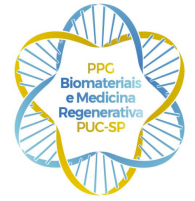




PUC-SP

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA SAÚDE**



Júlia Oliveira Germano

**Estudo da associação de micropartículas de poli-L-ácido láctico e
policaprolactona na síntese de colágeno *in vitro***

Mestrado em Biomateriais e Medicina Regenerativa

SOROCABA

2025

Júlia Oliveira Germano

Estudo da associação de micropartículas de poli-L-ácido láctico e policaprolactona
na síntese de colágeno *in vitro*

Dissertação de Mestrado apresentada à Banca
Examinadora da Pontifícia Universidade
Católica de São Paulo, como exigência parcial
para obtenção do título de Mestre em
Biomateriais e Medicina Regenerativa.
Orientadora: Profa. Dra. **Priscila Randazzo de
Moura**

SOROCABA

2025

Sistemas de Bibliotecas da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo -
Ficha Catalográfica com dados fornecidos pelo autor

Germano, Júlia Oliveira
Estudo da associação de micropartículas de poli-L-ácido
láctico e policaprolactona na síntese de colágeno in vitro.
/ Júlia Oliveira Germano. -- Sorocaba, SP: [s.n.], 2025.
p. il. ; cm.

Orientador: Priscila Randazzo de Moura.
Dissertação (Mestrado)-- Pontifícia Universidade Católica de
São Paulo, Programa de Estudos Pós-Graduados em Biomateriais
e Medicina Regenerativa.

1. Bioestimuladores de colágeno. 2. PLLA. 3. PCL. 4.
Envelhecimento facial. I. Moura, Priscila Randazzo de. II.
Pontifícia Universidade Católica de Sorocaba, SP, Programa de
Estudos Pós-Graduados em Biomateriais e Medicina
Regenerativa. III. Título.

CDD

Banca Examinadora

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 – processo número 88887.895196/2023-00

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fonte de vida, força e direção, agradeço por ter sustentado cada passo desta jornada.

À minha família, minha base incondicional, e ao meu marido, companheiro presente em todos os momentos, dos desafios e ansiedades às vitórias e conquistas.

À minha orientadora, Profa. Dra. Priscila Randazzo de Moura, expresse minha profunda admiração e reconhecimento. Sua dedicação incansável, generosidade e excelência no ensino, na clínica e na orientação foram inspirações constantes ao longo deste percurso.

Ao Prof. Dr. Daniel Komatsu, agradeço por sua atenção, paciência e colaboração atenta, sempre disposto a compartilhar seu conhecimento e tempo com generosidade.

À Profa. Dra. Moema Hausen, sou grata por sua contribuição essencial ao compartilhar sua expertise em cultura celular e colaborar ativamente com este trabalho.

Ao Dr. Rodrigo Gomes, que me acompanhou com precisão e comprometimento em todas as etapas laboratoriais, e à Dra. Jéssica Asami, pelo apoio zeloso e competente na área de microbiologia, deixo meus sinceros agradecimentos.

Ao Filipe Feitosa, obrigada pelo cuidado e dedicação no manejo dos animais utilizados no projeto.

Aos docentes e à equipe da pós-graduação, agradeço pelo ensino de excelência e por guiarem minha formação com seriedade e acolhimento.

À Pontifícia Universidade Católica de São Paulo – Campus Sorocaba, pela estrutura e oportunidade de formação.

À FUNDASP, pelo apoio institucional por meio do PIPEq nº 31328/PUC/SP.

À CAPES/PROSUC, pelo auxílio financeiro concedido durante o mestrado, que foi fundamental para a realização deste trabalho.

RESUMO

Germano, J. O. Estudo da associação de micropartículas de poli-L-ácido láctico e policaprolactona na síntese de colágeno *in vitro*.

O fotoenvelhecimento da pele, que resulta na substituição da matriz colágena por fibras disfuncionais, impulsiona a crescente busca por biomateriais capazes de estimular a produção de colágeno na estética e engenharia tecidual. O poli-L-ácido láctico (PLLA) e a policaprolactona (PCL) são biomateriais amplamente utilizados com o objetivo de estímulo da neocolagênese. Este estudo avaliou o efeito da associação de micropartículas de PLLA e PCL sobre a síntese de colágeno tipo I *in vitro*, utilizando culturas de fibroblastos e macrófagos murinos. Micropartículas com diâmetro médio de 2µm foram obtidas e caracterizadas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise de distribuição de tamanho. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT em 1, 3 e 7 dias. A produção de colágeno tipo I foi quantificada por ELISA dentro de 14 dias de experimento. Os resultados demonstraram que as micropartículas mantiveram suas características químicas e mecânicas e a associação de PLLA e PCL não comprometeu a viabilidade celular além de resultar numa produção significativamente maior de colágeno ($p < 0,01$) quando comparada as micropartículas isoladas. A associação dos dois polímeros, promoveu um microambiente mais favorável no aumento de fibras colágenas pelos fibroblastos, possivelmente devido à melhor internalização das partículas. Concluiu-se que a associação das micropartículas de PLLA e PCL representa uma estratégia terapêutica simples e mais efetiva no estímulo da neocolagênese, com potencial promissor na aplicação como bioestimulador dérmico na harmonização orofacial e/ou nos tratamentos de defeitos dérmicos de tecidos moles.

Palavras-chave: bioestimuladores de colágeno, PLLA, PCL, envelhecimento facial.

ABSTRACT

Germano, J. O. Evaluation of Poly-L-lactic Acid and Polycaprolactone Microparticle Association for Collagen Synthesis *In Vitro*

Skin photoaging, characterized by the replacement of the collagen matrix with dysfunctional fibers, drives the growing demand for biomaterials capable of stimulating collagen production in aesthetics and tissue engineering. Poly-L-lactic acid (PLLA) and polycaprolactone (PCL) are widely used biomaterials aimed at promoting neocollagenesis. This study evaluated the effect of the combined use of PLLA and PCL microparticles on type I collagen synthesis *in vitro*, using murine fibroblast and macrophage cultures. Microparticles with an average diameter of $2\ \mu\text{m}$ were obtained and characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), scanning electron microscopy (SEM), and particle size distribution analysis. Cell viability was assessed using the MTT assay on days 1, 3, and 7. Type I collagen production was quantified by ELISA over a 14-day period. The results demonstrated that the microparticles retained their chemical and mechanical properties, and the combination of PLLA and PCL did not impair cell viability. Moreover, it resulted in significantly higher collagen production ($p < 0.01$) compared to isolated microparticles. The association of both polymers created a more favorable microenvironment for collagen fiber production by fibroblasts, possibly due to improved particle internalization. It is concluded that the combination of PLLA and PCL microparticles represents a simple and more effective therapeutic strategy for stimulating neocollagenesis, showing promising potential as a dermal biostimulant in orofacial harmonization and/or the treatment of dermal soft tissue defects.

Keywords: collagen biostimulators, PLLA, PCL, facial aging.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Envelhecimento facial	12
Figura 2 – Histologia da Pele	13
Figura 3 – MEV das micropartículas comerciais: PLLA (Sculptra) e PCL (Ellansé) .	15
Figura 4 – Desenho experimental	18
Figura 5 - Esquema representativo da síntese e estrutura molecular do PLLA.....	19
Figura 6 – Etapas de isolamento de macrófagos intraperitoneais	23
Figura 7 – Curva padrão para o Ensaio ELISA	26
Figura 8 - Espectro de FTIR do PLLA	27
Figura 9 - Espectro de FTIR do PCL.....	28
Figura 10 - Curva de DSC referente ao segundo aquecimento do PLLA	29
Figura 11 - Curva de DSC referente ao resfriamento do PLLA	29
Figura 12 - Curva de DSC referente ao segundo aquecimento do PCL.....	30
Figura 13 - Curva de DSC referente ao resfriamento do PCL	31
Figura 14 - Termograma do PLLA.....	32
Figura 15 - Termograma do PCL	33
Figura 16 – MEV das micropartículas de PLLA e PCL	34
Figura 17 - Curva de distribuição do tamanho das partículas de PLLA.....	34
Figura 18 - Curva de distribuição do tamanho das partículas de PCL.....	35
Figura 19 - Resultados do ensaio de atividade metabólica (MTT).....	37
Figura 20 – Produção de colágeno I <i>in vitro</i>	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Poli-L-ácido láctico (PLLA):	18
3.2 Policaprolactona (PCL):.....	19
3.3 Obtenção das micropartículas.....	19
3.3.1 PLLA:.....	19
3.3.2 PCL:	20
3.4 Caracterização das partículas	20
3.4.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	20
3.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	21
3.4.3 Termogravimetria (TG).....	21
3.4.4 Análise das micropartículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)..	21
3.5 Estudo biológico	21
3.5.1 Animais.....	21
3.5.2 Obtenção de material biológico para cultura de fibroblastos	22
3.5.3 Obtenção de material biológico para cultura de macrófagos.....	22
3.5.4 Ensaio experimental <i>in vitro</i>	24
3.6 Avaliação da viabilidade celular e da produção de colágeno	24
3.6.1 Ensaio de atividade metabólica (MTT).....	24
3.6.2 Teste imunoenzimático ELISA	25
3.7 Análise estatística	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Caracterização das micropartículas.....	27
4.1.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	27
4.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	28
4.1.3 Termogravimetria (TG).....	31
4.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	33
4.2 Cultura celular	36
4.2.1 Ensaio de atividade metabólica (MTT).....	36
4.2.2 Teste Imunoenzimático ELISA	39

5 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXO A - CERTIFICADO CEUA.....	47

1 INTRODUÇÃO

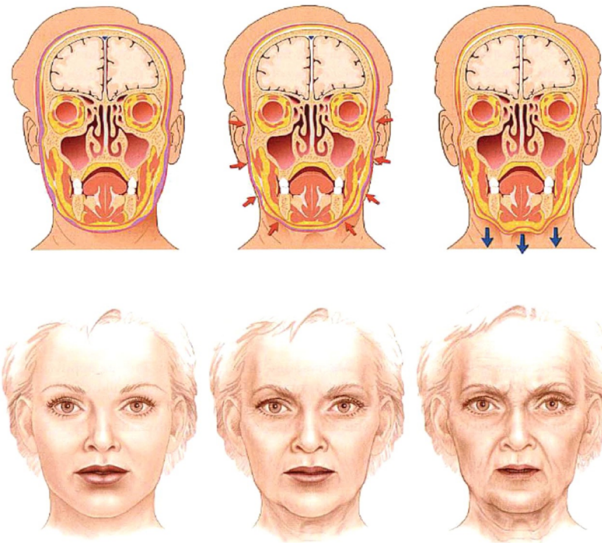
A busca por um ideal de beleza é evidente e tem crescido muito nos últimos anos mediante a utilização das redes sociais. À medida que a expectativa de vida aumenta, a percepção da juventude torna-se um ideal cultural cada vez mais valorizado. Uma pessoa jovem é interpretada como saudável, bonita e cheia de energia, enquanto uma pessoa que não tem traços faciais característicos de um rosto jovem, muitas vezes, tem sua autoestima, auto-percepção e interações sociais prejudicadas (1).

O processo de envelhecimento apresenta sinais evidentes nos tecidos da face que tendem a alterar as proporções entre os terços faciais. Esses sinais são decorrentes de processos biológicos como a remodelação óssea que caracteriza a perda de volume ósseo principalmente nas regiões periorbital, zigomática e peribucal, a redistribuição e perda de gordura subcutânea e a flacidez da pele (2,3).

A gordura facial é dividida em compartimentos chamados coxins de gordura, que são subdivididos em superficiais e profundos. Cotofana *et al.* (4), através de estudos em cadáveres sugerem que os coxins de gordura profundos não apresentam significativa movimentação com o processo de envelhecimento, mas os coxins de gordura superficiais podem migrar, no sentido da gravidade, gerando um aspecto de derretimento facial, conforme exemplificado na Figura 1. Este aumento da mobilidade dos compartimentos de gordura superficiais explica porque com o aumento da idade o sulco nasolabial torna-se mais proeminente, assim como a papada e o sulco labiogeniano.

Enquanto um rosto jovem tem o aspecto de triângulo invertido, com traços bem definidos na região zigomática, a face em processo de envelhecimento avançado tem a aparência oposta, somando-se os efeitos da ação muscular através dos anos, a remodelação óssea e a mobilidade dos coxins de gordura. Essas características são ainda mais evidenciadas com o aumento progressivo da flacidez da pele (2).

