

DIEGO MARTINS CHAPARRO

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES TECIDUAIS INDUZIDAS PELO
ÁCIDO HIALURÔNICO NA PAPILA INTERDENTÁRIA DE RATOS**

CAMPO GRANDE

2019

DIEGO MARTINS CHAPARRO

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES TECIDUAIS INDUZIDAS PELO
ÁCIDO HIALURÔNICO NA PÁPILA INTERDENTÁRIA DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson José de Carvalho Marion

CAMPO GRANDE

2019

DIEGO MARTINS CHAPARRO

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES TECIDUAIS INDUZIDAS PELO
ÁCIDO HIALURÔNICO NA PÁPILA INTERDENTÁRIA DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Odontologia da
Universidade Federal de Mato Grosso
do, para obtenção do título de mestre.

Resultado: _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jefferson José de Carvalho Marion (Presidente)
Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. José Peixoto Ferrão Junior
Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Paulo Zárate Pereira
Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha Vó Esther, que infelizmente nos deixou, mas mostrou para mim o que é o amor verdadeiro e incondicional. Obrigado pelo apoio sempre. Te amo eternamente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus a oportunidade de poder ir em busca dos meus sonhos e conquista-los;

A minha família em especial a minha Mãe Ciomara, meu Pai Hilarion e meu Irmão Danilo pelo suporte e amor. Sem vocês eu não sou nada;

Aos meus amigos que nesses dois anos estiveram muito presentes na minha vida. São os irmãos que escolhi para mim;

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul em especial a todos os profissionais da Faodo, técnicos, alunos, professores, a todos envolvidos no programa de pós-graduação e também a Laís e Sílvia a quem sempre recorri nos momentos de aperto;

Aos meus colegas de turma – MESTRADO 2019 – a convivência com vocês tornou mais fácil o caminho percorrido;

A todos os profissionais do Biotério da UFMS, técnicos e pesquisadores, em especial a Veterinária Adriana, ao Carlos e a Amanda por sempre terem sido muito prestativos comigo e por ter apoiado essa pesquisa;

Ao Cláudio da Histologia UFMS, pela ajuda na confecção das lâminas e disponibilidade;

Ao Professor Alan Kalife, pela parceria, conselhos e amizade desde a graduação;

A Professora Dra Mônica Cristina Toffoli Kadri, pela fundamental contribuição a esta pesquisa, desde o projeto piloto, qualificação e elaboração final do texto.

Ao Professor Cléverson Silva, pela coorientação nessa pesquisa e pela oportunidade de ter realizado uma disciplina no programa de mestrado da UEM/PR;

Ao Professor Daniel Herrera, pela amizade, conselhos e ajuda na metodologia do trabalho.

Ao Professor Rafael Aiello, pela disponibilidade e contribuição na estatística do trabalho;

A Professora Rosana Mara Giordano, por ter sido muito presente na minha formação desde a graduação e agora no mestrado não foi diferente. Obrigado pelo seu tempo e dedicação. Te admiro desde criança;

A Thalita Lorrayne, pelo empenho na execução desta pesquisa. Obrigado pela amizade, sem você não teria conseguido;

A Professora Daniela de Moraes Antunes, que se empenhou e me aconselhou nessa pesquisa. Tenho uma admiração muito grande por você. Espero um dia ser um professor tão didático, tão acessível e querido como você.

Ao Professor Paulo Zárate Perereira, por sempre me incentivar e estar sempre presente na minha formação. Agradeço as oportunidades, a amizade e o companheirismo, devo muito ao você;

Ao Professor José Peixoto Ferrão Junior, que será sempre meu mentor. Obrigado pela oportunidade de realizar essa pesquisa, por confiar em mim e por estar sempre presente na minha vida. Tenho uma admiração enorme por você e espero atender suas expectativas perante a mim sempre;

O último e especial agradecimento vai ao meu orientador Professor Jefferson Marion, que me acolheu em um momento difícil do programa. Comprou a ideia dessa pesquisa e mesmo não sendo periodontista, me orientou e me guiou com maestria. Obrigado pela amizade e por ter me aberto portas e mostrar caminhos que eu jamais pensaria em percorrer. Minha eterna gratidão.

Todas as escolhas têm perda. Quem não estiver preparado para perder o irrelevante, não estará apto para conquistar o fundamental.

Augusto Cury

RESUMO

Avaliação das alterações teciduais induzidas pelo ácido hialurônico na papila interdentária de ratos. Campo Grande; 2019. [Tese – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O ácido hialurônico (AH) está em evidência na odontologia para o tratamento de inflamações, estética facial, lesões na boca e preenchimento de papila interdentária (PI). O objetivo deste estudo foi avaliar se a aplicação de AH na PI de ratos promove exacerbação do infiltrado leucocitário e hemorragia. Foram utilizados 51 animais divididos aleatoriamente em grupo experimental (GE) e grupo controle (GC), todos os animais receberam a primeira aplicação das substâncias (AH e solução salina - SS). Os GE1 (n=7), GE2 (n=9) e GE3 (n=9) e GC1 (n=7), GC2 (n=9) e GC3 (n=9) foram eutanasiados nos tempos experimentais de 12 horas, 72 horas e 7 dias, respectivamente. Os GE4 (n=9), GE5 (n=8) e GE6 (n=9) GC4 (n=9), GC5 (n=8) e GC6 (n=9) receberam nova aplicação após 7 dias da primeira intervenção e foram eutanasiados nos tempos de 12 horas, 72 horas e 7 dias respectivamente. A avaliação das lâminas foi realizada por dois examinadores previamente calibrados e cegados. Na comparação entre os GE1 com GE6, a intensidade do infiltrado leucocitário regrediu ($p < 0,005$). O G1E apresentou maior intensidade de infiltrado inflamatório do que o G1C (12h) ($p < 0,005$). No GE houve presença de hemorragia leve e moderada quando comparado ao GC ($p < 0,005$). Quando se compara GC com GE nos mesmos tempos experimentais, houve diferença estatística entre os grupos: G1C e G1E ($p = 0,0217$), G2C e G2E ($p < 0,005$) e G3C e G3E ($p < 0,005$). Entre os G4C e G4E, G5C e G5E e G6C e G6E não houve diferença estatística ($p > 0,05$). Concluiu-se que a aplicação de AH na PI de ratos promove aumento da intensidade do infiltrado leucocitário, com predomínio de polimorfonucleares, após 12 horas de sua aplicação regredindo progressivamente até o 14º dia. A hemorragia causada pela aplicação de AH apresentou-se histologicamente mais leve e moderada quando comparada a solução salina, além disso, houve maior presença de hemorragia nos grupos que receberam apenas uma aplicação de AH.

Palavras-chave: Ácido hialurônico. Papila dentária. Histologia.

Abstract

Evaluation of hyaluronic acid-induced tissue alterations in rat interdental papilla. Campo Grande; 2019. [Thesis - Federal University of Mato Grosso do Sul].

Hyaluronic acid (HA) is well underway in dentistry for the treatment of inflammation, facial aesthetics, mouth injuries and interdental papilla (IP) filling. The aim of this study was to evaluate whether HA application in rat IP promotes leukocyte infiltrate exacerbation and hemorrhage. Fifty-one animals were randomly divided into experimental group (EG) and control group (CG), all animals received the first application of the substances (HA and saline solution - SS). GE1 (n = 7), GE2 (n = 9) and GE3 (n = 9) and GC1 (n = 7), GC2 (n = 9) and GC3 (n = 9) were euthanized at 12-hour experimental times. , 72 hours and 7 days, respectively. GE4 (n = 9), GE5 (n = 8) and GE6 (n = 9) GC4 (n = 9), GC5 (n = 8) and GC6 (n = 9) received new application 7 days after the first intervention. and were euthanized at 12 hours, 72 hours and 7 days respectively. Slide evaluation was performed by two previously calibrated and blinded examiners. In the comparison between GE1 and GE6, the intensity of leukocyte infiltrate decreased ($p < 0.005$). G1E presented higher intensity of inflammatory infiltrate than G1C (12h) ($p < 0.005$). In EG there was presence of mild and moderate hemorrhage when compared to CG ($p < 0.005$). When comparing GC with GE at the same experimental times, there was a statistical difference between the groups G1C and G1E ($p = 0.0217$), G2C and G2E ($p < 0.005$) and G3C and G3E ($p < 0.005$). Between G4C and G4E, G5C and G5E and G6C and G6E there was no statistical difference ($p > 0.05$). It was concluded that the application of HA in rats IP increases the intensity of the leukocyte infiltrate, with predominance of polymorphonuclear cells, after 12 hours of its application progressively regressing until the 14th day. Haemorrhage caused by HA application was histologically lighter and more moderate when compared to saline solution, and there was a greater presence of hemorrhage in the groups that received only one HA application.

Keywords: Hyaluronic acid. Dental papilla. Histology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	A – Cloridrato de cetamina (75 mg/kg) (CETAMIN®) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) (DOPASER®); B – Anestesia intraperitoneal.....	27
Figura 2:	A – Ácido Hialurônico (JUVÉDERM® ULTRA); B – Solução salina (EQUIPLEX®).....	27
Figura 3:	Seringa para insulina com agulha acoplada (UNIQMED®).....	28
Figura 4:	A – Papila interdentária superior; B – Papila interdentária inferior..	28
Quadro 1:	Grupos experimentais e quantidade aplicada e número de aplicações e tempos de eutanásia.....	29
Figura 5:	A – Espécime desmineralizado e individualizado; B – Espécime preparado para inclusão na parafina.....	30
Figura 6:	Lâmina corada pelo método HE, evidenciando o sentido longitudinal do corte.....	31
Figura 7:	Área de tecido conjuntivo da papila interdental considerada para análise histológica, porção incisal da papila (I) linha imaginária tangencial ao ponto mais convexo do epitélio amelogênico (*) incisivo central (IC) . HE 50x.....	32
Figura 8:	Distribuição do infiltrado leucocitário na papila interdental, respectivamente no grupo controle (A,C,E) e experimental(B,D,F), leve (A e B), moderada (C e D) e intensa (E e F), hemorragia leve (A e F) e intensa (C). HE 400x	33
Figura 9:	A – Lâmina histológica do GE1 (12h), evidenciando a presença de AH no interior do tecido conjuntivo da PI (→) 40x; B – Maior aumento da figura A evidenciando presença de AH (→), presença de células polimorfonucleares circundando o AH (→) 100x.....	35

