

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

LUCAS CORREIA PERES

Bioestimuladores hidroxiapatita de cálcio e ácido poli-D-láctico combinados ou não com ozônio alteram a viabilidade, proliferação e migração de fibroblastos HFF-1?

Uberlândia

2024

LUCAS CORREIA PERES

Bioestimuladores hidroxiapatita de cálcio e ácido poli-D-láctico combinados ou não com ozônio alteram a viabilidade, proliferação e migração de fibroblastos HFF-1?

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pelo curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Profa. Dra. Letícia de Souza Castro Filice

Uberlândia

2024

LUCAS CORREIA PERES

Bioestimuladores hidroxiapatita de cálcio e ácido poli-láctico combinados ou não com ozônio alteram a viabilidade, proliferação e migração de fibroblastos HFF-1?

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pelo curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Uberlândia, 16 de janeiro de 2024.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Letícia de Souza Castro Filice – Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Msc. Natieli Saito – Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Msc. Lorryne Cristina Moura Garcia – Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica – Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

AGRADECIMENTOS

À Loyna, por ter me introduzido à ciência de verdade. Sou grato por todos os nossos resultados e por todas as intercorrências que a pesquisa oferece, pois com elas também aprendemos. Sou grato por todas as risadas, histórias e tudo mais que vivemos juntos dentro e fora da sala de cultura.

À Lud por ter sido a coorientadora (não oficial) desse trabalho, permitindo com que eu ajudasse em sua pesquisa e por ser um exemplo de pesquisadora e pessoa. Obrigado por todo o apoio, conselhos e amizade.

À minha orientadora, Profa. Dra. Letícia de Souza Castro Filice por sempre confiar e me apoiar em minhas decisões, tornando a vida da pesquisa muito mais tranquila e doce com seu carinho. Tenho muito orgulho de ser seu orientado nesses 3 anos em 3 iniciações científicas e agora em meu Trabalho de Conclusão de Curso.

À Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart por sempre estar de portas abertas para me ouvir e propor soluções para qualquer intercorrência que acabava surgindo durante essa jornada e por sempre acreditar em meu potencial.

Aos pesquisadores Lorryne, Maria Eduarda, Nathalia, Natieli e Phelipe e outros (muitos) integrantes do Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (NANOs) da UFU, por tornarem o laboratório um espaço de trabalho amigável, confortável, produtivo e inspirador.

Aos meus pais, Armando e Adalívia, por garantirem que eu tivesse oportunidade de chegar aonde estou hoje, por todo o amor e por todo o apoio nas minhas escolhas. Aos meus irmãos Túlio e Amanda pela curiosidade e interesse sobre a minha pesquisa.

Ao Lian, pelo apoio incondicional e me lembrar constantemente que eu sou capaz de conquistar meus sonhos. À Emanuelle, Kamila e Maria Paula por me acompanharem nessa caminhada desde o começo do curso. À Fernanda, Gabriela e Mariana por todo o amor e inspiração.

À Fundação de Amparo do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

RESUMO

A busca por novos procedimentos na redução de sinais da idade em que o paciente não precise se submeter a dores intensas e longos períodos de repouso, aliado de resultados mais prolongados e satisfatórios, tem sido cada vez maior. Os bioestimuladores de colágeno hidroxapatita de cálcio (CaHA) e o ácido poliláctico (PDLA) se destacam no mercado e o ozônio aparece como um possível potencializador dos efeitos, porém são escassos os estudos definindo concentrações de trabalho seguros e efetivos sobre esses compostos. Dessa forma, o objetivo do estudo foi investigar se a viabilidade e migração de fibroblastos é afetada quando cultivada junto dos compostos. As três concentrações testadas de CaHA apresentaram citotoxicidade quando aplicadas isoladamente, enquanto as de PDLA e ozônio isoladamente se mantiveram viáveis após 24h de tratamento. Ao combinar os bioestimuladores com o ozônio, houve uma aparente melhora na viabilidade pelo teste de resazurina. Concentrações de 100 µg/mL de PDLA e 10 µg/mL de ozônio não interferiram negativamente na migração das células. Estudos complementares são necessários para validar os achados deste estudo.

Palavras-chave: Bioestimulação; Viabilidade Celular, Migração Celular, Ozônio.

ABSTRACT

The search for new procedures to reduce signs of aging in which the patient does not need to undergo intense pain and long periods of rest, combined with longer and more satisfactory results, has been increasing. The collagen biostimulators calcium hydroxyapatite (CaHA) and polylactic acid (PDLA) stand out on the market and ozone appears as a possible enhancer of the effects, but there are few studies defining safe and effective working concentrations on these compounds. Therefore, the objective of the study was to investigate whether the viability and migration of fibroblasts is affected when cultivated with the compounds. The three tested concentrations of CaHA showed cytotoxicity when applied alone, while those of PDLA and ozone alone remained viable after 24 hours of treatment. When combining biostimulators with ozone, there was an apparent improvement in viability by the resazurin test. Concentrations of 100 µg/mL of PDLA and 10 µg/mL of ozone did not negatively interfere with cell migration. Additional studies are needed to validate the findings of this study.

Keywords: Biostimulation; Cell Viability, Cell Migration, Ozone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática das camadas da pele e das principais células que a compõem.....	11
Figura 2 – Viabilidade Celular de fibroblastos HFF-1 cultivados junto dos compostos CaHA, PDLA e meio ozonizado em diferentes concentrações.....	25
Figura 3 – Viabilidade Celular com análise comparativa entre os tratamentos com o grupo controle.....	27
Figura 4 – Viabilidade Celular com análise comparativa entre o uso do tratamento de forma isolada e combinada com o ozônio.....	28
Figura 5 – Imagens do ensaio de <i>Wound Healing</i>	30
Figura 6 – Migração celular ao longo do tempo de fibroblastos HFF-1 cultivados junto do bioestimulador PDLA II e do meio ozonizado em concentrações intermediárias.....	31
Figura 7 – Taxa de migração de fibroblastos HFF-1 cultivados junto do bioestimulador PDLA e do meio ozonizado em concentrações intermediárias.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nomenclatura dos grupos de acordo com as concentrações utilizadas.....	20
Tabela 2 – Percentual de fechamento da ferida.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MEC – Matriz extracelular

CaHA – Hidroxiapatita de cálcio

CMC – Carboxi-metil-celulose

PLLA – ácido poli-L-láctico

PDLLA – ácido poli-D-L-láctico

O₃ – Ozônio

ISAPS - Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica Estética

PDLA – ácido poli-D-láctico

BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

SFB – Soro fetal bovino

SUMÁRIO

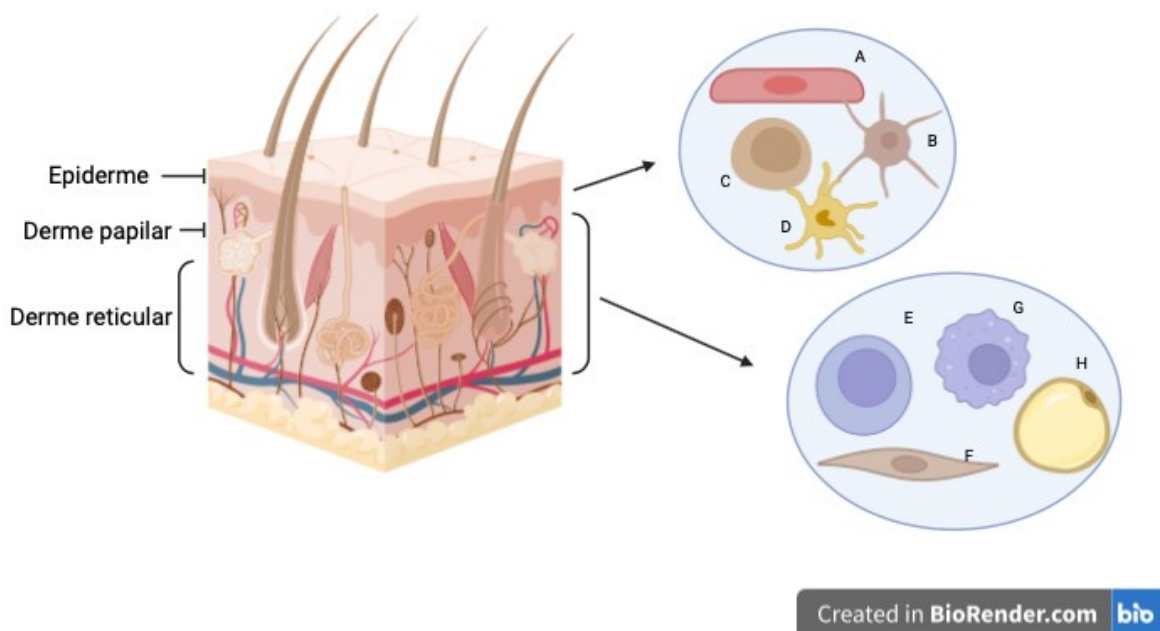
1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Pele: camadas, células e a matriz extracelular	11
1.2	Colágeno	12
1.3	Envelhecimento	13
1.4	Medicina estética	14
1.5	Bioestimuladores de colágeno	15
1.6	Ozônio	16
2	JUSTIFICATIVA	17
3	OBJETIVO GERAL	18
4	MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1	Cultivo da linhagem HFF-1	19
4.2	Preparo dos bioestimuladores em solução	19
4.3	Ensaio de viabilidade celular por redução da resazurina	20
4.4	Ensaio de proliferação e migração (<i>Scratch Assay</i>)	21
4.5	Análise Estatística	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1	Ensaio de Viabilidade Celular por redução da resazurina	23
5.2	Ensaio de proliferação e migração (<i>Scratch Assay</i>)	28
6	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pele: camadas, células e a matriz extracelular.