Figura 1- Envelhecimento facial

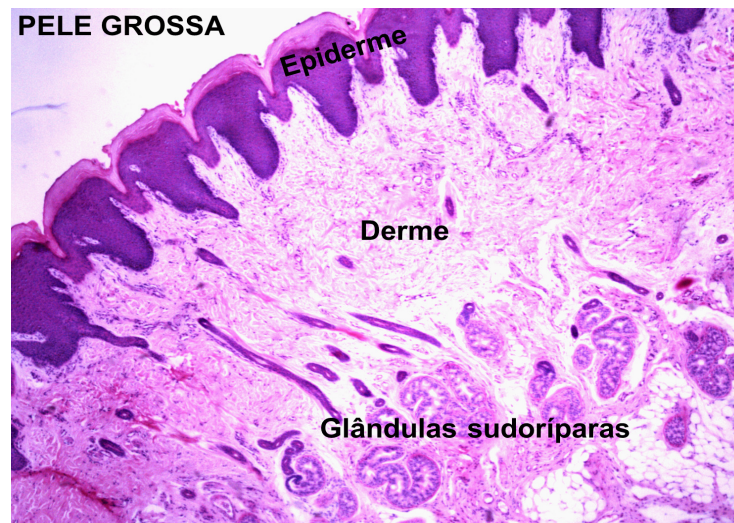


Fonte: Coleman *et al.* (2)

A pele é dividida, do ponto de vista estrutural, em epiderme, constituída por tecido epitelial, e derme, constituída por tecido conjuntivo. Estas repousam sobre o tecido subcutâneo - um tecido conjuntivo mais frouxo e rico em lipídeos (5). Essas três camadas sofrem alterações durante o processo de envelhecimento, principalmente ao tratar-se de indivíduos que se expõem ao sol sem fotoproteção.

A junção entre epiderme e derme, exemplificada na Figura 2, se dá através de papilas dérmicas. Essa constituição irregular da superfície limitante entre derme e epiderme é de grande importância para aumentar a superfície de contato e reforçar a união entre as camadas (6). Tal junção sofre um achatamento com o avanço da idade, e uma junção mais fraca entre as camadas favorece a flacidez e a aparência de rugas (7, 8). Em relação ao tecido conjuntivo (derme), durante o processo de envelhecimento é observada a diminuição do suprimento sanguíneo e também da quantidade de fibroblastos e os produtos que essas células sintetizam – matriz extracelular, glicosaminoglicanos, ácido hialurônico e colágeno. A derme envelhecida pelo sol tem um aumento de fibras elásticas disfuncionais e anormais que substituem a matriz colágena normal. Essa diminuição geral da integridade da derme e alteração de seus componentes resultam em rigidez, elasticidade reduzida e maior vulnerabilidade (7).

Figura 2 – Histologia da Pele



Fonte: histologiatextoeatlasufpr.com.br/wp-content/uploads/2021/05/pele-1G.jpg

Fibroblastos são as células mais comuns e importantes do tecido conjuntivo. Estes produzem colágeno, elastina e outras proteínas da matriz extracelular, que dão sustentação e elasticidade à pele. Os fibroblastos são especialmente preparados para o reparo tecidual, pois podem reativar o ciclo celular facilmente e demonstram plasticidade fenotípica reversível – capacidade de mudar seu fenótipo em resposta a estímulos ambientais e retornar ao seu estado original após a remoção do estímulo (9).

Conforme citado por Fisher *et al.* (10), os fibroblastos regulam a síntese de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular em resposta à tensão mecânica. Eles possuem integrinas na superfície celular, que se ligam a proteínas da matriz extracelular - como o colágeno tipo I - formando adesões focais que desempenham funções regulatórias e mecânicas. As adesões focais ativam cascatas de sinalização intracelular, regulando o metabolismo dos fibroblastos, incluindo a produção de colágeno e sua degradação por metaloproteinases da matriz. O acúmulo lento de fragmentos de colágeno, que ocorre durante o processo de envelhecimento, compromete a integridade estrutural da matriz de colágeno, criando um ambiente onde os fibroblastos perdem tensão mecânica e colapsam, resultando em menor produção de colágeno e maior degradação do mesmo. Uma vez iniciado, esse desequilíbrio em direção à degradação do colágeno é auto-perpetuante, levando à uma pele fina e frágil, característica dos indivíduos idosos (10).

Muitos procedimentos dermatológicos minimamente invasivos foram desenvolvidos para tratar e prevenir os impactos do envelhecimento facial. As técnicas de rejuvenescimento facial, como a utilização de preenchedores injetáveis e bioestimuladores de colágeno têm mostrado um impacto bastante positivo na qualidade de vida dos indivíduos. O poli-L-ácido láctico (PLLA) e a policaprolactona (PCL) são exemplos de biomateriais amplamente utilizados nos tratamentos estéticos (11).

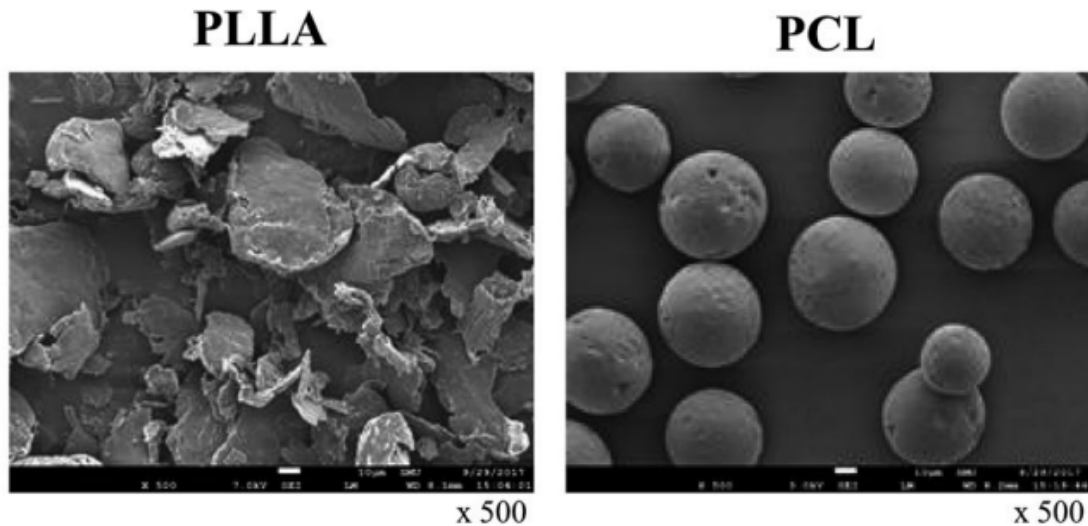
Desde o ano de 2004 micropartículas de poli-L-ácido láctico (Sculptra, Galderma) são utilizadas no mercado norte americano para tratamento de lipodistrofia facial, característica que acomete muitos pacientes em tratamento de HIV (12). Esse biopolímero corrige a perda de volume de maneira diferente dos preenchedores à base de ácido hialurônico, induzindo a síntese de colágeno e aumentando a espessura dérmica (13). A injeção do PLLA na hipoderme gera um volume inicial devido a presença da água destilada para injeção, meio utilizado para a reconstituição das microesferas. A água para injeção é reabsorvida entre 48 a 72 horas enquanto a degradação de PLLA acontece lentamente através de uma reação de corpo estranho com aumento do número de macrófagos, mastócitos e linfócitos no local da aplicação. Esse processo inflamatório subclínico tem como consequência a produção de colágeno e matriz extracelular pelos fibroblastos teciduais (12, 14).

O PCL é um polímero da família dos alfa-hidroxiácidos, biodegradável e biorreabsorvível (15). Sua utilização médica já é documentada desde a década de 80 (16). O material injetável à base de PCL mais conhecido no mercado da estética atualmente é o Ellansé (Sinclair Pharma). Este foi reconhecido em 2009 nos Estados Unidos como dispositivo médico de classe III indicado para injeção subdérmica visando a correção de sinais de envelhecimento facial. A composição do Ellansé é de 30% de microesferas de PCL de superfície lisa e 70% de veículo aquoso constituído de carboximetilcelulose (CMC), um derivado da celulose não tóxico comumente utilizado como veículo carreador na indústria alimentícia e cosmética (15,16).

As partículas de PLLA presentes no Sculptra (Galderma) apresentam formato de placas/tactóides medindo entre 40-63 μ m e as partículas de PCL presentes no Ellansé (Sinclair) apresentam formato esférico medindo entre 25-

50µm. Estas foram avaliadas microscopicamente por Kwon *et al.* (17) e estão representadas respectivamente na Figura 3.

Figura 3 – MEV das micropartículas comerciais: PLLA (Sculptra) e PCL (Ellansé)



Fonte: Kwon *et al.* (17)

O mecanismo de neocolagênese mais bem aceito pelos pesquisadores é uma reação inflamatória de corpo estranho gerada nos tecidos onde esse PCL é injetado (15), assim como também foi descrito com a utilização do PLLA. Entretanto, outros autores acreditam que as microesferas de PCL atuam como arcabouço facilitando o desenvolvimento de novas fibras colágenas sem induzir uma resposta inflamatória nos tecidos circundantes (16).

Esses polímeros, chamados de bioestimuladores de colágeno no campo da estética, uma vez injetados no tecido subcutâneo promovem uma reação inflamatória subclínica com recrutamento de macrófagos, os quais expressam citocinas inflamatórias que estimulam a secreção de matriz extracelular pelos fibroblastos. O PLLA e o PCL, portanto, são amplamente empregados em tratamentos estéticos, como promotores do rejuvenescimento cutâneo. Clinicamente pode-se observar melhora na textura e qualidade da pele, redução de rugas e flacidez, e aumento da hidratação e luminosidade da pele (18).

Ray *et al.* (19) avaliaram a síntese de colágeno *in vitro* utilizando culturas de fibroblastos e macrófagos separadamente e em seguida ambos os

tipos celulares em co-cultura. As três culturas geradas após 24h de incubação foram expostas a diferentes concentrações de nanopartículas de PLLA (30, 100 e 300µg/mL) e Sculptra™ à 1mg/ml durante 24h. Os pesquisadores concluíram que a cultura celular de fibroblastos humanos sozinhos não mostrou sinais de estímulo de colágeno dentro das 24h. Entretanto, a co-cultura de fibroblastos e macrófagos demonstrou estímulo de colágeno no mesmo período sendo que a citocina TGF-β1, secretada por macrófagos, foi um dos fatores responsáveis pela estimulação do colágeno. Em um ambiente de co-cultura entre estes dois tipos de célula, macrófagos M2 estimulam a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno tipo I e III (20).

Oh *et al.* (21), avaliaram o efeito de PLLA injetável na síntese de colágeno em pele envelhecida de camundongos e observaram que este polímero promoveu a expressão de interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13). A interleucina-13 estimula macrófagos a secretar TGF-β1 e ambas as citocinas têm ação direta na síntese de matriz extracelular pelos fibroblastos.

Uma associação de PLLA e PCL pode ter resultados interessantes no estímulo de colágeno e rejuvenescimento cutâneo, mas esta não é citada detalhadamente na literatura, mesmo se tratando de dois polímeros muito utilizados na medicina e na estética. Diante da escassez de literatura e relevância clínica, este trabalho analisou comparativamente a indução da biossíntese de colágeno por micropartículas com diâmetro médio de 2µm de PLLA e PCL isoladas ou associadas, em culturas de células.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a associação das micropartículas de PLLA e PCL na síntese de colágeno *in vitro*.

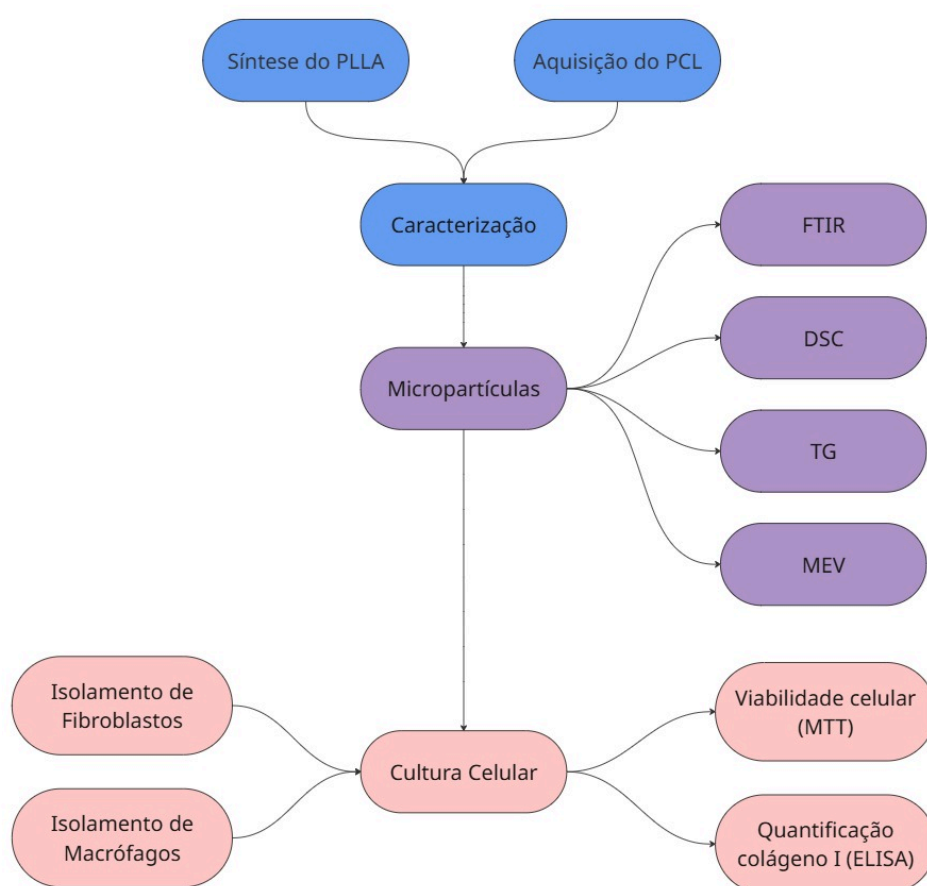
2.2 Específicos

- Obter e caracterizar as micropartículas de PLLA e PCL;
- Cultivar fibroblastos e macrófagos isoladamente e associados em co-cultura;
- Avaliar a viabilidade celular dos fibroblastos e macrófagos na presença das micropartículas de PLLA e PCL isoladas ou associadas;
- Avaliar e comparar a expressão do colágeno I pela co-cultura de fibroblastos e macrófagos *in vitro* nas seguintes condições:
 - a) na ausência das micropartículas;
 - b) na presença das micropartículas de PLLA ou de PCL;
 - c) na presença das micropartículas de PLLA e PCL associadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia do presente trabalho foi realizada conforme ilustrado no desenho experimental da figura 4.