Figura 10: Lâmina histológica do GE1 (12h), evidenciando a presença de AH (→) no interior do tecido conjuntivo da PI e células inflamatórias polimorfonucleares circundando o AH (→) 400x.....	36
Figura 11: A – Lâmina histológica do GE1 (12h) , evidenciando a presença de AH (→) no interior do tecido conjuntivo da PI 100x; B – Maior aumento da figura A mostrando presença de AH (→) e ausência de células inflamatórias circundando o AH 400x.....	36
Figura 12: Lâmina histológica do GE1 (12h) , evidenciando a presença de AH (→) no interior do tecido conjuntivo da PI e presença de hemorragia (→) ao redor do material no ligamento gengival 100x..	37
Figura 13: A – Lâmina histológica do GE1 (12) , evidenciando a presença de AH (→) na região de tecido muscular (→) 100x; B – Maior aumento da figura A evidenciando a deposição de AH (→) no tecido muscular (→), com ausência de hemorragia ou infiltrado leucocitário 400x.....	37
Gráfico 1: Gráfico ilustrativo da porcentagem do aparecimento de cada score de intensidades do infiltrado leucocitário nos cortes histológicos por grupo.....	39
Gráfico 2: Gráfico ilustrativo da porcentagem do aparecimento de cada score de hemorragia em cada corte histológico por grupo.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Descrição dos valores da intensidade do infiltrado leucocitário, expresso em porcentagem de vezes que o score apareceu em cada corte histológico.....	38
Tabela 2:	Descrição dos valores de hemorragia, expresso em porcentagem de vezes que o score apareceu em cada corte histológico.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(i)	Hipótese nula 1
(ii)	Hipótese nula 2
(iii)	Hipótese nula 3
(iiii)	Hipótese nula 4
®	Marca registrada
AH	Ácido hialurônico
PI	Papila interdentária
C°	Graus celsius
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cm ³	Centímetro cubico
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
d	Dia
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
G	Gauge
g	Gramma
GC	Grupo controle
GE	Grupo experimental
h	Horas
HE	hematoxilina – eosina
Kg	Quilograma
Kw	Coeficiente de ponderação Kappa
mg	Miligramas
ml	Mililitros
mm	Milimitros
MS	Mato Grosso do Sul
n	Número
PBS	Fosfato de Sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
SPSS	<i>Statistical package for social sciences</i>
SS	Solução salina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Ácido Hialurônico.....	16
2.2	Papila Interdentária.....	18
2.3	Preenchimento da papila interdentária com ácido hialurônico.....	19
2.4	Uso de ácido hialurônico em modelos de estudo com animais.....	23
3	OBJETIVO.....	25
3.1	Objetivos específicos.....	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1	Animais.....	26
4.2	Anestesia.....	26
4.3	Formação dos grupos.....	29
4.4	Procedimentos laboratoriais.....	31
4.5	Análise Histomorfológica.....	31
4.6	Análise Estatística.....	34
5	RESULTADOS.....	35
5.1	Avaliação histomorfológica.....	35
6	DISCUSSÃO.....	42
7	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46
	ANEXO.....	52

1 INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) foi descoberto por Meyer e Palmer, em 1934. Ele é encontrado em altas concentrações na matriz extracelular de vários tecidos conjuntivos (MEYER e PALMER, 1934). Possui propriedades higroscópicas, reológicas e viscoelásticas únicas. O AH também pode afetar o comportamento celular ao afetar o macro e microambiente ao redor das células. Ele está diretamente ou indiretamente relacionado a muitas funções celulares como proliferação, reconhecimento e locomoção, o que contribui para suas propriedades de cicatrização tecidual (SUKUMAR e DRÍZHAL, 2007).

O AH quando utilizado como material de preenchimento, pode-se observar que seus efeitos colaterais e contra-indicações são pouco comuns, quando raramente ocorrem, manifestam-se por meio de reações inflamatórias, pequenos hematomas e/ou equimoses, abscessos nos sítios de aplicação, necrose tecidual (por injeção intravascular ou compressão da rede vascular adjacente), edema persistente e granulomas (SALLES et al., 2011).

Esse ácido está em evidência na odontologia para o tratamento de inflamações, lesões na boca, estética, tratamento periodontal e preenchimento de papila interdental (PI) (BAISSE et al., 2004; BALLINI et al., 2009; BECKER et al., 2010; BERTL et al., 2017).

A ausência da PI torna as ameias gengivais abertas, podendo desencadear problemas fonéticos, impactação lateral de restos alimentares e desconforto estético (BLATZ et al., 1999; de CASTRO PINTO et al., 2010). A reconstrução cirúrgica da PI é um procedimento estético complexo e com previsibilidade de sucesso baixa. (SHARMA e PARK, 2010; URZAL et al., 2010). A aplicação de AH é uma modalidade de tratamento que se tem mostrado segura e minimamente invasiva para recessões pequenas - classe I de Tarnow (BECKER et al., 2010).

A literatura pesquisada mostrou o quanto é promissor o uso dessa técnica (PETERSEN e HOHL, 2011; GÖTTFERT e STRIEGEL, 2011; MANSOURI et al., 2013; AWARTANI e TATAKIS, 2016; DALL'MAGRO et al., 2016; LEE et al., 2016), contudo, o suprimento sanguíneo nessa área é limitado e já há relatos de reações adversas após a injeção do ácido na mucosa bucal como, inchaço e sensibilidade

extrema com sensação de queimação no lábio ao lado da área de injeção e descoloração da pele (BERTL et al., 2016; BERTL et al., 2017).

Desta forma, um conhecimento mais abrangente sobre possíveis alterações teciduais causadas por esse material e um protocolo clínico de aplicação, tornam-se cruciais e experimentos em modelos animais tendem a ser mais confiáveis, devido a possibilidade de padronizar variáveis importantes como, operador, aplicação de técnicas e análise de materias (MOURE et al., 2012; BORGHETTI et al., 2012; HUH et al.2015 ,PI et al., 2017). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se a aplicação de AH na PI de ratos promove exacerbação do infiltrado leucocitário e hemorragia.

As hipóteses nulas a serem consideradas por este estudo são: (i) a aplicação do AH na PI não gera infiltrado leucocitário significativo; (ii) não existe diferença no infiltrado leucocitário gerado na PI após uma ou duas aplicações de AH; (iii) a aplicação do AH na PI não gera hemorragia significativa; (iiii) não existe diferença na hemorragia gerada na PI após uma ou duas aplicações de AH.

2. Revisão de Literatura

Esta revisão de literatura destaca os pontos fundamentais para embasar a aplicabilidade do AH em PI. Optou-se por apresentar a literatura em créditos (subitens) ordenados assim por tema. Inicialmente foram selecionados 103 artigos para composição deste trabalho. Após a leitura de todos os resumos foram excluídos 61, portanto, esta revisão integra 42 artigos compreendidos entre os anos de 1934 a 2019.

Como fonte para pesquisa foram utilizadas as bases de dados Medline, Pubmed, BBO, Lilacs e Scielo. Os seguintes descritores foram aplicados para o levantamento dos artigos: ácido hialurônico (*hyaluronic acid*), papila interdentária (*interdental papilla*), gengiva (*gingive*) histologia (*histologic*), preenchedores dérmicos (*dermal fillers*), ratos (*rats*), inflamação (*inflammation*).

2.1 Ácido hialurônico

Em 1934, Karl Meyer e John Palmer isolaram uma substância química, até então desconhecida do corpo vítreo dos olhos de vacas. Eles descobriram que a substância continha duas moléculas de açúcar das quais uma era o ácido urônico. Por conveniência, propuseram o nome ácido hialurônico. O nome popular é derivado de "*hyalos*", que é a palavra grega para o vidro + ácido urônico. Na época, eles não sabiam que a substância que haviam descoberto tornaria-se uma das macromoléculas naturais mais interessantes e úteis.

O AH foi usado comercialmente pela primeira vez em 1942, quando Endre Balazs pediu uma patente para usá-lo como um substituto para a clara de ovo em produtos de padaria. A primeira aplicação médica de hialuronano para humanos foi para a substituição vítrea em cirurgias oculares no final da década de 1950. O AH que usa-se habitualmente foi inicialmente isolado a partir do cordão umbilical humano e pouco depois a partir de cristas de galo em uma forma altamente

purificada e de elevado peso molecular. Ele é um amino-açúcar onde os dissacáridos são ácido d-glucurônico e d-N-acetilglucosamina e são ligados entre si através de ligações beta-1,4 e beta-1,3 glicosídicas alternadas. O AH de fórmula geral (C₁₄H₂₂NO₁₁) é um hidrato de carbono, mais especificamente um mucopolissacárido, que ocorre naturalmente em todos os organismos vivos. Apresenta-se em uma poli união linear, com uma estrutura de dissacárido de repetição energeticamente muito estável [(1 → 3) -β-dGlcNAc- (1 → 4) -p-d-GlcA-] (NECAS et al., 2008).

Sukumar e Drízhal (2007) destacaram que as funções fisiológicas e biológicas do AH são muito importantes. Ele é encontrado em altas concentrações em vários tecidos conjuntivos, incluindo pele, cordão umbilical, líquido sinovial e humor vítreo. Quantidades significativas de AH também são encontradas nos tecidos de pulmão, rim, cérebro e músculo. Por causa de suas propriedades higroscópicas, reológicas e viscoelásticas únicas, ele também pode afetar o comportamento celular ao afetar o macro e microambiente ao redor das células. AH está diretamente ou indiretamente relacionado a muitas funções celulares como proliferação celular, reconhecimento e locomoção, o que contribuiu para suas propriedades de cicatrização tecidual.

O AH é particularmente denso nas camadas superficiais da mucosa bucal onde contribui para o efeito de barreira epitelial ao mesmo tempo em que aumenta a estabilidade e a elasticidade do tecido conjuntivo periférico. Quando desagregado seletivamente por hialuronidase (uma enzima que é produzida por placa bacteriana), a matriz extracelular do tecido conjuntivo torna-se desorganizada levando a uma maior permeabilidade epitelial. Não tem efeitos tóxicos e não há contra-indicações para o seu uso. A sua atividade contra a inflamação e infecção, juntamente com a sua capacidade para promover a cicatrização de feridas, faz com que o uso esteja em evidência na odontologia para o tratamento da inflamações, lesões na boca, preenchimento de papila, tratamentos estéticos. (BAISSE et al., 2004; BALLINI et al, 2009).

Salles et al. (2011) afirmaram que suas potenciais complicações são raras, autolimitadas e incluem reações inflamatórias, pequenos hematomas e/ou equimoses, abscessos nos sítios de aplicação, necrose tecidual (por injeção intravascular ou compressão da rede vascular adjacente), edema persistente e granulomas.

2.2 Papila interdentária

A PI é classificada como tecido gengival não queratinizado ou paraqueratinizado, recoberto por epitélio escamoso estratificado. Na região anterior possui formato piramidal, que ocupa o espaço localizado entre dois dentes adjacentes, coronalmente à crista óssea alveolar e imediatamente abaixo do ponto de contato. Na região posterior a papila é ampla e possui uma área côncava não queratinizada, denominada área do *col* que une a papila vestibular à lingual (TARNOW et al., 1992). Adere-se ao dente coronalmente através do epitélio juncional e pela inserção das fibras do tecido conjuntivo gengival. Sua porção mais coronal é revestida pelo epitélio sulcular sendo sua função proteger as estruturas subjacentes (CARDAROPOLI et al., 2004; ZETU e WANG, 2005).

A ausência desta estrutura torna as ameias gengivais abertas, podendo desencadear problemas fonéticos, impactação lateral de restos alimentares e desconforto estético. (BLATZ et al., 1999; de CASTRO PINTO et al., 2010).

A etiologia da recessão da PI é multifatorial, podendo ou não estar associada às doenças periodontais ou ao tratamento das mesmas. Estes fatores determinam a alteração da distância entre o ponto de contato interdental e a crista óssea alveolar (CHEN et al., 2010; CHOW et al., 2010).

Nordland e Tarnow, em 1992, propuseram uma nomenclatura para classificarmos os defeitos papilares; Classe I: quando a extremidade da papila se localiza entre o ponto de contato e o nível da junção cimento-esmalte (JCE) proximal; Classe II: quando a papila se encontra apicalmente ou em nível de JCE proximal, porém, coronalmente ao nível da JCE vestibular; e Classe III: quando se localiza apicalmente ao nível de JCE vestibular (TARNOW et al., 1992).

A reconstrução cirúrgica da PI é um dos procedimentos estéticos mais difíceis da periodontia devido a sua previsibilidade. Inúmeras técnicas cirúrgicas já foram propostas para a reconstrução da papila. As abordagens vão desde curetagens sucessivas, enxerto de tecido conjuntivo a reposicionamento coronal da papila residual, porém, o suprimento sanguíneo da área é limitado diminuindo assim as chances de sucesso de ganho papilar (SHARMA e PARK, 2010). Alguns aspectos devem ser observados quando há o intuito de realizar a criação ou restabelecimento

da PI: divergência radicular, formato do dente, presença de diastema, anatomia gengival e posicionamento dos implantes (URZAL, 2010).

