

Universidade do Brasil –UFRJ

Centro de Ciências da Saúde

Faculdade de Odontologia

**ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA PAPILA INTERDENTÁRIA DE
RATO APÓS PREENCHIMENTO COM GEL DE ÁCIDO
HIALURÔNICO**

Laura Mello Figueiredo, CD

Dissertação submetida ao corpo docente da Faculdade de Odontologia da Universidade do Brasil -UFRJ, como parte dos requisitos, para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia (Ortodontia).

Rio de Janeiro

- 2016 –

**ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA PAPILA INTERDENTÁRIA DE RATO APÓS
PREENCHIMENTO COM GEL DE ÁCIDO HIALURÔNICO**

LAURA MELLO FIGUEIREDO, CD

Orientadores: Prof^a. Dr^a. MÔNICA TIRRE DE SOUZA ARAÚJO

Prof^a. Dr^a. LILIANE SIQUEIRA DE MORAIS

**Dissertação submetida ao corpo docente da
Faculdade de Odontologia da Universidade do Brasil -
UFRJ, como parte dos requisitos, para obtenção do Título
de Mestre em Odontologia (Ortodontia).**

Comissão Examinadora:

**Prof. Dr. Matheus Melo Python
CD, MO, DO**

**Prof. Dr. Eduardo Franzotti Sant'Anna
CD, MO, DO**

**Prof^a. Dr^a. Matilde da Cunha Gonçalves Nojima
CD, MO, DO**

Rio de Janeiro

2016

Ficha Catalográfica**FIGUEIREDO, Laura**

Aspectos histológicos da papila interdentária de rato após preenchimento com gel de ácido hialurônico. Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Odontologia, 2016.

xxi, 63 f.

Dissertação: Mestrado em Odontologia (Ortodontia) – Universidade do Brasil – UFRJ, Faculdade de Odontologia, 2016.

1. Ácido Hialurônico

2. Papila interdentária

3. Histologia

4. Teses

I. Título

II. Dissertação (Mestrado – UFRJ/Faculdade de Odontologia)

LINHA DE PESQUISA: Fisiomorfologia, terapêutica e bioengenharia dos tecidos bucais

TÍTULO: ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA PAPILA INTERDENTÁRIA DE RATO APÓS PREENCHIMENTO COM GEL DE ÁCIDO HIALURÔNICO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 12 de maio de 2015

Prezada Professora Mônica Tirre Souza de Araújo

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sobre o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: **“Aspectos Histológicos da Papila Interdentária de Ratos Após Preenchimento com Ácido Hialurônico.”**, protocolo nº 017/15, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia **15/04/2015**.

Vigência do Projeto	Até 12/05/2016
Espécie/linhagem	<i>Rattus norvegicus/ Wistar</i>
Nº de animais	35 animais
Peso/idade	300 / 12 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério de Produção de Roedores do Instituto de Ciências Biomédicas do CCS UFRJ - bloco k, 1º andar sala 1.

DEDICO

Aos meus pais, **Walmir Gomes Figueiredo e Maria Alves de Mello Figueiredo**, pelo apoio incondicional, pelo carinho e amor desmedido, por me incentivarem a sonhar e por nunca medirem esforços para que eu realizasse meus sonhos. Meu mais profundo agradecimento por me ajudarem a transpor esse desafio com mais leveza e segurança. Seus exemplos são minha força e determinação.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela minha vida, pela minha saúde, pela proteção e por me proporcionar a realização desse sonho.

Aos meus irmãos, **Davi Figueiredo, Millane Figueiredo, Walmir Figueiredo e Lucas Figueiredo**, pelo apoio, por torcerem sempre por mim, me incentivando a cada novo passo. A convivência da nossa família é o meu bem mais precioso. Vocês tornam os meus dias mais leves, cheios de amor, carinho e muitas felicidade. Sei que juntos somos mais fortes. Cada um, de maneira especial e singular, é parte do que sou hoje.

À minha avó paterna, **Maria Umbelina de Sá**, pelo exemplo de coragem. Aos meus avós maternos, sei que me protegem e torcem pelo meu sucesso de onde estão.

Aos meus queridos tios da família Mello, em especial tia à **Gedalva Mello** e à tia **Nazaré Mello**, pelo amor, pelos inúmeros conselhos e torcida, pela preocupação, sempre tão carinhosas. À minha tia **Iolanda Mello**, pelo amor incondicional que ultrapassa a vida.

