

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA
CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL

**ESTUDO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO DA APLICAÇÃO DO
POLIMETILMETACRILATO (PMMA) EM RATOS.**

Linha de Pesquisa: Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

Autor: Luciano Henrique de Jesus

Orientador: Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho

PORTO ALEGRE, 2011

**À Gláucia,
Pelo amor incondicional e por todo suporte nesta árdua caminhada,
TE AMO MUITO!!!**

**Aos meus Pais Osvaldo e Ana,
Muito obrigado pelo tempo e incentivo em minha vida educacional e familiar.**

**Ao Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho,
Agradeço pelo voto de confiança e por contribuir muito com minha formação
profissional e pessoal, minha mais profunda admiração!!!**

**Às colegas Francinne e Laura,
Minha gratidão por todo esforço e ajuda em todas as etapas de meu trabalho, sem vocês
ele não seria possível!**

**À Bióloga Isabel Lauxen,
Por toda colaboração com a parte histológica deste estudo, muito obrigado!**

**À Chris Krebs,
Muito obrigado pela ajuda e contribuição e por todas as vezes que eu te pedi ajuda a
distância, muito obrigado!**

**À todos os funcionários do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Em especial a Dona Geni e Lorena, pela imensa generosidade, carinho e ajuda para a
realização deste estudo.**

**E a Todos que de muitas formas me ajudaram nesta caminhada de minha formação,
MUITO OBRIGADO!!!**

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar clínica e histologicamente a reação do material de preenchimento em dois sítios diferentes.

Método: Vinte e duas fêmeas de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) foram submetidas a aplicação de PMMA testando duas técnicas: subcutânea e transmuscular. Passados 3 meses do ato cirúrgico os ratos foram eutanasiados e as áreas injetadas foram excisadas, submetidas a técnica de inclusão em parafina e coloração por hematoxilina e eosina. As lâminas foram analisadas observando-se a resposta local à injeção do corpo estranho quanto ao grau de inflamação.

Resultados: Foi encontrada diferença significativamente estatística entre os sítios muscular e subdérmico quanto a formação de granuloma ($p < 0,05$), sendo que o grupo subdérmico obteve melhores resultados.

Conclusão: A aplicação de materiais de preenchimento, que provoca maior trauma e sangramento nos tecidos, é a casusa de reações adversas.

Palavras-chave: polimetilmetacrilato (PMMA), reações adversas, preenchimento.

ABSTRACT

Objective: The objective of this study was to evaluate clinical and histopathology the reaction of the fill material at two different sites.

Method: Twenty-two female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) submitted the application of PMMA testing two techniques: subcutaneous and trans. After 3 months of surgery, the rats were euthanized and the injected areas were excised, subjected to paraffin embedding technique and stained with hematoxylin and eosin. The slides were analyzed by observing the local response to injection of foreign body in the degree of inflammation.

Results: We found statistically significant differences between sites and subdermal muscle as granuloma formation ($p < 0.05$), and the subdermal group achieved better results.

Conclusion: The application of filling materials, which causes more injury and bleeding in the tissues, is a cause of adverse reactions.

Keywords: polymethylmethacrylate (PMMA), adverse reactions, fillers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Técnica de Tuneilização para aplicação do PMMA. Fonte: Modificado de Lamperle et al., 2006.....	11
Figura-2: PMMA de preenchimento é formado por 20% de microesferas e 80% de colágeno bovino. Este é substituído por tecido conjuntivo endógeno e a relação de 20:80 se mantém constante.....	13

SUMÁRIO

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA.....	08
2. OBJETIVOS.....	15
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	18
4. ANEXOS.....	30

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

Atualmente a preocupação com a estética atinge homens e mulheres de todas as idades, conseqüentemente o número de cirurgias plásticas tem aumentado. Para a correção de cicatrizes de acne e marcas de idade na pele os chamados fillers ou preenchimentos têm sido muito utilizados.

Os materiais de preenchimento são géis ou suspensões sintéticas injetáveis que possuem resultados transitórios ou permanentes bastante popularizados. Estes materiais não diferem apenas quanto a sua composição química e interação com os tecidos adjacentes, mas também por provocar diferentes reações adversas no local de aplicação (Ellis et al., 2007; Christensen, 2005). Os materiais de preenchimento mais utilizados no Brasil são: silicone líquido, polimetilmetacrilato (PMMA) e ácido hialurônico (Christensen, 2005; Broder, Cohen 2006).

Apesar da biocompatibilidade comprovada destes materiais existem na literatura relatos de complicações inflamatórias conseqüentes do seu uso (Christensen, 2005; Broder, Cohen 2006). Dentre estas complicações estão a formação de abscessos e granulomas (Christensen, 2005; Jham, 2009; Fernandez-Cossio, Castaño-Orejac, 2006; Allen, 1992). Na literatura consultada, não há um consenso sobre a causa destas reações adversas, assim como não há discussão a respeito da técnica como possível fator etiológico.

PMMA-Polimetilmetacrilato

Nos dias de hoje, com o advento de uma diversidade de novos materiais de preenchimento, torna-se cada vez mais importante atentar-se para sua composição e características, a fim de oferecer aos pacientes a melhor indicação de material para cada caso.