Novas modalidades de tratamento estão sendo propostas. A cultura de células associada a fatores de crescimento promovem a multiplicação e o crescimento celular para neoformação de colágeno e tecido gengival. Estas técnicas estão sendo empregadas em várias especialidades da medicina para neoformação de órgãos e tecidos. Células mesenquimais indiferenciadas sob determinados estímulos podem se diferenciar em fibroblastos, cementoblastos e osteoblastos e induzir a formação de colágeno, estrutura essencial para neoformação de tecido gengival. (YAMADA et al.; 2006; MCGUIRE e SCHEYER, 2007). Becker et al. (2010) ainda destacam outra opção inovadora e promissora que é o uso do AH em recessões pequenas, que já está sendo empregada na indústria cosmética de maneira segura, eficaz e de forma minimamente invasiva.

2.3 Preenchimento da papila interdentária com ácido hialurônico

O uso do AH para o preenchimento de “*Black space*” formado pela falta de papila no espaço interdental teve seu primeiro registro na literatura em 2010 com artigo de Becker et al. que em um projeto piloto propôs eliminar pequenas deficiências papilares. Foram incluídos 11 pacientes, sete do sexo feminino e quatro do sexo masculino, com idade média de 55,8 anos (variando de 25 a 75 anos) com 14 sítios de aplicação. Após a administração de um anestésico local, utilizou-se uma agulha de calibre 23 para injectar menos de 0,2 ml de o gel de AH de 2-3 mm apical à ponta coronária das papilas envolvidas. Os pacientes foram vistos a cada três semanas e o tratamento foi repetido até três vezes. Os pacientes foram seguidos e fotografados de 6 a 25 meses após a aplicação inicial. Três locais de implante e um local adjacente a um dente apresentaram melhora de 100%. Sete locais melhoraram de 94 para 97%, três sítios melhoraram de 76 para 88% e um local adjacente a um implante teve melhora de 57%. Os resultados desse estudo foram encorajadores para que outros pesquisadores encontrassem evidências e que também possam propor novos protocolos e meios de avaliação do preenchimento papilar.

Petersen e Hohl (2011) criaram o método ASP visando resultados minimamente invasivos e cosmeticamente bonitos. Eles trataram sete pacientes com uma preparação comercialmente disponível de AH. As injeções foram realizadas em três dias de tratamento, a uma distância de pelo menos uma semana. O AH foi injetado cerca de 2-3 mm a partir de cada ponto mais alto da papila. Neste caso, utilizou-se uma agulha de calibre 20 *standard*. A pressão de aplicação foi até o tecido gengival mostrar-se significativamente anêmico. Foram aplicados por papila, em média, de 0,2 a 0,3 ml. A metodologia desenvolvida ASP inclui ainda instruções precisas sobre o ângulo de injeção e orientação da cânula. O período total de observação dos pacientes do estudo foi entre seis e oito meses. Em nenhum dos casos, a aplicação o AH foi repetido além do referido período e eles consideraram eficaz essa técnica para pequenos defeitos.

Em outro estudo Göttfert e Striegel (2011), propuzeram a técnica de três passos" que pode ser aplicada em praticamente todas as indicações de AH. O objetivo desta técnica é o de proporcionar um "ampla base" para dar o corpo a oportunidade de possuir regeneração. Isto assegura uma meia-vida mais longa no tecido gengival. Para injeção a agulha deve ter bisel curto e um calibre de no máximo 27. Também é contra-indicada pressão demasiada, pois o epitélio de junção não-queratinizado da gengiva do sulco pode não suportar. Segue os passos: 1: A injeção de AH com a quantidade selecionada individualmente. 2: injeção na gengiva inserida.3: injeção a dois milímetros abaixo do ponto mais alto da papila, seguindo um ângulo de cerca de 45 °.

Mansouri et al. (2013) em um estudo experimental realizado em 11 pacientes com 21 deficiências de PI. Após a indução da anestesia local, injetou-se menos de 0,2 ml de gel de AH a 2-3mm do ápice da PI, este procedimento foi repetido após três semanas e três meses. As fotografias obtidas antes do tratamento e três semanas, três meses e seis meses após a intervenção foram avaliadas pelo software Image J baseado em pixels de imagem. Os dados foram extraídos e as alterações no espaço interdental nos pontos de tempo mencionados foram analisadas estatisticamente utilizando ANOVA de Medidas Repetidas. A aplicação do AH para reconstrução da PI foi bem sucedida após um período de seis meses. Na segunda avaliação, 10% dos indivíduos apresentaram melhora na reconstrução

interdental da papila em 50%. No terceiro acompanhamento, 43% das amostras apresentaram melhora de 50% ou superior.

Bertl et al. (2015), realizaram uma revisão sistemática com objetivo de avaliar o efeito da aplicação de AH como monoterapia ou como coadjuvante à terapia periodontal não cirúrgica e / ou cirúrgica. Os estudos foram altamente heterogêneos, com relação ao uso do produto e modo de aplicação. A maioria dos estudos clínicos descreveram efeitos benéficos em relação a sangramento a sondagem, profundidade da sondagem e nenhum efeito adverso foi reportado. Com isso concluíram que devido a heterogeneidade dos estudos não há como fornecer recomendações sobre o modo de aplicação e eficácia do efeito do AH como coadjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico e cirúrgico.

Bertl et al. (2016) relataram dois casos clínicos de reação adversa após injeção de AH na mucosa em torno de coroas implanto-suportadas, com o objetivo de aumentar a PI ausente. A injeção de AH foi realizada bilateralmente usando uma técnica de três passos: criação de um reservatório na mucosa diretamente acima da junção mucogingival, injeção na gengiva / mucosa anexa abaixo da papila ausente, e injeção 2 -3 mm apicalmente à ponta da papila. A sessão foi repetida uma vez após aproximadamente 4 semanas. Ambos os pacientes apresentaram tumefação e sensibilidade extrema com sensação de queimação no lábio próximo à área de injeção, após a segunda sessão de injeção. Em um dos casos, também foi observada uma descoloração da pele (livedo reticularis). Os sintomas duraram até 7 dias e, em ambos os casos, os sintomas desapareceram sem sinais de necrose cutânea ou mucosa ou qualquer dano permanente. Provavelmente, a atração de água ao longo do tempo pelo AH altamente higroscópico, exerceu progressivamente uma compressão vascular externa gerando oclusão parcial de vasos sanguíneos vizinhos. Uma infecção ou uma reação alérgica parece improvável, uma vez que todos os sintomas desapareceram gradualmente dentro de uma semana independentemente do uso de antimicrobianos, enquanto uma reação alérgica provavelmente não teria sido restrita a um lado. Com base nos efeitos adversos observados, a técnica de injeção em 3 etapas deve ser reconsiderada. Provavelmente, a injeção de AH na mucosa alveolar acima da margem mucogingival deve ser evitada. Alternativamente, a quantidade de AH injetada deve ser reduzida para <0,1 mL (comparativamente aos 0,18 ml sugeridos atualmente), de forma

semelhante ao que é geralmente recomendado por local de injeção em dermatologia.

Awartani et al. (2016) pesquisaram através de um ensaio clínico prospectivo nove adultos, com pelo menos um local anterior com perda de PI de classe I ou II. Após a anestesia local, aproximadamente 0,2 ml de gel de AH foi injetado diretamente na base da papila. A injeção foi repetida 21 dias mais tarde. Os pacientes foram vistos mensalmente para acompanhamento. A área de papila perdida foi calculada a partir de fotografias clínicas digitais tomadas no início e no final de quatro e seis meses pós-operatórios. Diferenças na área de papila perdida entre os pontos de tempo basal e pós-operatório foram analisados. Além disso, os pacientes responderam a um questionário. Dos 17 locais, quatro sítios maxilares foram classificados como classe II e 13 locais foram classificados como classe I. As injeções de AH foram sem intercorrências. Foram observados / notificados efeitos temporários localizados, tais como inchaço e sensibilidade limitada no local da injeção, e tipicamente duraram nos primeiros 2-3 dias pós-operatórios. Dois pacientes manifestaram insatisfação com o procedimento em termos de dor / desconforto durante a primeira semana pós-operatória, enquanto (5/9) pacientes classificaram o desconforto no pós-operatório como a pior parte da experiência geral. Cerca de dois meses dos procedimentos (5/9) pacientes classificaram a 1ª injeção como pior, enquanto os demais pacientes (4/9) classificaram todas as injeções da mesma forma. Embora a satisfação do paciente com o seu sorriso e a quantidade de espaço entre os dentes melhorarem pós-tratamento, apenas 66% dos pacientes optaram por submeter-se ao procedimento novamente.

Dall'Magro et al. (2016) em um relato de caso apresentaram um paciente branco, 53 anos, gênero masculino, apresentando durante exame clínico perda de PI na arcada superior anterior, abrangendo os elementos dentários 13, 12, 11, 21, 22 e 23. Logo após exame clínico e fotografias, foram realizadas aplicações de 0,1 ml de AH para preenchimento do *black space*. O AH demonstrou eficácia e biocompatibilidade com os tecidos, obtendo resultados satisfatórios.

Lee et al. (2016) aplicaram 0,01cc de AH a 2-3mm do ápice da PI em 10 pacientes, totalizando 43 áreas de perda de papila um total de 29 e 14 sítios mostraram de 39-96% de melhora. Cada local mostrou uma média de 92,55% de

preenchimento papilar com o número médio de aplicações de gel de AH foi de 3,42 vezes. Eles concluíram que há associação entre a reconstrução da PI usando gel de AH e o número de aplicações realizadas.

Bertl et al., em 2017, em um ensaio clínico selecionaram vinte e dois pacientes com papila deficientes na maxila anterior ao lado de uma coroa suportada por implante. Foi injetado 0,12 ml de AH no grupo teste e solução salina no grupo controle por três vezes. Após 3 e 6 meses de avaliações não foram observados aumento de volume clínico das papilas, somente uma diferença no desconforto após a injeção que durou mais tempo no grupo de teste.

Pilloni et al.(2019) em um estudo clínico, em 30 pacientes com recessão gengival foi realizado uma cirurgia a retalho para recobrimento radicular e na metade da amostra foi aplicado AH. Após 18 meses, a redução da recessão e cobertura média da raiz foi estatisticamente significativa no grupo que recebeu AH.

Singh et al. (2019) usaram três diferentes concentrações - 1%, 2% e 5% de AH para avaliar a eficácia no aumento da PI. Foi injetado até 0,2ml de AH a 2 mm do ápice PI em intervalos semanais por 3 semanas. Os resultados do estudo sugeriram que o uso de 5% de AH é efetivo para o tratamento das deficiências na PI ao final de 1, 3 e 6 meses de avaliação.

2.4 Uso de ácido hialurônico em modelos de estudo com animais

Borguetti et al. (2012) avaliaram os efeitos precoces e tardios, locais ou sistêmicos, da injeção de 0,07 mL de HA em duas diferentes concentrações 5,5 mg / mL e 25 mg / mL no ventre da língua de ratos. Essas duas concentrações extremas foram escolhidas para comparar as respostas dos tecidos, devido ao fato de haver alta aplicabilidade na região facial de interesse do cirurgião-dentista e estar sujeita a efeitos adversos. Os materiais foram injetados no início do experimento e o monitoramento ocorreu nos respectivos períodos de estudo de 7, 60 e 90 dias. As alterações clínicas não diferiram significativamente entre os grupos. Histologicamente, houve uma resposta inflamatória moderada nos grupos com AH após 7 dias e leve a 60 e 90 dias. Todas as amostras de rim eram normais. O grupo de 25 mg / mL de AH apresentou maior formação de colágeno.