A pele, o maior órgão do corpo humano, desempenha papel importante na defesa do corpo, garantindo proteção contra estresses mecânicos, raios ultravioletas e evitando a perda excessiva de água por evaporação. Participa também da resposta imune, já que grande parte das células presentes na pele estão envolvidas nesse processo (Vidal Yucha; Tamamoto; Kaplan, 2019). Composta por duas camadas distintas, a epiderme, camada mais externa onde se encontram células dendríticas de Langerhans, células de Merckel, melanócitos, e predominantemente, os queratinócitos; e a derme, que é a camada mais dominante, servindo de apoio para a epiderme. Esta, por sua vez, se divide em duas camadas, a papilar e a reticular, apresentando células como os fibroblastos, fibrócitos, macrófagos, linfócitos e células adiposas (Arda; Göksügür; Tüzün, 2014; Rippa; Kalabusheva; Vorotelyak, 2019).

Figura 1 – Representação esquemática das camadas da pele e das principais células que a compõem.



A epiderme contém os queratinócitos (A) melanócitos (B) células de Merkel (C) e células de Langerhans (D), enquanto linfócitos (E) fibroblastos (F) macrófagos (G) adipócitos (H) compõem a derme (subdivida em derme papilar e derme reticular). Fonte: Autoria própria, a figura foi gerada utilizando o software BioRender.

Fibroblastos, células de morfologia alongada e fusiforme, são características de tecidos conjuntivos como a derme, apresentam um volume aproximado de $1600 \mu\text{m}^3$. Essas células são responsáveis pela manutenção da integridade estrutural, elasticidade e firmeza da pele, pois são as principais produtoras da matriz extracelular (MEC), uma complexa rede que fornece suporte estrutural e metabólico aos tecidos em que se encontra, promovendo a coesão entre as células. Além disso, participam de funções mais especializadas, como a cicatrização de feridas e lesões (Biologia celular e molecular, 2021; Chua; Laurent, 2006).

A MEC garante a organização celular, além de coordenar funções celulares por meio da ativação de vias de sinalização intracelulares que, por sua vez, controlam fatores celulares como a proliferação, crescimento e expressão gênica (Biologia celular e molecular, 2021). Fazem parte da MEC diversos componentes, como as glicoproteínas, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, além da elastina que está envolvida com a elasticidade de tecidos e o colágeno (Karamanos *et al.*, 2021). As fibras de colágeno garantem a integridade estrutural, força mecânica e firmeza para a pele e outros tecidos em que são encontradas (Papaiordanou *et al.*, 2022).

1.2 Colágeno.

A estrutura do colágeno apresenta 3 cadeias α com um domínio globular, torcidas entre si, nomeando esse complexo de tripla hélice colagenosa (Biologia celular e molecular, 2021). Diferenças na composição e combinação das cadeias na tripla hélice colagenosa conferem uma variedade de tipos de colágenos, sendo documentados na literatura aproximadamente 28 isoformas (ou tipos) com 46 cadeias polipeptídicas distintas. Essas isoformas são classificadas em diferentes grupos, divididos de acordo com a função básica desse colágeno (Pawelec; Best; Cameron, 2016).

Colágenos fibrilares, como o tipo I, II, III e V tem como função dar resistência ao tecido em que se encontram ao se agregarem, formando as fibrilas. Existem outros grupamentos com funções mais específicas, como os colágenos associados a fibrilas (tipo VI e IX) e os transmembrana (XIII e XVII) que estão ligados com a conexão entre componentes celulares. Colágenos de ancoramento e formadores de camada são comumente encontrados próximos ou compondo a lâmina basal do tecido, fazem parte desse grupo o colágeno tipo IV, que se apresenta em forma de bastões que formam uma rede bidimensional, o colágeno tipo VII e XV (Biologia celular e molecular, 2021).

O colágeno tipo I, é o mais estudado na medicina estética, devido à sua abundância e importância funcional em humanos, assim como os outros tipos, é produzido principalmente pelos fibroblastos. Em processos de cicatrização da pele, após algum tipo de lesão ou ferida, essas células são recrutadas para a área e ao serem ativadas produzem componentes da MEC, especialmente o colágeno tipo I, que será responsável por garantir resistência ao estresse mecânico, preenchendo a área lesionada (Biologia celular e molecular, 2021; Wong *et al.*, 2020). Portanto, a verificação e investigação da capacidade de multiplicação e migração dos fibroblastos em contexto de reparo tecidual revelam-se fundamentais.

1.3 Envelhecimento.

Hayflick e Moorhead foram os primeiros a demonstrar a senescência de fibroblastos, processo comum de declínio de multiplicação e metabolismo celular ao longo dos anos da vida do indivíduo (Hayflick; Moorhead, 1961). Essa redução pode ser justificada pela diminuição do tamanho dos telômeros durante o processo de replicação (Csekes; Račková, 2021), impactando também na proliferação e conseqüentemente nas funções das células em um tecido, como é o caso dos fibroblastos, que perdem gradativamente a capacidade de produção de colágeno, o que leva a pele a perder sua tonicidade, reduzindo espessura e ficando com aspecto flácido (Dengjel; Bruckner-Tuderman; Nyström, 2020).

Em contexto macroscópico e topográfico, o envelhecimento gera mudanças na estrutura, espessura e quantidade de colágeno presente na pele, resultando no aparecimento de sinais de envelhecimento, como flacidez, rugas e linhas de expressões (Lombardi *et al.*, 2020). Com o avanço da idade, as ligações covalentes que interligam as cadeias α de colágeno e as moléculas de colágeno fibrilar no tecido conjuntivo são encontradas em maior quantidade, o que por sua vez aumenta a rigidez do tecido, reduzindo assim a elasticidade da pele com aparecimento desses sinais (Franzen *et al.*, 2013). O aparecimento dos sinais de envelhecimento frequentemente resulta em insatisfação, favorecendo a busca pela reposição do colágeno por meio de tratamentos estéticos e alternativas para o rejuvenescimento tegumentar, facial e corporal.

1.4 Medicina estética.

Na medicina estética existem dois tipos de práticas que são aplicadas para tentar burlar os efeitos do tempo: a invasiva e a não-invasiva, diferenciando na seriedade ou grau da cirurgia ou procedimento a ser feito. As invasivas levam longos períodos de recuperação, podendo gerar risco de vida, dores e cicatrizes, como é o caso da ritidectomia, que consiste na remoção de excesso de pele facial. Enquanto para as não-invasivas, como os procedimentos injetáveis, o processo é relativamente simples e gera intercorrências mínimas, além de um resultado praticamente instantâneo como nos preenchimentos com ácido hialurônico e uso de bioestimuladores que apresenta resultados mais duradouros (Devgan; Singh; Durairaj, 2019; Kochhar; Kumar; Karimi, 2022).

A escolha de qual processo a ser feito depende da indicação de um profissional qualificado da área: o preenchimento é mais indicado em casos que se busca uma harmonia facial, de forma a repor volumes de forma imediata, enquanto o uso de bioestimuladores de colágeno que agem na derme, estimulando os fibroblastos a produzir colágeno, é mais indicado quando se busca um resultado prolongado para redução da flacidez e aumento de espessura

tegumentar (Lacombe, 2023). Os bioestimuladores ideais para uso, devem ser efetivos, não tóxicos, de fácil aplicação e de longa duração (Nettar; Maas, 2012). Dessa forma, dois compostos que atendem esses requisitos são a hidroxiapatita e o ácido-poli-láctico.

1.5 Bioestimuladores de colágeno.

A hidroxiapatita de cálcio (CaHA) é a mais utilizada como bioestimulador e comumente vendida comercialmente pelo nome de Radiesse® (Merz North America, Greensboro, NC), consiste em microesferas (de 25 a 45 µm de diâmetro) de CaHA que se encontram suspensas em gel de carboxi-metil-celulose (CMC), o que aumenta a sua biocompatibilidade (Almeida; Levy; Buzalaf, 2023). Esse bioestimulador possui alta biocompatibilidade por ser um componente mineral naturalmente encontrado nos ossos e dentes (Ali; Ende; Maas, 2007). Marmur, Phelps e Goldberg demonstraram pela primeira vez em 2004 que após a injeção de CaHA em um paciente, houve a deposição de novas fibras de colágeno, e que partículas do bioestimulador persistiram após 6 meses da aplicação, comprovando assim que a CaHA se mostra como um bom bioestimulador (Marmur; Phelps; Goldberg, 2004). O processo de bioestimulação provocada pela CaHA ocorre por um processo inflamatório inicial, que induz os fibroblastos a produzirem colágeno do tipo III, o qual, após remodelação, será substituído pelo colágeno tipo I. Esse processo leva cerca de 6 meses, e como consequência, suaviza as linhas de expressão (Berlin; Hussain; Goldberg, 2008).

Outro bioestimulador muito utilizado são os polímeros derivados do ácido láctico, como por exemplo a Sculptra® (Q – MED AB – SUÉCIA), que utiliza o ácido poli-L-láctico (PLLA) e o Aesthefill® (REGEN Biotech, Seoul, South Korea) que utiliza o ácido poli-D-L-láctico (PDLLA). O que diferencia esses bioestimuladores é a sua estrutura química, conferindo diferentes características, como a degradação mais rápida do PDLLA e estrutura mais cristalina do PLLA (Fitzgerald *et al.*, 2018; Oh *et al.*, 2023). O processo de bioestimulação provocado pelos compostos de ácido poli-láctico ocorre devido ao estímulo de resposta inflamatória local,

onde monócitos, macrófagos e fibroblastos migram para a área de injeção para envolver essas partículas e degradá-las por hidrólise. Durante essa metabolização fibras de colágeno são produzidas pelos fibroblastos (Lacombe, 2009).