De maneira geral, os materiais de preenchimento devem apresentar alguns requisitos básicos para serem aprovados no uso em seres humanos. Dentre estes estão: suscitar uma controlada e limitada resposta inflamatória (biocompatibilidade), ser facilmente injetado no

sítio receptor (fluidez adequada) e permanecer retido no tecido, com o mesmo volume por um longo período de tempo (Christensen, 2005; Eppley, 2006; Fernandez-Cossio, Castaño-Orejac, 2006).

Tendo em vista a grande variedade de materiais existentes no mercado, será abordado nesse estudo um dos mais utilizados por seu menor custo (Costa et al., 2009), o polimetilmetacrilato (PMMA).

O PMMA foi descoberto na Alemanha em 1902, pelo químico O. Röhm. O primeiro uso, na área da saúde, ocorreu em 1936, em próteses dentárias. Foi utilizado extensivamente desde então em uma variedade de produtos médicos e odontológicos, incluindo cimento ósseo, dentaduras e lentes intraoculares (Lemperle et al., 2004). Os primeiros estudos voltados para a estética e reparação de defeitos na pele foram em 1985 (Lemperle et al., 2004). O primeiro uso do material em seres humanos foi em 1989, desde então foi descrita sua utilização com segurança e poucas complicações em mais de 15.000 pacientes (Lemperle et al., 2010).

Para facilitar a aplicação das esferas de PMMA no tecido, foi adicionado um gel como veículo (colágeno bovino), que ao ser absorvido, deixa espaço para uma reação inflamatória inicial, e posteriormente a produção de colágeno autólogo (Lemperle et al., 2004; Lemperle et al., 2010). Além disso, as esferas do PMMA devem apresentar tamanho uniforme e serem maiores que os macrófagos, afim de não serem fagocitadas. Desta maneira, as partículas do material devem ter no mínimo 20 μ m de diâmetro e apresentar superfície lisa para atenuar a resposta inflamatória do organismo (Lemperle et al., 2004).

Mecanismo de Ação

O colágeno bovino, além de servir como veículo para facilitar a aplicação no tecido, age como uma cola, impedindo que as microesferas de PMMA se dissipem entre as fibras colágenas do tecido. Da mesma maneira, esta substância mantém o espaço entre as

microesferas, impedindo que elas se aglutinem após a aplicação e conseqüentemente diminuam o volume total de material injetado (Ellis et al., 2007).

Após algum tempo da aplicação do PMMA, o colágeno bovino é gradualmente absorvido pelo organismo e substituído por colágeno autólogo. Porém, as esferas do PMMA não são metabolizadas e funcionam como uma estrutura que o colágeno autólogo neoformado deve preencher. Assim, o PMMA torna-se parte do tecido do próprio paciente, mantendo a sua integridade ao longo dos anos (Ellis et al., 2007; Eppley et al., 2006)

Técnicas de aplicação

De maneira geral, os materiais de preenchimento são aplicados com agulhas de calibre que vai de 26 a 30G. O volume de material a ser injetado varia de acordo com o local e o defeito a ser corrigido. A profundidade ideal de aplicação é na camada subepitelial da pele (Christensen, 2005; Eppley, 2006; Fernandez-Cossio, Castaño-Orejac, 2006).

Na maioria dos estudos encontramos diversas formas e técnicas de aplicação. Lemperle (2004) em revisão de literatura preconiza a utilização da técnica de tunelização para minimizar dos efeitos adversos (Lemperle et al., 2004; Lemperle et al., 2010). Esta técnica consiste na localização do plano correto para a injeção do material. Uma vez que a espessura da derme facial varia entre 0,4 e 1,2 milímetros, o uso de micro agulhas 26G permite alcançar penetração longitudinal intradérmica e estabelecer o plano correto para injeção, manipulando a ponta da agulha ao longo da derme (Figura 1). Esta técnica minimiza o trauma e evita criação de hematomas intradérmicos (Lemperle et al., 2004; Lemperle et al., 2010).

A aplicação de materiais injetáveis tipo PMMA deve seguir os seguintes passos:

- Antes de inserir a agulha, deve-se esticar a pele para criar uma superfície firme. A agulha é introduzida (com bisel para cima ou para baixo) na região subdérmica, entre a epiderme e a camada de gordura subcutânea, num ângulo de aproximadamente 10 graus.

- Retirar a agulha ao longo do trajeto da ruga e aplicar o material de maneira contínua e pressão constante (Lemperle et al., 2004; Lemperle et al., 2010).

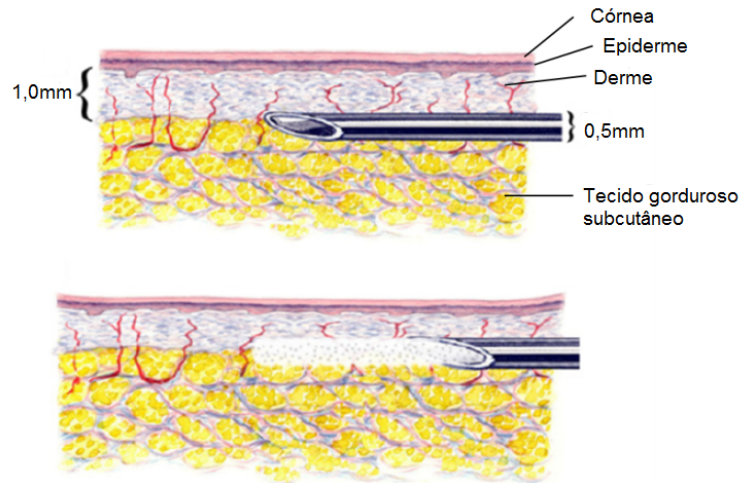


Figura 1: Técnica de Tuneilização para aplicação do PMMA

Fonte: Modificado de Lamperle et al., 2006

Se a inserção da agulha for muito superficial, o bisel fica visível através da pele e há isquemia dos tecidos adjacentes, indicando a colocação em local impróprio. Se isso for observado, a agulha deve ser retirada e recolocada no local correto.