Huh et al. (2015) realizaram em ratos a injeção subcutânea craniana e submucosa na região de incisivos centrais inferiores de solução salina, HA, dextrano reticulado em hidroxipropilmetilcelulose (DiHM) e dextrano reticulado misturado com PMMA em hidroxipropilmetilcelulose (PDiHM). A injeção subcutânea craniana (0,1 mL) foi realizada com seringa de 1 mL e agulha de 25 gramas. O local da injeção foi o ponto médio da linha interpapilar. A injeção submucosa intra-oral (0,02 mL) foi realizada usando uma seringa de 0,3 mL e uma agulha de 25 G. O local da injeção foi a 2 mm abaixo da linha cervical do incisivo inferior esquerdo. Na análise fotográfica de ambas as regiões o grupo AH apresentou uma diminuição constante, mas DiHM e PDiHM tenderam a aumentar nas primeiras 4 semanas e mais tarde diminuíram até 12 semanas. Na análise histomorfológica os grupos não apresentaram anormalidades histológicas. No grupo AH, macrófagos e células gigantes foram raramente detectados. O AH induziu uma banda estreita de formação de colagénio, mas inferior à de DiHM e PDiHM. Os macrófagos raramente se infiltravam no tecido conjuntivo fibroso que circundava o AH com neovascularização mínima. DiHM e PDiHM mostraram microesferas de dextrano cercadas por macrófagos e infiltração proeminente de fibroblastos, acompanhada de formação de colágeno, por isso, eles podem ser excelente método cirúrgico alternativo para o aumento de tecidos moles em campos orais e craniofaciais comparado com o AH.

Pi et al. (2017) desenvolveram um modelo de estudo em animais, por ser mais confiável, foi promovido um defeito na PI dos animais através da fixação de uma mola de compressão, colado nos incisivos centrais inferiores, com objetivo de validar uma técnica de injeção minimamente invasiva usando AH para aumentar a PI. Foram utilizadas 20 fêmeas, onde 10 receberam 20 ui de AH e solução salina (SL) respectivamente. Após 7 dias da abertura do espaço, uma análise morfológica foi realizada usando fotografias seriadas padronizadas, tomografia computadorizada e cortes histológicos. A margem da PI entre os incisivos inferiores tornou-se gradativamente irregular e plana, indicando uma condição semelhante ao aspecto clínico em humanos. A injeção local de preenchimento de AH induziu um efeito de aumento da PI em comparação com a injeção de solução salina. Não houve reação inflamatória em ambos os grupos. A PI tornou-se convexa e os grânulos internos contendo AH foram detectados dentro da camada submucosa após sua injeção.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar se a aplicação de ácido hialurônico na papila interdentária de ratos promove exacerbação do infiltrado leucocitário e hemorragia.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar se há diferença na intensidade do infiltrado leucocitário e hemorragia após uma ou duas aplicações de ácido hialurônico;
- Analisar se os efeitos da aplicação do ácido hialurônico são semelhantes histologicamente nos diferentes tempos operatórios (12 horas, 72 horas e 7 dias).

4 MATERIAIS E MÉTODO

Este estudo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob o protocolo n. 887/2017 (Anexo A) e os procedimentos foram realizados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.1 Animais

Foram solicitados 54 ratos (*Rattus norvegicus albinus wistar*) adultos jovens, machos, com peso de aproximadamente 250 g, de procedência do biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Campo Grande – MS). Desse total, três morreram durante o experimento. Os animais foram mantidos em gaiolas unitárias de 25 cm³, possibilitando espaço suficiente para sua movimentação e descanso, sob temperatura ambiente, iluminação e higiene controlada; alimentados com ração balanceada (Nuvilab CR – 1[®] – Colombo – PR) e água à vontade durante todo o experimento. Os animais permaneceram isolados, para certificar que ficassem estáveis e saudáveis, mantendo contato apenas com as pessoas envolvidas no trabalho.

4.2 Anestesia

Previamente aos procedimentos, os animais foram pesados e as quantidades de anestésicos individualizadas. A anestesia foi composta pela associação de cloridrato de cetamina (75 mg/kg) (CETAMIN[®] – Hortolândia – SP) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) (DOPASER[®] – Hortolândia – SP) (Figura 1A) e a aplicação por via intraperitoneal (Figura 1B).

Figura 1: **A** – Cloridrato de cetamina (CETAMIN[®]) e cloridrato de xilazina (DOPASER[®]);
B – Anestesia intraperitoneal.



Fonte: arquivo pessoal, 2019.

Foram aplicadas duas substâncias em cada rato:

- Ácido Hialurônico 24 mg/mL, lidocaína 0,3% (JUVÉDERM[®] ULTRA – Pringy – França); Grupo experimental – GE. A aplicação de 0,02 mL de AH na papila interdental dos incisivos centrais superiores e inferiores dos ratos (Figura 2A);
- Solução salina (SS) (Cloreto de sódio 0,9% – EQUIPLEX[®] – São Paulo – SP); Grupo controle – GC. A aplicação de 0,02 mL de SS na papila interdental dos incisivos centrais superiores e inferiores dos ratos (Figura 2B).

Figura 2: **A** – Ácido Hialurônico (JUVÉDERM[®] ULTRA); **B** – Solução salina (EQUIPLEX[®]).



Fonte: arquivo pessoal, 2019.

Estas substâncias eram inseridas em uma seringa de 0,5 mL 15/64” com agulha acoplada de 31G (6x0,25 mm) (UNIQMED® - São Paulo - SP) (Figura 3).

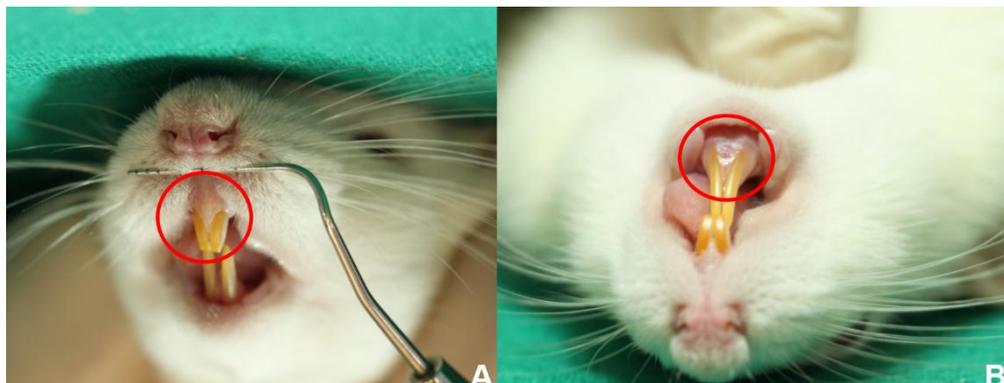
Figura 3: Seringa para insulina com agulha acoplada (UNIQMED®).



Fonte: arquivo pessoal, 2019.

A inserção da agulha foi paralela ao longo eixo do dente no sentido coroa-ápice e depositado um volume de 0,02 mL dos materiais a 2-3 mm do ápice da papila em todos animais. A aplicação foi conduzida de forma controlada e realizada por um único operador experiente (Figura 4).

Figura 4: A – Papila interdentária superior; B – Papila interdentária inferior.



Fonte: arquivo pessoal, 2019.

Para o controle da dor injetou-se, via muscular, o analgésico butorfanol (Torbugesic® – Campinas – SP), princípio ativo: tartarato de butorfanol, com o volume de 0,1 mL/300 g, após se concluir as aplicações em cada grupo.

4.3 Formação dos grupos

Utilizou-se 51 ratos no modelo experimental boca dividida (*Split mouth*) (SUSIN e RÖSING, 2004), ou seja, o mesmo animal é o GE e GC, distribuídos aleatoriamente através da randomização dos grupos e todos os animais receberam aplicação das substâncias.

Os espécimes dos grupos GE1, GE2, GE3 e GC1, GC2, GC3, foram eutanasiados nos tempos experimentais pré-definidos: 12 horas, 72 horas e 7 dias, respectivamente (Quadro 1).

Os espécimes dos grupos GE4, GE5, GE6 e GC4, GC5, GC6, receberam uma nova aplicação após 7 dias da primeira intervenção e foram eutanasiados nos tempos experimentais pré-definidos: 12 horas, 72 horas e 7 dias respectivamente (Quadro 1).

Quadro 1: Grupos experimentais e quantidade aplicada e número de aplicações e tempos de eutanásia.

Grupos	Divisão dos grupos ¹ (n)	Quantidade aplicada e número de aplicações ²	Tempo de eutanásia
Grupo Experimental	GE1 (7)	AH (1)	12h
	GE2(9)		72h
	GE3 (9)		7d
	GE4 (9)	AH(2)	7d e 12h
	GE5 (8)		7d e 72h
	GE6 (9)		14d
Grupo Controle	GC1(7)	SS (1)	12h
	GC2(9)		72h
	GC3(9)		7d
	GC4(9)	SS (2)	7d e 12h
	GC5(8)		7d e 72h
	GC6(9)		14d

¹ - Modelo experimental Split mouth; ² - Cada aplicação foi de 0,02mL;

(1) Única aplicação de AH; (2) Duas aplicações de AH.

Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

A eutanásia foi realizada nos tempos pré-determinados por superdose anestésica (Cetamina + xilazina) na quantidade de cinco vezes da dose inicial.

As maxilas e mandíbulas foram separadas do restante do crânio com auxílio de uma lâmina de bisturi 15c (Solidor[®] – Diadema – SP) e fixadas com formaldeído 10% tamponado em pH neutro (Bio-Aplica[®] – São Paulo - SP) por um período de 48 horas.

4.4 Procedimentos laboratoriais

Passados o período de 48 horas as peças foram lavadas em PBS (solução tampão) (Dinâmica[®] – Indaiatuba – SP), desidratadas com a série de álcoois 70%, 80%, 95% e 100% (Santa Cruz[®] – Guarulhos – SP), diafanizadas em xilol (Xileno[®] – São Paulo – SP) e desmineralizadas com o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) com concentração de 0,1 molar e pH 11 (Asfer[®] – São Caetano do Sul – SP). O processo de desmineralização se finalizou quando as peças apresentarem consistência borrachóide (cartilagem) e incluídas em parafina (Isokad[®] – São Paulo – SP) a 60°C (Figura 5).

Figura 5: **A** – Espécime desmineralizado e individualizado; **B** – Espécime preparado para inclusão na parafina.



Fonte: arquivo pessoal, 2019.

Na microtomia os espécimes foram cortados seriados em 5 µm de espessura no sentido longitudinal. Os cortes foram corados com hematoxilina – eosina (HE),

segundo as orientações de Lillie (1954) para realizar a avaliação histomorfológica (Figura 6).

Figura 6: Lâmina corada pelo método HE, evidenciando o sentido longitudinal do corte.



Fonte: arquivo pessoal, 2019.

