas a 5 °C, 37 °C e 90 °C, por sete dias. As células apresentam morfologia alongada, achatada e filiforme (Aumento 10x).

## 6.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AS CHA'S 5 °C, 37 °C E 90 °C.

Algumas nanopartículas podem apresentar efeito citotóxico. Por esta razão, a viabilidade celular dos fibroblastos humanos expostos as CHAs durante 72 horas foi avaliada através do ensaio de MTT. Nossos resultados apontam que a viabilidade celular dos fibroblastos humanos não foi alterada na presença das CHA's 5 °C, 37 °C e 90 °C em concentração de 50μg/ml (**Figura 16**).

**Figura 16.** Ensaio de Viabilidade celular



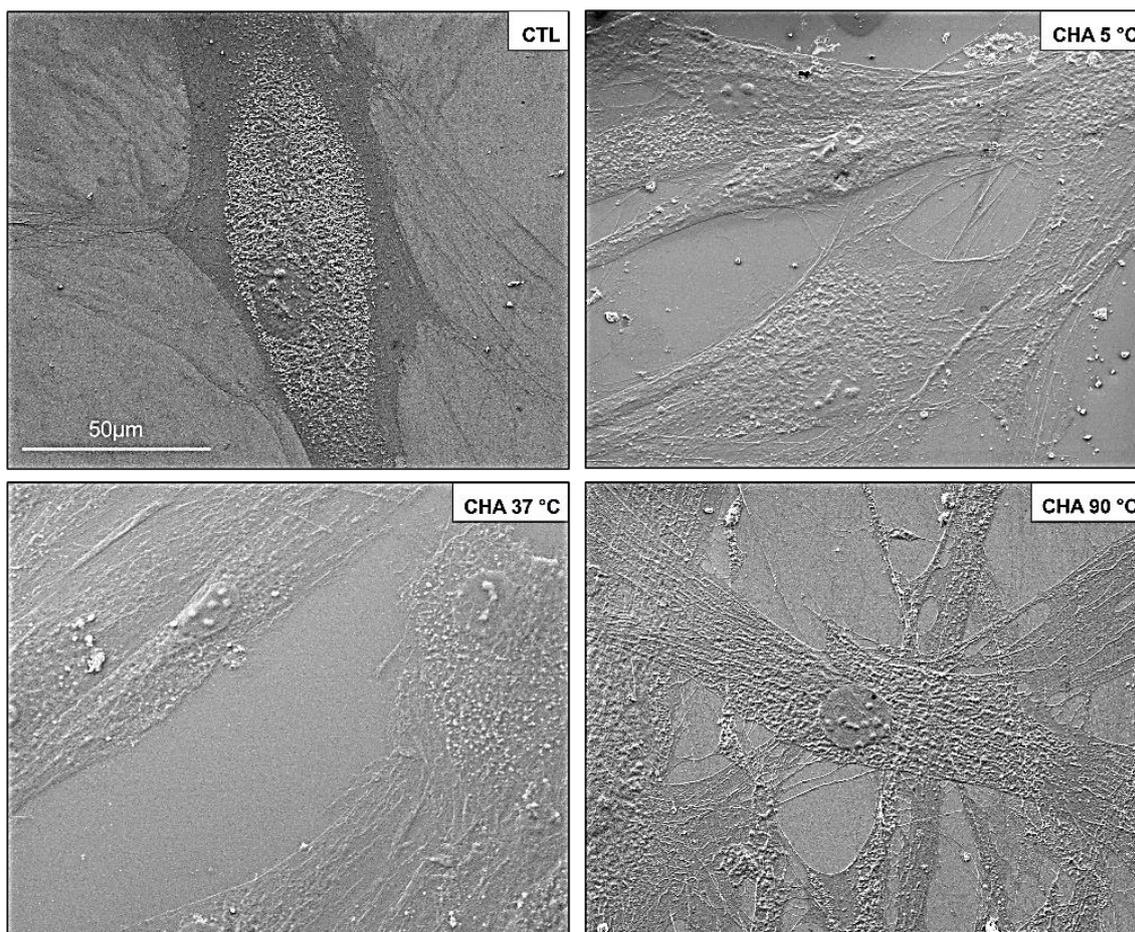
Cultura de fibroblastos humanos mantida por três dias. As células foram mantidas em meio de cultivo (CTL-), tratadas com triton X antes da realização do ensaio (CTL +) ou por três dias com 50µg/ml das CHA's sintetizadas a 5 °C, 37 °C ou 90 °C. O gráfico representa a viabilidade celular analisadas nas respectivas condições. Não observamos diferenças significativas na viabilidade celular no tratamento com as diversas condições de CHA. em nenhuma das temperaturas, indicando que nossas partículas nanoestruturadas não são citotóxicas para os fibroblastos humanos.

## 6.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOESTIMULADOR

### 6.6.1 Exposição das Carbonato Hidroxiapatitas as células

A exposição das células à partículas nanoestruturadas pode alterar a morfologia celular, ainda que não altere sua viabilidade. Para verificar se houve alteração morfológica dos fibroblastos humanos, cultivamos os mesmos em contato com as CHA's 5 °C, 37 °C ou 90 °C por 30 dias e analisamos sua morfologia por microscopia eletrônica de varredura (Figura 16). Os fibroblastos se apresentam morfológicamente espalhados, em formato de fuso aplanado, condizente com a morfologia descrita na literatura.