Figura 4 – Desenho experimental



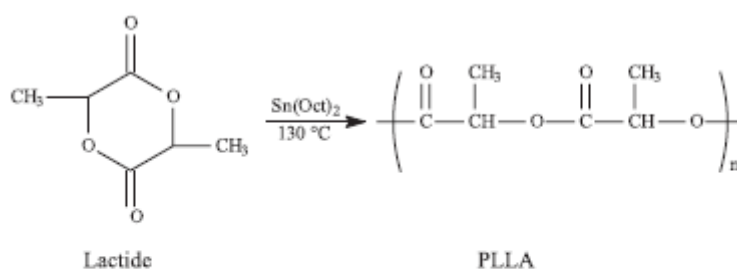
Fonte: do autor

3.1 Poli-L-ácido láctico (PLLA)

A síntese deste polímero foi realizada segundo Motta *et al.* (22). A reação do diéster cíclico do L-ácido láctico (Sigma-Aldrich) foi conduzida pela polimerização em massa, adicionando-se o monômero em uma ampola de vidro contendo o catalisador $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (Sigma-Aldrich). A razão monômero/catalisador foi de 5000:1. A mistura foi congelada em N_2 líquido,

fazendo-se a seguir vácuo na ampola, a qual foi selada e imersa em um banho de óleo à 130°C por 24h. Após esse período, o polímero foi dissolvido em clorofórmio, CHCl₃ (Merck), precipitado em metanol, CH₃OH (Merck) e seco numa estufa a vácuo a 60 °C por 8h. A figura 5 representa a reação de polimerização poli-L-ácido láctico a partir da abertura do dímero cíclico (lactídeo), utilizando-se Sn(Oct)₂ como catalisador a 130°C.

Figura 5 - Esquema representativo da síntese e estrutura molecular do PLLA



Fonte: Motta *et al.* (22)

3.2 Policaprolactona (PCL)

O polímero foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (1003653402 – MKCV0467) com massa molar (Mn) de 80.000 Da (Dalton).

3.3 Obtenção das micropartículas

3.3.1 PLLA

O método utilizado foi o de simples emulsão com evaporação de solvente. Neste método, adaptado dos trabalhos de Terukina *et al.* (23) e Nazato *et al.* (24), 2g de PLLA foram dissolvidos em 48mL de diclorometano (Merck®) (3,1% m/m), em agitador magnético. Essa mistura foi gotejada lentamente em 1 litro de solução aquosa de PVA 0,25% sob ação do mixer Ultra Turrex (T25, IKA), obtendo-se uma emulsão homogeneizada pela agitação do mixer a 10.000rpm durante 10 minutos. A emulsão foi então agitada por 5 horas em agitador magnético para evaporação do solvente diclorometano e depois centrifugada por 5 minutos a 5.000rpm. Após a

centrifugação a água destilada foi descartada e as microesferas foram congeladas a -5°C e liofilizadas por 24h a -100°C para a completa extração de água. Posteriormente, as micropartículas foram peneiradas em Tamises de 250 Mesh ($63\ \mu\text{m}$) e 270 Mesh ($53\ \mu\text{m}$) e agitadas manualmente até que todo o polímero passasse pelas malhas, descartando-se assim as partículas grandes.

3.3.2 PCL

O processo de obtenção das microesferas de PCL foi semelhante ao processo do PLLA. 2g de PCL (Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em 66ml de diclorometano (Merck) (2,3% m/m) em agitador magnético. A mistura foi gotejada lentamente em 1 litro de solução aquosa com 2,5g (0,25% m/m) de PVA sob ação do mixer Ultra Turrex (T25, IKA), obtendo-se uma emulsão homogeneizada pela agitação do mixer a 10.000rpm durante 10 minutos. A emulsão foi então agitada por 5 horas em agitador magnético para evaporação do solvente diclorometano e depois centrifugada por 5 minutos à 5.000rpm. Após a centrifugação a água destilada foi descartada e as microesferas foram congeladas a -5°C e liofilizadas por 24h a -100°C para a completa extração de água. Posteriormente, as micropartículas foram peneiradas em Tamises de 250 Mesh ($63\ \mu\text{m}$) e 270 Mesh ($53\ \mu\text{m}$) e agitadas manualmente até que todo o polímero passasse pelas malhas, descartando-se assim as partículas grandes.

3.4 Caracterização das partículas

3.4.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica para caracterização de grupos químicos e pode ser utilizada para identificar mudanças ocasionadas por agentes químicos e físicos em uma determinada amostra. As partículas de PLLA e PCL foram analisadas em um equipamento de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, com modo ATR (Attenuated Total Reflectance), Spectrum 65 (Perkin Elmer). Os espectros de absorção são obtidos na faixa de 4000cm^{-1} a 600cm^{-1} , com resolução de 4cm^{-1} e com 32 scans de varredura.

3.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de calorimetria exploratória diferencial foi realizada utilizando o equipamento TA Instruments modelo Discovery DSC 25. As amostras com massa de aproximadamente 7mg foram submetidas ao aquecimento no intervalo de 25°C até 250°C, com razão de aquecimento de 10°C/min sob atmosfera de nitrogênio.

3.4.3 Termogravimetria (TG)

A estabilidade térmica das amostras foi avaliada com o equipamento TA Instruments modelo Discovery TGA 55. As amostras com massa aproximada de 7mg foram submetidas ao aquecimento no intervalo de 25°C a 700°C, com uma razão de aquecimento de 10°C/min sob atmosfera de nitrogênio.

3.4.4 Análise das micropartículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras poliméricas foram metalizadas em ouro separadamente em *stubs*, através do metalizador DII-29010SCTR Smart Coaters sob durante 8 minutos e submetidas à análise em microscópio eletrônico de varredura (JSM - IT 200) sob tensão de 5kV. Através das imagens obtidas pelo MEV foi avaliado o diâmetro médio das partículas de cada material.

3.5 Estudo biológico

3.5.1 Animais

Foram utilizados 5 ratos Wistar machos, com 10 dias de idade para retirada dos tendões de Aquiles e 5 ratos Wistar machos, com 3 - 6 meses de idade para retirada de macrófagos do peritônio. Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde (FCMS-PUC/SP) e mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad*

libitum, em ambiente com temperatura constante e iluminação controlada (ciclo claro/escuro). O projeto foi submetido e aprovado protocolo nº 2023/138 pela CEUA - FCMS – PUC/SP (Anexo A).

3.5.2 Obtenção de material biológico para cultura de fibroblastos

Baseado no método descrito por Ramirez *et al.* (25), os fibroblastos foram isolados a partir do tendão de Aquiles de ratos com 10 dias de idade. Tais células do tecido neonatal possuem ciclo celular potente e sintetizam a matriz extracelular em grandes quantidades comparadas às células com maior senescência. Os filhotes foram eutanasiados com dose letal de isoflurano inalatório e imediatamente após a constatação da morte os membros inferiores foram dissecados para extração dos tendões de Aquiles de ambas as pernas, em condições estéreis. Os tendões foram lavados em solução salina balanceada de Hank (HBSS) à 37°C e clivados em fragmentos de 2 a 3mm. Estes fragmentos foram adicionados ao meio de cultura e os fibroblastos extraídos pela técnica de explante para obter uma cultura de células primárias.

Os fibroblastos foram cultivados como monocamadas em frascos plásticos de cultura de tecidos de 25cm² (Corning Costar, Cambridge, MA) em 3mL de meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suplementados com soro fetal bovino (FBS) a 10% e solução de penicilina e estreptomicina fungizona a 1%. Os frascos foram colocados em uma incubadora a 37°C com 5% de CO² e 95% de ar. Os fibroblastos que cresceram a partir dos explantes, se aproximaram da confluência e foram então separados com uma solução de tripsina a 0,025%-EDTA a 0,02% e recolocados em frascos de cultura de tecidos de 25cm² (25).

3.5.3 Obtenção de material biológico para cultura de macrófagos

O método de isolamento de macrófagos utilizado foi a lavagem peritoneal descrita por de Jesus *et al.* (26), Rios. *et al.* (27) e Meurer *et al.* (28).

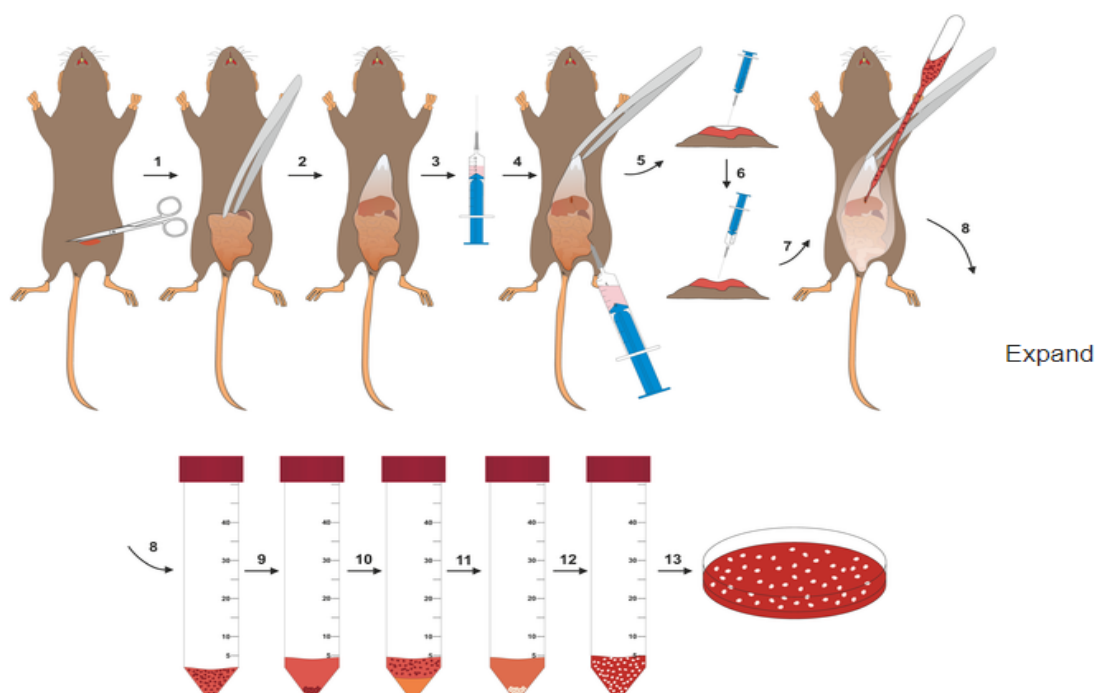
Antes de iniciar o protocolo de isolamento, os animais foram eutanasiados com dose letal de isoflurano anestésico inalatório e submetidos à laparotomia mediana para retirada de macrófagos do peritônio. A Figura 6

ilustra as etapas de isolamento de macrófagos residentes do espaço intraperitoneal.

Com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, foi realizada a laparotomia e na sequência injetado 10mL de PBS em administração única (tampão salina fosfato: 137mM NaCl; 2,7mM KCl; 8,0mM Na₂HPO₄; 0,6mM CaCl₂; 1mM MgCl₂; 1,4mM KHPO₄; e pH 7,2-7,4) na cavidade peritoneal, na linha alba, próxima ao esterno. O animal foi cuidadosamente agitado/movimentado para que todo o líquido alcançasse a cavidade abdominal.