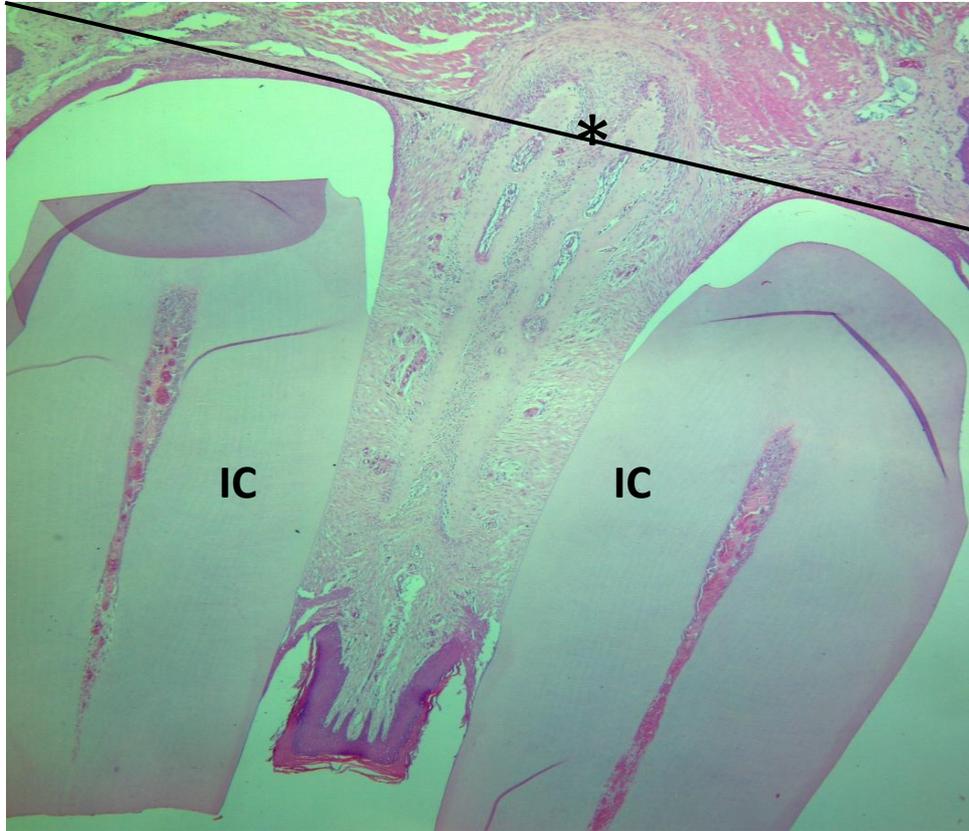
4.5 Análise histomorfológica

Os fragmentos em que o material exógeno estava presente foram considerados viáveis para análise histomorfológica. As lâminas pertencentes ao grupo controle foram consideradas viáveis quando se apresentavam sem artefatos.

A análise foi realizada por dois examinadores previamente calibrados e cegados. O teste Kappa (K_w) para calibração intra-examinadores e interexaminadores foi realizado com a pré análise de 10 lâminas, aleatoriamente selecionadas, em um intervalo de tempo de 7 e 14 dias da primeira leitura. Os resultados obtidos foram de Correlação Intra-classe interexaminadores $ICC = 0,80$ e intra-examinadores $ICC=0,88$, o que conferiu resultados satisfatórios de concordância para a posterior análises das lâminas experimentais e de controle.

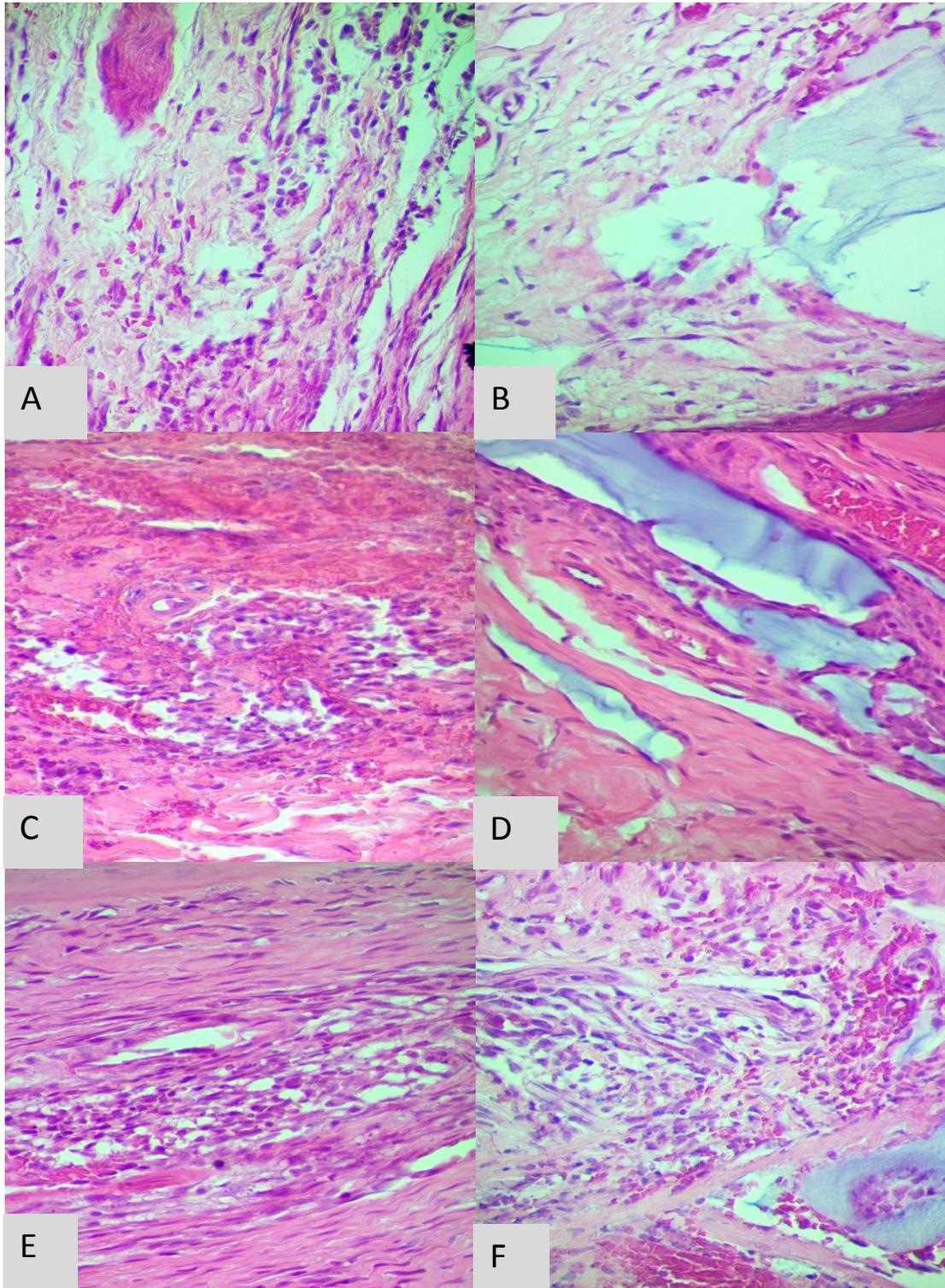
As lâminas foram analisadas com o uso de microscópio de luz (Olympus BX41 - Japão), nos aumentos de 100x e 400x. A área avaliada foi a porção da PI compreendida entre o tecido conjuntivo adjacente ao epitélio gengival (porção incisal), até a altura de uma linha imaginária perpendicular ao longo eixo dos incisivos centrais e tangencial ao ponto mais convexo do epitélio amelogênico (porção cervical) (Figura 7).

Figura 7: Área de tecido conjuntivo da papila interdental considerada para análise histológica, porção incisal da papila linha imaginária tangencial ao ponto mais convexo do epitélio amelogenético (*) incisivo central (IC). HE 50x.



Dentro desta área preestabelecida, a subárea com maior intensidade dos critérios a serem avaliados, era escolhida. Nos GE, o AH era observado como material amorfo, acelular e basofílico. Foi avaliada a intensidade do infiltrado leucocitário e de hemorragia. Para intensidade do infiltrado leucocitário foram utilizados os escores 0- ausente 1 - leve, 2 - moderada e 3 – intensa. Para hemorragia foram utilizados os escores 0 - ausente 1 - leve e 2 - intensa. A atribuição do escores foi feita de maneira comparativa entre os cortes. (Figura 8)

Figura 8: Distribuição do infiltrado leucocitário na papila interdental, respectivamente no grupo controle (A,C,E) e experimental(B,D,F) , leve (A e B), moderada (C e D) e intensa (E e F), hemorragia leve (A e F) e intensa (C).



Fonte: arquivo pessoal, 2019.

4.6 Análise estatística

Para análise estatística, utilizou-se o software Stata v.14 (College Station, TX, EUA). Inicialmente, foi realizado teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade das curvas dos desfechos (hemorragia, intensidade do infiltrado leucocitário). Os resultados mostraram que as curvas foram não normais, sendo selecionados testes não paramétricos para as análises. Como cada espécime gerou aproximadamente, em média, quatro lâminas e cada lâmina continha três cortes. Cada espécime gerou 12 cortes. Para cada desfecho utilizamos a medida de tendência central moda (valor que mais aparece) para caracterizar o desfecho do determinado espécime. A média e mediana, neste caso, não puderam ser aplicadas pois tenderia a dar uma medida que não é categórica e teria valores decimais, não permitindo uma aplicabilidade prática da categoria mensurada por cada desfecho, por isso que se optou pela moda como medida de tendência central.

Após isso foram processados testes de frequência absoluta e relativa, com os respectivos intervalos de confiança de 95%. Foram confeccionados gráficos de histograma para complementar a análise descritiva dos desfechos analisados. Após, foram realizados testes estatísticos de proporções qui quadrado para verificação da significância estatística entre os grupos. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

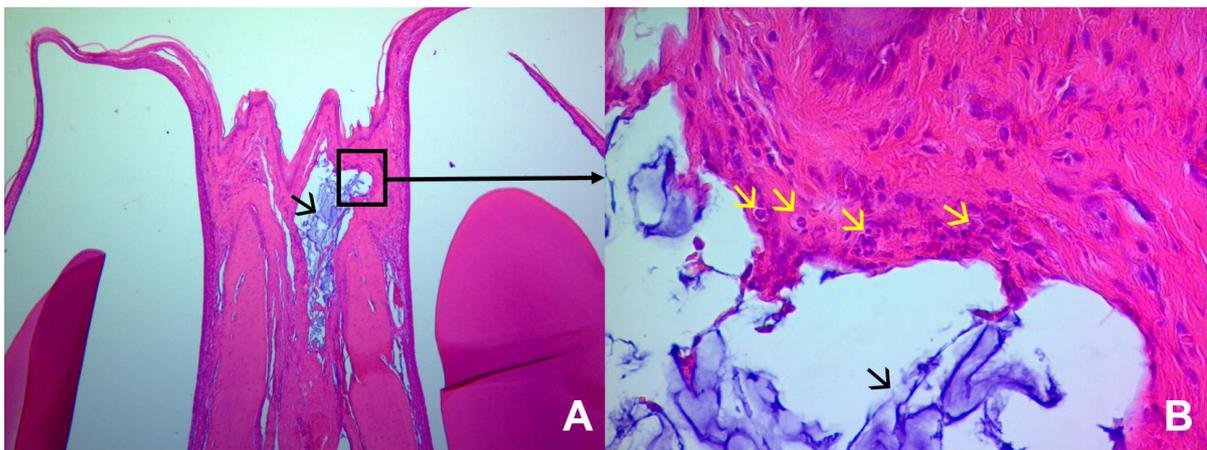
5. RESULTADOS

Durante os tempos experimentais três animais vieram a óbito após os procedimentos. Os demais mantiveram-se saudáveis. Desta forma, foram incluídos 51 animais no experimento de acordo com a seguinte distribuição: GC1 (n=7), GE1 (n=7), GC2 (n=9), GE2 (n=9), GC3 (n=9), GE3 (n=9), GC4 (n=9), GE4 (n=9), GC5 (n=8), GE5 (n=8), GC6 (n=9), GE6 (n=9).