1.6 Ozônio.

O Ozônio (O_3) vem sendo utilizado na clínica devido a sua provável propriedade antimicrobiana, por aumentar oxigenação tecidual e conseqüente redução de efeitos inflamatórios, agindo assim como uma molécula anti-idade promissora (Liu *et al.*, 2023). No entanto, existem outros relatos clínicos divergentes que afirmam que não obtiveram resultados significativos com o uso do O_3 ou indicam que o gás pode interagir com lipídeos da pele podendo assim, causar irritação da pele (Lakey *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2023). Tal controvérsia se dá pela escassez de estudos na área, podendo ser justificada pela dificuldade em trabalhar com esse gás que é altamente reativo, por ser muito eletronegativo, ou seja, com alta capacidade oxidante.

Alinhado a esses fatores, muitos dos estudos que existem sobre o gás são observacionais, faltando pesquisas com parâmetros mais controlados com as doses de trabalho, gerando resultados não tão claros da sua influência em processos como a melhora da oxigenação, cicatrização e até na produção de colágeno, visto que trabalhos como o de Scassellati (2020) sugerem que o ozônio pode agir como um molécula anti-idade enquanto o trabalho de Fuks (2019) sugerem que a exposição prolongada leva ao envelhecimento prematuro da pele (Fuks; Woodby; Valacchi, 2019; Scassellati *et al.*, 2020). Dessa forma, verificar a viabilidade das células fibroblásticas quando cultivadas junto dos bioestimuladores e do ozônio para definir a concentração de trabalho é essencial.

2 JUSTIFICATIVA

De acordo com dados do Grand View Research de 2023, o mercado global de medicina estética não-invasiva foi avaliado em US\$ 61.2 bilhões em 2022, e as previsões para os próximos anos preveem um crescimento de 15,40% entre 2023 e 2030. O segmento de procedimentos estéticos injetáveis, liderou o mercado em 2022 compondo 63% do mercado e com uma taxa de crescimento anual muito rápida (Grand View Research, 2023). Esse aumento na demanda de tratamentos estéticos não-invasivos, tal como o preenchimento e o uso de bioestimuladores devido a necessidade de reduzir os sinais de envelhecimento, se dá com maior foco na aparência estética entre adultos, que tem sido cada vez mais buscada

No Brasil, segundo os relatórios mais recentes, de 2021, emitidos pela Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica Estética (ISAPS), mostram que de um total de 2.723.640 procedimentos estéticos feitos no ano de 2020, 924.660 foram procedimentos injetáveis, em que 34.140 procedimentos foram utilizando o bioestimulador CaHA. Com isso o Brasil ocupa a segunda posição no ranking global de tratamentos estéticos não-cirúrgicos, mais especificamente de procedimentos injetáveis, compondo cerca de 7,2% do número global de procedimentos (ISAPS, 2021).

Apesar da busca de bioestimuladores como forma de rejuvenescimento da pele estar em alta, pesquisas na área para elucidar processos básicos da interação deles com as células são escassos. Sabendo que os bioestimuladores de colágeno, como o ácido poli-D-láctico (PDLA) e a CaHA podem auxiliar no processo de redução de sinais do envelhecimento ao induzir fibroblastos e outras células da pele de diferentes formas, o presente trabalho propõe que sejam analisados aspectos de viabilidade, proliferação e migração na célula HFF-1 na presença dos bioestimuladores, esclarecendo também a influência do ozônio nesses aspectos.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar aspectos celulares de viabilidade, proliferação e migração de fibroblastos (linhagem HFF-1) quando cultivadas com bioestimuladores já utilizados na medicina estética, como a hidroxiapatita de cálcio (CaHA) e o ácido poli-D-lático (PDLA), associados ou não ao ozônio (O₃), como potencializador da bioestimulação.

3.1 Objetivos específicos

- Cultivar HFF-1 com bioestimuladores CaHA e PDLA, associados ou não ao gás ozônio;
- Avaliar a viabilidade celular pelo teste colorimétrico AlamarBlue/Resazurina;
- Verificar a proliferação e migração de HFF-1 quando cultivadas junto aos bioestimuladores e o ozônio por *Scratch Assay*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo da linhagem HFF-1

No cultivo celular foi utilizada a linhagem celular HFF-1, fibroblastos de prepúcio humano adquirida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), código 0275, semeada em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (ThermoFisher®, EUA) suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®) tratados com antibiótico-antimicótico 1X (Anti-Anti, Gibco®) Todas as células foram cultivadas em ambiente com controle de umidade contendo 5% de CO₂ a 37°C. Foram utilizadas células em passagem de número 30 para todo o experimento.

4.2 Preparo dos bioestimuladores em solução

Os bioestimuladores utilizados foram a hidroxiapatita de cálcio (Laborclin, produtos para laboratórios LTDA ®), ácido poli-D-láctico (Sigma-Aldrich ®) e ozônio (Ozone & Life, Tecnologia em Geradores de Ozônio ®). Foram utilizadas diferentes concentrações apresentadas na tabela 1, conforme descrito na literatura, para os testes de viabilidade, para assim definir as concentrações a serem utilizadas no ensaio de migração. O ozônio foi utilizado em concentrações de 5 µg/mL, 10 µg/mL e 15 µg/mL em meio DMEM alta glicose (Cisterna *et al.*, 2021). A administração do Ozônio como tratamento foi feita em forma de meio ozonizado, para isto, o ozônio coletado a partir da injeção do mesmo em seringas no equipamento gerador de ozônio (Ozone & Life ®) foi difundido em meio completo com o auxílio de uma torneira de três vias.

As amostras de CaHA foram preparadas nas concentrações de 30 µg/mL, 100 µg/mL e 300 µg/mL. Para o PDLA foram utilizadas as mesmas concentrações (30 µg/mL, 100 µg/mL e 300 µg/mL) em conformidade com o testado previamente e fundamentalmente com a prática clínica (Breithaupt; Fitzgerald, 2015; Ray; Ta, 2020). Ambos os bioestimuladores foram

diluídos em água separadamente compondo um grupo em triplicata nas diferentes concentrações com o ozônio (exemplo: 30 µg/mL de CaHA combinado com as três concentrações de O₃, e assim por diante).

Tabela 1 – Nomenclatura dos grupos de acordo com as concentrações utilizadas

Grupos	I	II	III
CaHA	300 µg/mL	100 µg/mL	30 µg/mL
PDLA	300 µg/mL	100 µg/mL	30 µg/mL
O ₃	15 µg/mL	10 µg/mL	5 µg/mL

4.3 Ensaio de Viabilidade Celular por redução da resazurina

O teste de viabilidade celular é realizado com o objetivo de analisar se algum composto, na concentração que está sendo testado é tóxico para as células, usualmente os testes utilizados são feitos a partir da análise do metabolismo ativo das células. Células vivas possuem diversas enzimas em seu citoplasma, algumas enzimas são capazes de reduzir compostos como a resazurina (composto de coloração azul) a resofurina (coloração rosa), indicando assim, de forma indireta, a quantidade de células viáveis. A resazurina é um sal que pode ser dissolvido em tampões fisiológicos, como o PBS, sendo permeável as membranas celulares, ao penetrar as membranas de células viáveis, há a redução de forma irreversível do composto à resofurina, por enzimas intracelulares no processo de respiração aeróbica, ocorrendo a mudança da cor do meio, que poderá ser quantificada por espectrofotometria (fluorescência ou absorbância) (Präbst *et al.*, 2017) (Longhin *et al.*, 2022).

Foram plaqueados em placas de 96 poços os fibroblastos (2×10^4 células por poço) correspondendo a quantidade de tratamentos e suas combinações propostos (em triplicata), após plaqueamento as células foram incubadas *overnight* em meio de cultivo completo. No dia seguinte foram aplicados os tratamentos nos respectivos poços e as placas foram incubadas por mais 24 horas. Para o branco, foi utilizado meio completo sem células, o controle positivo foi

utilizado meio completo com células HFF-1 e para o controle negativo foi utilizado células HFF-1 cultivadas em meio completo contendo 5% de DMSO em dose única por 24 horas.

A resazurina foi adicionada em cada poço (20 µL por poço de resazurina a uma concentração de estoque a 0,6 mM, chegando a 0,1mM em cada poço em um volume final de 120µL), em seguida as placas foram incubadas por até 4 horas, verificando de tempos em tempos se houve a mudança de cor dos poços de controle. Assim que houve clara distinção entre o controle (coloração rosada) e o branco (coloração azulada) a fluorescência (560 nm de emissão e 590 nm de excitação) foram quantificadas por espectrofotometria, indicando de forma diretamente proporcional o metabolismo das células, e a viabilidade celular (Kumar; Nagarajan; Uchil, 2018).

Para determinar o percentual de viabilidade para os resultados de fluorescência, foi utilizada a equação 1, após retirar os respectivos brancos:

$$\% \text{ de Viabilidade} = \frac{\text{Tratamento}}{\text{Controle Viável}} * 100 \text{ (Equação 1)}$$

Em que, o *Tratamento* corresponde ao valor individual de cada valor de fluorescência obtido da triplicata do tratamento; *Controle Viável* corresponde a média da triplicata utilizada na placa das células sem nenhum tratamento, que corresponde a 100% de viabilidade.

4.4 Ensaio de proliferação e migração (*Scratch Assay*)

O processo de migração celular é fundamental para desenvolvimento embrionário, angiogênese, cicatrização de feridas, resposta imune e inflamação. Diante disso, para avaliar a migração dos fibroblastos na presença dos bioestimuladores foi realizado o *Scratch assay* adaptado conforme Martinotti e Ranzato (Martinotti; Ranzato, 2019).