**Figura 17.** Microscopia eletrônica de varredura da cultura de fibroblastos humanos



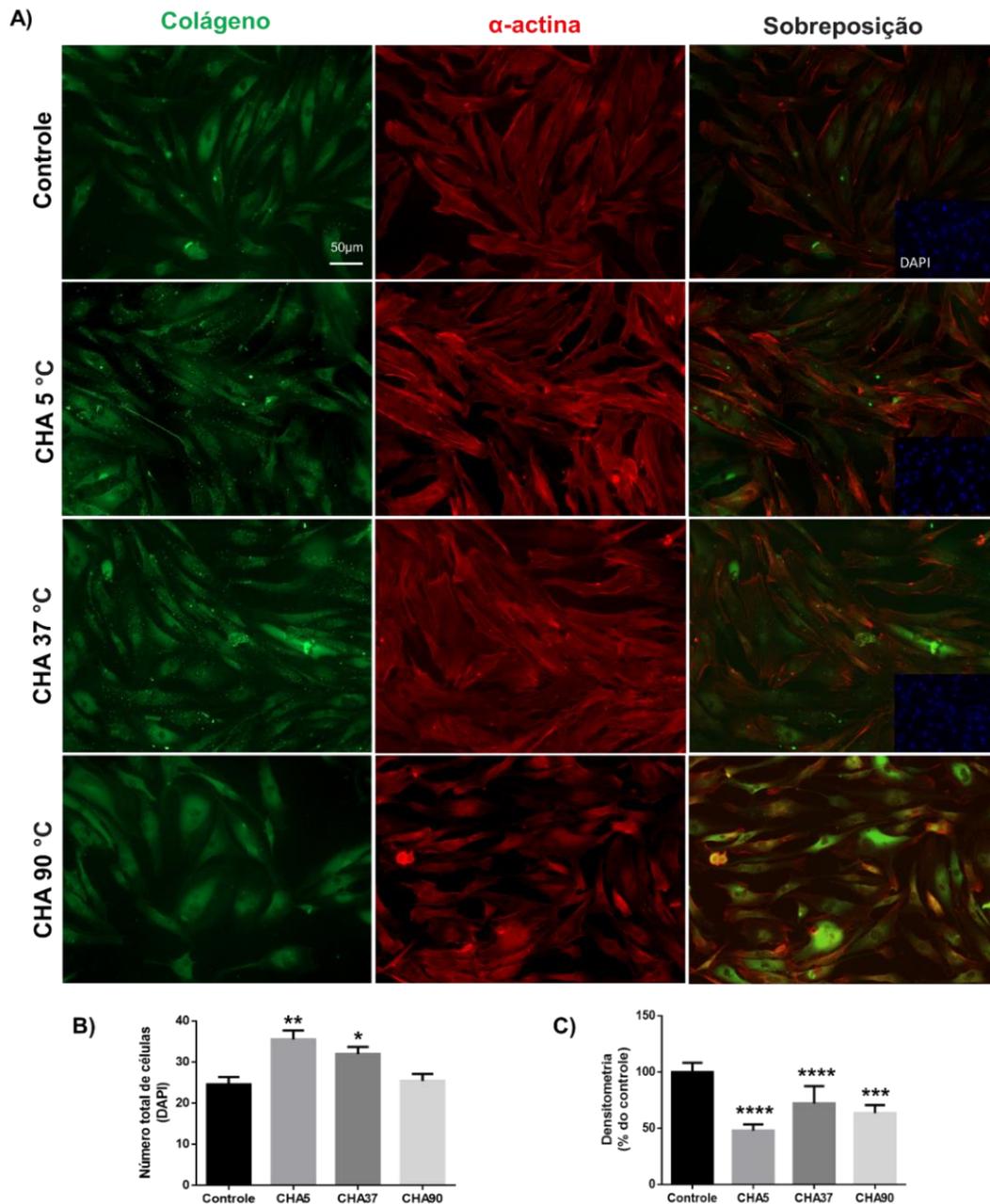
Fotomicrografia apresentando fibroblastos humanos em contato com partículas de Carbonato hidroxapatitas sintetizadas a 5 °C, 37 °C e 90 °C, por um período de 30 dias, comparadas ao controle (células não expostas). As células apresentam morfologia condizente com a literatura, formato de fuso aplanado.

### 6.6.2 Avaliação da matriz de colágeno

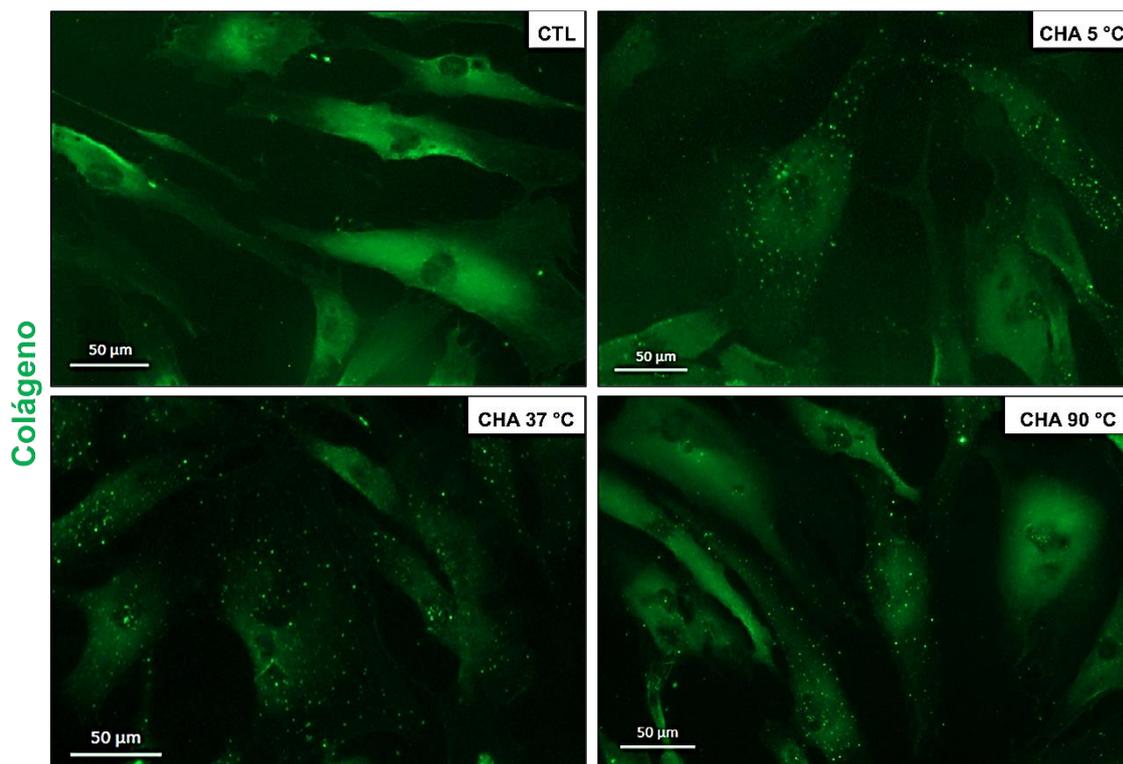
Como o colágeno é o principal constituinte da MEC dérmica, avaliamos seus níveis e organização na matriz por imunomarcagem, na cultura de fibroblastos humanos expostos as CHA's 5 °C, 37 °C ou 90 °C por 7 dias (**Figura 17**). Nossos resultados mostram que houve um aumento significativo do número de células nas condições CHA 5 °C (44%) e CHA 37 °C (30%), quando comparadas ao controle. Entretanto, as células expostas a CHA 90 °C não apresentaram aumento (**Figura 17B**). A densitometria dos níveis de colágeno da MEC apontam uma redução significativa de 52%, na CHA 5 °C, 28%, na CHA 37 °C, e 36%, na CHA 90 °C (**Figura 17C**). Indicando uma modulação negativa dos níveis de colágeno da matriz pelas CHA's. Embora não tenhamos observado um aumento dos níveis de colágeno na MEC, a análise de um maior aumento

evidenciou alterações no padrão de deposição de colágeno (**Figura 19**). As células tratadas com as CHA's 5 °C, 37 °C e 90 °C possuem um padrão de deposição mais pontual do colágeno, quando comparadas ao controle.