5.1 Avaliação histomorfológica

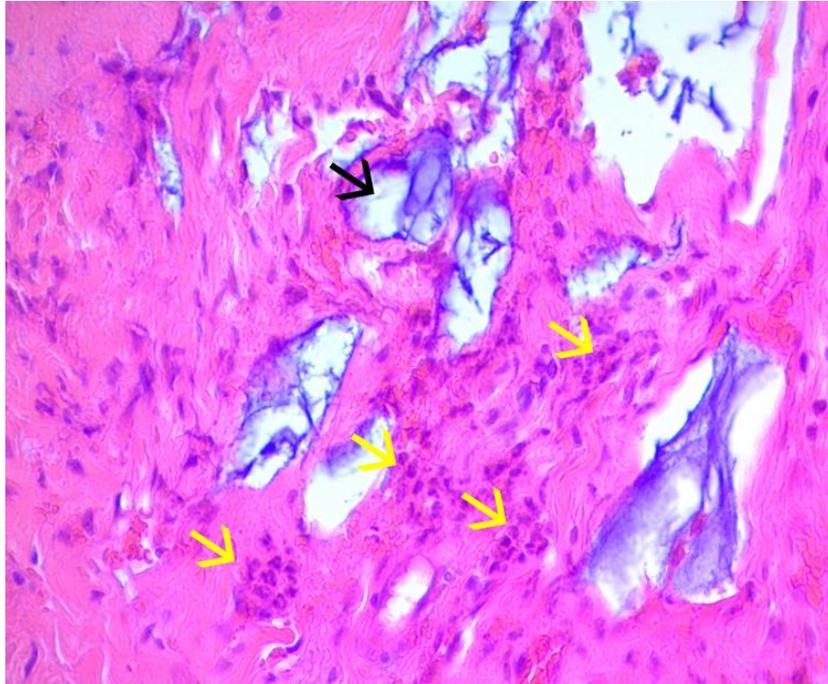
As lâminas foram coradas em HE e no GE, o AH mostrou-se basofílico, já no GC não houve mudanças no perfil da coloração. Na análise das lâminas, alguns cortes apresentaram infiltrado leucocitário na PI, após uma ou duas aplicações do AH (Figura 9, 10 e 11) e presença de hemorragia (Figura 12).

Figura 9: **A** – Lâmina histológica do GE1 (12h), evidenciando a presença de AH no interior do tecido conjuntivo da PI (→) 40x; **B** – Maior aumento da figura A evidenciando presença de AH (→), presença de células polimorfonucleares circundando o AH (→) 100x.



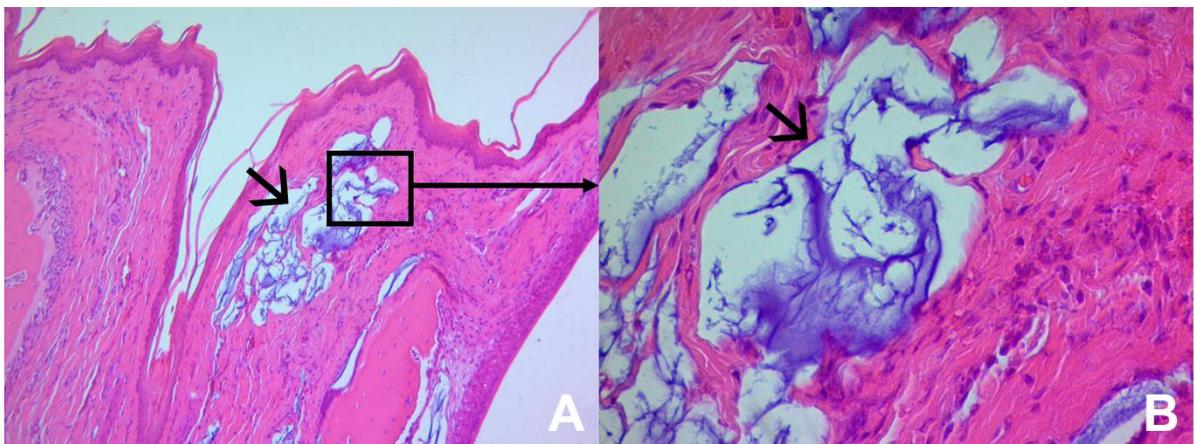
Fonte: arquivo pessoal, 2019.

Figura 10: Lâmina histológica do GE1 (12h), evidenciando a presença de AH (→) no interior do tecido conjuntivo da PI e células inflamatórias polimorfonucleares circundando o AH (→) 400x.



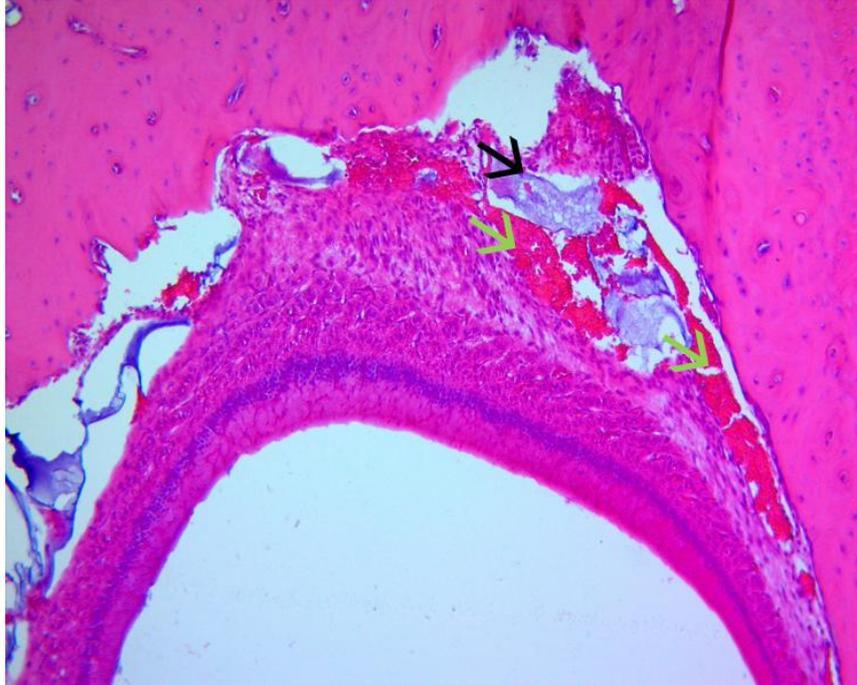
Fonte: arquivo pessoal, 2019.

Figura 11: **A** – Lâmina histológica do GE1 (12h) , evidenciando a presença de AH (→) no interior do tecido conjuntivo da PI 100x; **B** – Maior aumento da figura A mostrando presença de AH (→) e ausência de células inflamatórias circundando o AH 400x.



Fonte: arquivo pessoal, 2019.

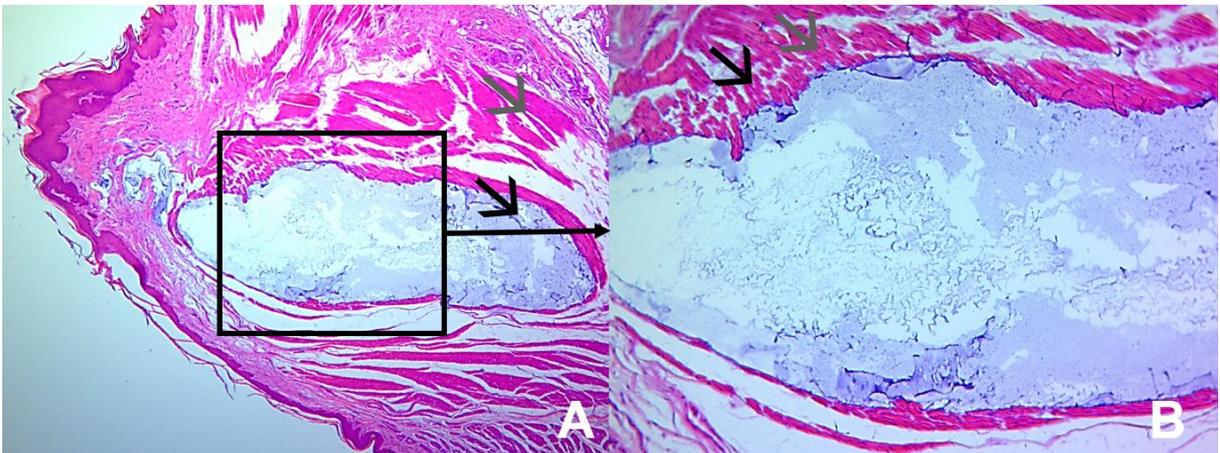
Figura 12: Lâmina histológica do GE1 (12h) , evidenciando a presença de AH (→) no interior do tecido conjuntivo da PI e presença de hemorragia (→) ao redor do material no ligamento periodontal 100x.



Fonte: arquivo pessoal, 2019.

Observou-se em todas as lâminas do GE, deposição de AH no tecido muscular e a ausência de infiltrado leucocitário no tecido.

Figura 13: **A** – Lâmina histológica do GE1 (12) , evidenciando a presença de AH (→) na região de tecido muscular (→) 100x; **B** – Maior aumento da figura evidenciando a deposição de AH (→) no tecido muscular (→), com ausência de hemorragia ou infiltrado leucocitário 400x.



Fonte: arquivo pessoal, 2019.

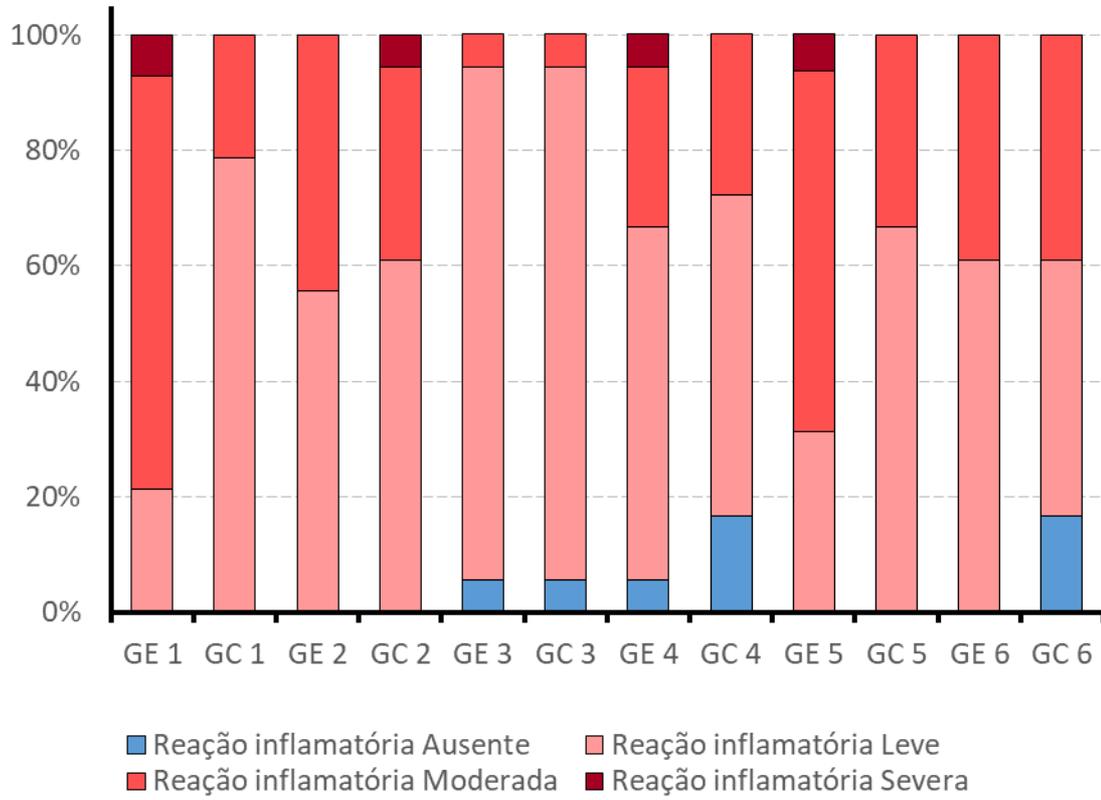
Na comparação entre todos os GC com GE, ocorreu maior aparecimento de infiltrado leucocitário intenso e moderado no GE e houve prevalência de intensidade leve no GC ($p= 0,004$). No comparativo entre os GE1 com GE6, a intensidade do infiltrado leucocitário diminuiu consideravelmente, mostrando-se mais leve ao final dos procedimentos ($p = 0,0184$). O infiltrado leucocitário entre os grupos GE1 e GC1 mostrou diferença estatística ($p= 0,0026$). Na demais comparações entre os grupos com os mesmos tempos experimentais a reação inflamatória foi considerada semelhante. (Tabela 1) (Gráfico 1).