As células foram plaqueadas (5×10^5 células/poço) em placas de 24 poços e incubadas a 37°C com 5% CO₂ overnight. No dia seguinte, foi produzida uma ferida perpendicular ao

fundo do poço com uma ponteira de 200 μL . Após a ferida, a placa foi lavada gentilmente com PBS 1X para remoção das células não aderidas. Em seguida, houve o reabastecimento da placa com meio DMEM alta glicose e tratamentos (CaHA, PDLA e meio ozonizado) nas concentrações definidas pelo teste de resazurina, para avaliar a proliferação e migração celular coletiva. As placas foram incubadas a 37°C a 5% CO_2 em atmosfera úmida por todo o experimento (exceto nos períodos de manipulação).

As células foram visualizadas por microscopia e fotodocumentadas em um aumento de 10x nos momentos definidos de acordo com o tempo inicial de tratamento (0h, 8h e 24h). Após 24h de tratamento, os tratamentos foram removidos e substituídos por DMEM alta glicose, fotodocumentando em mais um momento (48h após o início do tratamento). A análise foi feita utilizando a ferramenta ImageJ®.

Para o cálculo do percentual de fechamento da ferida, foi utilizada a equação 2:

$$\% \text{ de fechamento da ranhadura} = \left[\frac{A_{t=0h} - A_{t=\Delta h}}{A_{t=0h}} \right] \times 100\% \text{ (Equação 2)}$$

Em que, $A_{t=0h}$ é a área medida imediatamente após a ferida; e $A_{t=\Delta h}$ é a medição no tempo final.

A taxa de migração pela largura foi calculada pela razão do tempo de migração, conforme equação 3:

$$Rm = \frac{Wi - Wf}{t} \text{ (Equação 3)}$$

Onde, Rm representa a taxa de migração celular, Wi sendo a largura inicial e Wf a final, e t diz respeito a duração da migração em horas.

4.5 Análise Estatística

Os resultados de todos os testes (realizados em triplicata) foram analisados para obter a estatística pelo programa Graph Pad Prism 9.5.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), pelo método OneWay anova com pós teste Tukey ou Dunett para as múltiplas comparações, onde valores de 0,05% de probabilidade foram aceitos como estatisticamente significativos.

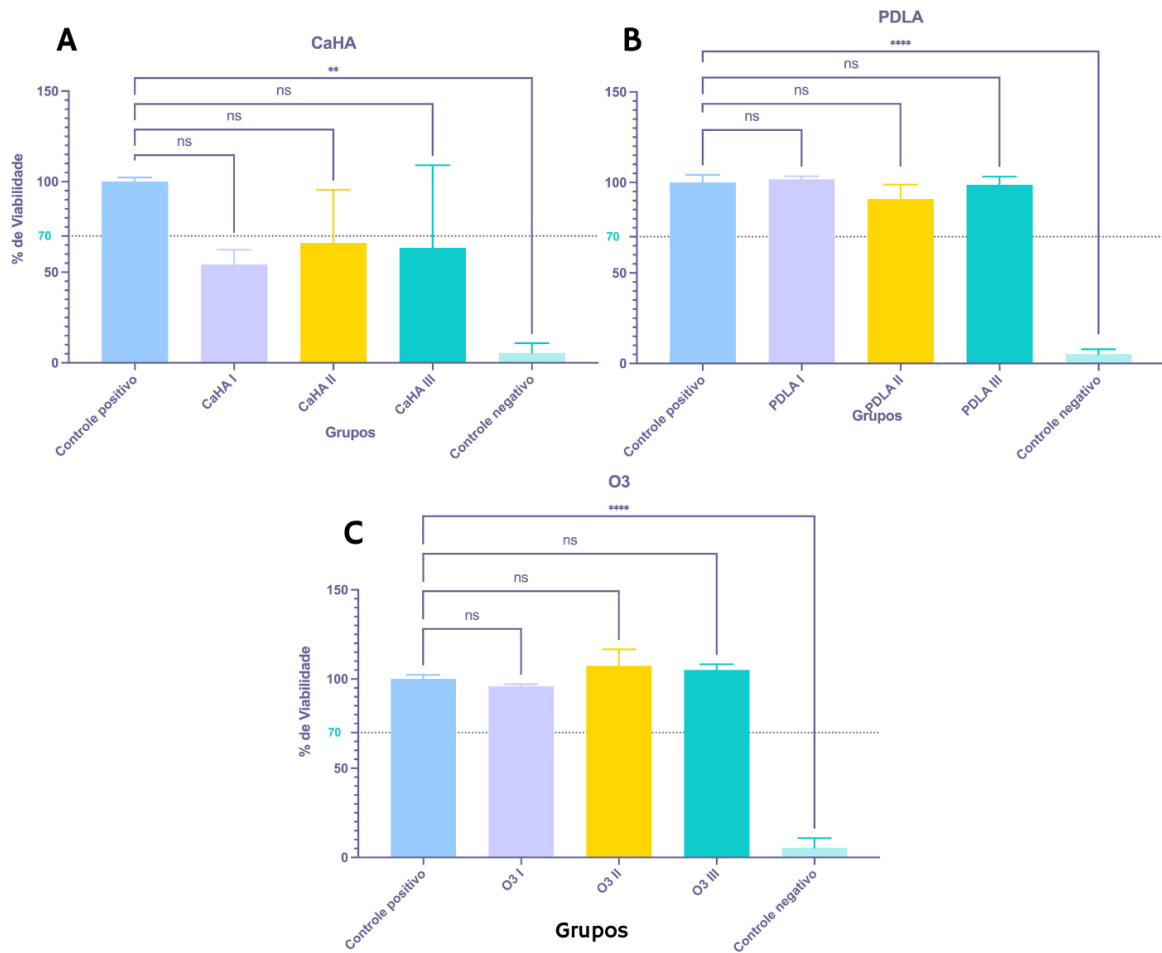
5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de Viabilidade Celular por redução da resazurina

A viabilidade celular de fibroblastos HFF-1 cultivados com os bioestimuladores CaHA e PDLA, e o Ozônio em diferentes concentrações foi feita utilizando a resazurina, o reagente esteve em contato por aproximadamente 4 horas, após uma única dose de cada tratamento por 24 horas.

Para que um composto seja considerado citotóxico em determinada concentração, a amostra deve ter um valor de viabilidade menor que 70% de acordo com a ISO10993:5 (2009). Os resultados apresentados na figura 2A indicam que o cultivo de HFF-1 com CaHA em todas as concentrações utilizadas (I – 300 µg/mL; II - 100 µg/mL; III - 30 µg/mL) apresentaram citotoxicidade, já que houve a redução da viabilidade abaixo de 70% se comparado com o controle. Entretanto essas diferenças não foram estatisticamente significativas. A figura 2B e 2C indicam que nem o PDLA nem o ozônio foram citotóxicos em nenhuma das concentrações utilizadas [(I – 300 µg/mL; II - 100 µg/mL; III - 30 µg/mL) para o PDLA] [(I – 15 µg/mL; II - 10 µg/mL; III - 5 µg/mL) para o Ozônio], ressalta-se que essas diferenças também não foram estatisticamente significativas (Teste ANOVA, *one-way analysis of variance*, seguido do pós-teste Dunett para comparações múltiplas).

Figura 2 – Viabilidade Celular de fibroblastos HFF-1 cultivados junto dos compostos CaHA, PDLA e meio ozonizado em diferentes concentrações



Viabilidade celular por resazurina após 24 horas de tratamento com CaHA (A), PDLA (B) e meio ozonizado (C). As análises estatísticas foram avaliadas pelo método ANOVA-One-Way (** 0,001 < p < 0.01; **** p < 0,0001).
 Fonte: Autoria própria, com dados retirados do software GraphPad Prism 9.5.1.

Foram analisadas combinações de cada bioestimulador com o meio ozonizado para verificar se houve alguma mudança no perfil de viabilidade celular das células tratadas com os bioestimuladores, os resultados estão descritos na figura 3, onde verifica-se que o indutor de morte DMSO 5% foi adequado devido a diferença significativa ($p < 0,0001$) do controle negativo com o controle positivo.

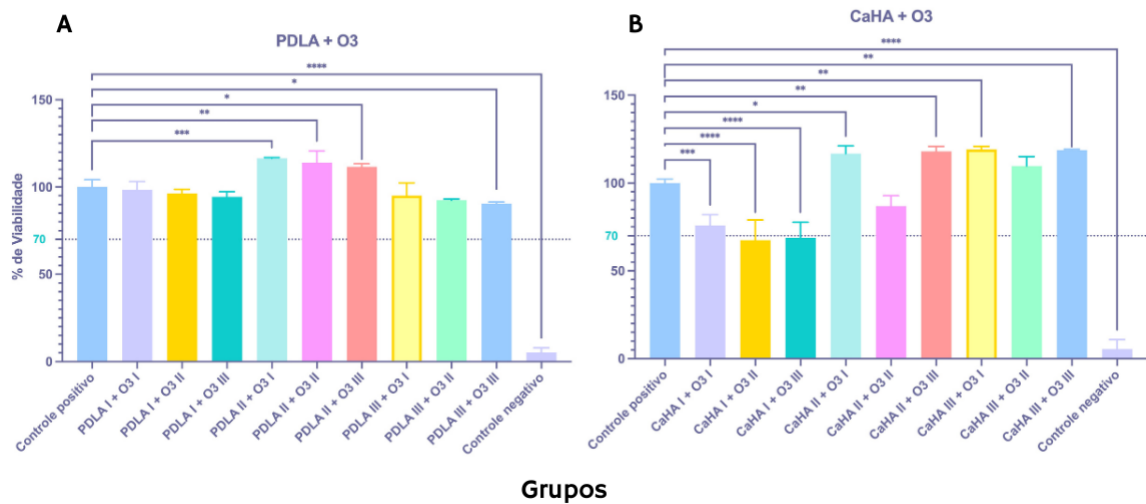
Como visto na figura 3A, quando as células são cultivadas junto do PDLA e do ozônio, a viabilidade é mantida maior que 70% para todas as concentrações, destaca-se que na concentração de PDLA II – 100 $\mu\text{g/mL}$ (e nas três concentrações do ozônio) houve diferença estatisticamente significativa [PDLA II com: Ozônio I ($0,0001 < p < 0,001$); Ozônio II ($0,001 < p < 0,01$); Ozônio III ($0,01 < p < 0,05$)] se comparado com o grupo controle, sendo o grupo com a maior viabilidade encontrada, superando até mesmo o grupo controle. Há diferença significativa ($0,01 < p < 0,05$) entre o controle e o grupo PDLA III combinado com a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ de Ozônio (III).