Aos meus primos e primas tão queridos, sempre tão presentes na minha vida, por torcerem e dividirem comigo minhas felicidades.

Ao meu noivo, **Ivan Nobre de Abreu Carvalho**, por viver esse sonho comigo, pela paciência e compreensão constante, por dividir comigo minhas

alegrias e tristezas. Pelo seu amor. Por me trazer segurança e tranquilidade, por ser meu verdadeiro companheiro. À **sua família** por todo apoio e torcida.

À minha orientadora **Dr^a. Monica Tirre de Souza Araújo**, pela ideia brilhante que deu origem a esse trabalho, por confiar em mim para o desenvolvimento deste projeto e por me incentivar a executá-lo. Pelo carinho, atenção e por dividir seus conhecimentos comigo, pelo exemplo de carinho e atenção com os pacientes, muito obrigada.

À minha co-orientadora **Dr^a Liliane Siqueira de Moraes**, pelo incentivo, pela maneira carinhosa e atenciosa com que sempre me tratou, por acalmar meus momentos de desespero e ansiedade, meu muito obrigada.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Ortodontia da UFRJ, **Dr. Eduardo Franzotti Sant'Anna** e aos demais professores, **Dra. Ana Maria Bolognese**, **Dr. Antônio Carlos de Oliveira Ruellas**, **Dr. José Fernando Stangler Brazalle**, **Dr. José Vinícius Bolognesi Maciel**, **Dr. Lincoln Issamu Nojima**, **Dra. Luciana Rougemont Squeff**, **Dra. Margareth Maria Gomes de Souza**, **Dra. Matilde da Cunha Gonçalves Nojima**, por dividirem seus conhecimentos, pela dedicação ao curso, pela busca incessante pelo conhecimento e por contribuírem de maneira grandiosa para minha formação profissional. Agradeço especialmente ao **Dr. Lincoln Issamu Nojima** e **Dra. Matilde da Cunha Gonçalves Nojima** pela atenção, pelo cuidado, sensibilidade e carinho tantas vezes fraternal. Estendo agradecimento especial ao **Dr. Antônio Carlos de Oliveira Ruellas** pelo carinho, por em tão pouco tempo dividir seus conhecimentos, pela disponibilidade e convívio sempre agradável, por ser exemplo de dedicação ao ensino.

Aos professores das Disciplinas conexas, **André Antonio Monteiro, Carlos Nelson Elias, Fábio Ribeiro Guedes, Glaucio Serra Guimarães, Ieda Maria Orioli, Maria Cynésia Medeiros de Barros Torres, Ronir Raggio Luiz e Sandra Regina Torres**, pelos ensinamentos transmitidos e pela contribuição valiosa na minha formação profissional.

Ao querido Professor da Universidade Federal de Alagoas **Edgard Norões Rodrigues da Matta**, por ter despertado em mim o interesse pela Ortodontia, por ser minha fonte de inspiração, meu exemplo, pelo carinho, por me incentivar e acreditar em mim desde que eu era aluna da graduação, meu mais sincero agradecimento.

Aos meus amados companheiros de turma, **Adilson Tolfo de Oliveira, Carolina Ribeiro Starling, Patrícia Valim Carneiro, Ramiro Estacia da Silveira e Priscilla de Almeida Solon de Melo**, pelo convívio incrível durante esses dois anos, por tudo que pude aprender com vocês, foi uma oportunidade indescritível desfrutar dessa amizade. Cada um com seu jeito singular contribuiu para meu crescimento pessoal e profissional. Lembrarei com muito carinho dos momentos maravilhosos e difíceis que vivemos juntos. Aos meninos, pelo equilíbrio e sensatez nos momentos mais necessários. Às minhas “Meninas da Orto”, pelo colo, pelas confidências, pelo amor mais sincero, minha mais profunda gratidão. Sem vocês não me encaixaria em outra turma.

Aos amigos da 49ª turma **Alice Spitz, Carla Juliane Lima, Fernanda Blaudt Carvalho Marques, Fernando Cardoso Brito, Lilian Siqueira de Lima e Nathalia Ferrare Pinto**, nossa convivência foi muito feliz e proveitosa. Obrigada pelo acolhimento, pelas inúmeras respostas às minhas inúmeras perguntas, pela paciência, pela força e exemplo, pelo carinho e amizade que fizemos no

departamento. Em especial à **Carlinha**, pelas inúmeras ajudas, pelas parcerias, pelo carinho e por me fazer sentir segura e mais perto de casa.