Tabela 1- Valores da intensidade do infiltrado leucocitário, expresso em porcentagem de vezes que o score apareceu em cada corte histológico.

Grupo	Infiltrado			
	ausente %	leve %	moderado%	intensa %
GE1	0	21,4	71,4	7,1
GC1	0	78,5	21,4	0
GE2	0	55,5	44,4	0
GC2	0	61,1	33,3	5,5
GE3	5,5	88,8	5,5	0
GC3	5,5	88,8	5,5	0
GE4	5,5	61,1	27,7	5,5
GC4	16,6	55,5	27,7	0
GE5	0	31,2	6,2	6,2
GC5	0	66,6	33,3	0
GE6	0	61,1	38,8	0
GC6	16,6	44,4	38,8	0

Fonte: arquivo pessoal, 2019.

Gráfico 1- Porcentagem do aparecimento de cada score de intensidades do infiltrado leucocitário nos cortes histológicos por grupo.



Fonte: arquivo pessoal, 2019.

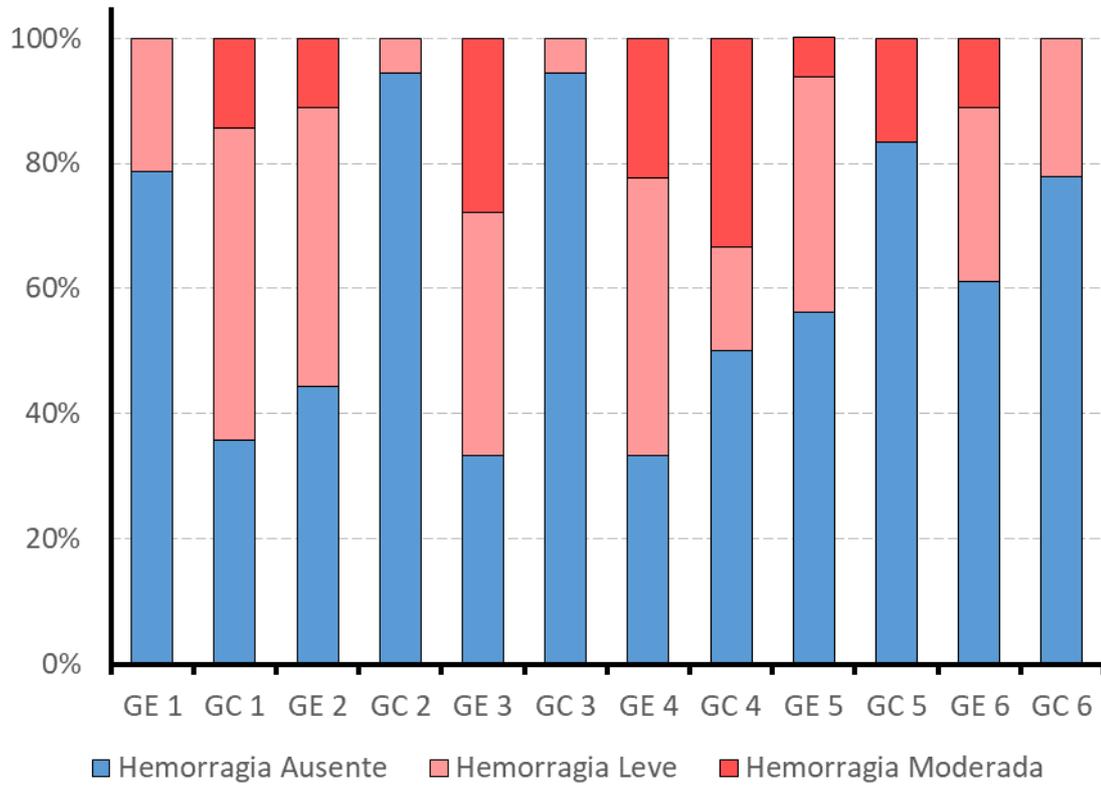
Nos padrões referentes a hemorragia causada após as aplicações, o gráfico mostra que a maior parte dos animais do GC e GE não apresentaram hemorragia, contudo, no GE houve significativa presença de hemorragia leve e moderada quando comparado ao GC ($p = 0,0001$) (Gráfico 2). Quando se compara GC com GE nos mesmos tempos experimentais, houve diferença estatística entre os grupos: G1C e G1E ($p = 0,0217$), G2C e G2E ($p = 0,0042$) e G3C e G3E ($p = 0,0001$). Entre os G4C e G4E, G5C e G5E e G6C e G6E não houve diferença estatística ($p > 0,05$) (Tabela2).

Tabela 2 – Descrição dos valores de hemorragia, expresso em porcentagem de vezes que o score apareceu em cada corte histológico

Grupo	Hemorragia		
	ausente %	leve %	intensa %
GE1	78,57	21,42	0
GC1	35,71	50,00	14,28
GE2	44,44	44,44	11,11
GC2	94,44	5,55	0
GE3	33,33	38,88	27,77
GC3	94,44	5,55	0
GE4	33,33	44,44	22,22
GC4	50,00	16,66	33,33
GE5	56,25	37,50	6,25
GC5	83,33	0	16,66
GE6	61,11	27,77	11,11
GC6	77,77	22,22	0

Fonte: arquivo pessoal, 2019.

Gráfico 2 – Gráfico ilustrativo da porcentagem do aparecimento de cada score de hemorragia em cada corte histológico por grupo



Fonte: arquivo pessoal, 2019.

6 DISCUSSÃO

O conhecimento dos benefícios estéticos causados pelo AH vem se difundindo pela sociedade. Na odontologia, com o advento da aplicação dessa substância pelo cirurgião-dentista, pesquisas em torno das possibilidades de tratamento com AH estão sendo amplamente realizadas. Na periodontia, ele tem sido usado para tratar gengivite (JENRSCH et al.,2003), periodontite (JOHANNSEN et al. 2009; EICK et al., 2013), tratamento de defeitos intra-ósseos periodontais (BALLINI et al.,2009) e no preenchimento de PI defeituosas (BECKER et al.,2010).

Já existem ensaios clínicos que propõem protocolos de aplicação de AH na PI (BERTL et al.,2015), contudo, com a alta demanda desse procedimento, relatos de reações adversas já foram publicados (BERTL et al., 2016). Diante deste fato Pi et al., em 2017, sugeriram que estudos em modelos animais são necessários para realizar avaliações histológicas precisas para descartar possíveis efeitos colaterais das injeções de preenchimento intra-oral de AH.

Ensaios clínicos propuseram a aplicação 0,2 ml de AH por duas ou três vezes na PI (BECKER et al.,2010; MANSOURI et l., 2013; TANWAR e HUNGUND 2015; SINGH et al., 2019). No presente estudo, aplicou-se a dosagem de 0,02 mL (HUH et al., 2015) de AH e SS inicialmente e, em metade dos casos, e também após 7 dias. As substâncias foram aplicadas a 2-3 mm do ápice da PI (BECKER et al., 2010; PETERSEN e HOHL, 2011; MANSOURI et al., 2013; BERTL et al., 2016; AWARTANI et al., 2016; LEE et al., 2016). Com isso, priorizou-se reproduzir e analisar de forma segura, controlada e proporcional um ensaio em modelo animal, objetivando verificar possível presença de hemorragia e a intensidade do infiltrado leucocitário na região da PI superior e inferior dos incisivos centrais de ratos.

Na análise dos cortes histológicos, em relação a intensidade do infiltrado leucocitário, observou-se que houve prevalência de intensidade leve em todos os tempos experimentais já as intensidades moderada e intensa foram mais observadas no grupo AH, mas sem diferença estatística, levando os autores a acreditarem que o AH apesar de poder gerar uma reação exacerbada em algum

momento, o organismo consegue rapidamente estabilizar esta reação (BAISSE et al.,2004). Este fato pode ter ocorrido nos estudos de HUH et al., 2015 e PI et al., 2017, que relataram ausência de reação inflamatória em seus animais, isso pelo fato de eles terem realizado a avaliação histomorfológica tardia quatro e 12 semanas e sete dias, respectivamente. Isso nos mostra que apesar de terem sido aplicadas duas substâncias distintas, a intensidade permaneceu leve em todos grupos, evidenciando a biocompatibilidade de ambos produtos, haja vista que a região da PI apresenta frequentemente reação inflamatória decorrente da constante agressão a área devido a mastigação e hábitos (BALLINI et al, 2009).

Um achado que não fazia parte dos objetivos deste estudo foi a constatação da presença de AH no tecido muscular com a ausência de infiltrado leucocitário, evidenciando ainda mais a biocompatibilidade do mesmo com a mucosa bucal (DESIDERIO et al.,2013). Por isso, sugere-se que novos estudos sejam realizados com a finalidade de comprovar a integração do AH com o tecido muscular.

Quando se comparou os G1E e G1C (eutanásia com 12 h após aplicação), houve maior infiltrado inflamatório no GE ($p= 0,0026$). Esse dado mostra que houve uma reação aguda após a injeção de AH. Nos cortes, houve predomínio de células polimorfonucleares, reforçando o argumento de ter havido uma reação inflamatória aguda na PI nesse tempo experimental (ZHANG et al.,2017). Já nas outras comparações a intensidade do infiltrado permaneceu semelhante entre os grupos e foi se tornando mais leve com o passar do tempo (14 dias), isso quando se compara o GE1 ao GE6 ($p>0,0184$). Esses dados foram diferentes de BORGUETTI et al.,2012, que após 7 dias da aplicação o infiltrado foi considerado moderado.

SALLES et al., em 2011, apontaram que as complicações após a injeção de AH em humanos são pouco frequentes e quando ocorrem podem se apresentar com pequenos hematomas, equimoses, abscessos, necrose tecidual, edema persistente e granulomas. Ao se investigar a literatura, constatou-se que os estudos em animais não focaram na investigação da ocorrência de hemorragia. Por isso, analisamos a presença deste evento após a aplicação das substâncias, para comparar com os achados em humanos (BERTL et al.,2016). Neste estudo, observou-se no GE a predominância de hemorragia leve e moderada, ocorrida geralmente na região de ligamento periodontal e na região central da PI inferior, onde há um vaso calibroso. Diante desta constatação, os autores acreditam que a inserção do AH, por ser uma substância reticulada e densa (BERTL 2015), pode promover expansão tecidual,

compressão e lesão de vasos promovendo o extravasamento sanguíneo. Esse acontecimento pode ser decorrente do volume injetado e da força e velocidade da aplicação (BAISSE et al.,2004).