Já na figura 3B, observa-se que quando as células são cultivadas junto da CaHA e do ozônio a viabilidade, anteriormente verificada como menor que 70% para todos as concentrações (Figura 2A) é aumentada em alguns casos, deixando inclusive de ser citotóxica, isso pode ser verificado em todas as concentrações de CaHA II (100 $\mu\text{g/mL}$) e CaHA III (30 $\mu\text{g/mL}$).

Na maior concentração de CaHA (I – 300 $\mu\text{g/mL}$) combinada com ozônio apresentou diferenças significativas nas concentrações de I - 15 $\mu\text{g/mL}$ ($0,0001 < p < 0,001$), II - 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,0001$) e III - 5 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,0001$) se comparado com o controle. Porém somente na combinação CaHA I com Ozônio I a viabilidade superou 70%. Já na concentração de CaHA II somente houve diferença significativa com o controle quando combinado com a concentração de Ozônio I - 15 $\mu\text{g/mL}$ ($0,01 < p < 0,05$) e de Ozônio III - 5 $\mu\text{g/mL}$ ($0,001 < p < 0,01$).

A menor concentração de CaHA (III), onde o perfil de viabilidade celular é mantido mais próximo dentre as diferentes concentrações de ozônio, foi estatisticamente maior que o grupo controle ($0,001 < p < 0,01$) para as concentrações 15 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$ (I e III, respectivamente) de ozônio (Teste ANOVA, *one-way analysis of variance*, seguido do pós-teste Dunett para comparações múltiplas).

Figura 3 – Viabilidade Celular com análise comparativa entre os tratamentos com o grupo controle.

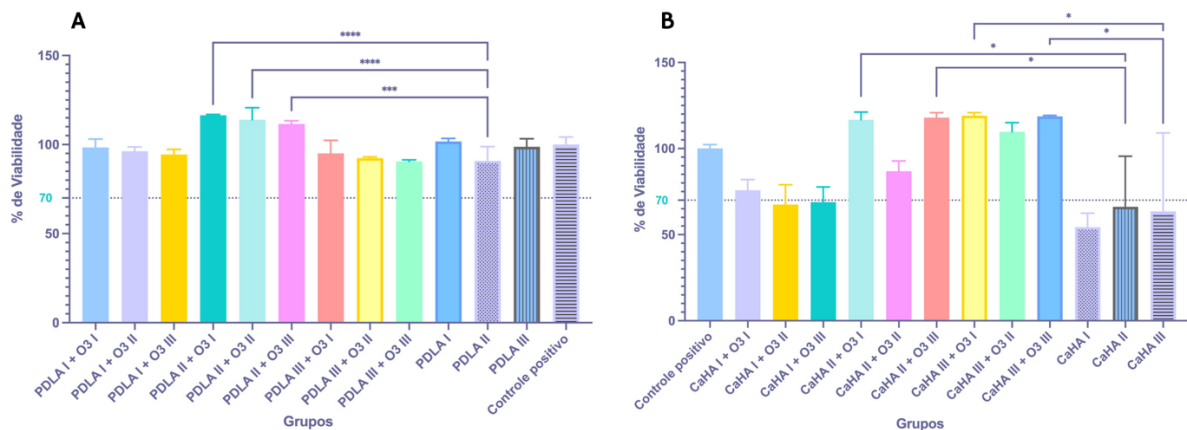


Viabilidade celular por resazurina após 24 horas de tratamento com CaHA combinado com O₃ (A), PDLA combinado com O₃ (B). As análises estatísticas foram avaliadas pelo método ANOVA-One-Way (* $0,01 < p < 0,05$; ** $0,001 < p < 0,01$; *** $0,0001 < p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Fonte: Autoria própria, com dados retirados do software GraphPad Prism 9.5.1.

Houve diferença significativa entre o uso do bioestimulador de forma isolada com a combinação do mesmo com o ozônio somente para a concentração intermediária de PDLA (Figura 4A). Porém dentro desse grupo (PDLA II) não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de ozônio (I, II e III), podendo indicar que as concentrações de ozônio utilizadas não são tão discriminatórias entre si. Dessa forma constata-se que o ozônio surtiu efeito significativo somente no grupo de PDLA II, independente de sua concentração de trabalho. Esse achado pode indicar que tal aumento na viabilidade foi provocado também por

efeitos diferentes dos efeitos do ozônio, pois caso fosse apenas do ozônio haveria um aumento significativo em outras combinações, mas não elimina-se a hipótese de que a associação do ozônio e a dose ideal do bioestimulador surtiu efeito positivo na viabilidade. Algo semelhante pode ser visto com os resultados da CaHA (Figura 4B), em que houve diferença significativa entre o uso do bioestimulador de forma isolada com a combinação do mesmo nas concentrações de ozônio I e III, isso vale para as concentrações de CaHA II e III, e mais uma vez, não havendo diferença significativa entre as diferentes concentrações de ozônio dentro de cada grupo (Teste ANOVA, *one-way analysis of variance*, seguido do pós-teste Tukey para comparações múltiplas).

Figura 4 – Viabilidade Celular com análise comparativa entre o uso do tratamento de forma isolada e combinada com o ozônio.



Viabilidade celular por resazurina após 24 horas de tratamento com PDLA combinado com O₃ (A), CaHA combinado com O₃ (B) evidenciando a influência do ozônio. As análises estatísticas foram avaliadas pelo método ANOVA-One-Way (* 0,01 < p < 0,05; *** 0,0001 < p < 0,001; **** p < 0,0001). Fonte: Autoria própria, com dados retirados do software GraphPad Prism 9.5.1.

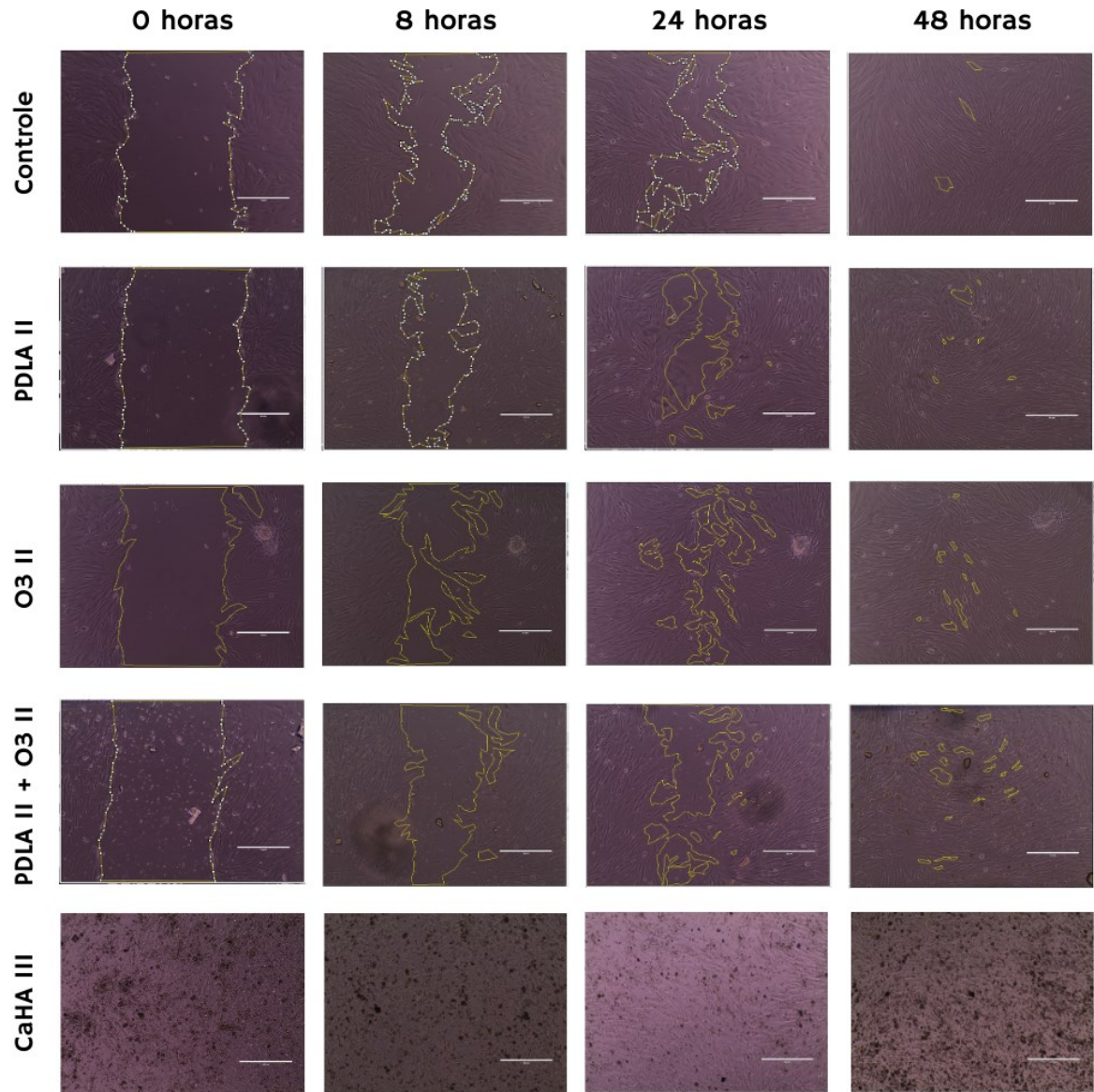
5.2 Ensaio de proliferação e migração (Scratch Assay)

Com resultados não tão discriminatórios sobre a viabilidade dos compostos nas concentrações utilizadas, optou-se por utilizar as concentrações intermediárias de PDLA (100 $\mu\text{g/mL}$) e de Ozônio (10 $\mu\text{g/mL}$) para seguir com os experimentos de migração. Como a visualização do fundo do poço é essencial para o ensaio de migração optou-se pela menor concentração (30 $\mu\text{g/mL}$) de CaHA, visto que nas concentrações mais altas, a fotodocumentação é impossibilitada, além disso essa concentração (CaHA III) foi a que apresentou resultados mais consistentes de viabilidade.