Alguns cuidados e precauções devem ser observados, como por exemplo, a presença de isquemia no local de aplicação indicando que o material foi colocado na região intradérmica e, portanto, muito raso. O PMMA deve permanecer no interior do túnel em que foi injetado, portanto a área de implantação não deve ser massageada para não ocorrer a disseminação do material no tecido (Lemperle et al., 2004; Lemperle et al., 2006; Lemperle et al., 2010).

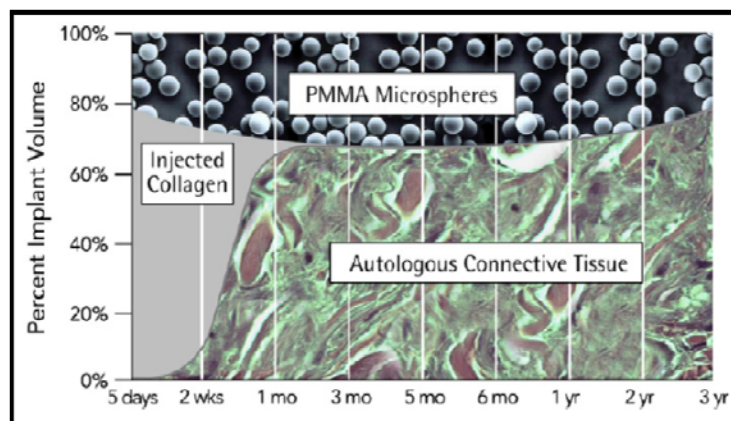
Histologia

A injeção de material de preenchimento no tecido subcutâneo provoca uma resposta inflamatória do tecido conjuntivo, sendo este processo uma reação natural do organismo frente a um material exógeno. Allen (1992) em um estudo longitudinal descreveu as etapas da resposta do organismo:

- Primeiras 24h: predomínio de neutrófilos;
- Após 48h: predomínio de monócitos;
- Após 7 dias: presença de células gigantes do tipo corpo estranho;
- Segunda semana: resposta celular diminui;
- Quarta semana: células epitelióides e fibroblastos;
- Sexta semana: aumento do depósito de colágeno;
- Oitava semana: a inflamação crônica apresenta-se mais dispersa;
- 6 meses: baixa resposta celular e presença de colágeno denso;

Portanto, histologicamente após 3 meses todas microesferas de PMMA estão completamente encapsuladas, cercadas por fibroblastos e septos de tecido conjuntivo (Figura-2). Nesta fase os macrófagos são raros e a angiogênese é evidente (Lemperle et al., 2004; Lemperle et al., 2006; Lemperle et al., 2010). Após 10 anos os cortes histológicos revelam fibras colágenas e capilares maduros circundando as microesferas (Lemperle et al., 2004; Lemperle et al., 2006; Lemperle et al., 2010).

Figura-2. PMMA de preenchimento é formado por 20% de microesferas e 80% de colágeno bovino. Este é substituído por tecido conjuntivo endógeno e a relação de 20:80 se mantém constante.



Fonte: Lemperle, 2006. Artefill: A Third Generation Permanent Dermal Filler and Tissue stimulator.

Clinics in Plastic Surgery: 33: 551-565.

Complicações decorrentes da injeção de materiais de preenchimento

Clinicamente, as reações adversas que podem ocorrer após a injeção de materiais de preenchimento são divididas em imediata, intermediária e tardia (Lemperle et al., 2004; Lemperle et al., 2010). A reação imediata é comum e inclui: dor, edema, equimose, alterações de pigmentação e embolia, esta última ocorre somente quando o gel é acidentalmente injetado dentro de um vaso sanguíneo. As reações imediatas iniciam alguns dias após a aplicação e tendem a desaparecer espontaneamente depois de 1 ou 2 semanas. A reação intermediária é mais rara, ocorrendo num período de tempo que varia de 2 à 12 meses após a aplicação. Clinicamente apresenta-se como um nódulo flutuante, podendo ter ulceração e supuração. A reação tardia ocorre anos após a aplicação e apresenta-se como um nódulo inerte e dolorido no local de injeção ocasionando distorção da área (Christensen, 2005, Lemperle et al., 2010). O tratamento destas complicações varia de acordo com a localização e extensão da lesão, que pode ser com injeções locais de esteróides ou excisão cirúrgica (Broder, Cohen 2006).

Segundo alguns autores, a reação inflamatória formada independe do tipo de material de preenchimento injetado (Christensen et al., 2005; Lemperle et al., 2004). Fernandez-Cossío e Castaño-Oreja (2006) não relataram diferenças no aspecto histopatológico de reações inflamatórias provocadas pela aplicação de material de preenchimento ou soro fisiológico que foi utilizado como placebo. O aspecto histopatológico das complicações relatadas na literatura são: abscesso e granuloma.