Aos amigos da 51ª turma **Anna Paula Nigri, Bárbara Pilla Tavares, Kelly Galisteu Luiz, Larine Ferreira Lira, Mariana Lago de Salles Brasil e Mirella Lemos de Queiróz Tavares**, pela convivência e pelos momentos de descontração que vivemos juntas. Em especial a Larine, que se tornou muito especial e querida, representando um pedacinho da minha Maceió no Rio de Janeiro.

Aos doutorandos, **Adrielle da Silveira Araújo, Amanda Carneiro da Cunha, Ana Paula Tenório de Sá, Daniel Paludo Brunetto, Geórgia Wain Thi Lau, Ilana Oliveira, Johnny Holanda de Gauw, Lúcio Henrique E.G. Maia, Teresa Cristina Pereira de Oliveira, Rodrigo Lopes Lima e Luciana Duarte Caldas**. Em especial à **Ana Paula**, pela ajuda desmedida na execução deste trabalho, pela companhia, pelo apoio físico e moral, pela disponibilidade, carinho e atenção, agradeço de coração. Estendo meu agradecimento especial ao **Rodrigo** pelos inúmeros auxílios, por me acompanhar e indicar profissionais competentes para a execução deste trabalho, por estar sempre disponível, pelo carinho e atenção, meu muito obrigada. À **Johnny** pelo carinho e pelos momentos de descontração sempre tão necessários.

Aos funcionários, **Diane Esteves de Souza Gomes, Laís Monteiro, Mônica Mello do Nascimento Gonçalves e Vanilda Antônio Saturnino** por toda a ajuda durante estes anos. Agradeço em especial à **Diane Esteves** pelo carinho e cuidado com que sempre me tratou, pela amizade, pela convivência agradável e por representar sempre a alegria no Departamento.

Ao Professor **Vivaldo Moura Neto** do Laboratório de Morfogênese celular –UFRJ, por permitir a execução deste trabalho nas dependências do laboratório. À doutoranda **Carla Veríssimo**, pela paciência, por dividir comigo seus conhecimentos, pelas inúmeras ajudas, pela disponibilidade e pelo carinho.

Em especial à **Fábio Jorge da Silva**, por entender e abraçar esse trabalho, por não medir esforços em me ajudar em toda e qualquer situação, pela competência, pela paciência e compreensão, meu profundo agradecimento.

Ao meu quarteto fantástico, **Camilla Albuquerque, Kyssia Mesquita e Suzana Pereira** por serem o meu colo, a minha segurança e por nunca desistirem de mim, apesar da minha falta de tempo. Por tudo que já vivemos juntas, pelo companheirismo e por acreditarem nos meus sonhos, meu muito obrigada.

Às minhas queridas **Dannyele Pimentel e Viviane Amorim**, pelos anos de graduação em que pude crescer e aprender com vocês, pelo amor, carinho, apoio e torcida. Saber que essa amizade ultrapassou os muros da UFAL me mantém segura e muito feliz.

Aos **pacientes em tratamento na clínica do Departamento de Ortodontia da UFRJ** pela confiança, pelos bons laços que formamos e por atuarem como instrumento na minha formação profissional.

Aos **alunos da disciplina de Ortodontia da graduação da UFRJ** por permitirem a minha iniciação na docência e por tornarem essa experiência agradável e prazerosa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela bolsa de estudos concedida.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à pesquisa do estado do Rio de Janeiro (**FAPERJ**).

RESUMO

FIGUEIREDO, Laura Mello. Aspectos histológicos da papila interdentária de rato após preenchimento com gel de ácido hialurônico. Orientadores: Dr^a. Mônica Tirre de Souza Araújo e Dr^a. Lilliane Siqueira de Moraes. Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Odontologia, 2016. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Ortodontia) 63f.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar os aspectos histológicos iniciais da papila interdentária de rato após o preenchimento com gel de ácido hialurônico, para indicar seu uso em humanos. Quarenta e três ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: o grupo ácido hialurônico (GAH) e o grupo solução salina (GSS). O grupo GAH foi subdividido em 6 grupos contendo 5 animais cada e o grupo GSS foi subdividido em 6 grupos contendo 2 animais cada. Um animal foi destinado ao controle negativo. Os animais do grupo GAH receberam injeção de 0,02ml do gel de ácido hialurônico (23mg/ml) na papila interdentária superior vestibular e os animais do grupo GSS receberam 0,02ml de solução salina 0,9%. Os grupos diferiram entre si pelo tempo de avaliação: 0 dias (imediatamente), 1 dia, 3 dias, 5 dias, 6 dias e 7 dias. Parte dos cortes histológicos foi destinada à análise histopatológica, para caracterização de eventos como: reação inflamatória, vascularização, atividade