Com os resultados obtidos, foi possível visualizar a ferida para o grupo controle (células HFF-1 cultivadas em meio DMEM alta glicose suplementado com 15% de SFB), e para os tratamentos de PDLA II (100 $\mu\text{g/mL}$), meio ozonizado (10 $\mu\text{g/mL}$) e sua combinação. Entretanto não foi possível, visualizar a ferida para as células tratadas com CaHA III (30 $\mu\text{g/mL}$) mesmo essa sendo a menor concentração proposta. Dessa forma, os resultados desse bioestimulador (bem como o bioestimulador combinado com o meio ozonizado) não foram possíveis de serem analisados.

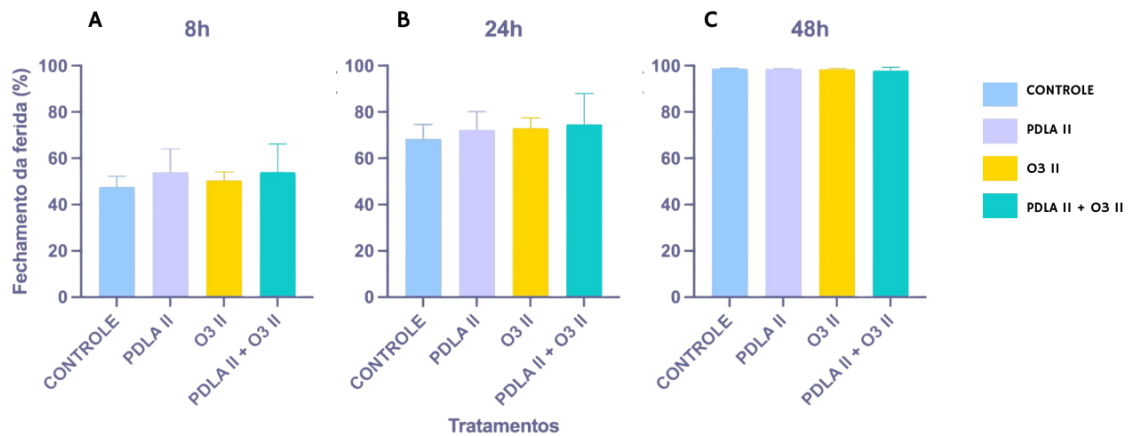
A partir dos resultados da migração celular (Figura 5) e do percentual de cicatrização da ferida (Figura 6), foi possível verificar que os tratamentos testados permitem que as células proliferem e façam a migração celular. Observa-se que com o passar do tempo a tendência de cicatrização é mantida em todos os grupos (Figura 6A e 6B) e que a ferida é praticamente toda fechada (Figura 5C) em um tempo de 48 horas após o início do tratamento. Os resultados não apresentaram diferenças estatísticas significativas (Teste ANOVA, *one-way analysis of variance*, seguido do pós-teste Tukey para comparações múltiplas).

Figura 5 – Imagens do ensaio de *Wound Healing*.



Migração dos fibroblastos HFF-1 tratados com PDLA II (100 µg/mL), O₃ II (10 µg/mL) e sua combinação nos tempos 0, 8, 24 e 48 horas em aumento de 10X (400 µm) do microscópio EVOS, é mostrado também a baixa visualização provocada pela CaHA III (30 µg/mL) o que impediu a análise dos resultados para esse grupo. Fonte: Autoria própria, com dados retirados do software ImageJ.

Figura 6 – Migração celular ao longo do tempo de fibroblastos HFF-1 cultivados junto do bioestimulador PDLA II e do meio ozonizado em concentrações intermediárias.



Migração celular nos tempos 8 horas (A), 24 horas (B) e 48 horas (C). Nenhum dos grupos apresentou diferença significativa quando avaliadas pelo método ANOVA-One-Way ($p > 0,05$). Fonte: Autoria própria, com dados retirados do software GraphPad Prism 9.5.1.

A tabela 2 apresenta os valores do percentual de fechamento da ferida, onde verifica-se que houve um aumento da migração celular coletiva e proliferação de todos os grupos tratados em relação ao controle e em ambos os tempos analisados (8 e 24 horas de tratamento). Os percentuais médios de cicatrização com 8h de tratamento foram maiores para os tratamentos se comparado com o grupo controle (aproximadamente 48%), sendo de aproximadamente 54% para o PDLA II (100 $\mu\text{g/mL}$), 50% para o meio ozonizado II (10 $\mu\text{g/mL}$) e 54% para a sua combinação. Indicando que não houve potencialização do efeito de proliferação nem migração celular provocado pelo ozônio quando combinado com o PDLA, visto que o percentual médio de cicatrização da combinação foi bem próximo do bioestimulador isolado.

Resultados semelhantes são encontrados com o passar de 24h de tratamento das células com o bioestimulador e o ozônio (Tabela 2), em que o grupo controle apresentou o menor percentual médio de cicatrização de aproximadamente 68% enquanto os grupos tratados houve um pequeno aumento, mas sem muitas diferenças entre si, de aproximadamente 72% para o PDLA II, 73% para o Ozônio II e 75% para a sua combinação. Os resultados não apresentaram

significância estatística (Teste ANOVA, *one-way analysis of variance*, seguido do pós-teste Tukey para comparações múltiplas).

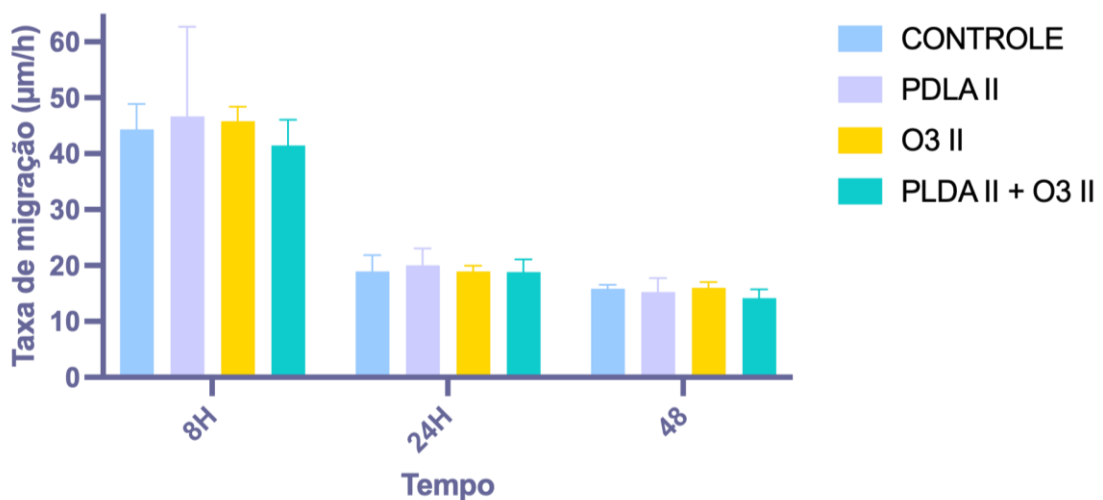
Tabela 2 – Percentual de fechamento da ferida

Grupos	Controle	PDLA II	O ₃ II	PDLA II + O ₃ II
% Média de Cicatrização (8h)	47,61 ± 4,66	53,92 ± 10,08	50,45 ± 3,58	54,13 ± 12,11
% Média de Cicatrização (24h)	68,38 ± 6,24	72,17 ± 7,91	73,03 ± 4,51	74,69 ± 13,39

Os dados estão expressos como média ± SD e representam um experimento realizado em triplicata. Fonte: Autoria própria, com dados obtidos a partir do software ImageJ.

Os resultados da taxa de migração (Figura 7) corroboram com os achados anteriores, indicando que houve uma queda na taxa de migração com o passar do tempo, o que é esperado, pois indica que a ferida está sendo cicatrizada com o passar do tempo. Os resultados não apresentaram significância estatísticas (Teste ANOVA, *one-way analysis of variance*, seguido do pós-teste Tukey para comparações múltiplas).

Figura 7 – Taxa de migração de fibroblastos HFF-1 cultivados junto do bioestimulador PDLA e do meio ozonizado em concentrações intermediárias.



Taxa de migração celular coletiva expressa em µm/h nos tempos 8, 24 e 48h para os grupos testados. Nenhum dos grupos apresentou diferença significativa quando avaliadas pelo método ANOVA-One-Way ($p > 0,05$). Fonte: Autoria própria, com dados retirados do software GraphPad Prism 9.5.1.

6 DISCUSSÃO

Por ser uma área de estudo emergente há uma escassez de trabalhos científicos sobre o uso do PDLA e da CaHA como bioestimuladores. Dos estudos disponíveis, a maioria são relatos clínicos utilizando os produtos comerciais que fazem uso desses compostos. Diversos dos estudos envolvendo o uso do PDLA possuem como finalidade a regeneração óssea, devido a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade, para isso são utilizados *scaffolds* a base de PDLA combinados ou não com outros compostos (Merolli *et al.*, 2001). Estudo como o de Sarasua e colaboradores mostra que ao cultivar fibroblastos da linhagem L929 e fibroblastos neonatais sobre *scaffolds* de PLLA ou de PDLA não houve citotoxicidade significativa pelo método de detecção de viabilidade por MTT, se mantendo viáveis por até 3 dias, propostos pelos pesquisadores, resultado semelhante ao encontrado na pesquisa atual, apesar do foco do trabalho ser diferente (Sarasua *et al.*, 2011).