O abscesso é uma inflamação purulenta circunscrita caracterizada pelo acúmulo de supuração em uma cavidade neoformada nos tecidos e circundada por uma membrana ou cápsula de tecido conjuntivo inflamado, da qual o pus é gerado (Brasileiro Filho, 1993).

O granuloma é uma reação inflamatória crônica que se caracteriza por agrupamentos de macrófagos, linfócitos, plasmócitos, vasos de neoformação e fibroplasia que circunscrevem o agente agressor. Os macrófagos podem apresentar graus variados de maturação e

diferenciação que dependem do agente agressor ou do tipo de resposta do hospedeiro e que vão classificar o granuloma em epitelióide ou do tipo corpo estranho (Lemperle et al., 2004).

O tempo de formação de um granuloma pode ser variável, dependendo do tipo de material aplicado (Christensen et al., 2005). Em lesões tardias, observadas três anos após a aplicação do material de preenchimento, podem ser observados alguns fragmentos de calcificação (Christensen et al., 2005; Zimmermann, Clerici, 2004).

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Avaliar clínica e histologicamente a reação do material de preenchimento em dois sítios diferentes.

Objetivos Específicos:

- Avaliar semanalmente as alterações clínicas subsequentes a colocação do material de preenchimento no período de 3 meses;

- Analisar microscopicamente a resposta tecidual frente ao material de preenchimento nos diferentes sítios após 3 meses da aplicação.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen O. Response to subdermal implantation of textured microimplants in humans. Aesth Plast Surg 1992;16: 227-230.

Brasileiro Filho G, Ferreira F.E.L, Pittella J.E.H, Bambirra EA, Barbosa AJA. Bogliolo: Patologia Geral 1993; RJ: Guanabara-Koogan. Cap 7

Broder KW, Cohen SR. An overview of permanent and semipermanent fillers. Plast Reconstr 2006;118:7S-14S.

Christensen L, Beiting V, Janssen M, Vuust J, Hogdal E. Adverse reactions to injectable soft tissue permanent fillers. Aesth Plast Surg 2005;29:34-48.

Costa, I.M.C.; Salaro, C.P.; Costa, M.C.; polymethylmethacrylate Facial Implant: A Successful Personal Experience in Brazil for more than 9 years. Dermatol Surg, Wiley Periodicals Inc., 2009: 35: 1221-1227

Ellis, D.A.F.; Segall, L.; Review of Non-FDA-Approved Fillers. Facial Plastic Surgery of North America, 2007:15: 239-246

Eppley BL, Dadvand B. Injectable soft-tissue fillers: clinical overview. Plast Reconstr Surg 2006;118:98e-106e

Fernandez-Cossio S, Castaño-Orejac MT. Biocompatibility of two novel dermal fillers: histological evaluation of implants of a hyaluronic acid filler and a polyacrylamide filler. Plast Reconstr Surg 2006;117:1789-96.

Jham BC, Nikitakis NG, Sheper MA, Papadimitriou J, Levy BA, Rivera H. Granulomatous foreign-body reaction involving oral and perioral tissues after injections of biomaterials: a series of 7 cases and review of the literature. J Oral Maxillofac Surg 2009;67:280-5.

Lemperle, G.; Sadick, N.S.; Knapp, T.R.; Lemperle, S.M.; Artefill[®] Permanent Injectable for Soft Tissue Augmentation: II. Indications and applications. Aesth Plast Surg, July 2010; N.34: 264-272.

Lemperle, G.; de Fazio, S.; Nicolau, P.; Artefill: A Third Generation Permanent Dermal Filler and Tissue stimulator. Clinics in Plastic Surgery, 2006: 33: 551-565

Lemperle, G.; Morhenn, V.B.; Pestonjamas, V.; Gallo, R.L.; Migration Studies and Histology of Injectable Microspheres of Different Sizes in Mice. Plastic and Reconstructive Surgery, 2004: 113: 1380-1390

Reisberger, E.; Landthaler, M.; Wiest, L.; Schröder, J.; Stolz, W.; Foreign Body Granulomas Caused by Polymethylmethacrylate Microspheres. Arch Dermatol, American Medical Association, 2003: 139: 17-20

Zimmermann, U.S.; Clerici, T.J.; The Histological Aspects of Fillers Complications. Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery, 2004: 23: 241-250

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo apresentado de acordo com as normas do periódico *Journal of the American Academy of Dermatology* (Quallis Medicina / Odontologia A1 – Ano base 2008, Fator de Impacto 4.105).

ESTUDO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO DA APLICAÇÃO DO POLIMETILMETACRILATO (PMMA) EM RATOS.

Luciano Henrique de Jesus¹; Francinne Miranda da Rosa²; Laura de Campos Hildebrand²;
Chris Krebs³; Manoel Sant’Ana Filho⁴.