**Figura 18.** Avaliação de colágeno da matriz extracelular



Fotomicrografias de fibroblastos humanos expostos a 50µg/ml das CHA's sintetizadas a 5 °C, 37 °C e 90 °C ou apenas ao meio de cultivo, por um período de sete dias. **(A)** Imunomarcagem da matriz de colágeno (verde), dos microfilamentos de actina (faloidina - vermelho) e do núcleo celular (DAPI – azul). Em todas as condições as células se apresentam com morfologia de fuso alongada, condizente com a morfologia dos fibroblastos humanos *in vitro*. **(B)** Número de células nas diferentes condições. **(C)** Densitometria do colágeno. O tratamento com as CHA'S 5 °C e 37 °C aumentou o número de células. Enquanto a exposição das CHA's diminuíram os níveis de colágeno na MEC. ( $p < 0,05$ ). Este estudo foi feito em uma triplicata experimental.

**Figura 19.** Padrão da organização de colágeno da MEC

Maior aumento das fotomicrografias de fibroblastos humanos expostos a 50µg/ml das CHA's sintetizadas a 5 °C, 37 °C e 90 °C ou apenas ao meio de cultivo, por um período de sete dias, imunomarcadas para colágeno. As fotomicrografias evidenciam pontos de acúmulo de fluoróforo por todo o citoplasma das células que foram tratadas com as partículas nanoestruturadas, divergindo do controle (células não tratadas). Indicando uma modificação no padrão de deposição do colágeno na MEC.

## 7. DISCUSSÃO

No presente estudo verificamos que o tratamento de fibroblastos humanos com as CHA's 5 °C, 37 °C com concentração de 50µg/ml por um período de sete dias foi capaz de aumentar o número de células. Embora, nenhuma condição tenha modificado a viabilidade celular, a morfologia e os níveis de colágeno na matriz. Porém, as células tratadas apresentam um padrão distinto de deposição de colágeno na MEC, quando comparado ao controle. Possivelmente, indicando um remodelamento da MEC e/ou uma melhoria na adesão celular, evidenciada pela alteração do número de células.

A literatura informa que o preenchedor estético ideal deve ser: não alergênico, fácil de injetar, evocar o mínimo de dor durante o procedimento, possuir baixo custo, se degradar naturalmente, ser maleável o suficiente para fornecer uma aparência natural, não requerer reconstituição, ser de fácil armazenamento e não necessitar de refrigeração, ter um prazo de validade longo, proporcionar ao paciente um tempo de recuperação mínimo e apresentar poucos efeitos colaterais (FELDERMAN LI, 2005). E estas características podem ser estendidas aos bioestimuladores. Outra informação que deve ser levada em consideração é que as partículas de CHA por serem feitas de íons cálcio e fosfato inorgânicos idênticos à porção mineral do osso, não requerem testes alérgicos prévios, permitindo tratamento imediato (MARMUR ES et al, 2004).

De fato, a hidroxiapatita é um biomaterial cerâmico amplamente estudado e já utilizado na medicina e na odontologia devido as suas propriedades de: biocompatibilidade, capacidade de aderência ao tecido, propriedade de osteocondução, ausência de reações adversas como: inflamação, respostas de corpo estranho, toxicidade e por apresentar grande versatilidade físico-química (RIBEIRO CC et al., 2006).

O potencial de versatilidade da hidroxiapatita, permite a incorporação de  $\text{CO}_3^{2-}$  na estrutura da hidroxiapatita denominada de carbonatada e isso é um fator importante, pois essa substituição faz com que ocorra distorção da rede cristalina. O aumento da quantidade de  $\text{CO}_3^{2-}$  causa diminuição do cristal fazendo com que seja aumentada sua área superficial e contribuindo para o aumento da solubilidade das carbonato hidroxiapatitas (VALLET-REGI M, 2001).

Existem dois tipos possíveis de carbonatação, denominadas carbonatação do tipo A que são preparadas em condições secas e altas temperaturas e a carbonatação do tipo B que acontece em baixas temperaturas e por via úmida (GIBSON IR & BONFIELD W, 2002). Para este trabalho, optamos por trabalhar com a carbonatação do tipo B, em vista do seu produto final apresentar características similares aos tecidos biológicos, o que aumenta sua biocompatibilidade (RIGO ECS et al., 2007). A substituição de  $\text{PO}_4^{3-}$  por  $\text{CO}_3^{2-}$ , um grupo funcional de tamanho comparável ao  $\text{PO}_4^{3-}$  é conhecida por desestabilizar a estrutura da hidroxiapatita e torná-la mais solúvel. (LEGEROS, 1991).

Esta solubilidade poderia estar relacionada à possível facilidade na utilização em procedimentos injetáveis, tornando mais confortável o procedimento para o paciente, em vista de requerer agulha menos calibrosa durante o procedimento, todavia, fármacos solúveis demais talvez estejam associados a uma maior possibilidade de migração.

Atualmente estão disponíveis diversos tipos de síntese do pó devido as crescentes aplicações do mesmo nas diversas áreas das ciências (Santos ML et al, 2005). É importante destacar que os métodos de síntese estão diretamente ligados ao produto final gerado. Dentre os métodos existentes podemos destacar: o método por via seca e o método por via úmida, ambos com diversas subclasses entre eles. Este último tem sido descrito na literatura como a técnica mais utilizada em vista de sua simplicidade de execução, baixo custo e facilidade na eliminação dos rejeitos (VALLET-REGI M et al., 2004).

O método de via úmida ocorre entre precursores de cálcio e fósforo com controle de temperatura e pH da solução. E apesar de ser considerado simples, quando comparado aos demais, devemos levar em consideração a grande dificuldade dos métodos de precipitação por via úmida que está relacionada ao controle das variáveis como: pH, temperatura, razão Ca/P o que pode levar a síntese com produtos finais com diferentes cristalinidades, morfologia e estequiometria o que implica diretamente no comportamento *in vitro* e *in vivo* desse biomaterial (VALLET-REGI M et al., 2004). Acreditamos que produtos sintetizados em temperaturas aproximadas a temperatura corporal (37 °C),

apresentem maior similaridade aos sintetizados dentro do organismo, melhorando com isso sua biocompatibilidade.

As partículas que são produzidas por este método normalmente são estequiométricas, possuem baixa cristalinidade, morfologia irregular e são nanoestruturadas (VERWILGHEN C et al., 2009). O método de síntese por via úmida foi o método adotado durante este trabalho para a obtenção da CHA, era um método conhecido e já executado pelo grupo. Durante a síntese todos os parâmetros foram fielmente controlados, porém, para afirmar o produto final gerado durante a síntese foram executadas técnicas de caracterização físico-químicas tais como: DRX, FTIR e MET. Os próximos passos consistiram em expor o biomaterial sintetizado a célula, e é importante destacar que todas as técnicas de caracterização foram executadas antes e depois do contato com o meio de cultivo.

Os resultados do DRX nos evidenciam que ambas as CHA's apresentam picos com pouca definição e bandas alargadas, característico do perfil de hidroxiapatitas com baixa cristalinidade e nanométricas, o que proporciona a este produto boa similaridade a fase mineral do osso e com isso, maior grau de biocompatibilidade com o organismo (LEGEROS, 2008). As três CHA's sintetizadas durante este projeto e avaliadas por DRX, apresentam graus de cristalinidade semelhantes. Segundo a literatura, o aumento da cristalinidade diminui a solubilidade do material devido ao aumento do tamanho dos cristalitos e/ou aumento da distorção do cristal (HU QH et al., 2007). É válido frisar que também avaliamos por DRX a CHA após exposição ao meio de cultivo e a mesma manteve seus padrões de grau de cristalinidade.