Ray e Ta ao cultivarem fibroblastos HFF-1 combinadas com nanopartículas de PLLA por 24h em diferentes concentrações, obtiveram como resultado de viabilidade pelo teste Presto Blue que a viabilidade caiu gradativamente, em pequena quantidade, à medida que a concentração do PLLA foi aumentando (até atingir 1000 µg/mL). Para o restante do estudo foi definido que a concentração das nanopartículas de PLLA a ser utilizada seria de 300 µg/mL por manter a viabilidade das células utilizadas, resultado semelhante ao encontrado na pesquisa atual, onde essa mesma concentração manteve a viabilidade acima de 100% após 24h de tratamento (Ray; Ta, 2020). Um marco interessante do mesmo estudo é que não foi possível confirmar que o PLLA nas concentrações testadas estimulou a produção de colágeno em fibroblastos, porém em uma concentração de 100 µg/mL quando testada em co-cultura de fibroblastos e macrófagos houve a estimulação dessas células para a neocolagênese, essa concentração foi a que demonstrou resultados mais consistentes de viabilidade em nossa pesquisa (Ray; Ta, 2020).

Wollina e colaboradores publicaram um estudo de caso em que foram testados três diferentes produtos que utilizam a CaHA como bioestimulador, em que apresentam diferentes concentrações do composto. Os resultados de viabilidade celular e proliferação não apresentaram diferenças significativas provocadas pela CaHA, mantendo assim a viabilidade celular de culturas de fibroblastos dérmicos humanos (Wollina; Wiegand; Hipler, 2018). No caso dos resultados no nosso trabalho, a CaHA se mostrou citotóxica quando testada isoladamente, mas não de maneira significativa. Tal diferença de resultados pode ser explicada pelo uso isolado da CaHA, visto que quando testada com o O₃ a viabilidade foi mantida maior que 70% para a maior parte das combinações, diferente do presente estudo Wollina utilizou o produto comercial como tratamento, assim, algum dos outros componentes do produto pode também ter permitido uma viabilidade próxima do controle.

O estudo de Poma utiliza uma forma de administração de ozônio diferente da que utilizamos nesse trabalho, enquanto utilizamos o meio ozonizado, Poma e colaboradores utilizaram uma câmara de cultura com atmosfera controlada com injeção de 120 parte por milhão de ozônio, valor duas vezes abaixo do recomendado para uso em humanos de acordo com a legislação da União Européia (Poma *et al.*, 2017). Os resultados de viabilidade indicam que o ozônio não foi citotóxico após 24h para células fibroblásticas da linhagem Hs27, apesar dos resultados não terem apresentado significância estatística (Poma *et al.*, 2017). O estudo de Borges e colaboradores administra o ozônio como tratamento por meio de uma salina (PBS) ozonizada. Foram feitos testes de viabilidade em fibroblastos pelo método de MTT, mas não encontraram resultados significativos para as diferentes concentrações testadas (Borges *et al.*, 2017). Ambos estudos corroboram com os resultados achados em nossa pesquisa, em que o ozônio manteve a viabilidade das células, mas não de maneira significativa.

Após a aplicação do bioestimulador na pele, o processo de inflamação se inicia onde fibroblastos serão recrutados para o local de aplicação, onde ocorrerá uma produção

novas fibras de colágeno e outros componentes da MEC, dessa forma a migração dos fibroblastos não deve ser influenciada negativamente pela ação desses produtos (Cunha *et al.*, 2016). No ensaio *Wound Healing*, se deseja verificar a capacidade de migração coletiva de células, após uma ferida ser feita, por exemplo de forma mecânica, sendo um importante aspecto a ser analisado, principalmente de fibroblastos, que agirão de forma direta na produção de colágeno em processos de inflamação induzida pelo uso de bioestimuladores como a CaHA e o PDLA com o objetivo de melhorar o aspecto geral da pele (Grada *et al.*, 2017).

Xiao e colaboradores isolaram fibroblastos de zonas de granulação de ratos injuriados e a partir disso foi feito o *Scratch assay* utilizando o óleo de camélia ozonizado como tratamento, e os resultados encontrados mostram que houve um aumento da migração das células quando comparado com o controle, de forma significativa após 3 e 5 dias (Xiao *et al.*, 2017). Borges e colaboradores não encontraram resultados significativos para o teste de migração pelo método *Scratch Assay* ao administrarem PBS contendo 8 µg/mL de ozônio em fibroblastos L929 quando comparado com o grupo controle após 24 horas (Borges *et al.*, 2017). Enquanto na nossa pesquisa a migração dos tratamentos de PDLA e O3 não surtiram efeitos significativos na melhora da migração, apesar de aumentarem em pouca proporção os valores do percentual de fechamento da ferida em 8h e 24h se comparado com o grupo controle.

7 CONCLUSÃO

Em suma, todas concentrações de CaHA testadas isoladamente apresentaram citotoxicidade (viabilidade menor que 70%) para as células HFF-1, enquanto as concentrações de PDLA e de ozônio, quando administradas isoladamente, não apresentaram citotoxicidade para os fibroblastos, esses resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Ao administrar o meio ozonizado combinado com os bioestimuladores, o O₃ pode ter sido o causador do aumento da viabilidade, mas não de forma completamente significativa, somente em alguns casos. Assim, os resultados não foram tão esclarecedores quanto a influência do ozônio na viabilidade celular quando combinado com os bioestimuladores.

O modo de preparo das soluções de CaHA deve ser otimizado em estudos futuros, visto que até mesmo nas menores concentrações utilizadas, que são concentrações próximas as usadas em outros trabalhos e no mercado, não apresentaram resultados significativos para a viabilidade, e impossibilitou a visualização das células, interferindo assim nos resultados de migração pelo *Scratch Assay*. Apesar dos resultados do *Scratch Assay* não terem apresentado diferença significativa, o fato do PDLA na concentração de 100 µg/mL e do ozônio de 10 µg/mL surtirem efeito positivo na migração dos fibroblastos já é por si só um bom resultado, além disso após 48 horas do início do tratamento, todas as feridas já estavam cicatrizadas.

Por fim, a influência do ozônio e dos bioestimuladores sobre os fibroblastos devem ser investigados melhor através de outros métodos, como a quantificação de colágeno produzido por HFF-1 estimulados, ou até mesmo para um melhor entendimento, investigar os genes envolvidos na produção dos diferentes tipos de colágeno após o tratamento.

REFERÊNCIAS

- ALI, M. Jafer; ENDE, Kevin; MAAS, Corey S. Perioral Rejuvenation and Lip Augmentation. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 491–500, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2007.08.008>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18005890/>. Acesso em: 07 jan. 2024
- ALMEIDA, Elizandra Paccola Moretto De; LEVY, Flávia Mauad; BUZALAF, Marília Afonso Rabelo. “RichBlend” protocol for full-face filling and collagen biostimulation. **RGO - Revista Gaúcha de Odontologia**, [s. l.], v. 71, p. e20230014, 2023. <https://doi.org/10.1590/1981-86372023001420210069>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rgo/a/mYr89QCTk9Ftv658mcSZVPR/>. Acesso em: 07 jan. 2024
- ARDA, Oktay; GÖKSÜGÜR, Nadir; TÜZÜN, Yalçın. Basic histological structure and functions of facial skin. **Clinics in Dermatology**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 3–13, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.021>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24314373/>. Acesso em: 07 jan. 2024
- BERLIN, Alexander L.; HUSSAIN, Mussarratt; GOLDBERG, David J. Calcium Hydroxylapatite Filler for Facial Rejuvenation: A Histologic and Immunohistochemical Analysis. **Dermatologic Surgery**, [s. l.], v. 34, n. s1, p. S64–S67, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2008.34245.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18547184/>. Acesso em: 07 jan. 2024
- LODISH, H. et al. **BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**. [S. l.], 7. ed., p.947-956 Porto Alegre: Artmed, 2014.
- BORGES, Gabriel Álvares *et al.* In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 364–370, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.01.005>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28169044/>. Acesso em: 07 jan. 2024
- BREITHAUPT, Andrew; FITZGERALD, Rebecca. Collagen Stimulators: Poly-L-Lactic Acid and Calcium Hydroxyl Apatite. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, [s. l.], v. 23, n. 4, Cosmetic Injectable Fillers, p. 459–469, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.01.005>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28169044/>. Acesso em: 07 jan. 2024

CHUA, F.; LAURENT, G.J. FIBROBLASTS. *In: ENCYCLOPEDIA OF RESPIRATORY MEDICINE.* [S. l.]: Elsevier, 2006. p. 213–219. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0123708796001563>. Acesso em: 5 jan. 2024.

CISTERNA, Barbara *et al.* Low Ozone Concentrations Differentially Affect the Structural and Functional Features of Non-Activated and Activated Fibroblasts In Vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 18, p. 10133, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms221810133>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34576295/>. Acesso em: 07 jan. 2024

CSEKES, Erika; RAČKOVÁ, Lucia. Skin Aging, Cellular Senescence and Natural Polyphenols. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 23, p. 12641, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms221810133>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34576295/>. Acesso em: 07 jan. 2024

CUNHA, Marisa Gonzaga Da *et al.* Poly-L-lactic acid injections in sagging body skin. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, [s. l.], v. 8, n. 4, 2016. <https://doi.org/10.5935/SCD1984-8773.20168404>. Disponível em: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/scd1984-8773.20168404>. Acesso em: 7 jan. 2024.