1. Mestrando em Clínica Odontológica, Cirurgia Bucomaxilofacial, Faculdade de Odontologia, UFRGS
2. Doutorandas em Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia, UFRGS
3. Técnica em biotecnologia Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia-UFRGS
4. Professor Associado, Faculdade de Odontologia, UFRGS

Introdução

Os materiais de preenchimento são géis ou suspensões sintéticas injetáveis que são classificados em duas categorias de acordo com sua interação com o organismo. Os materiais classificados como permanentes ou não absorvíveis são estáveis por toda a vida do indivíduo, já os biodegradáveis ou transitórios incluem os materiais que são absorvidos pelo organismo em meses ou anos. (1, 2)

Quase na mesma proporção em que cresce o número de tratamentos com materiais de preenchimento aumenta também o número de reações adversas a este tipo de intervenção estética. As reações adversas provenientes dos materiais de preenchimento transitórios tendem a desaparecer espontaneamente após alguns meses, uma vez que o material é absorvível. Entretanto as reações adversas resultantes da aplicação de materiais permanentes tendem a ser

mais severas e duradouras, podendo surgir anos após a administração do material de preenchimento (3,4). Dentre a reação ao material a mais comumente observada é o granuloma de corpo estranho. Neste processo o organismo receptor forma uma reação inflamatória crônica encapsulada em torno do material de preenchimento permanente aplicado (1, 5, 6). O interessante nestes casos é que dificilmente a lesão ocorre bilateralmente, mesmo que a aplicação do material de preenchimento usualmente seja realizada de ambos os lados (7).

As causas das possíveis reações adversas frente à aplicação dos materiais de preenchimento podem ser relacionadas ao material, ao paciente ou à técnica. As causas relacionadas aos materiais são mínimas, uma vez que para entrar no mercado o produto deve ser aprovado pelos órgãos de vigilância sanitária de cada país, preenchendo uma série de exigências quanto a sua formulação. Um exemplo disto é o polimetilmetacrilato (PMMA), em que o tamanho e superfície de suas microesferas minimizam a reação inflamatória e a atividade de fagocitose dos macrófagos (4,8). As causas de reação adversa relacionadas ao paciente podem ser: trauma sobre a região de aplicação, ocasionando o deslocamento das esferas e reação inflamatória, hipersensibilidade aos componentes do material de preenchimento e lesão de acne próxima ao local de aplicação do material.

As causas de reação adversa após a aplicação de materiais de preenchimento relacionada à técnica não são totalmente explicadas. (8, 9, 10, 11)

O objetivo deste estudo foi avaliar clínica e histologicamente a reação do material de preenchimento em dois sítios diferentes.

Metodologia

Vinte e duas fêmeas de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) de 12 meses de idade foram submetidas a aplicação de material de preenchimento - PMMA. O tamanho da amostra foi selecionada a partir de um cálculo realizado através do software Winpepi[®], módulo Compare 2, versão 1.62, atribuindo-se valores de 5% e 95% para nível de significância e

poder da amostra, respectivamente, com base nos valores de desvio-padrão apresentados por Lemperle (11).

Todos os animais do experimento foram manipulados de acordo com normas de utilização de animais em projetos de pesquisa, conforme Resolução Normativa 04/97, da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/Hospital de Clínicas de Porto Alegre/International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (1985).

Após anestesia com Cloridrato de Xylazina e Cloridrato de Cetamina a 10% respectivamente, o material de preenchimento PMMA (Newplastic[®] 10% - Lebon Prods. Quims. e Ftcos. Ltda) foi aplicado da seguinte maneira: do lado esquerdo na região infraorbitária o material foi injetado por via subcutânea entre a derme e o músculo masseter, e na região de mento por via transmuscular entre a mucosa bucal e o músculo mental. O volume de material aplicado foi de 0,1 ml em cada sítio (11, 12) e não foi realizada qualquer massagem na área, permitindo assim uma porção de material centralizado no local do depósito.

Após a intervenção cirúrgica, os ratos foram monitorados a cada 24 horas na primeira semana e semanalmente nos três meses seguintes, uma vez que após este período de tempo as microesferas de PMMA estão completamente encapsuladas, cercadas por fibroblastos e septos de tecido conjuntivo (Lemperle et al., 2006). Nas avaliações clínicas foram anotadas quaisquer alterações visíveis, como aumento de volume extra-oral, drenagem de secreção purulenta e alterações no comportamento e/ou peso dos animais o que poderiam indicar presença de sintomatologia de acordo com os critérios descritos na tabela 1.

Tabela 1: Escores de avaliação das alterações clínicas:

ESCORES CLÍNICOS	AUMENTO DE VOLUME EXTRA-ORAL	SUPURAÇÃO	ALTERAÇÃO PESO	ALTERAÇÃO COMPORTAMENTO
NÃO	0	0	0	0
SIM	1	1	1	1

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Central da Universidade federal do Rio Grande do Sul e pelo Comitê de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade federal do Rio Grande do Sul com o número 17794/2010.

Análise histológica

Após o período experimental de 3 meses os animais foram eutanasiados de acordo com protocolo do CREAL com base na Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA - Resolução Normativa 04/97/International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (1985). As áreas injetadas foram excisadas, fixadas em formalina neutra tamponada 10% por 24 horas, as peças foram seccionadas no sentido longitudinal e emblocadas em parafina, seccionadas três cortes em micrótomo (3 μ m) e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e analisados todos os espécimes.