A partir da técnica de DRX, também foi possível avaliar o tamanho médio dos cristalitos, e nossos resultados indicaram que os tamanhos médios dos cristais da CHA sintetizada a 5 °C são menores do que o das CHA's sintetizadas a 37 °C e 90 °C. Cristais menores apresentam uma maior área de contato, permitindo uma melhor interação entre a partícula e o meio aonde a mesma se encontra, como a adsorção de proteínas em superfícies pode facilitar sua internalização, partículas com boa capacidade adsortiva podem ser melhores recebidas dentro do organismo, em vista da melhoria da biocompatibilidade.

Com o objetivo de confirmar a incorporação do grupo  $\text{CO}_3^{2-}$  a hidroxiapatita, fizemos análises de FTIR, que confirmaram a incorporação e nos deram a certeza de que o produto final da síntese era uma CHA. O meio de cultivo simula os fluidos biológicos e quando as partículas nano-estruturadas entram em contato com fluidos biológicos, sua superfície é modificada devido a interação das mesmas com peptídeos, glicolipídios e com as proteínas do meio, que são adsorvidas à superfície das partículas nano-estruturadas conduzindo à formação de um recobrimento proteico dito como “Coroa Proteica”. Este recobrimento não é estável, na maioria das vezes as proteínas que se encontram em alta concentração plasmática são adsorvidas na superfície primeiro, porém ao longo do tempo, estas serão substituídas por proteínas de menor concentração, mas com maior afinidade pelo sítio de ligação (RAHMAN et al, 2013). As células passam a ver então prioritariamente o recobrimento proteico o que pode modificar a interação das partículas nano-estruturadas com as células, sendo necessário ainda analisar essa coroa proteica.

Nossos achados em MET corroboram os achados da literatura quanto a morfologia da CHA. Segundo Hong YL e cols em 2010, as CHA's apresentam formato do tipo nano-bastões e agulhas. Após o contato com o meio de cultivo, as mesmas continuavam apresentando a morfologia esperada. Adicionalmente, a literatura diz que apesar das partículas sintetizadas por precipitação serem de tamanho nanométrico, as mesmas possuem grande capacidade para formação de agregados, e é assim que as mesmas se apresentam em nossos resultados de MET (HONG YL et al., 2010; ANJOS et al, 2018).

Após a confirmação da eficiência da síntese e do comportamento do biomaterial frente ao contato com o meio de cultivo, trabalhamos no cultivo dos fibroblastos e expomos a eles por três dias a dose de  $50\mu\text{g/ml}$  das CHA's para a execução dos ensaios de viabilidade e conforme esperado as CHA's não induziam a morte dos fibroblastos, levando em consideração que o número de células não teve decréscimo após contato com as CHA's. Estando nossa viabilidade  $\geq$  a 70% podemos afirmar que as CHA's não alteram a viabilidade de fibroblastos humanos.

Sabendo que o material não era citotóxico, cabia agora compreender se este material apresentava potencial bioestimulador de colágeno em fibroblastos humanos, assim como o mesmo é capaz de induzir síntese de colágeno em células mg63 (dados anteriores do grupo ainda em fase de publicação), para que pudesse ser utilizado como um futuro bioestimulador em procedimentos estéticos clínicos.

A análise da exposição das CHA's aos fibroblastos humanos, através da técnica de microscopia de fluorescência mostram que as CHA's não causaram alterações na morfologia dos fibroblastos, os mesmos se mantiveram bem espalhados, em formato de fuso aplanado. A morfologia dos fibroblastos está intimamente ligada ao desempenho dos mesmos na síntese de proteínas da MEC e na preservação das mesmas. Segundo Fisher e Cols, os fibroblastos apresentam integrinas associadas ao seu citoesqueleto que se unem ao colágeno, mantendo a tensão mecânica adequada e promovendo o estiramento dos mesmos. O estiramento dos fibroblastos é necessário para a produção de níveis normais de colágeno e para a redução dos níveis de MMP's, como a collagenase que reduzem os níveis de colágeno da MEC (Fisher *et al.*, 2008).

Sabendo que a melhoria do estiramento celular e da adesão de fibroblastos a MEC está associada a uma síntese de colágeno normal (Langholz O *et al.*, 1995), caberia avaliar futuramente as integrinas da membrana dos fibroblastos humanos, para verificar se de alguma forma as CHA's melhoraram o estiramento celular e a adesão das mesmas a MEC, propiciando um melhor funcionamento celular.

Em nossas imagens de microscopia de fluorescência as culturas tratadas com CHA's apresentavam pontos focais de colágeno co-localizados, que podem ser pontos de adesão focal à matriz. Em vista do colágeno da MEC estar ligado por integrinas contidas na membrana dos fibroblastos, e estas integrinas estarem associadas internamente ao citoesqueleto intermediadas por proteínas de adesão como vinculina, FAK e talina, analisar esses pontos de adesão focal através da microscopia de fluorescência, utilizando marcadores para estas proteínas indicaria se estas células estão melhores aderidas a MEC após exposição as nossas partículas de CHA, o que pode ser um bom indicativo

da melhoria na síntese de componentes de MEC. Um possível indicativo na melhoria da adesão das células é o fato de em nossos achados termos visualizado o aumento do número de células após contato das mesmas com as CHA's. Entretanto, ensaios adicionais que analisem a proliferação e o ciclo celular seriam importantes.

A análise das fibras de estresse também seria de grande valia na fundamentação e conseqüente entendimento se houve melhoria na adesão celular e conseqüente maior efetividade na síntese de componentes da MEC. As Fibras de estresse são feixes à base de actina e miosina localizados no citoplasma das células, cujas propriedades estruturais e contráteis são a base de vários processos celulares, incluindo adesão, remodelamento da MEC e motilidade das células (Elena Kassianidou E & and Kumar S, 2015).

Diferente da epiderme que é um tecido epitelial, e por isso rico em células, a derme é um tecido abundante em matriz celular, e com menor número de células. A principal célula da derme é o fibroblasto e a síntese da MEC dérmica é principalmente função dele. A derme é composta majoritariamente de fibras colágenas, compreendendo aproximadamente 75% do peso seco da pele. Os principais tipos de colágeno da pele são os de tipo I, que representam 80 a 90% do colágeno total e os de tipo III que representam entre 8 a 12%. Como a MEC dérmica é ocupada em grande percentagem pelo colágeno, optamos por avaliar por densitometria o aumento de síntese desta proteína, por acreditarmos que a maior reestruturação da derme envelhecida, virá a partir do depósito desta proteína em concentrações ideais. Contudo, nossos resultados quanto ao aumento da expressão de colágeno mostram que as CHA's não foram capazes de induzir a síntese de colágeno do tipo I em fibroblastos humanos por um período de sete dias, porém como a análise se concentrou apenas na presença ou não da proteína, caberia a avaliação da qualidade desta proteína. O Colágeno é uma proteína que sofre remodelamento, e podemos avaliar isso efetivamente no processo de cicatrização de feridas. Por isso, caberia avaliar o remodelamento do colágeno através da microscopia eletrônica de varredura com imunomarcagem também, pois o efeito lifting visualizado clinicamente pode advir do remodelamento do colágeno e não apenas do aumento de concentração desta proteína.