Posteriormente, foi obtido um fluido contendo células da cavidade peritoneal cuidadosamente coletado com o auxílio de uma seringa estéril e colocado em um tubo Falcon estéril. As células foram então sedimentadas por centrifugação por aproximadamente 8 minutos à 2.000rpm. O sedimento celular final foi plaqueado em alíquotas em meio de cultura apropriado (28).

Figura 6 – Etapas de isolamento de macrófagos intraperitoneais



Fonte: Meurer *et al.* (28)

3.5.4 Ensaio experimental *in vitro*

Os fibroblastos de segunda passagem, após o isolamento tecidual, foram tripsinizados após atingirem subconfluência e adicionados em novas placas para expansão celular pré-experimental. O meio de cultura foi substituído três vezes por semana. Foram utilizados nos experimentos fibroblastos da segunda à quinta subculturas.

Os fibroblastos explantados foram utilizados no experimento ao atingirem monocamada na placa de Petri. Os macrófagos obtidos de peritônio murino conforme descrito por Meurer *et al.* (28) foram contados e adicionados aos poços contendo os fibroblastos, na seguinte proporção 1 fibroblasto para 1,5 macrófagos, essa proporção foi definida segundo Ray *et al.* (19). As células foram cultivadas por 24h antes de iniciar o experimento, sendo a concentração inicial das células de 1×10^4 células/poço em placa de cultura de 96 poços.

Segundo pesquisadores Ray *et al.* (19) e Zhu *et al.* (18), a produção de colágeno induzida por partículas de PLLA é concentração-dependente. Portanto, este trabalho utilizou a concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ de ambos os polímeros, conforme foi demonstrada ser eficiente na literatura supracitada.

Os fibroblastos com ou sem macrófagos foram tratados com diferentes concentrações de micropartículas de PLLA e/u PCL descritos nos grupos experimentais, durante 3, 7 e 14 dias à 37°C e concentração de 5% de CO_2 . Após os devidos tempos de cultivo em interação com os materiais, as culturas foram avaliadas quanto à viabilidade celular pelo ensaio de atividade metabólica (MTT), obtido em leitor de microplacas e a quantificação do colágeno foi realizada pela detecção de colágeno pela técnica de ELISA (conforme detalhado nos tópicos 3.6.1 e 3.6.2)

3.6 Avaliação da viabilidade celular e da produção de colágeno

3.6.1 Ensaio de atividade metabólica (MTT)

O ensaio de atividade metabólica foi realizado após o período de cultivo requerido de 1, 3 e 7 dias. Os fibroblastos foram lavados duas vezes com PBS estéril e incubadas a 37°C , em uma atmosfera de 5% de CO_2 e 95% de ar, com

150µL de MTT a uma concentração de 1 mg/mL em meio de cultura fresco. Após uma incubação de 3 horas, o meio de cultura foi removido e os cristais de formazan formados dissolvidos em uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO). A quantidade de formazan presente foi então medida em uma absorbância de 570nm utilizando um leitor de placas.

A quantidade de formazan formada é diretamente proporcional à quantidade de células metabólicas viáveis em uma cultura, o que torna esse método eficaz de avaliar a citotoxicidade celular (29). O ensaio de atividade metabólica foi realizado em sextuplicata a partir dos seguintes grupos experimentais:

- Controle negativo (somente cultura de fibroblastos);
- Fibroblastos com PLLA 100µg/mL;
- Fibroblastos com PCL 100µg/mL;
- Fibroblastos com PLLA + PCL em solução contendo 50µg/mL de cada polímero.

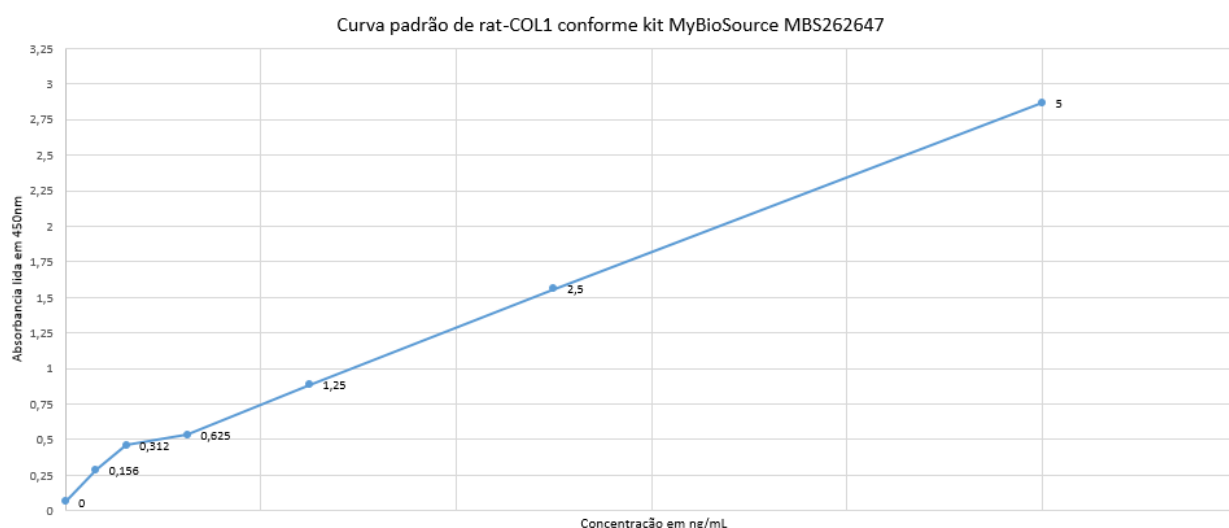
3.6.2 Teste imunoenzimático ELISA

A quantificação do colágeno tipo I foi realizada através da técnica "Double Antibody Sandwich" utilizando-se o kit de detecção de colágeno I por ELISA MyBioSource MBS262647. Após o período de cultivo de 3, 7 e 14 dias, as células dos grupos experimentais foram destacadas e lisadas mecanicamente para exposição e liberação do colágeno. Após o destacamento, todo o conteúdo biológico foi centrifugado a 5.000rpm por 5 min a 23°C. Alíquotas de cada amostra foram analisadas por meio de ELISA para determinação dos níveis de colágeno tipo I, conforme recomendações do fabricante (MyBioSource). O colágeno tipo I total foi quantificado em nanogramas por mL (ng/mL). Os resultados foram então calculados utilizando a curva padrão (Figura 7) criada para os ensaios. Os ensaios ELISA foram realizados em duplicata a partir dos seguintes grupos experimentais:

- Controle negativo A (somente cultura de fibroblastos);

- Controle negativo B (co-cultura fibroblastos e macrófagos);
- Fibroblastos com PLLA 100µg/mL;
- Co-cultura de fibroblastos e macrófagos com PLLA 100µg/mL;
- Fibroblastos com PCL 100µg/mL;
- Co-cultura de fibroblastos e macrófagos com PCL 100µg/mL;
- Fibroblastos com PLLA + PCL 1:1 em solução contendo 50µg/mL de cada polímero;
- Co-cultura de fibroblastos e macrófagos com PLLA + PCL 1:1 em solução contendo 50µg/mL de cada polímero;

Figura 7 – Curva padrão para o Ensaio ELISA



Padronização do protocolo de concentrações (0-10ng/ML) da detecção de colágeno I pelo kit ELISA MyBioSource. Fonte: do autor.

3.7 Análise estatística

Os cálculos estatísticos foram executados usando software GraphPad (Prism 10.0.2, EUA). As comparações estatísticas foram feitas utilizando a ferramenta ANOVA com pós-teste de Tukey. Foram avaliados o grau de significância pelo valor de p obtido, sendo: $p > 0,05$ não significativo; $p < 0,05$ pouco significativo; $p < 0,01$ bastante significativo; e $p < 0,001$ muito significativo.

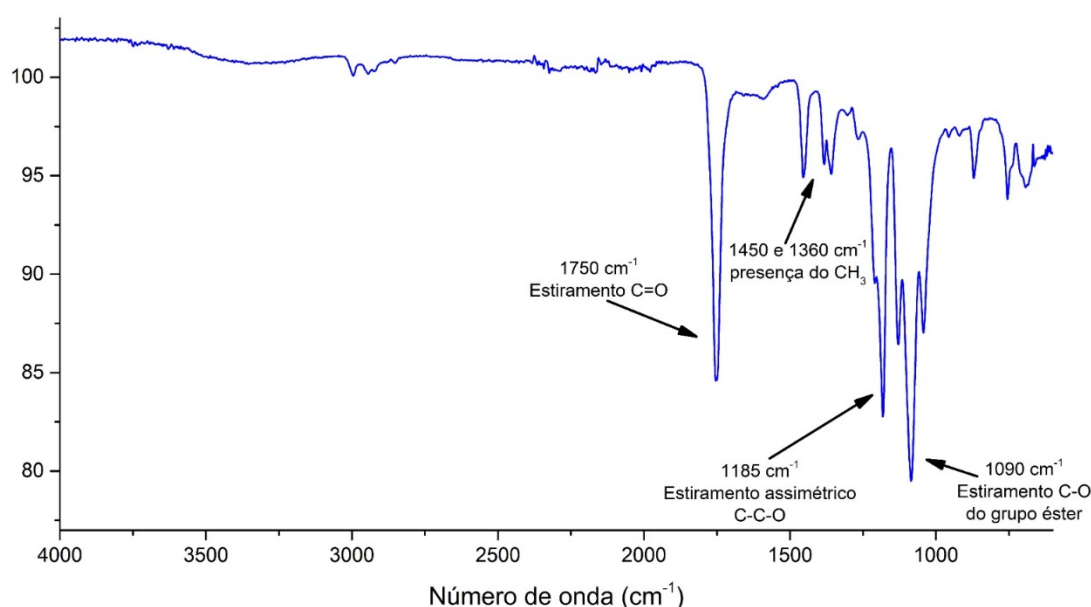
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das micropartículas

4.1.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 8, que apresenta o espectro do PLLA, confirmou a presença dos principais grupos funcionais esperados para o polímero. Foi possível observar um pico em 1750 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação C=O; picos em 1450 cm^{-1} e 1360 cm^{-1} relacionados a presença do CH_3 ; um pico em 1185 cm^{-1} que está relacionado ao estiramento assimétrico da ligação C-C-O; e pico em 1090 cm^{-1} que corresponde ao estiramento C-O do grupo éster. O espectro do PLLA aqui apresentados corroboraram com o trabalho de Motta *et al.* (22).

Figura 8 - Espectro de FTIR do PLLA

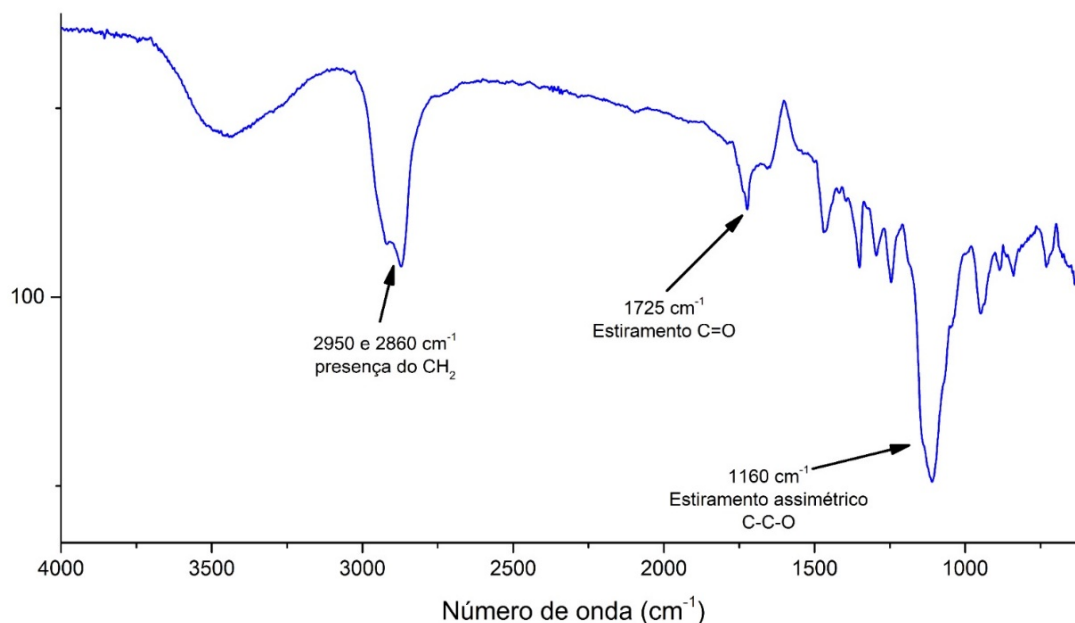


Fonte: do autor

O espectro de FTIR do PCL adquirido comercialmente está representado na Figura 9. Foi possível observar o estiramento assimétrico e simétrico da ligação CH_2 respectivamente em 2950 e 2860 cm^{-1} , bem como o estiramento da ligação C=O do éster presentes no PCL em 1725 cm^{-1} , além do

pico em 1160 cm^{-1} referente ao estiramento assimétrico relacionado ao C-C-O. Esses achados corroboraram com o trabalho de Gurlek *et al.* (30).