As lâminas foram analisadas em um microscópio óptico no aumento de 100x, observando-se a resposta local à injeção do material de preenchimento de acordo com a escala de Duranti adaptada, onde foram estabelecidos escores grau 0 a grau 4 dependendo dos achados observados: grau 0 – ausência do material; grau 1 – presença de infiltrado inflamatório (até 10% de células inflamatórias) e formação de septos de tecido conjuntivo entre as esferas de PMMA; grau 2 – presença de infiltrado inflamatório (entre 10% e 50% de células inflamatórias) e formação de fibras colágenas entre as esferas de PMMA; grau 3 –

presença de infiltrado inflamatório (mais que 50% de células inflamatórias) e formação de fibras colágenas entre as esferas de PMMA; grau 4 – presença de granuloma.

A calibragem intra-examinador foi realizada durante o estudo. Foi empregado o teste t de student pareado com coeficiente de correlação de Pearson, sendo aceito o valor de 0.8, sem diferença entre as médias. A análise das lâminas foi feita por um examinador que não estava ciente do grupo ao qual as lâminas faziam parte.

Análise estatística

A variável ordinal grau de inflamação foi descrita com mediana (mínimo, máximo) e comparada entre os dois grupos com o teste de Mann-Whitney. A diferença significativa observada no teste de Mann-Whitney foi melhor investigada utilizando-se o método de permutação para obter os valores de p ajustados para comparações múltiplas. A comparação de proporções de granuloma entre os 2 grupos foi efetuado segundo teste exato de Fisher-Freeman-Halton seguido de comparações múltiplas via testes de permutação. Testes de permutação foram baseados em 20000 replicações. Todos os valores de p apresentados são do tipo bilateral e valores menores que 0.05 considerados estatisticamente significantes. A análise estatística dos dados foi efetuada utilizando-se SAS versão 9.2 (Statistical Analysis System, Cary, NC, USA)

Resultados

Nas avaliações clínicas das duas técnicas utilizadas tanto no período pós-operatório imediato (sete primeiros dias) quanto no acompanhamento semanal por três meses não foram observadas alterações visíveis relacionadas com a aplicação do PMMA tais como: aumento de volume no local, drenagem de secreção purulenta, alteração no comportamento ou peso dos animais, que indicariam presença de sintomatologia.

As avaliações histológicas de cada grupo estão descritos na tabela 2.

No grupo subdérmico observou-se 77,27% de grau 1. Neste mesmo grupo não foi observado nem a perda de material e nem a formação de granulomas.

Já no grupo transmuscular observou-se equilíbrio entre os graus 1 e 2 (Figura 1 e 2). No mesmo grupo observou-se em 4 casos a formação de granulomas e sangue ao redor e entre as microesferas (Figura 3).

Figura 1. Fotomicrografia ilustrando a presença de septos de tecido conjuntivo entre as microesferas de PMMA caracterizando o grau 1 (HE, 100x).

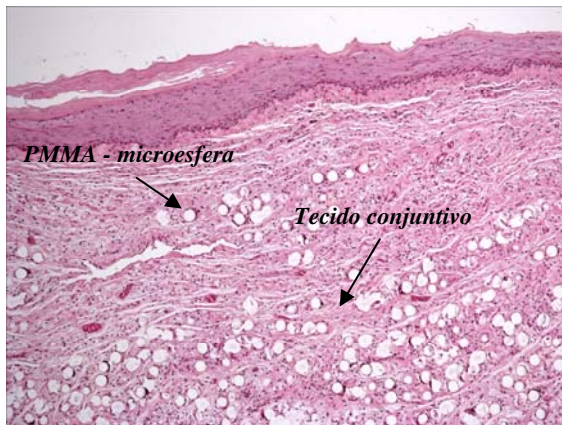


Figura 2. Fotomicrografia ilustrando a presença de fibras colágenas entre as microesferas de PMMA caracterizando o grau 2 (HE, 100x).

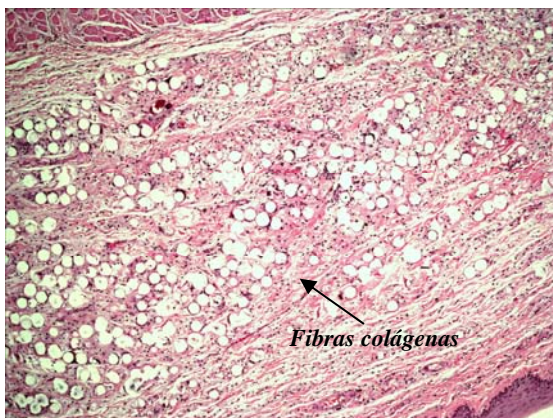


Figura 3. Fotomicrografia ilustrando um granuloma, observamos as microesferas de PMMA encapsuladas, caracterizando o grau 4 (HE, 100x).

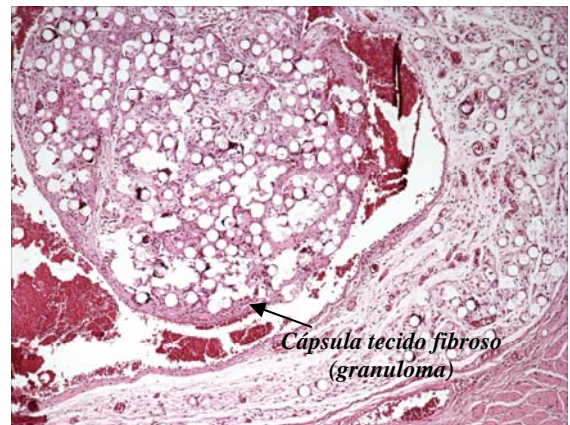


Tabela 2. Distribuição da amostra de acordo com o grau de inflamação escala de Duranti Adaptada, $p < 0,05$.