A técnica utilizada em nossa avaliação se concentrava em colágeno do tipo I, o colágeno do tipo III não foi avaliado em nossos experimentos. Sabemos que após as injeções *in vivo* de hidroxiapatita o organismo absorve rapidamente o gel de condução, e gera um processo inflamatório local com síntese de colágeno III, primariamente, e ao término remodela o colágeno para um colágeno de tipo I (Broughton G *et al.*, 2006).

Apesar do colágeno ser o principal componente da MEC, os fibroblastos por serem a principal célula deste tecido também sintetizam outros componentes como a elastina, os proteoglicanos, glicosaminoglicanos, e entre outros. Do ponto de vista da reestruturação de um tecido, analisar os demais componentes poderia responder se as CHA's foram capazes de melhorar o tecido dérmico em algum aspecto. Vale frisar também que segundo a literatura a reposição de outros componentes da matriz é capaz de tornar o microambiente propício a síntese de colágeno (Quan T *et al.*, 2013).

A fibras de elastina desempenham um papel importante na complacência da pele, permitindo o retorno da pele após seu prévio estiramento, contribuindo bastante com o aspecto clínico de firmeza da pele. A análise da expressão dessa proteína, poderia ser avaliada a partir de técnicas como ELISA e *Western Blot*.

A análise de moléculas também se faz importante, visto que o fator de transformação de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) é um importante regulador da biossíntese da MEC. O TGF- $\beta$  controla a homeostase do colágeno, regulando a produção e a degradação do colágeno pela via Smad em fibroblastos humanos dérmicos. Genes da MEC incluindo os da síntese de colágeno, são diretamente regulados positivamente pela sinalização de TGF- $\beta$  / Smad e por isso a via de sinalização TGF- $\beta$  / Smad é crítica para manter a integridade estrutural e mecânica do tecido conjuntivo dérmico, aumentando a produção de MEC e inibindo a degradação (Langholz O *et al.*, 1995).

Embora pelas nossas análises as CHA's não tenham aumentado a síntese de colágeno tipo I em fibroblastos humanos, as CHA's 5°C e 37 °C conseguiram estimular o aumento do número de células, e isso a longo prazo poderá se refletir em uma maior síntese de componentes dérmicos que reestruturarão o tecido, devolvendo clinicamente um aspecto de firmeza mais

jovial. Em face dos resultados apresentados o biomaterial que apresentou características mais desejáveis para utilização clínica, foi a CHA 5 °C. Em função do seu cristalito ser menor, com uma mesma massa teremos mais superfícies para adsorção de proteínas e componentes teciduais, fazendo com que sua biocompatibilidade possa ser maior. Além disso, o tamanho menor da partícula fará com que a aplicação seja facilitada e a incorporação do biomaterial ao tecido seja melhor. O aumento no número de células poderá ser benéfico no que tange o aumento dos níveis de colágeno da MEC ao longo prazo. Entretanto, serão necessários estudos adicionais, *in vivo*, que comprovem os efeitos observados *in vitro*, bem como como uma análise da resposta inflamatória, afim de comprovar sua biocompatibilidade.

## 8. CONCLUSÃO

### 8.1 Conclusão geral

Nosso trabalho evidenciou que todas as CHA's não apresentaram efeito citotóxico. Entretanto as mesmas não foram capazes de bioestimular a curto prazo a síntese de colágeno pelos fibroblastos humanos de pele em cultura *in vitro*.

### 8.2 Conclusões específicas

- As CHA's nanoestruturadas foram sintetizadas adequadamente nas três temperaturas de síntese escolhidas (5 °C, 37 °C e 90 °C);
- A caracterização das CHA's nanoestruturadas mostrou que em contato com o meio de cultura, todas as CHA's foram capazes de adsorver proteínas do meio, possivelmente, fator relevante para sua apresentação para a célula e consequente aumento da biocompatibilidade;
- Quando comparadas com as demais partículas nanoestruturadas estudadas, a CHA 5 °C possui um tamanho médio de cristalito menor, o que pode favorecer a adsorção a sua superfície, influenciando sua biocompatibilidade;
- As CHA's não demonstraram citotoxicidade aos fibroblastos de pele humana;
- Identificamos a diminuição dos níveis de colágeno tipo I na matriz de fibroblastos expostos as CHA's. Entretanto, não podemos descartar o papel bioestimulador dessas partículas em um prazo maior ou mesmo em outros componentes da matriz extracelular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afshar, A., Ghorbani, M., Ehsani, N., Saeri, M. R., & Sorrell, C. C. (2003). Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite. *Materials & Design*, 24(3), 197-202.
- Araújo, A. R. D., Soares, V. P. C., Silva, F. S. D., & Moreira, T. D. S. (2015). Radiofrequency for the treatment of skin laxity: myth or truth. *Anais brasileiros de dermatologia*, 90(5), 707-721.
- Avantaggiato, A., Girardi, A., Palmieri, A., Pascali, M., & Carinci, F. (2015). Comparison of bio-revitalizing injective products: a study on skin fibroblast cultures. *Rejuvenation research*, 18(3), 270-276.
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. D. C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de nutrição*, 23(4), 629-643.
- Barrán-Berdón, A. L., Pozzi, D., Caracciolo, G., Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., ... & Laganà, A. (2013). Time evolution of nanoparticle–protein corona in human plasma: relevance for targeted drug delivery. *Langmuir*, 29(21), 6485-6494.
- Beigvand, H. H., Razzaghi, M., Rostami-Nejad, M., Rezaei-Tavirani, M., Safari, S., Rezaei-Tavirani, M., ... & Heidari, M. H. (2020). Assessment of Laser Effects on Skin Rejuvenation. *Journal of lasers in medical sciences*, 11(2), 212.
- Benítez, J. M., & Montáns, F. J. (2017). The mechanical behavior of skin: Structures and models for the finite element analysis. *Computers & Structures*, 190, 75-107.
- Berneburg, M., Grether-Beck, S., Kürten, V., Ruzicka, T., Briviba, K., Sies, H., & Krutmann, J. (1999). Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *Journal of Biological Chemistry*, 274(22), 15345-15349.
- Boer, M., Duchnik, E., Maleszka, R., & Marchlewicz, M. (2016). Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, 33(1), 1.
- Braun, N. J., DeBrosse, M. C., Hussain, S. M., & Comfort, K. K. (2016). Modification of the protein corona–nanoparticle complex by physiological factors. *Materials Science and Engineering: C*, 64, 34-42.
- Capella-Monsonís, H., Coentro, J. Q., Graceffa, V., Wu, Z., & Zeugolis, D. I. (2018). An experimental toolbox for characterization of mammalian collagen type I in biological specimens. *Nature protocols*, 13(3), 507.
- Caracciolo, G., Farokhzad, O. C., & Mahmoudi, M. (2017). Biological identity of nanoparticles in vivo: clinical implications of the protein corona. *Trends in biotechnology*, 35(3), 257-264.