Figura 9 - Espectro de FTIR do PCL

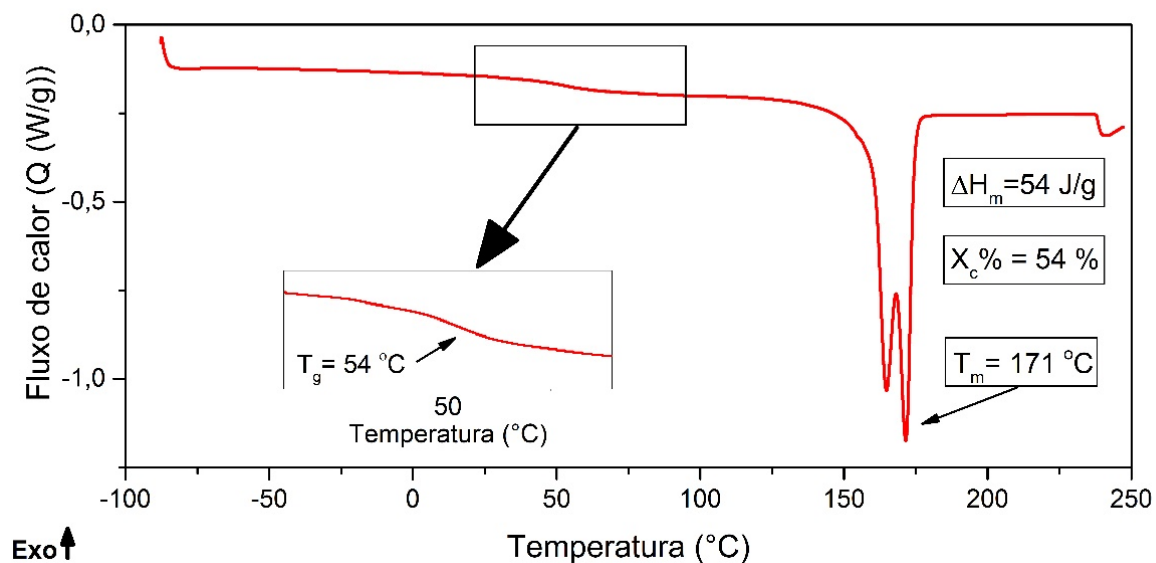


Fonte: do autor

4.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Figura 10 ilustra a curva de DSC, referente ao segundo aquecimento do PLLA. Nela foi possível observar uma temperatura de transição vítrea (T_g) em 54°C . Além disso, observou-se, também, dois picos endotérmicos próximos a 170°C , o que está relacionado à temperatura de fusão (T_m) do PLLA. A entalpia de fusão (ΔH_m) envolvida no processo de fusão foi de 54 J/g e com isso, foi possível calcular a cristalinidade (χ_c) do PLLA utilizado neste trabalho, que foi aproximadamente 54%.

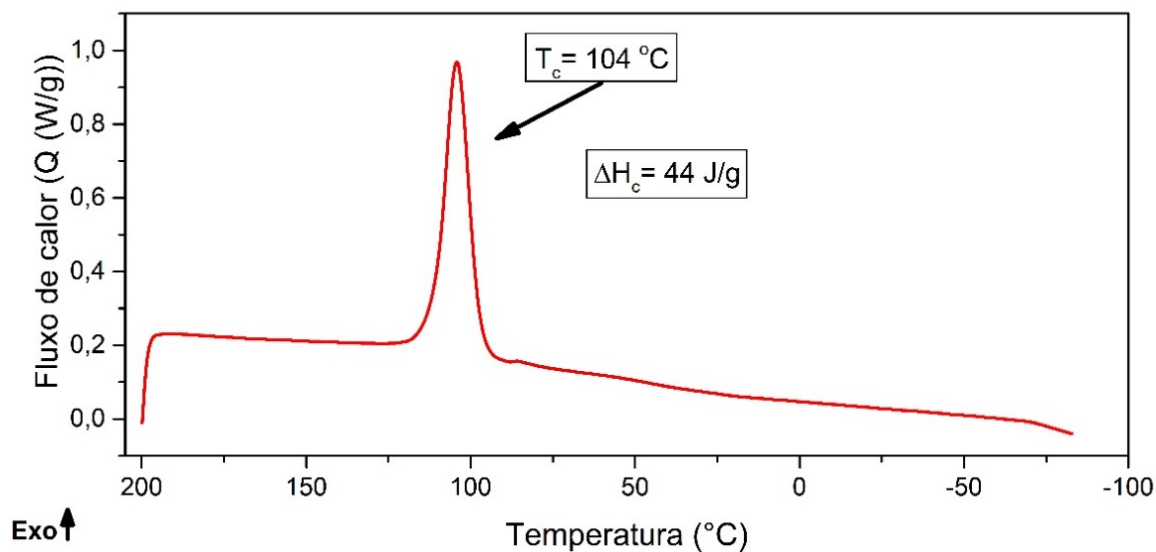
Figura 10 - Curva de DSC referente ao segundo aquecimento do PLLA



Fonte: do autor

A Figura 11 ilustra a curva de DSC, referente ao resfriamento, do PLLA. Neste processo foi possível observar um pico exotérmico em $104 \text{ }^\circ\text{C}$ que está relacionado a cristalização das cadeias do PLLA. Observa-se, também, que a entalpia (ΔH_c) envolvida no processo de cristalização foi de 44 J/g . Portanto, os resultados obtidos neste trabalho corroboraram com os obtidos por Motta *et al.* (22).

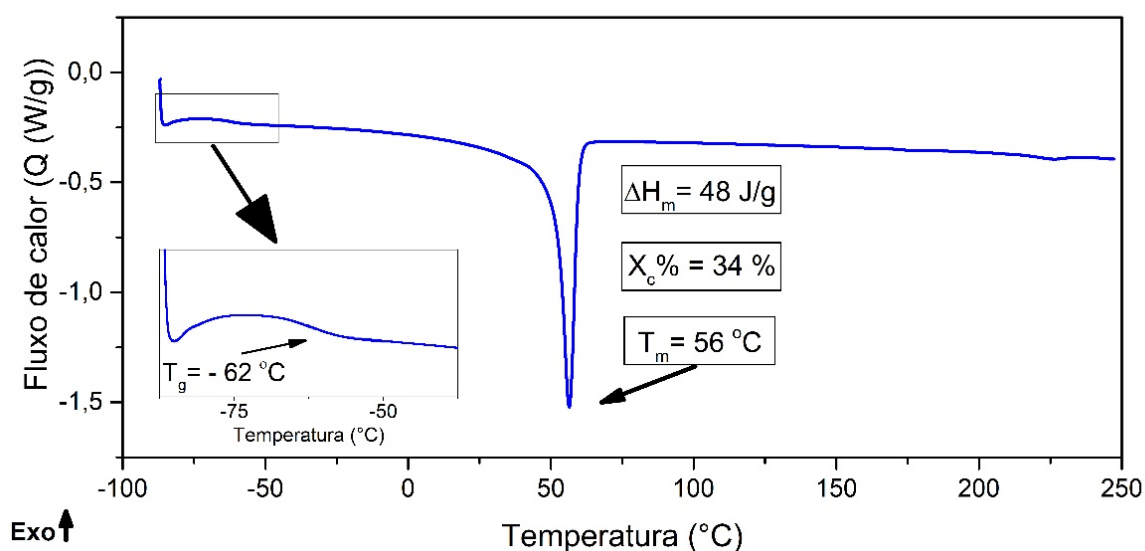
Figura 11 - Curva de DSC referente ao resfriamento do PLLA



Fonte: do autor

A Figura 12 ilustra a curva de DSC, referente ao segundo aquecimento do PCL. Foi possível observar que o PCL apresentou uma temperatura de transição vítrea (T_g) em -62°C . Isto mostra que o PCL apresenta uma característica mais flexível e elastomérica do que o PLLA. Observou-se, também, um pico endotérmico em 56°C que está relacionado à temperatura de fusão (T_m) do PCL. A energia envolvida neste processo, chamada entalpia de fusão (ΔH_m), foi de 48 J/g . Dessa forma, foi possível calcular a cristalinidade (χ_c) do PCL utilizado neste trabalho, que foi aproximadamente 34% . Labet *et al.* (31) através de uma revisão de literatura avaliaram as propriedades térmicas da policaprolactona com massa molar de 530 a $630.000 \text{ g mol}^{-1}$ encontraram valores de temperatura de transição vítrea (T_g) = -65°C à -60°C e temperatura de fusão (T_m) = 56°C à 65°C , coerentes portanto com os valores obtidos no presente estudo.

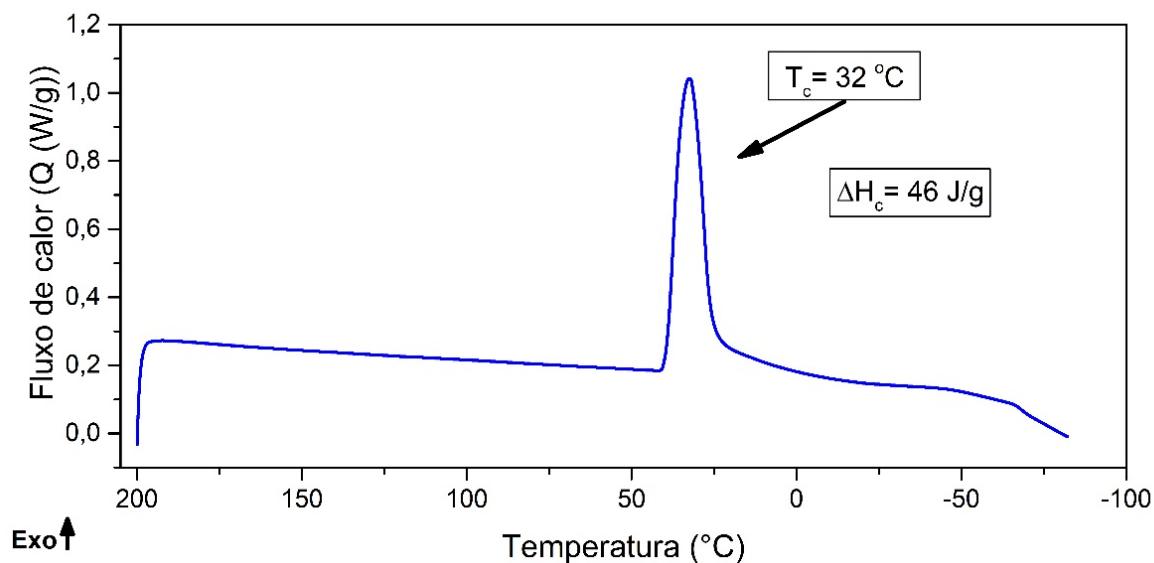
Figura 12 - Curva de DSC referente ao segundo aquecimento do PCL



Fonte: do autor

A Figura 13 apresenta a curva de DSC, referente ao resfriamento do PCL. Foi possível observar um pico exotérmico em 32°C que está relacionado à cristalização do PCL. Observou-se, também, que a entalpia (ΔH_c) envolvida no processo de cristalização foi de 46 J/g . Portanto, os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os obtidos por Chen *et al.* (32).

Figura 13 - Curva de DSC referente ao resfriamento do PCL



Fonte: do autor

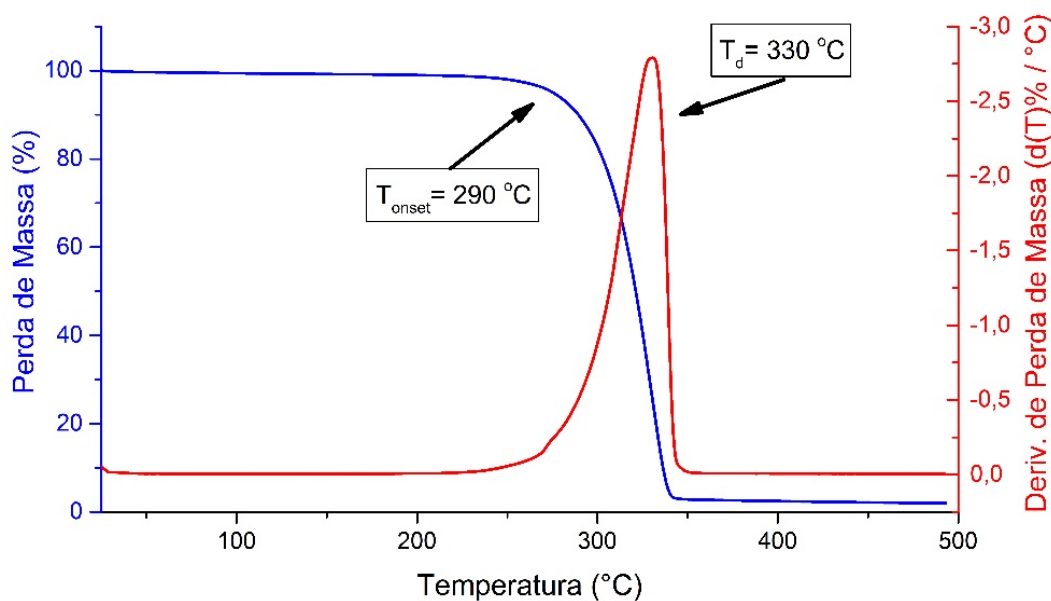
Segundo Woodbury *et al.* (33), a cristalinidade do PLLA permite que este polímero tenha alta resistência à tração e à compressão. Sua degradação também é interessante para o objetivo de bioestímulo de colágeno, sendo essa na ordem de 6 a 9 meses, a depender de seu peso molecular. Os autores também demonstraram que o PCL foi capaz de suportar uma deformação térmica sem perda de propriedades devido à sua baixa temperatura de fusão e ductibilidade, além de possuir um tempo de degradação ainda maior que o PLLA (33).