SCORES	GRAU 0	GRAU 1	GRAU 2	GRAU 3	GRAU 4	TOTAL
TÉCNICA						
SUBDÉRMICA	0	17	5	0	0	22
TRANSMUSCULAR	1	9	8	0	4	22
TOTAL	1	26	13	0	4	44

Comparando as medianas do grau de inflamação segundo as técnicas cirúrgicas, observou-se diferença significativa entre as medianas dos graus de inflamação comparadas entre as duas técnicas cirúrgicas ($p < 0,05$).

Realizando comparações múltiplas de proporções segundo método de permutação, observou-se diferença nas proporções de granuloma entre técnica subdérmica e técnica transmuscular ($p < 0,05$), sendo que o grupo subdérmico obteve melhores resultados.

Discussão

O PMMA é um material de preenchimento biocompatível, inerte, já demonstrado extensivamente na literatura, que quando injetado nos tecidos é reconhecido como corpo estranho, provocando inicialmente uma reação inflamatória transitória (3,7). Nossos resultados demonstram concordância com a literatura uma vez que nas avaliações clínicas não foram observados sinais de agudização do processo inflamatório.

Trabalhos que utilizam o PMMA como cimento para próteses ortopédicas mostram a presença de uma reação inflamatória intensa, uma vez que o acesso cirúrgico é mais cruento. Esta inflamação com presença de macrófagos, linfócitos e granulócitos resulta na liberação de enzimas que podem provocar a corrosão superficial nas microesferas facilitando assim a resposta celular do sistema imune. A alteração da superfície do material ativa a função de apresentação de antígeno dos macrófagos desencadeando um processo que ao longo do tempo

se organiza na forma de granuloma (13, 14, 15). No presente estudo esse tipo de reação inflamatória foi observado somente no grupo teste transmuscular onde a aplicação do material provocou um maior trauma.

Estudos discutem que as falhas decorrentes da aplicação do PMMA podem ser devido ao tamanho da agulha, quantidade de material, formas de deposição e profundidade de aplicação na pele, mas não relacionam a técnica cirúrgica como um possível fator etiológico para as reações adversas. (3, 5, 7, 9, 16, 17). Os resultados do presente estudo demonstraram outro fator preponderante, uma vez que a técnica de aplicação do material foi determinante para a ocorrência de granulomas.

A técnica preconizada para a aplicação do PMMA é a colocação do material na camada subdérmica onde são esperados os melhores resultados a longo prazo (3). No grupo subdérmico observou-se que 77,27% dos casos apresentou formação de septos de tecido conjuntivo, evidenciando a estabilidade do material no local de aplicação e mínimo infiltrado inflamatório, o que sustenta a utilização deste material como preenchimento de marcas de expressão facial e cicatrizes de acnes superficiais.

Quando o material é injetado em local invadindo outras camadas teciduais observa-se uma maior ocorrência de reações adversas como observamos no grupo teste transmuscular. Neste grupo ocorreu uma diversidade de reações que foram desde a ausência do material até a formação de granulomas. A ausência do material pode ter ocorrido devido à migração do material em áreas de grande atividade muscular (21).

A lesão provocada pela agulha na camada transmuscular provoca sangramento excessivo dando nova característica ao processo de inflamação no local, há formação de tecido de granulação para reparo e regeneração muscular. O tecido de granulação tem dois constituintes básicos: capilares neoformados e infiltrado inflamatório crônico inespecífico.

O infiltrado mostra os quatro tipos de células da inflamação crônica: linfócitos, plasmócitos, macrófagos e fibroblastos. As células inflamatórias (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) ajudam a combater o agente inflamatório através da imunidade humoral (anticorpos) e celular. Os macrófagos fagocitam os restos celulares resultantes da inflamação. Uma vez que este processo de regeneração muscular provoca maior atividade fagocitária próxima ao material injetado, este pode ser apresentado ao sistema imune como corpo estranho gerando assim uma reação inflamatória organizada na forma de granuloma, concordando com os achados deste estudo no grupo teste transmuscular. (21, 22)

Outra hipótese para ocorrência de granulomas grupo teste transmuscular seria a formação do coágulo, onde a ativação da quinina para lise da plasmina provoca danos na superfície das microesferas facilitando a ação de fagocitose dos macrófagos frente ao material aplicado. (21, 22)

Na maioria dos estudos, a reação inflamatória é avaliada de maneira subjetiva, sendo classificada em leve, moderada e severa (2, 18, 19). No presente estudo, assim como Requena et al. (2011) o infiltrado inflamatório foi quantificado segundo a escala de Duranti et al. (1998) adaptada para melhor reprodutibilidade da pesquisa.

Conclusão

A aplicação de materiais de preenchimento, que provoca maior trauma e sangramento nos tecidos, é a casusa de reações adversas.