Casals, E., Pfaller, T., Duschl, A., Oostingh, G. J., & Puentes, V. F. (2011). Hardening of the nanoparticle–protein corona in metal (Au, Ag) and oxide (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, CoO, and CeO<sub>2</sub>) nanoparticles. *Small*, 7(24), 3479-3486.

Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggård, T., Thulin, E., Nilsson, H., ... & Linse, S. (2007). Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7), 2050-2055.

Christen, M. O., & Vercesi, F. (2020). Polycaprolactone: How a well-known and futuristic polymer has become an innovative collagen-stimulator in esthetics. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 13, 31.

da Silva, W. J. M., & Ferrari, C. K. B. (2011). Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, 14(3), 441-451.

Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F., & Desmoulière, A. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 7, 301.

de Melo Costa, A. C. F., de Lima, M. G., de Almeida Lima, L. H. M., Cordeiro, V. V., de Souto Viana, K. M., de Souza, C. V., & de Lucena Lira, H. (2009). 4. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. *Revista eletrônica de Materiais e Processos*, 4(3).

Deda, D. K., Pavani, C., Caritá, E., Baptista, M. S., Toma, H. E., & Araki, K. (2013). Control of cytolocalization and mechanism of cell death by encapsulation of a photosensitizer. *Journal of biomedical nanotechnology*, 9(8), 1307-1317.

Desjardins-Park, H. E., Foster, D. S., & Longaker, M. T. (2018). Fibroblasts and wound healing: an update.

Donath, A. S., Glasgold, R. A., & Glasgold, M. J. (2007). Volume loss versus gravity: new concepts in facial aging. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 15(4), 238-243.

Dos Anjos, S., Mavropoulos, E., Alves, G. G., Costa, A. M., de Alencar Hausen, M., Spiegel, C. N., ... & Rossi, A. M. (2019). Impact of crystallinity and crystal size of nanostructured carbonated hydroxyapatite on pre-osteoblast in vitro biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107(9), 1965-1976.

Emerich, D. F., & Thanos, C. G. (2003). Nanotechnology and medicine. *Expert opinion on biological therapy*, 3(4), 655-663.

Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., & Maibach, H. I. (2008). Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *International Journal of Cosmetic Science*, 30(2), 87-95.

Felderman, L. I. (2005). Radiesse™ for facial rejuvenation. *COSMETIC DERMATOLOGY-CEDAR KNOLLS-*, 18(12), 823-829.

Fisher, G. J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S., & Voorhees, J. J. (2002). Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Archives of dermatology*, *138*(11), 1462-1470.

Fisher, G. J., Varani, J., & Voorhees, J. J. (2008). Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Archives of dermatology*, *144*(5), 666-672.

Fitzgerald, R., Graivier, M. H., Kane, M., Lorenc, Z. P., Vleggaar, D., Werschler, W. P., & Kenkel, J. M. (2010). Nonsurgical modalities to treat the aging face. *Aesthetic surgery journal*, *30*(1\_Supplement), 31S-35S.

Fleischer, C. C., & Payne, C. K. (2014). Nanoparticle–cell interactions: molecular structure of the protein corona and cellular outcomes. *Accounts of chemical research*, *47*(8), 2651-2659.

Fore, J. (2006). A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy/wound management*, *52*(9), 24-35.

Foroozandeh, P., & Aziz, A. A. (2015). Merging worlds of nanomaterials and biological environment: factors governing protein corona formation on nanoparticles and its biological consequences. *Nanoscale research letters*, *10*(1), 1-12.

Foroozandeh, P., & Aziz, A. A. (2015). Merging worlds of nanomaterials and biological environment: factors governing protein corona formation on nanoparticles and its biological consequences. *Nanoscale research letters*, *10*(1), 1-12.

Fulmer, M. T., Martin, R. I., & Brown, P. W. (1992). Formation of calcium deficient hydroxyapatite at near-physiological temperature. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *3*(4), 299-305.

George Broughton, I. I., Janis, J. E., & Attinger, C. E. (2006). The basic science of wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*, *117*(7S), 12S-34S.

Gibson, I. R., & Bonfield, W. (2002). Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, *59*(4), 697-708.

Gibson, S. J., & Farrell, M. (2004). A review of age differences in the neurophysiology of nociception and the perceptual experience of pain. *The Clinical journal of pain*, *20*(4), 227-239.

Gilchrest, B. A., Murphy, G. F., & Soter, N. A. (1982). Effect of chronologic aging and ultraviolet irradiation on Langerhans cells in human epidermis. *Journal of investigative dermatology*, *79*(2), 85-88.

Gilhar, A., Ullmann, Y., Karry, R., Shalaginov, R., Assy, B., Serafimovich, S., & Kalish, R. S. (2004). Ageing of human epidermis: the role of apoptosis, Fas and telomerase. *British journal of dermatology*, *150*(1), 56-63.

Goldberg, D., Guana, A., Volk, A., & Daro-Kaftan, E. (2013). Single-arm study for the characterization of human tissue response to injectable poly-L-lactic acid. *Dermatologic Surgery*, 39(6), 915-922.

Guastaldi, A. C., & Aparecida, A. H. (2010). Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Química nova*, 33(6), 1352-1358.

Guinot, C., Malvy, D. J. M., Ambroisine, L., Latreille, J., Mauger, E., Tenenhaus, M., ... & Tschachler, E. (2002). Relative contribution of intrinsic vs extrinsic factors to skin aging as determined by a validated skin age score. *Archives of dermatology*, 138(11), 1454-1460.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.

Helfrich, Y. R., Sachs, D. L., & Voorhees, J. J. (2008). Overview of skin aging and photoaging. *Dermatology nursing*, 20(3).

Hong, Y., Fan, H., Li, B., Guo, B., Liu, M., & Zhang, X. (2010). Fabrication, biological effects, and medical applications of calcium phosphate nanoceramics. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 70(3-6), 225-242.

Hu, Q., Tan, Z., Liu, Y., Tao, J., Cai, Y., Zhang, M., ... & Tang, R. (2007). Effect of crystallinity of calcium phosphate nanoparticles on adhesion, proliferation, and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Materials Chemistry*, 17(44), 4690-4698.

Hughes, J. M. (1996). *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates* By JC Elliot (The London Hospital Medical College). Elsevier: Amsterdam. 1994. xii+ 389 pp. ISBN 0-444-81582-1.

International Society of Plastic Surgery (ISAPS), Global Statistics, <https://www.isaps.org/> 2021 (Acessado em: 06 de fevereiro de 2021)

Iorizzo, M., De Padova, M. P., & Tosti, A. (2008). Biorejuvenation: theory and practice. *Clinics in dermatology*, 26(2), 177-181.