4.1.3 Termogravimetria (TG)

As curvas de TG permitiram conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar nos materiais, sendo possível estabelecer a faixa de temperatura em que eles adquiriram composição química fixa, definida e constante, e a temperatura em que começaram a se decompor. A Figura 14 ilustra o termograma do PLLA. Foi possível observar que o PLLA apresenta uma estabilidade térmica até aproximadamente 290°C, iniciando, após essa temperatura, uma perda de massa acentuada, cuja temperatura de pico equivale a 330 °C. Nesta temperatura, foi onde o processo de perda de massa do polímero foi máximo. E por fim, a presença de um único pico de DTG

indicou que o processo de decomposição aconteceu em uma única etapa. Assim, os resultados obtidos neste trabalho corroboraram com os obtidos por Shi *et al.* (34).

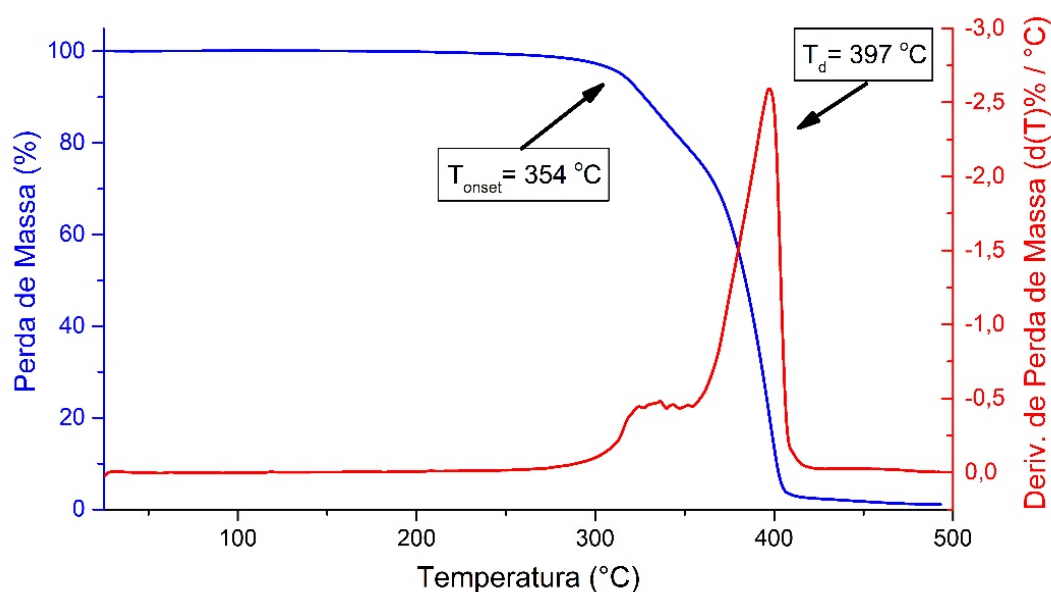
Figura 14 - Termograma do PLLA



Fonte: do autor

A Figura 15 ilustra o termograma do PCL. Foi possível observar que o PCL apresentou uma estabilidade térmica até próximo a 354°C, iniciando, após essa temperatura, uma perda de massa acentuada. Entretanto, diferentemente do que foi observado para o PLLA, a decomposição do PCL ocorreu em duas etapas. A primeira aconteceu por volta de 325°C, sendo menos acentuada, e a segunda por volta de 397°C, sendo a mais acentuada. Estes resultados observados para o PCL corroboraram com os obtidos por Pekdemir *et al.* (35).

Figura 15 - Termograma do PCL



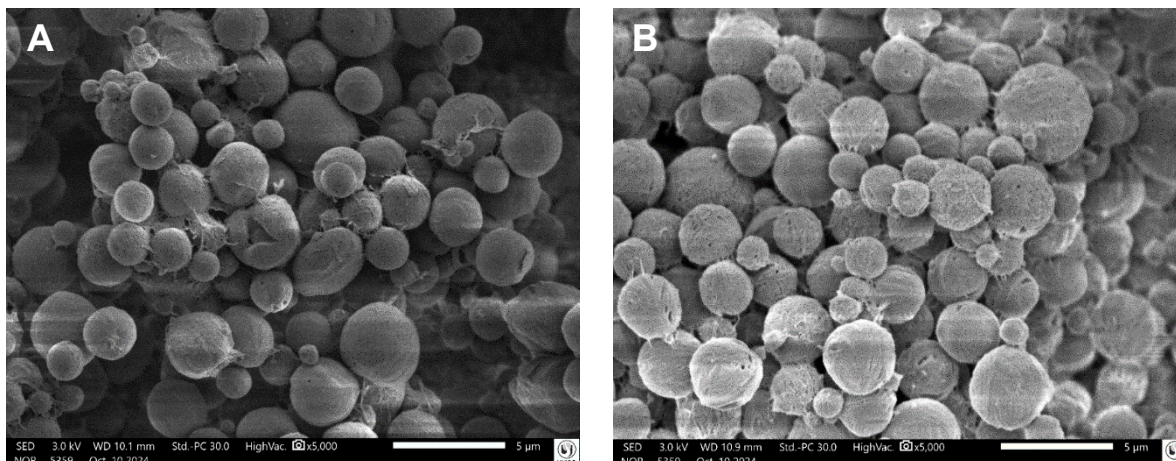
Fonte: do autor

A estabilidade térmica de ambos os polímeros foi confirmada pelas análises termogravimétricas (Figuras 14 e 15), sendo o PCL mais estável termicamente, embora com decomposição em duas etapas.

4.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 16 ilustra as partículas de PLLA e PCL, respectivamente. As partículas de PLLA apresentaram formato esférico e diâmetro médio de 2,34µm (Figura 16 - A). Este resultado difere do encontrado por Kwon *et al.* (17) cujas partículas maiores de PLLA (40-63µm) apresentaram formato espiculado. Por sua vez, as partículas de PCL obtidas neste trabalho (Figura 16 - B) apresentaram formato esférico e com diâmetro médio de 2,52µm. O formato esférico foi semelhante às partículas de PCL presentes no Ellansé (Sinclair) que medem 25-50µm (17).

Figura 16 – MEV das micropartículas de PLLA e PCL

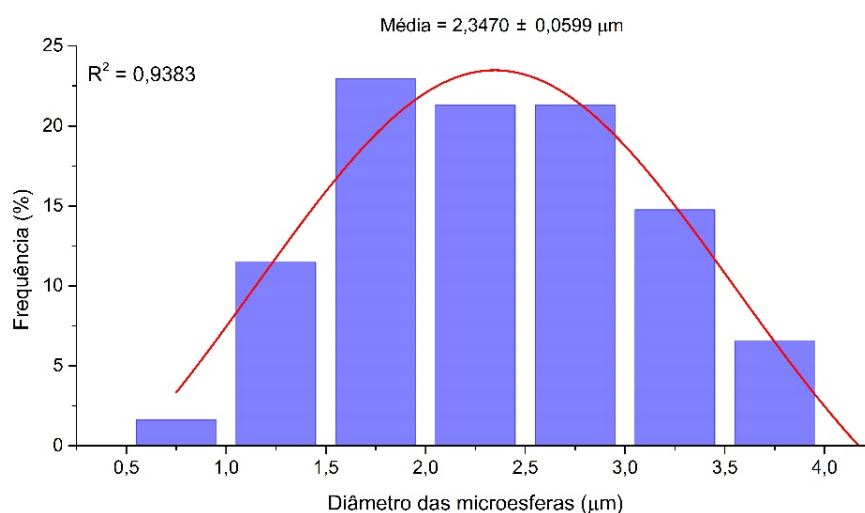


A: Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do poli-L-ácido láctico (PLLA), evidenciando a morfologia da superfície (5000x). Barra: 5 µm. Fonte: do autor.

B: Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da policaprolactona (PCL), mostrando detalhes da estrutura superficial (5000x). Barra: 5 µm. Fonte: do autor.

A Figura 17 apresenta a curva de distribuição dos tamanhos de partículas de PLLA obtidas neste trabalho. Foi possível observar que o diâmetro médio é de 2,34µm.

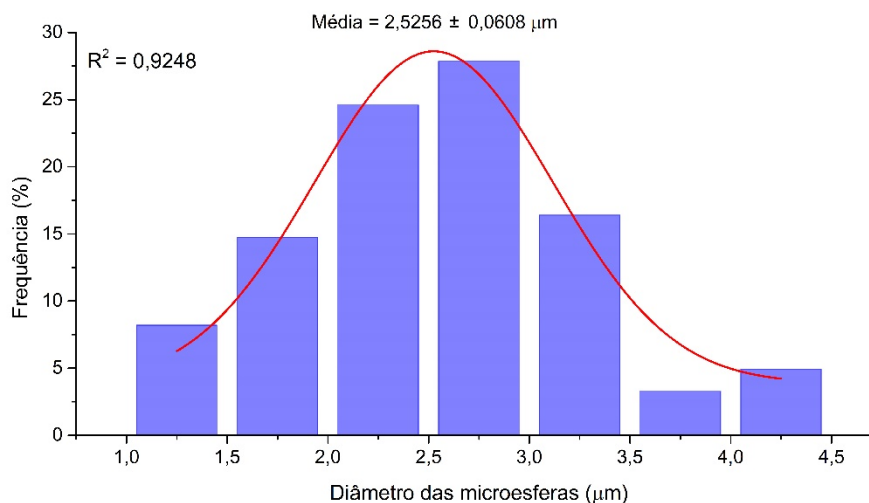
Figura 17 - Curva de distribuição do tamanho das partículas de PLLA



Fonte: do autor

A Figura 18 apresenta a curva de distribuição dos tamanhos de partículas de PCL obtidas neste trabalho, sendo possível observar que o diâmetro médio é de 2,52µm.

Figura 18 - Curva de distribuição do tamanho das partículas de PCL



Fonte: do autor

As curvas de distribuição indicam que ambas as formulações possuem distribuição de tamanho relativamente homogênea, o que favorece a interação célula-material e a reprodutibilidade experimental. Ao contrário das micropartículas comerciais com diâmetros entre 40-63μm (Sculptra, Galderma) e 25-50μm (Ellansé, Sinclair), as partículas desenvolvidas neste estudo apresentam tamanho significativamente menor. Essa característica é relevante do ponto de vista da fagocitose por macrófagos, que é facilitada mediante partículas de 2-3 μm e da subsequente liberação de citocinas envolvidas na síntese e remodelação da matriz extracelular (36).

Embora sejam considerados um tratamento seguro e de bons resultados para a estética facial e para o tratamento de lesões de tecidos moles, os bioestimuladores de colágeno já comercializados (Sculptra e Ellansé) podem apresentar efeitos adversos, principalmente relacionados à técnica incorreta de aplicação. Nódulos e granulomas são os principais efeitos adversos relacionados aos bioestimuladores hiperdiluídos que podem causar efeitos inestéticos importantes (37,38). Os nódulos geralmente são papulares, assintomáticos e aparecem semanas após a injeção, resolvendo-se espontaneamente com o tempo. Eles ocorrem devido a técnicas inadequadas de reconstituição ou aplicação do produto, sendo mais comuns nas áreas perioral e periocular. Histologicamente, são compostos por micropartículas do

polímero cercadas por uma reação inflamatória normal de corpo estranho, sem necessidade de tratamento específico, embora o uso de ácido hialurônico para camuflar a lesão até sua resolução seja uma opção (37).