Referências Bibliográficas

1. Alcalay J, alkalay R, Gat A, Yorav S. Late-onset granulomatous reaction to Artecoll. *Dermatol Surg*. 2003 Aug;29(8):859-62.
2. Lemperle G, Kind P. Biocompatibility of Artecoll. *Plast Reconstr Surg* 1999;103:338-40.
3. Lemperle, G.; Sadick, N.S.; Knapp, T.R.; Lemperle, S.M.; Artefill[®] Permanent Injectable for Soft Tissue Augmentation: II. Indications and applications. *Aesth Plast Surg*, July 2010; N.34: 264-272.
4. Haneke, E.; polymethyl Methacrylate Microspheres in Collagen. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 2004; 23: 227-232
5. Requena C, Izquierdo MJ, Navarro M, Martínez A, Vilata JJ, Botella R, Amorrortu J, Sabater V, Aliaga A, Requena L. Adverse reactions to injectable aesthetic microimplants. *Am J Dermatopathol*. 2001;23(3):197-202.
6. Ellis, D.A.F.; Segall, L.; Review of Non-FDA-Approved Fillers. *Facial Plastic Surgery of North America*, 2007;15: 239-246
7. Lemperle, G.; de Fazio, S.; Nicolau, P.; Artefill: A Third Generation Permanent Dermal Filler and Tissue stimulator. *Clinics in Plastic Surgery*, 2006: 33: 551-565
8. Dadzie, O.E.; Mahalingam, M.; Parada, M.; El Helou, T.; Philips, T.; Bhawan, J.; Adverse cutaneous reactions to soft tissue fillers – a review of the histological features. *Journal of Cutaneous Pathology*, 2008: 35: 536-548
9. Lemperle, G.; Romano, J.J.; Busso, M.; Soft Tissue Augmentation With Artecoll: 10-years History, Indications, Techniques and Complications. *Dermatol Surg*, 2003: 29: 573-587
10. Morhenn, V.B.; Lemperle, G.; Gallo, R.L.; Phagocytosis of Different Particulate Dermal Filler Substances by Human Macrophages and Skin Cells. *Dermatol Surg*, 2002: 28: 484-490

11. Lemperle, G.; Morhenn, V.B.; Pestonjamas, V.; Gallo, R.L.; Migration Studies and Histology of Injectable Microspheres of Different Sizes in Mice. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2004; 113: 1380-1390
12. Duranti F, Salti G, Bovani B, Calandra M, Rosati ML., Injectable hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation. A clinical and histological study. *Dermatol Surg*. 1998 Dec;24(12):1317-25.
13. Santin, M.; Motta, A.; Borzachiello, A.; Nicolais, L.; Ambrosio, L.; Effect of PMMA cement radical polymerisation on inflammatory response. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2004; 15: 1175-1180
14. Trindade, M.C.D.; Lind, M.; Nakashima, Y.; Sun, D.; Goodman, S.B.; Schurman, D.J.; Smith, R.L.; Interleukin-10 inhibits polymethylmethacrylate particle induced interleukin-6 and tumor necrosis factor- α release by human monocyte/macrophages in vitro. *Biomaterials*, 2001; 21: 2067-2073
15. Sun, D.; Trindade, M.C.D.; Nakashima, Y.; Maloney, W.J.; Goodman, S.B.; Schurman, D.J.; Smith, R.L.; Human sérum opsonization of orthopedic biomaterial particles: Protein-binding and monocyte/macrophage activation in vitro. *J Biomed Mater Res*, 2003; 65A: 290-298
16. Costa, I.M.C.; Salaro, C.P.; Costa, M.C.; polymethylmethacrylate Facial Implant: A Successful Personal Experience in Brazil for more than 9 years. *Dermatol Surg*, Wiley Periodicals Inc., 2009; 35: 1221-1227
17. Quatela, V.C.; Chow, J.; Synthetic Facial Implants. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 2008; 16: 1-10
18. Lemperle, G.; Gauthier-Hazan, N.; Lemperle, M.; PMMA-Microspheres (Artecoll) for long-lasting Correction of Wrinkles: Refinements and Statistical Results. *Aesthetic Plastic Surgery*, 1998; 22: 356-365

19. Narins, R.S.; Bowman, P.H.; Injectable Skin Fillers. *Clinics in Plastic Surgery*, 2005: 32: 151-162
20. Requena, L.; Requena, C.; Christensen, L.; Zimmermann, U.S.; Kutzner, H.; Cerroni, L.; Adverse reactions to injectable soft tissue fillers. *J Am Acad Dermatol*, 2011: 64(1): 1-34
21. Loell I, Lundberg IE. Can muscle regeneration fail in chronic inflammation: a weakness in inflammatory myopathies? *J Intern Med*. 2011 Mar;269(3):243-57.
22. Leung LL, Myles T, Nishimura T, Song JJ, Robinson WH. Regulation of tissue inflammation by thrombin-activatable carboxypeptidase B (or TAFI). *Mol Immunol*. 2008 Oct;45(16):4080-3.

**UFRGS**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs

**CARTA DE APROVAÇÃO****O Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs analisou o projeto:****Número:** 17794**Título:**

Avaliação clínica e histológica da resposta dos tecidos frente a duas diferentes técnicas de aplicação de materiais de preenchimento: estudo in vivo.

Pesquisadores:**Equipe UFRGS:**

MANOEL SANTANA FILHO - coordenador desde 15/03/2010

O mesmo foi aprovado pelo Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs, em reunião realizada em 10/06/2010 - Sala de Reuniões do Gabinete do Reitor (Ex Salão Vermelho) - Prédio Reitoria, 6º andar, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho nacional de Saúde.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 10 de Junho de 2010



JOSE ARTUR BOGO CHIES
Coordenador da comissão de ética