Jiang, X., Dausend, J., Hafner, M., Musyanovych, A., Röcker, C., Landfester, K., ... & Nienhaus, G. U. (2010). Specific effects of surface amines on polystyrene nanoparticles in their interactions with mesenchymal stem cells. *Biomacromolecules*, 11(3), 748-753.

Kadouch, J. A. (2017). Calcium hydroxylapatite: a review on safety and complications. *Journal of cosmetic dermatology*, 16(2), 152-161.

Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 16(9), 582.

Kammeyer, A., & Luiten, R. M. (2015). Oxidation events and skin aging. *Ageing research reviews*, 21, 16-29.

- Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European journal of dermatology*, 12(4), 390-401.
- Kassianidou, E., & Kumar, S. (2015). A biomechanical perspective on stress fiber structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1853(11), 3065-3074.
- Katiyar, S. K., & Mukhtar, H. (2001). Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment to mouse skin prevents UVB-induced infiltration of leukocytes, depletion of antigen-presenting cells, and oxidative stress. *Journal of Leukocyte Biology*, 69(5), 719-726.
- Kligman, A. M. (1979). Perspectives and problems in cutaneous gerontology. *Journal of Investigative Dermatology*, 73(1), 39-46.
- Kolarsick, P. A., Kolarsick, M. A., & Goodwin, C. (2011). Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), 203-213.
- Koutsopoulos, S. (2002). Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 62(4), 600-612.
- Kumar, R., Prakash, K. H., Cheang, P., & Khor, K. A. (2004). Temperature driven morphological changes of chemically precipitated hydroxyapatite nanoparticles. *Langmuir*, 20(13), 5196-5200.
- Kumta, P. N., Sfeir, C., Lee, D. H., Olton, D., & Choi, D. (2005). Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. *Acta Biomaterialia*, 1(1), 65-83.
- Labet, M., & Thielemans, W. (2009). Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical society reviews*, 38(12), 3484-3504.
- Lacarrubba, F., Tedeschi, A., Nardone, B., & Micali, G. (2008). Mesotherapy for skin rejuvenation: assessment of the subepidermal low-echogenic band by ultrasound evaluation with cross-sectional B-mode scanning. *Dermatologic therapy*, 21, S1-S5.
- Lam, S. M., Azizzadeh, B., & Graivier, M. (2006). Injectable poly-L-lactic acid (Sculptra): technical considerations in soft-tissue contouring. *Plastic and reconstructive surgery*, 118(3S), 55S-63S.
- Langholz, O., Röckel, D., Mauch, C., Kozłowska, E., Bank, I., Krieg, T., & Eckes, B. (1995). Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins. *The Journal of cell biology*, 131(6), 1903-1915.
- Lazić, S., Katanić-Popović, J., Zec, S., & Miljević, N. (1996). Properties of hydroxyapatite crystallized from high temperature alkaline solutions. *Journal of Crystal Growth*, 165(1-2), 124-128.

- Lee, J. C., & Lorenc, Z. P. (2016). Synthetic fillers for facial rejuvenation. *Clinics in plastic surgery*, 43(3), 497-503.
- LeGeros, R. Z. (1991). Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monographs in oral sciences*, 15, 109-111.
- LeGeros, R. Z. (2008). Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chemical reviews*, 108(11), 4742-4753.
- Liu, W., Rose, J., Plantevin, S., Auffan, M., Bottero, J. Y., & Vidaud, C. (2013). Protein corona formation for nanomaterials and proteins of a similar size: hard or soft corona?. *Nanoscale*, 5(4), 1658-1668.
- Lück, M., Paulke, B. R., Schröder, W., Blunk, T., & Müller, R. H. (1998). Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials*, 39(3), 478-485.
- Ma, Q. Y., Logan, T. J., & Traina, S. J. (1995). Lead immobilization from aqueous solutions and contaminated soils using phosphate rocks. *Environmental Science & Technology*, 29(4), 1118-1126.
- Marambio-Jones, C., & Hoek, E. M. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1531-1551.
- Marmur, E. S., Phelps, R., & Goldberg, D. J. (2004). Clinical, histologic and electron microscopic findings after injection of a calcium hydroxylapatite filler. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 6(4), 223-226.
- Mavropoulos, E. (1999). A hidroxiapatita como removedora de chumbo. *Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz*.
- Michniak-Kohn, B., & Leonardi, G. R. (2017). An overview about oxidation in clinical practice of skin aging. *Anais brasileiros de dermatologia*, 92(3), 367-374.
- Milani, S., Baldelli Bombelli, F., Pitek, A. S., Dawson, K. A., & Radler, J. (2012). Reversible versus irreversible binding of transferrin to polystyrene nanoparticles: soft and hard corona. *ACS nano*, 6(3), 2532-2541.
- Monopoli, M. P., Walczyk, D., Campbell, A., Elia, G., Lynch, I., Baldelli Bombelli, F., & Dawson, K. A. (2011). Physical– chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 133(8), 2525-2534.
- Neerken, S., Lucassen, G. W., Bisschop, M. A., Lenderink, E., & Nuijs, T. A. (2004). Characterization of age-related effects in human skin: A comparative study that applies confocal laser scanning microscopy and optical coherence tomography. *Journal of biomedical optics*, 9(2), 274-281.

O'Brien, J., & Shea, K. J. (2016). Tuning the protein corona of hydrogel nanoparticles: the synthesis of abiotic protein and peptide affinity reagents. *Accounts of chemical research*, 49(6), 1200-1210.

Oriá, R. B., Ferreira, F. V. A., Santana, É. N., Fernandes, M. R., & Brito, G. A. (2003). Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histo-morfometria e autofluorescência. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 78(4), 425-434.

Park, H., Kim, E., Kim, J., Ro, Y., & Ko, J. (2015). High-intensity focused ultrasound for the treatment of wrinkles and skin laxity in seven different facial areas. *Annals of dermatology*, 27(6), 688.

Park, J. I., Kim, M. G., Jun, Y. W., Lee, J. S., Lee, W. R., & Cheon, J. (2004). Characterization of superparamagnetic "core-shell" nanoparticles and monitoring their anisotropic phase transition to ferromagnetic "solid solution" nanoalloys. *Journal of the American Chemical Society*, 126(29), 9072-9078.

PASSOTTO, J. A., PENTEADO, M. D. V. C., & MANCINI-FILHO, J. (1998). Atividade antioxidante do beta-caroteno e da vitamina A. Estudo comparativo com antioxidante sintético. *Food Science and Technology*, 18(1), 68-72.

Paula, A. J., Araujo Junior, R. T., Martinez, D. S. T., Paredes-Gamero, E. J., Nader, H. B., Durán, N., ... & Alves, O. L. (2013). Influence of protein corona on the transport of molecules into cells by mesoporous silica nanoparticles. *ACS applied materials & interfaces*, 5(17), 8387-8393.

Pelletier-Louis, M. L. (2017, October). Peelings chimiques et prise en charge du vieillissement cutané. In *Annales de Chirurgie Plastique Esthétique* (Vol. 62, No. 5, pp. 520-531). Elsevier Masson.

Pepla, E., Besharat, L. K., Palaia, G., Tenore, G., & Migliau, G. (2014). Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. *Annali di stomatologia*, 5(3), 108.