Quando se comparou GE ao GC, os animais que foram eutanasiados antes da segunda aplicação, apresentaram no GE hemorragia significativamente maior, quando se compara aos animais do segundo tempo experimental. Os autores deste estudo acreditam que após a primeira aplicação, o AH se integrou ao tecido, promovendo aumento tecidual e na segunda aplicação, o tecido mucoso já estava mais apto a receber o produto, confirmando a característica viscoelástica do ácido (SUKUMAR e DRÍZHAL, 2007) e a necessidade de uma segunda e ou terceira aplicação, como sugerem os estudos clínicos (BECKER et al.,2010; PETERSEN E HOHL, 2011; MANSOURI et l., 2013; TANWAR e HUNGUND 2015; BERTL et al.,2016; AWARTANI et al.,2016; LEE et al.,2016, SINGH et al., 2019). Diante do aparecimento de hemorragia em até sete dias da aplicação, podemos sugerir a inserção gradativa de AH na PI, sendo que na primeira aplicação seja depositado uma menor quantidade do que em uma segunda ou terceira, com objetivo de preparar o tecido para sua expansão (BERTL et al.,2016).

A técnica de aplicação de AH em PI defeituosas necessita de diversos esclarecimentos para que seja proposto um protocolo clínico seguro e eficaz. Essa pesquisa veio para contribuir com esse conhecimento, priorizando um ensaio pré-clínico em animais, haja vista que a técnica em humanos diante dos achados bibliográficos ainda permanece empírica.

Novas investigações são necessárias para se estabelecer a dose ideal a ser aplicada, posologia que o ácido deve ser aplicado para gerar um volume aceitável, quantidade de tempo que ele permanecerá no tecido e como minimizar possíveis reações que esse produto possa gerar.

Foram rejeitados todas as hipóteses nulas, pois nas primeiras 12 horas, a aplicação do AH na PI gerou infiltrado leucocitário significativo e existiu diferença após uma ou duas aplicações de AH. Houve hemorragia significativa e existiu diferença entre a hemorragia gerada na papila interdentária após uma ou duas aplicações de AH.

7 CONCLUSÃO

É lícito aos autores concluir que a aplicação de ácido hialurônico na papila interdental de ratos promove aumento da intensidade do infiltrado leucocitário, com predomínio de polimorfonucleares, após 12 horas de sua aplicação regredindo progressivamente até o 14º dia. A hemorragia causada pela aplicação de AH apresentou-se histologicamente mais leve e moderada quando comparada a solução salina, além disso, houve maior presença de hemorragia nos grupos que receberam apenas uma aplicação de AH.

REFERÊNCIAS*

Awartani AF, Tatakis DN. Interdental papilla loss: treatment by hyaluronic acid gel injection: a case series. *Clin Oral Invest* 2016; 20:1775-80.

Baisse E, Piotrowski B, Piantoni P, Brunel G. Action of hyaluronic acid on the wound healing process following extraction. *J Clin Pathol* 2004; 18(7):387-90.

Ballini A, Cantore S, Capodiferro S, Grassi FR. Esterified Hyaluronic Acid and Autologous Bone in the Surgical Correction of the Infra-Bone Defects *Int. J. Med. Sci* 2009; 7:6-18.

Becker W, Gabitov I, Stepanov M, Kois J, Smidt A, Becker BE. Minimally Invasive Treatment for Papillae Deficiencies in the Esthetic Zone: A Pilot Study. *Clin Implant Dent Relat R* 2010; 12(1):1-8.

Becker W. Commentary. Esthetic considerations in interdental papilla: remediation and regeneration. *J Esthet Restor Dent* 2010; 22(1):29-30.

Bertl K, Bruckmann C, Isberg P-E, Klinge B, Gottfredsen K, Stavropoulos A. Hyaluronan in non-surgical and surgical periodontal therapy: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2015; 42:236–46.

* Normas que regem este estudo são as estilo Vancouver 1978.

Bertl K, Gotfredsen K, Jensen SS, Bruckmann C, Stavropoulos A. Adverse reaction after hyaluronan injection for minimally invasive papilla volume augmentation. A report on two cases. *Clin Oral Impl Res* 2016; 1-6.

Bertl K, Gotfredsen K, Jensen SS, Bruckmann C, Stavropoulos A. Can hyaluronan injections augment deficient papillae at implant-supported crowns in the anterior maxilla? A randomized controlled clinical trial with 6 months follow-up. *Clin Oral Impl Res* 2017; 28:1054–61.

Blatz MB, Hurzeler MB, Strub J. Reconstruction of the lost interproximal papilla-presentation of surgical and nonsurgical approaches. *Int J Periodont Rest Dent* 1999; 19:395-406.

Borghetti RL, Vargas KF, Moure SP, Salum FG, Figueiredo MA. Clinical and histologic evaluation of effects of hyaluronic acid in the rat tongue. *Oral Surg Oral* 2012; 113:488-94.

Cardaropoli D, Re S, Corrente G, Abundo R. Reconstruction of the maxillary midline papilla following a combined orthodontic– periodontic treatment in adult periodontal patients. *J Clin Periodontol* 2004; 31(2):79-84.

Chen M, Liao Y, Chan C, Ku Y, Pan W, Tui Y. Factors influencing the presence of interproximal dental papillae between maxillary anterior teeth. *J Periodontol* 2010; 81(2):318-24.

Chow YC, Eber RM, Tsao YP, Shotwell JL, Wang HL. Factors associated with the appearance of gingival papillae. *J Clin Periodontol* 2010; 37(8):719-27.

Dall'Magro AK, Dalacort M, Santos R, Rocha RV, Valcanaia TC, Dall'Magro E. Neoformação de papila gengival com ácido hialurônico: relato de caso. RFO 2016; 21(1):90-5.

De Castro Pinto R, Colombini B, Ishikiriama S, Chambrone L, Pustiglione F, Romito G. The subepithelial connective tissue pedicle graft combined with the coronally advanced flap for restoring missing papilla: A report of two cases. Quint Int 2010; 41:213-20.

Eick S, Renatus A, Heinicke M, Pfister W, Stratul SI, Jentsch H. Hyaluronic acid as an adjunct after scaling and root planing: a prospective randomized clinical trial. J Periodontol 2013; 84:941–49.

Göttfert F, Striegel M. Minimalinvasive Therapiekonzepte mit Hyaluronsäure (HA) in der modernen Zahnmedizin. Cosmet dentist 2011; 4:1-4.

Huh JB, Kim JH, Kim S, Lee SH, Shim KM, Kim SE, Kang SS, Jeong CM. Effects of pmma and cross-linked dextran filler for soft tissue augmentation in rats. Int J Mol Sci 2015; 16:28523-33.

Jentsch H, Pomowski R, Kundt G, Göcke R. Treatment of gingivitis with hyaluronan. J Clin Periodontol 2013; 30:159–64.

Johannsen A, Tellefsen M, Wikesjö U, Johannsen G. Local delivery of hyaluronan as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. J Periodontol 2009; 80:1493–7.

Lee WP, Kim HJ, Jounyu S, Kim BO. Six month clinical evaluation of interdental papilla reconstruction with injectable hyaluronic acid gel using an image analysis system. *J Esthet Rest Dentist* 2016; 0:1-10.

Lillie, RD *Histopathologic technic and practical histochemistry*. New York: Blakiston; 1954.114.

Mansouri SS, Ghasemi M, Salmani Z, Shams N. Clinical Application of Hyaluronic Acid Gel for Reconstruction of Interdental Papilla at the Esthetic zone. *J Islamic Dentl Associat Iran* 2013; 25(2): 152-7.

McGuire MK, Scheyer ET. A randomized, double-blind, placebocontrolled study to determine the safety and efficacy of cultured and expanded autologous fibroblast injections for the treatment of interdental papillary insufficiency associated with the papilla priming procedure. *J Periodontol* 2007; 78(1): 4-17.

Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Bio Chem* 1934; 107: 629-34.

Moure SP, de Vargas KF, Borghetti RL, Salum FG, Cherubini K, da Silva VD, Figueiredo MAZ. Clinical and pathological characteristics of polymethylmethacrylate and hyaluronic acid in the rat tongue. *J oral maxilla surg* 2012; 41(10):1296-303.

Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet Med* 2008; 53(8):397-411.

Nordland WP, Sandhu HS. Microsurgical technique for augmentation of the interdental papilla: three case reports. *Int J Perio Rest Dent* 2008; 28(6):543-9.

Petersen AN, Hohl S. Computergesteuerte Weichgewebsaugmentation mit Hyaluronsäure – die ASP-Methode. *Cosmet dentist* 2011; 4:22-4.

Pi Soojin, Choi YJ, Hwang S, Lee Dw Yook JI Kim KH Chung CJ. Local injection of hyaluronic acid filler improves open gingival embrasure: validation through a rat model. *J Periodontol* 2017; 88(11): 1221-30.

Pilloni A, Schmidlin PR, Sahrman P, Sculean A, Rojas MA. Effectiveness of adjunctive hyaluronic acid application in coronally advanced flap in Miller class I single gingival recession sites: a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Invest* 2019; 23:1133–41.

Salles AG, Remigio AFN, Zacchi VBL, Salto OC, Ferreira MC. Avaliação clínica e da espessura cutânea um ano após preenchimento de ácido hialurônico. *Rev Bras Cir Plást* 2011; 26(1):257-60.

Sharma AA, Park JH. Esthetic considerations in interdental papilla: remediation and regeneration. *J Esthet Restor Dent* 2010; 22(1):18-28.

Singh S, Vandana K. Use of different concentrations of hyaluronic acid in interdental papillary deficiency treatment: A clinical study. *J Ind Soci Perio* 2019; 23(1):35-40.

Sukumar S, Drízhal I. Hyaluronic acid and periodontitis. *Ac med* 2007; 50(4):225-8.

Susin, C., Rösing, CK. *Praticando odontologia baseado em evidências*. 2a. ed. Canoas: Ulbra; 2004. 158 p.

Tanwar J, Hungund SA. Hyaluronic acid: Hope of light to black triangles. *J Int Soc Prev Community Dent* 2016; 6:497-50.

Tarnow DP, Magner AW, Fletcher P. The effect of the distance from the contact point to the crest of bone on the presence or absence of the interproximal dental papilla. *J Periodontol* 1992; 63(12):995-6.

Urzal V. Relationships between teeth and adjacent structures: How to achieve more esthetic results. *Int Ortho* 2010; 8(2):91-104.

Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Baba S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: a clinical case report. *Int J of Perio Rest Dent* 2006; 26(4): 362-9.

Zhang ML, Fu FH, Yu LC. Antinociception induced by galanin in anterior cingulate cortex in rats with acute inflammation. *Neuro Let* 2017; 638:156–161.

Zetu L, Wang HL. Management of inter-dental/inter-implant papilla. *J Cli Periodontol* 2005; 32(7):831-9.

ANEXO

ANEXO A - PROJETO DE PESQUISA APROVADO PELO CEUA



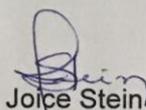
Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Ácido hialurônico no tecido gengival de ratos: análise histológica", registrada com o nº 887/2017, sob a responsabilidade de **José Peixoto Ferrão Júnior** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 8ª reunião ordinária do dia 19/09/2017.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	06/03/2017 a 06/03/2019
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	76
Peso/Idade	250 g/ 10 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central/INBIO/UFMS


Joice Stein

Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 20 de setembro de 2017.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.propp@ufms.br
fone (67) 3345-7925