Já os granulomas, embora raros, representam uma resposta inflamatória crônica e sistêmica mais intensa. Diferente dos nódulos, que apresentam uma abundância excessiva de produto com uma reação normal de corpo estranho composta por poucas células gigantes, a histopatologia de um granuloma verdadeiro mostra uma quantidade menor de produto e uma reação excessiva do hospedeiro com grande quantidade de células gigantes multinucleadas por toda sua extensão, podendo surgir meses ou até anos após a injeção. Embora também se resolvam espontaneamente, os granulomas podem ser um problema estético importante e são mais difíceis de tratar (37). O tratamento de nódulos e granulomas pode ser feito através injeções intralesionais de esteroides, utilização de ultrassom microfocado, lasers fracionados ou excisão cirúrgica (38).

No presente estudo foram utilizadas micropartículas de pequeno diâmetro, aproximadamente 2 μ m, que, de acordo com Champion *et al.* (36), são facilmente aderidas e fagocitadas pelos macrófagos por apresentarem um diâmetro médio semelhante aos principais patógenos bacterianos transmitidos pelo ar e água. Este tamanho intermediário de 2 μ m permite que o macrófago envolva mais facilmente a partícula com seus pseudópodes, em comparação a partículas muito grandes, que exigem a formação de células gigantes multinucleadas (36), por esse motivo sugere-se a hipótese que as micropartículas de 2 μ m provavelmente não apresentarão esse tipo de efeito deletério.

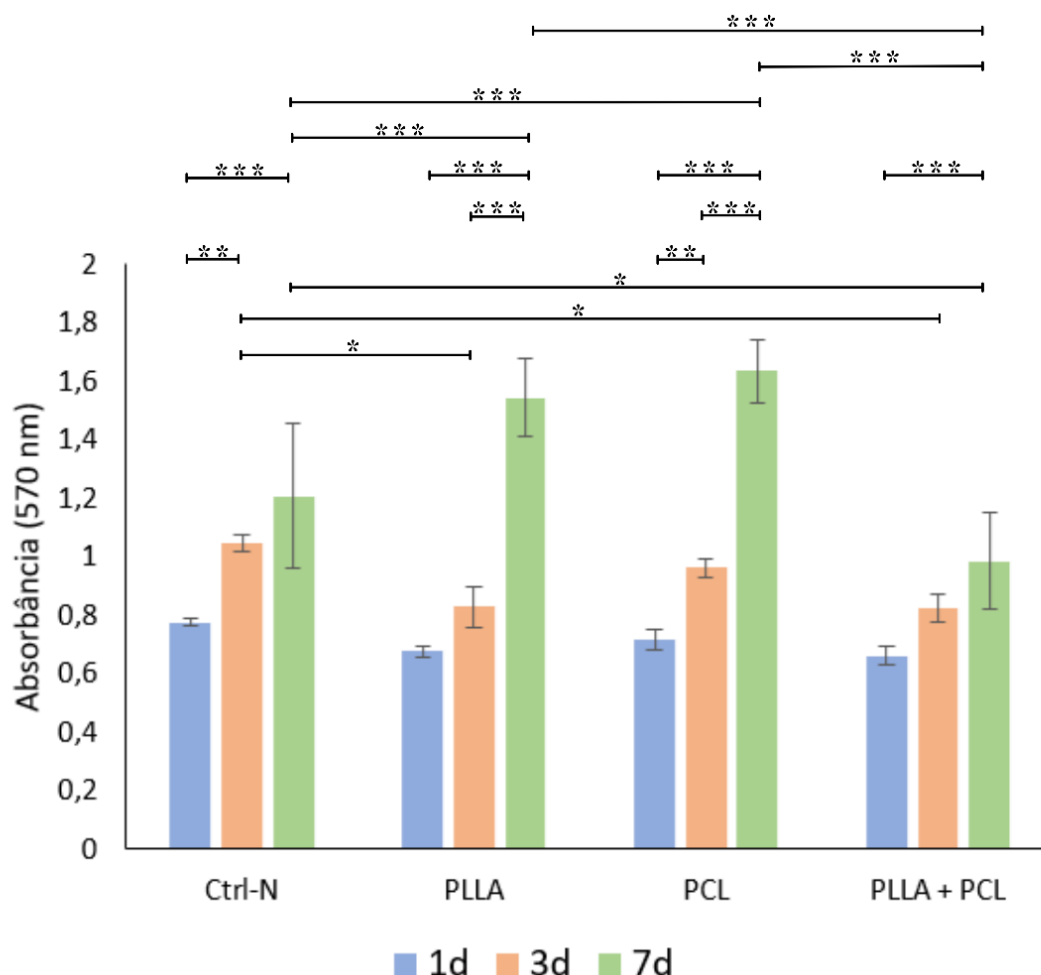
4.2 Cultura celular

4.2.1 Ensaio de atividade metabólica (MTT)

Os dados obtidos pelo ensaio de atividade metabólica (MTT) (Figura 19) demonstraram que tanto as micropartículas de PLLA quanto as de PCL, quando utilizadas de forma isolada ou associada, mantiveram a viabilidade celular em níveis adequados ao longo do período de 1, 3 e 7 dias. Foi possível

concluir que os materiais são biocompatíveis e sem citotoxicidade nas concentrações empregadas.

Figura 19 - Resultados do ensaio de atividade metabólica (MTT)



Representação gráfica dos resultados de absorbância lida através do ensaio de viabilidade celular por MTT entre 1, 3 e 7 dias em cultura das células fibroblásticas com os respectivos materiais. Ctrl-N: Controle negativo; PLLA: Fibroblastos com PLLA; PCL: Fibroblastos com PCL; e PLLA + PCL: Fibroblastos com PLLA e PCL. As barras verticais sobre cada grupo representam o desvio padrão e as barras horizontais representam a diferença estatística, onde: $P > 0,05$ sem diferença estatística (não representados); $P < 0,05$ pouco significantes (*); $P < 0,01$ (**) bastante significantes; e $P < 0,001$ muito significantes (***).
Fonte: do autor.

A taxa de absorbância aumentou em todos os grupos experimentais com o passar dos dias. Isso pode ser traduzido como um aumento do metabolismo celular do dia 1 ao dia 7 de experimento. Conforme citado pela Thermo Fisher Scientific (39), as células em cultura passam por fases de crescimento celular. No período de sete dias são comumente observadas as fases de latência; exponencial; e estacionária. Na fase de latência, que ocorre nas primeiras 24h,

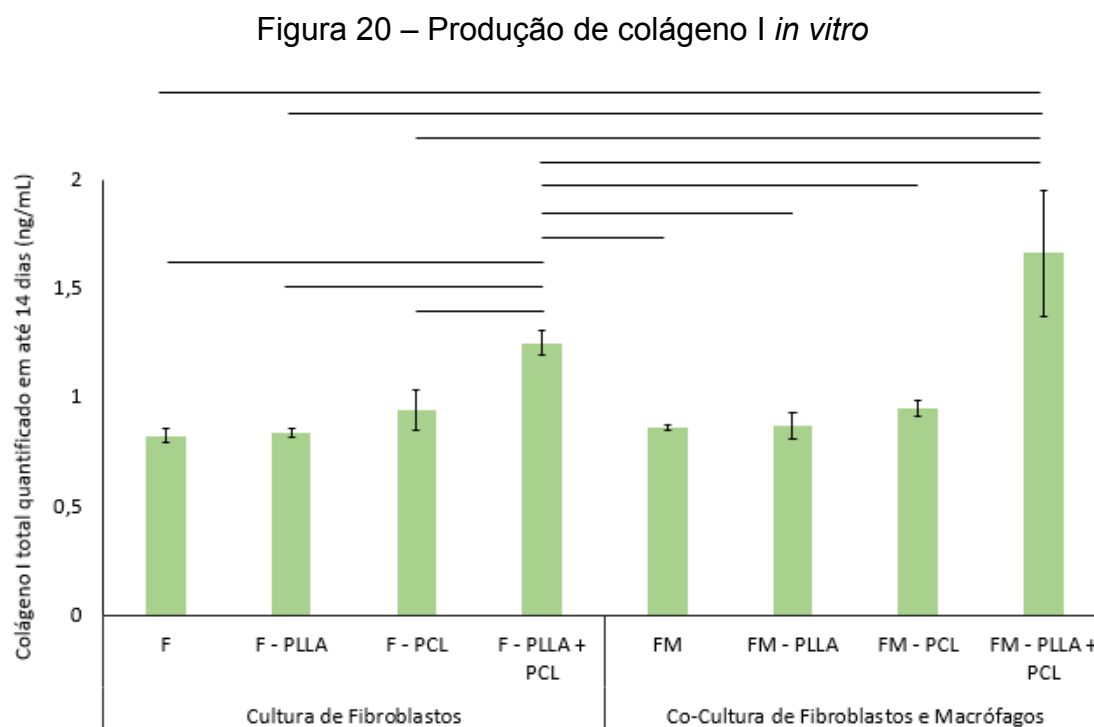
as células estão metabolicamente ativas, porém ainda se adaptando ao ambiente, por isso não há muita divisão celular. A fase exponencial tem duração média de 2 a 4 dias após o semeio e nessa fase as células começam a se dividir e multiplicar ativamente. Após 4 dias de cultura as células atingem a fase estacionária, quando a confluência atinge 80% e o crescimento desacelera devido ao esgotamento de nutrientes. Após a fase estacionária as células entrariam na fase de declínio, onde há redução progressiva da viabilidade celular devido ao esgotamento de nutrientes e acúmulo de resíduos tóxicos (39).

Conforme observado na Figura 19 não houve a identificação do período estacionário até 7 dias, embora a literatura previamente citada aborde que neste período a maioria das células em cultura já se encontra em fase estacionária de crescimento. Tanto o Ctrl-N quanto PLLA + PCL apresentaram um resultado de absorvância semelhante, sendo de baixa significância ($p < 0,05$) entre os mesmos tempos (3d e 7d) destes grupos. Este é um indicativo de que a fase exponencial foi mais lenta. Já os grupos onde PLLA e PCL foram adicionados às células isoladamente apresentaram continuidade do crescimento exponencial (fase log) até 7 dias.

Fibroblastos são células com capacidade de multiplicação e produção de matriz de forma distinta de acordo com o ciclo celular, ou seja, quando em processo de proliferação reduzem a síntese de matriz, assim como quando em processo ativo de síntese, retardam processo mitótico (40). É importante ressaltar que o tempo de 7 dias em uma situação sem intervenções em cultura de células em placas de 96 poços é um período longo para uma área de crescimento celular disponível muito reduzida ($0,33\text{cm}^2$), quando na ordem de 10^4 em densidade celular. Há duas possibilidades para a maior lentidão do crescimento exponencial no grupo PLLA + PCL: ou por motivo de espaço disponível, ou conforme detectado no ensaio de ELISA (descrito em detalhes no tópico seguinte), devido ao aumento na atividade de síntese de matriz. Essa última condição explica porque a atividade do ciclo celular se encontra diminuída e por este motivo gerando menos sinal na absorvância do ensaio de MTT (39,40).

4.2.2 Teste Imunoenzimático ELISA

Os grupos experimentais foram cultivados durante 3, 7 e 14 dias, e a somatória total da produção de colágeno I mensurada está exemplificada na Figura 20.



Representação gráfica da somatória de quantificação total de colágeno I obtida através de ELISA. As barras verticais sobre cada grupo representam o desvio padrão e as barras horizontais exemplificam somente os grupos com resultados estatisticamente significativos ($p < 0,01$).

Fonte: do autor.

Foi possível observar um aumento progressivo na síntese de colágeno em todos os grupos tratados com micropartículas, com destaque para o grupo com co-cultura de fibroblastos e macrófagos que recebeu a associação física de PLLA + PCL, que apresentou produção de colágeno significativamente superior aos demais. Esses resultados sugerem que, mesmo sem combinação química entre os polímeros, a associação simultânea pode promover efeitos na bioestimulação da matriz extracelular.

A maior produção de colágeno pode estar relacionada à interação dinâmica entre fibroblastos e macrófagos, modulada pela presença das micropartículas poliméricas, especialmente em razão do tamanho reduzido das

mesmas. Além disso, é possível que as propriedades distintas de cada material — como rigidez do PLLA e flexibilidade do PCL — tenham contribuído de forma complementar para a ativação celular e síntese de proteínas de matriz.

Diferentemente do que se pensava, somente os grupos amostrais que associaram as micropartículas de PLLA e PCL obtiveram resultados significativamente relevantes na produção de colágeno I em comparação aos grupos controle. Isso pode ter acontecido pois estes polímeros são extremamente biocompatíveis, conforme mostrado no ensaio de MTT. Portanto, as células mantiveram constante multiplicação até o sétimo dia nos grupos onde foram expostas ao PLLA e PCL separadamente, mas sem tanta produção de matriz extracelular. Esse crescimento em número de células pode ter sido mais lento nos grupos expostos ao PLLA + PCL pois os fibroblastos produziram mais matriz extracelular do que se multiplicaram, conforme descrito nos fundamentos do ciclo celular por Oshima *et al.* (40).