Pires, A. L. R., Bierhalz, A. C., & Moraes, Â. M. (2015). Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Química nova*, 38(7), 957-971.

Poljšak, B., & Dahmane, R. Free Radicals and Extrinsic Skin Aging. *Dermatology Research and Practice*. 2012; 2012: 1-4.

Quan, T., Wang, F., Shao, Y., Rittié, L., Xia, W., Orringer, J. S., ... & Fisher, G. J. (2013). Enhancing structural support of the dermal microenvironment activates fibroblasts, endothelial cells, and keratinocytes in aged human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 658-667.

Rahman, M., Laurent, S., Tawil, N., & Mahmoudi, M. (2013). Protein corona: applications and challenges. In *Protein-Nanoparticle Interactions* (pp. 45-63). Springer, Berlin, Heidelberg.

Raynaud, S., Champion, E., Bernache-Assollant, D., & Thomas, P. (2002). Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis,

characterisation and thermal stability of powders. *Biomaterials*, 23(4), 1065-1072.

Ribeiro, C. C., Barrias, C. C., & Barbosa, M. A. (2006). Preparation and characterisation of calcium-phosphate porous microspheres with a uniform size for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(5), 455-463.

Rigo, E. C. D. S., Gehrke, S. A., & Carbonari, M. (2007). Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. *Rev. dental press periodontia implantol*, 39-50.

Rittié, L., & Fisher, G. J. (2015). Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold spring harbor perspectives in medicine*, 5(1), a015370.

Sachs, D. L., Varani, J., Chubb, H., Fligiel, S. E., Cui, Y., Calderone, K., ... & Voorhees, J. J. (2019). Atrophic and hypertrophic photoaging: Clinical, histologic, and molecular features of 2 distinct phenotypes of photoaged skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 81(2), 480-488.

Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., Dinpanah-Khoshdargi, E., & Jamshidi, A. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta biomaterialia*, 9(8), 7591-7621.

Saeri, M. R., Afshar, A., Ghorbani, M., Ehsani, N., & Sorrell, C. C. (2003). The wet precipitation process of hydroxyapatite. *Materials Letters*, 57(24-25), 4064-4069.

Safi, M., Courtois, J., Seigneuret, M., Conjeaud, H., & Berret, J. F. (2011). The effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 32(35), 9353-9363.

Sahay, G., Alakhova, D. Y., & Kabanov, A. V. (2010). Endocytosis of nanomedicines. *Journal of controlled release*, 145(3), 182-195.

Saleh, J., Willke, L. W., Bassani, I. A., Kraether, L., Molz, R. F., & Santos, L. A. (2004, December). Obtenção e avaliação de hidroxiapatita in vivo. In *XVI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais*.

Santos, M. L., Florentino, A. O., Saeki, M. J., Aparecida, A. H., Fook, M. L., & Guastaldi, A. C. (2005). Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. *Eclética Química Journal*, 30(3), 29-35.

Schäffler, M., Semmler-Behnke, M., Sarioglu, H., Takenaka, S., Wenk, A., Schleh, C., ... & Kreyling, W. G. (2013). Serum protein identification and quantification of the corona of 5, 15 and 80 nm gold nanoparticles. *Nanotechnology*, 24(26), 265103.

Sheikh, Z., Najeeb, S., Khurshid, Z., Verma, V., Rashid, H., & Glogauer, M. (2015). Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications. *Materials*, 8(9), 5744-5794.

Shindo, Y., Witt, E., & Packer, L. (1993). Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *Journal of Investigative Dermatology*, 100(3), 260-265.

Silvers, S. L., Eviatar, J. A., Echavez, M. I., & Pappas, A. L. (2006). Prospective, open-label, 18-month trial of calcium hydroxylapatite (Radiesse) for facial soft-tissue augmentation in patients with human immunodeficiency virus-associated lipoatrophy: one-year durability. *Plastic and reconstructive surgery*, 118(3S), 34S-45S.

Tadic, D., Peters, F., & Epple, M. (2002). Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites. *Biomaterials*, 23(12), 2553-2559.

Tan, L., Yu, X., Wan, P., & Yang, K. (2013). Biodegradable materials for bone repairs: a review. *Journal of Materials Science & Technology*, 29(6), 503-513.

Tobe H.E. A nanotecnologia das moléculas. *Química Nova*, N° 21, 2005.

Tracy, L. E., Minasian, R. A., & Cateson, E. J. (2016). Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. *Advances in wound care*, 5(3), 119-136.

Treuel, L., Docter, D., Maskos, M., & Stauber, R. H. (2015). Protein corona—from molecular adsorption to physiological complexity. *Beilstein journal of nanotechnology*, 6(1), 857-873.

Tripoli, M., Cordova, A., & Moschella, F. (2016). Update on the role of molecular factors and fibroblasts in the pathogenesis of Dupuytren's disease. *Journal of cell communication and signaling*, 10(4), 315-330.

Vallet-Regí, M. (2001). Ceramics for medical applications. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (2), 97-108.

Vallet-Regi, M., & González-Calbet, J. M. (2004). Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress in solid state chemistry*, 32(1-2), 1-31.

Van Loghem, J., Yutskovskaya, Y. A., & Werschler, W. P. (2015). Calcium hydroxylapatite: over a decade of clinical experience. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 8(1), 38.

Varga, J., Rosenbloom, J., & Jimenez, S. A. (1987). Transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochemical Journal*, 247(3), 597-604.

Verwilghen, C., Chkir, M., Rio, S., Nzihou, A., Sharrock, P., & Depelsenaire, G. (2009). Convenient conversion of calcium carbonate to hydroxyapatite at ambient pressure. *Materials Science and Engineering: C*, 29(3), 771-773.

Vleggaar, D. (2006). Soft-tissue augmentation and the role of poly-L-lactic acid. *Plastic and reconstructive surgery*, 118(3S), 46S-54S.

Wolfram, J., Yang, Y., Shen, J., Moten, A., Chen, C., Shen, H., ... & Zhao, Y. (2014). The nano-plasma interface: Implications of the protein corona. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 124, 17-24.

Woodruff, M. A., & Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in polymer science*, 35(10), 1217-1256.

Yagi, M., & Yonei, Y. (2018). Glycative stress and anti-aging: 7. Glycative stress and skin aging. *Glycative Stress Res*, 5(1), 50-54.

Yang, S. T., Liu, Y., Wang, Y. W., & Cao, A. (2013). Biosafety and bioapplication of nanomaterials by designing protein–nanoparticle interactions. *Small*, 9(9-10), 1635-1653.

Yutskovskaya, Y. A., & Kogan, E. A. (2017). Improved neocollagenesis and skin mechanical properties after injection of diluted calcium hydroxylapatite in the neck and décolletage: a pilot study. *Journal of drugs in dermatology: JDD*, 16(1), 68-74.

Zhai, Y., Cui, F. Z., & Wang, Y. (2005). Formation of nano-hydroxyapatite on recombinant human-like collagen fibrils. *Current Applied Physics*, 5(5), 429-432.