DENGJEL, Jörn; BRUCKNER-TUDERMAN, Leena; NYSTRÖM, Alexander. Skin proteomics – analysis of the extracellular matrix in health and disease. **Expert Review of Proteomics**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 377–391, 2020. <https://doi.org/10.1080/14789450.2020.1773261>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32552150/>. Acesso em: 07 jan. 2024

DEVGAN, Lara; SINGH, Priyanka; DURAIRAJ, Kamala. Minimally Invasive Facial Cosmetic Procedures. **Otolaryngologic Clinics of North America**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 443–459, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2019.02.013>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30954270/>. Acesso em: 07 jan. 2024

FITZGERALD, Rebecca *et al.* Physiochemical Characteristics of Poly-L-Lactic Acid (PLLA). **Aesthetic Surgery Journal**, [s. l.], v. 38, n. suppl_1, p. S13–S17, 2018. <https://doi.org/10.1093/asj/sjy012>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29897517/>. Acesso em: 07 jan. 2024

FRANZEN, J. M.; SANTOS, J. M. S. R.; ZANCANARO, V. Colágeno: uma abordagem para a estética: Collagen: A New Approach To Aesthetic. **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde**. [s. l.], v.2, n.2, p.49-61, 2013. <https://doi.org/10.33362/ries.v2i2.161>. Disponível em: <https://periodicos.uniarp.edu.br/index.php/ries/article/view/161>. Acesso em: 10 jan. 2024.

FUKS, K. B.; WOODBY, B.; VALACCHI, G. Skin damage by tropospheric ozone. **Der Hautarzt**, [s. l.], 2019. <https://doi.org/10.1007/s00105-018-4319-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s00105-018-4319-y>. Acesso em: 5 jan. 2024.

GRADA, Ayman *et al.* Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 137, n. 2, p. e11–e16, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>. Acesso em: 07 jan. 2024

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 585–621, 1961. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13905658/>. Acesso em: 07 jan. 2024

Global Survey 2021. **ISAPS**. 2021. Disponível em: <https://www.isaps.org/discover/about-isaps/global-statistics/reports-and-press-releases/global-survey-2021-full-report-and-press-releases/>. Acesso em 07 jan. 2024

ISO. 10993–5: 2009. Biological Evaluation of Medical Devices–Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity. **International Organization for Standardization**. 2009. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/36406.html> Acesso em: 07 jan. 2024

KARAMANOS, Nikos K. *et al.* A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. **The FEBS Journal**, [s. l.], v. 288, n. 24, p. 6850–6912, 2021. <https://doi.org/10.1111/febs.15776>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33605520/>. Acesso em: 07 jan. 2024

KOCHHAR, Amit; KUMAR, Parvesh; KARIMI, Kian. Minimally Invasive Techniques for Facial Rejuvenation Utilizing Polydioxanone Threads. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 375–387, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2022.03.011> Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35934439/>. Acesso em: 07 jan. 2024

KUMAR, Priti; NAGARAJAN, Arvindhan; UCHIL, Pradeep D. Analysis of Cell Viability by the alamarBlue Assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, [s. l.], v. 2018, n. 6, p. pdb.prot095489, 2018. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095489>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29858336/>. Acesso em: 07 jan. 2024

LACOMBE, Victor. Sculptra: A Stimulatory Filler. **Facial Plastic Surgery**, [s. l.], v. 25, n. 02, p. 095–099, 2009. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1220648>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19415576/>. Acesso em: 07 jan. 2024

LACOMBE, Victor G. Volumizing Fillers for Skin. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 521–524, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2023.05.009>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37806685/>. Acesso em: 07 jan. 2024

LAKEY, P. S. J. *et al.* Chemical kinetics of multiphase reactions between ozone and human skin lipids: Implications for indoor air quality and health effects. **Indoor Air**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 816–828, 2017. <https://doi.org/10.1111/ina.12360>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27943451/>. Acesso em: 07 jan. 2024

LIU, Liyao *et al.* Ozone therapy for skin diseases: Cellular and molecular mechanisms. **International Wound Journal**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 2376–2385, 2023. <https://doi.org/10.1111/iwj.14060>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36527235/>. Acesso em: 07 jan. 2024

LOMBARDI, Francesca *et al.* Type I Collagen Suspension Induces Neocollagenesis and Myodifferentiation in Fibroblasts *In Vitro*. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2020, p. 1–11, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6093974>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34368344/>. Acesso em: 07 jan. 2024

LONGHIN, Eleonora Marta *et al.* The alamar blue assay in the context of safety testing of nanomaterials. **Frontiers in Toxicology**, [s. l.], v. 4, p. 981701, 2022. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.981701>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/ftox.2022.981701/full/>. Acesso em: 07 jan. 2024

MARMUR, Ellen S; PHELPS, Robert; GOLDBERG, David J. Clinical, histologic and electron microscopic findings after injection of a calcium hydroxylapatite filler. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 223–226, 2004.

<https://doi.org/10.1080/147641704100003048>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16020207/>. Acesso em: 07 jan. 2024

MARTINOTTI, Simona; RANZATO, Elia. Scratch Wound Healing Assay. *In*: TURKSEN, Kursad (org.). **Epidermal Cells**. New York, NY: Springer US, 2019. (Methods in Molecular Biology). v. 2109, p. 225–229. https://doi.org/10.1007/7651_2019_259 Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/7651_2019_259. Acesso em: 23 dez. 2023.

MEROLLI, A. *et al.* Bone response to polymers based on poly-lactic acid and having different degradation times. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 775–778, 2001. <https://doi.org/10.1023/a:1017912716351>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15348223/>. Acesso em: 07 jan. 2024

NETTAR, Kartik; MAAS, Corey. Facial Filler and Neurotoxin Complications. **Facial Plastic Surgery**, [s. l.], v. 28, n. 03, p. 288–293, 2012. <https://doi.org/10.1023/a:1017912716351>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15348223/>. Acesso em: 07 jan. 2024

Non-invasive Aesthetic Treatment Market. **Grand View Research**. 2023. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/non-invasive-aesthetic-treatment-market/>. Acesso em: 07 jan. 2024

OH, Seyeon *et al.* Poly-D,L-Lactic Acid Stimulates Angiogenesis and Collagen Synthesis in Aged Animal Skin. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 7986, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24097986>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37175693/>. Acesso em: 07 jan. 2024

PAPAIORDANOU, Francine *et al.* Colágeno e pele: da estrutura às evidências de sua suplementação oral. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, [s. l.], v. 14, 2022. Disponível em: <http://www.surgicalcosmetic.org.br/details/949/en-US/colageno-e-pele--da-estrutura-as-evidencias-de-sua-suplementacao-oral>. Acesso em: 5 jan. 2024.

PAWELEC, K. M.; BEST, S. M.; CAMERON, R. E. Collagen: a network for regenerative medicine. **Journal of Materials Chemistry B**, [s. l.], v. 4, n. 40, p. 6484–6496, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms24097986>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37175693/>. Acesso em: 07 jan. 2024

POMA, Anna *et al.* Effects of ozone exposure on human epithelial adenocarcinoma and normal fibroblasts cells. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. e0184519, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184519>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0184519>. Acesso em: 07 jan. 2024

PRÄBST, Konstantin *et al.* Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In: GILBERT, Daniel F.; FRIEDRICH, Oliver (org.). **Cell Viability Assays**. New York, NY: Springer New York, 2017. (Methods in Molecular Biology). v. 1601, p. 1–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6960-9_1. Acesso em: 23 dez. 2023.

RAY, Subarna; TA, Hang T. Investigating the Effect of Biomaterials Such as Poly-(l-Lactic Acid) Particles on Collagen Synthesis In Vitro: Method Is Matter. **Journal of Functional Biomaterials**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 51, 2020. <https://doi.org/10.3390/jfb11030051>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32722074/>. Acesso em: 07 jan. 2024

RIPPA, Alexandra L.; KALABUSHEVA, Ekaterina P.; VOROTELYAK, Ekaterina A. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. **Cells**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 607, 2019. <https://doi.org/10.3390/jfb11030051>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32722074/>. Acesso em: 07 jan. 2024

SARASUA, J. R. *et al.* Crystallinity assessment and in vitro cytotoxicity of polylactide scaffolds for biomedical applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 22, n. 11, p. 2513–2523, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4425-1>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10856-011-4425-1>. Acesso em: 07 jan. 2024

SCASSELLATI, Catia *et al.* Ozone: a natural bioactive molecule with antioxidant property as potential new strategy in aging and in neurodegenerative disorders. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 63, p. 101138, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101138>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32810649/>. Acesso em: 07 jan. 2024

VIDAL YUCHA, Sarah E.; TAMAMOTO, Kasey A.; KAPLAN, David L. The importance of the neuro-immuno-cutaneous system on human skin equivalent design. **Cell Proliferation**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. e12677, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101138>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32810649/> Acesso em: 07 jan. 2024

WOLLINA, U.; WIEGAND, C.; HIPLER, U.-C. Calcium hydroxylapatite microspheres - biocompatibility and clinical effects. **Georgian Medical News**, [s. l.], n. 278, p. 62–68, 2018.

Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/325805372_CALCIIUM_HYDROXYLAPATITE_MICROSPHERES_-_BIOCOMPATIBILITY_AND_CLINICAL_EFFECTS. Acesso em: 07 jan. 2024

WONG, Hui Hui *et al.* Red-COLA1: a human fibroblast reporter cell line for type I collagen transcription. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 19723, 2020.

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-75683-5>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-75683-5>. Acesso em: 07 jan. 2024

XIAO, Weirong *et al.* Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Bioscience Reports**, [s. l.], v. 37, n. 6, p. BSR20170658, 2017.

<https://doi.org/10.1042/bsr20170658>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28864782/>. Acesso em: 07 jan. 2024