Os achados obtidos neste estudo reforçam a hipótese de que a associação entre micropartículas de PLLA e PCL promove um ambiente mais favorável à síntese de colágeno tipo I, em comparação ao uso isolado dos polímeros. Isso é especialmente relevante considerando que os polímeros foram aplicados como sistemas particulados livres, sem qualquer funcionalização ou co-polimerização. Esse fator é importante pois segundo Negaresh *et al.* (41) a compatibilidade química entre PLA e PCL é baixa. Por serem polímeros termodinamicamente imiscíveis, tendem à separação de fases durante o processamento, resultando em microestruturas heterogêneas e fracas interações interfaciais. Isso compromete as propriedades mecânicas como resistência à tração, módulo elástico e resistência ao impacto no caso de síntese de blenda polimérica (41). Portanto, a utilização desses dois polímeros como sistemas particulados livres mantém as propriedades mecânicas, físicas e químicas de cada um.

Ainda é necessária uma maior compreensão sobre os detalhes do processo de reconhecimento e fagocitose realizada por leucócitos. Os resultados do estudo de Champion *et al.* (36) mostraram que a dependência do tamanho das partículas na fagocitose origina-se da etapa de aderência, e não da internalização do corpo estranho pelos macrófagos. Além disso, propõe-se que as características das dobras da membrana celular sejam responsáveis

pelo reconhecimento do tamanho das partículas pelas células fagocíticas. Isso implica que os macrófagos não apenas reconhecem moléculas específicas em seus alvos, mas também têm a capacidade de reconhecer o tamanho das partículas (36).

Apesar dos resultados promissores, é importante destacar que o modelo adotado é *in vitro* e, portanto, não contemplam as complexidades fisiológicas da regeneração tecidual *in vivo*. Pesquisas futuras complementares com mais ensaios pré-clínicos com modelos tridimensionais, ensaios de expressão gênica, análise de citocinas, modelos *in vivo* e *in vitro* direcionarão testes clínicos para melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos.

5 CONCLUSÃO

A associação de micropartículas de PLLA e PCL, mesmo sem qualquer modificação química entre si, mostrou-se eficaz na indução da síntese de colágeno tipo I em ambiente *in vitro*, superando os efeitos observados com o uso isolado de cada polímero. Essa resposta potencializada parece refletir uma sinergia entre as características físico-químicas complementares dos materiais e a eficiente fagocitose proporcionada pelo diâmetro reduzido das partículas.

Diante disso, a simples combinação física desses polímeros surge como uma abordagem promissora, de fácil implementação, segura, mais eficaz e economicamente acessível no uso como estratégia terapêutica na harmonização orofacial e/ou nos tratamentos de defeitos dérmicos de tecidos moles com o objetivo de bioestimular a síntese de colágeno. Este estudo também reforça que nem sempre são necessários processos de modificação química complexos para promover respostas celulares relevantes e de importância clínica.

Estes achados contribuem para a ampliação do conhecimento sobre os mecanismos de ação dos bioestimuladores de colágeno e oferecem uma base sólida para o desenvolvimento de novas formulações combinadas. Estudos futuros, especialmente em modelos tridimensionais e *in vivo*, são essenciais para validar a durabilidade dos efeitos observados e garantir a segurança clínica da proposta.

REFERÊNCIAS

1. Swift A, Liew S, Weinkle S, Garcia JK, Silberberg MB. The Facial Aging Process From the “Inside Out”. *Aesthet Surg J.* 14 de setembro de 2021;41(10):1107–19.
2. Coleman S, Grover R. The anatomy of the aging face: Volume loss and changes in 3-dimensional topography. *Aesthet Surg J.* janeiro de 2006;26(1):S4–9.
3. Trinh LN; G Amar. Non-Hyaluronic Acid Fillers for Midface Augmentation: A Systematic Review. *Facial Plast Surg.* 1º de março de 2021;37(04):536–42.
4. Cotofana S, Gotkin RH, Frank K, Koban KC, Targosinski S, Sykes JM, et al. The Functional Anatomy of the Deep Facial Fat Compartments: A Detailed Imaging-Based Investigation. *Plast Reconstr Surg.* 2019;143(1):53–63.
5. Freytag L, Alfertshofer MG, Frank K, Moellhoff N, Helm S, Redaelli A, et al. Understanding Facial Aging Through Facial Biomechanics: A Clinically Applicable Guide for Improved Outcomes. *Facial Nasal Anat.* 1º de maio de 2022;30(2):125–33.
6. Geneser F. *Histologia com bases biomoleculares.* Em: *Histologia com bases biomoleculares.* 3º ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.
7. Zargaran D, Zoller F, Zargaran A, Weyrich T, Mosahebi A. Facial skin ageing: Key concepts and overview of processes. *Int J Cosmet Sci.* agosto de 2022;44(4):414–20.
8. Waller JM, Maibach HI. Age and skin structure and function, a quantitative approach (I): blood flow, pH, thickness, and ultrasound echogenicity. *Skin Res Technol.* novembro de 2005;11(4):221–35.
9. Plikus MV, Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell.* julho de 2021;184(15):3852–72.
10. Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Looking Older: Fibroblast Collapse and Therapeutic Implications. *Arch Dermatol [Internet].* 1º de maio de 2008 [citado 9 de maio de 2025];144(5). Disponível em: <http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archderm.144.5.666>

11. Ogden S, Griffiths TW. A review of minimally invasive cosmetic procedures. *Br J Dermatol*. 1º de novembro de 2008;159(5):1036–50.
12. Christen MO. Collagen Stimulators in Body Applications: A Review Focused on Poly-L-Lactic Acid (PLLA). *Clin Cosmet Investig Dermatol*. junho de 2022;Volume 15:997–1019.
13. Lowe NJ. Optimizing poly-l-lactic acid use. *J Cosmet Laser Ther*. 1º de janeiro de 2008;10(1):43–6.
14. Narins RS. Minimizing Adverse Events Associated with Poly-L-lactic Acid Injection. *Dermatol Surg* [Internet]. 2008;34. Disponível em: https://journals.lww.com/dermatologicsurgery/fulltext/2008/06001/minimizing_adverse_events_associated_with.21.aspx
15. Christen MO, Vercesi F. Polycaprolactone: How a Well-Known and Futuristic Polymer Has Become an Innovative Collagen-Stimulator in Esthetics. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. janeiro de 2020;Volume 13:31–48.
16. Hong JY, Kim JH, Kwon TR, Hong JK, Li K, Kim BJ. In vivo evaluation of novel particle-free polycaprolactone fillers for safety, degradation, and neocollagenesis in a rat model. *Dermatol Ther*. 1º de março de 2021;34(2):e14770.
17. Kwon TR, Han SW, Yeo IK, Kim JH, Kim JM, Hong JY, et al. Biostimulatory effects of polydioxanone, poly-d, l lactic acid, and polycaprolactone fillers in mouse model. *J Cosmet Dermatol*. 2019;18:1002–8.
18. Palma ALDR, Espinha MN, De Carvalho SPA. Bioestimuladores de colágeno: aplicações na estética. *Braz J Health Rev*. 27 de novembro de 2023;6(6):29628–45.
19. Ray S, Ta HT. Investigating the Effect of Biomaterials Such as Poly-(l-Lactic Acid) Particles on Collagen Synthesis In Vitro: Method Is Matter. *J Funct Biomater*. 2020;11(3).
20. Zhu Z, Chen B, Peng L, Gao S, Guo J, Zhu X. Blockade of LINC01605-enriched exosome generation in M2 macrophages impairs M2 macrophage-induced proliferation, migration, and invasion of human dermal fibroblasts. *Int J Immunopathol Pharmacol*. janeiro de 2021;35:205873842110167.
21. Oh S, Lee JH, Kim HM, Batsukh S, Sung MJ, Lim TH, et al. Poly-L-Lactic Acid Fillers Improved Dermal Collagen Synthesis by Modulating M2 Macrophage Polarization in Aged Animal Skin. *Cells*. 2023;12(9).

22. Motta AC, Duek EAR. Síntese, caracterização e degradação “in vitro” do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). *Matér Rio Jan.* setembro de 2006;11(3):340–50.
23. Terukina T, Naito Y, Tagami T, Morikawa Y, Henmi Y, Prananingrum W, et al. The effect of the release behavior of simvastatin from different PLGA particles on bone regeneration in vitro and in vivo: Comparison of simvastatin-loaded PLGA microspheres and nanospheres. *J Drug Deliv Sci Technol.* 1º de junho de 2016;33:136–42.
24. Nazato VS. Caracterização morfológica e farmacológica de microesferas de PLGA contendo o antimicrobiano doxiciclina [dissertação]. [Sorocaba]: Universidade Federal de São Carlos; 2017.
25. Ramirez A, Schwane J, McFarland C, Starcher B. The Effect of Ultrasound on Collagen Synthesis and Fibroblast Proliferation in vitro. *Med Sci Sports Exerc.* maio de 1995;27(Supplement):S51.
26. De Jesus A, Pusec CM, Nguyen T, Keyhani-Nejad F, Gao P, Weinberg SE, et al. Optimized protocol to isolate primary mouse peritoneal macrophage metabolites. *STAR Protoc.* dezembro de 2022;3(4):101668.
27. Rios FJ, Touyz RM, Montezano AC. Isolation and Differentiation of Murine Macrophages. Em: Touyz RM, Schiffrin EL, organizadores. *Hypertension: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017. p. 297–309. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6625-7_23
28. Meurer SK, Neß M, Weiskirchen S, Kim P, Tag CG, Kauffmann M, et al. Isolation of Mature (Peritoneum-Derived) Mast Cells and Immature (Bone Marrow-Derived) Mast Cell Precursors from Mice. *Câmara NOS*, organizador. *PLOS ONE.* 23 de junho de 2016;11(6):e0158104.
29. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 16 de dezembro de 1983;65(1):55–63.
30. Gurlek AC, Sevinc B, Bayrak E, Erisken C. Synthesis and characterization of polycaprolactone for anterior cruciate ligament regeneration. *Mater Sci Eng C.* fevereiro de 2017;71:820–6.
31. Labet M, Thielemans W. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem Soc Rev.* 2009;38(12):3484.

32. Chen CC, Chueh JY, Tseng H, Huang HM, Lee SY. Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends. *Biomaterials*. março de 2003;24(7):1167–73.
33. Woodbury SM, Swanson WB, Douglas L, Niemann D, Mishina Y. Temperature-responsive PCL-PLLA nanofibrous tissue engineering scaffolds with memorized porous microstructure recovery. *Front Dent Med*. 26 de setembro de 2023;4:1240397.
34. Shi X, Jiang J, Sun L, Gan Z. Hydrolysis and biomineralization of porous PLA microspheres and their influence on cell growth. *Colloids Surf B Biointerfaces*. junho de 2011;85(1):73–80.
35. Pekdemir ME, Öner E, Kök M, Qader IN. Thermal behavior and shape memory properties of PCL blends film with PVC and PMMA polymers. *Iran Polym J*. junho de 2021;30(6):633–41.
36. Champion JA, Walker A, Mitragotri S. Role of Particle Size in Phagocytosis of Polymeric Microspheres. 2009;
37. Vlegaar D, Fitzgerald R, Facs ZPL. Understanding, Avoiding, and Treating Potential Adverse Events Following the Use of Injectable Poly-L-Lactic Acid for Facial and Nonfacial Volumization. 2014;13(4).
38. Woodward J, Khan T, Martin J. Facial Filler Complications. *Facial Plast Surg Clin N Am*. novembro de 2015;23(4):447–58.
39. Scientific TF. *Gibco Cell Culture Basics Handbook* [Internet]. Waltham, MA: Thermo Fisher Scientific; 2020. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/cellculturebasics>
40. Oshima J, Campisi J. Fundamentals of Cell Proliferation: Control of the Cell Cycle. *J Dairy Sci*. agosto de 1991;74(8):2778–87.
41. Negaresh M, Javadi A, Garmabi H. Poly(lactic acid)/ poly(ϵ -caprolactone) blends: the effect of nanocalcium carbonate and glycidyl methacrylate on interfacial characteristics. *Front Mater*. 21 de março de 2024;11:1377340.

ANEXO A - CERTIFICADO CEUA

Pontifícia Universidade Católica de São Paulo
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado " **Estudo da combinação de micropartículas de PLLA E PCL na síntese de colágeno in vitro** , protocolo nº2023/138, sob a responsabilidade da pesquisadora profa. Dra. Priscila Randazzo de Moura – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (CEUA-FCMS-PUC/SP), em reunião de **30/04/2024**.

Vigência do Projeto	05/2024 à 06/2025
Espécie/linhagem	Rato Wistar
Nº de animais	10
Peso/Idade	10 dias 3 a 6 meses
Sexo	Machos
Origem	CEMIB / UNICAMP

Profa. Dra. Gislaïne Ventrucci
Coordenadora CEUA-FCMS-PUC/SP