fagocitária, necrose e material residual. Outra parte à histomorfometria, para mensuração da área e do perímetro ocupada pelo gel de ácido hialurônico no tecido gengival. Houve reação inflamatória intensa 1 dia após a injeção do gel, a qual diminuiu de intensidade nos períodos seguintes de avaliação, comportamento semelhante ao da neovascularização. Houve formação de fina cápsula envolvendo o material a partir do 3º dia de avaliação. Não foi observada necrose. O material residual assumiu forma e tamanho variável dentro do tecido. A variável área não apresentou diferença significativa entre os grupos de tempo ($p = .265$). A variável perímetro apresentou diferença significativa entre os grupos de tempo ($p = .044$), os valores do perímetro para os grupos de tempo GAH6 e GAH7 diferem significativamente dos valores registrados nos grupos de tempo iniciais do experimento. A correlação de Pearson entre área e tempo apresentou uma fraca associação negativa ($r = .0461$), já a correlação entre perímetro e tempo apresentou uma moderada associação negativa ($r = .585$). O gel de HÁ desencadeou reação inflamatória de caráter agudo de curta duração, aumento da vascularização local e observou-se a formação de cápsula envolvendo o material, entretanto não foram identificadas áreas de necrose.

SUMMARY

FIGUEIREDO, Laura Mello. Aspectos histológicos da papila interdentária de rato após preenchimento com gel de ácido hialurônico. Orientadores: Dr^a. Mônica Tirre de Souza Araújo e Dr^a. Lilliane Siqueira de Moraes. Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Odontologia, 2016. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Ortodontia) 63f.

The purpose of this study was to investigate the initial histological effects of hyaluronic acid gel in the interdental papilla of rat model, so its use may be indicated in human. Forty-three male Wistar rats were randomly divided into 2 groups, the hyaluronic acid group (GAH) and the saline solution group (GSS). GAH group had 6 groups with 5 animals each and the GSS group had 6 groups with 2 animals each. One animal was designed to negative control. The GAH group received an injection of 0,02ml of hyaluronic acid gel (23mg/ml) in the upper buccal interdental papilla and the GSS group received 0,02ml of normal saline solution 0,9%. The groups differed by evaluation time: 0 days (immediately), 1 day, 3 days, 5 days, 6 days and 7 days. Histological slices were designated to histopathological analysis, describing events like: inflammatory reaction, vascularization, phagocytic activity, necrosis, and residual material; and to histomorphometry, measure area and perimeter occupied by the hyaluronic acid

gel in the gingival tissue. There was intense inflammatory reaction 1 day after gel injection, which decreased in intensity in the following evaluation periods, behavior similar to neovascularization. Thin capsule formation occurred involving the material from the third day evaluation. No necrosis was observed. Residual material took shape and variable size within the tissue. The variable area showed no significant difference between the periods of experiment ($p = .265$). Conversely perimeter values for GAH 6 and GAH 7 groups differ significantly ($p = .044$) from the values recorded in the initial periods of experiment. The Pearson's correlation between area and time showed a weak negative association ($r = .461$). The correlation between perimeter and time showed a moderate negative association ($r = .585$). In conclusion, it was observed that HA gel caused acute inflammatory reaction of short duration, increased local vascularization, capsule formation involving the material was observed, but necrotic areas were not identified.

LISTA DE SIGLAS

AH	ácido hialurônico
ANOVA	análise de variância
CEUA	Comissão de Ética com Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
g	gramas / grams
GAH	Grupo ácido hialurônico
GSS	Grupo Solução Salina
HA	hyaluronic acid
HE	hematoxilina e eosina / hematoxilin eosin
ICC	Índice de Correlação intraclasse / Intraclass correlation coefficient
NaCl	cloreto de sódio
µm	micrômetro / micrometer
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

LISTA DE FIGURAS

DELINEAMENTO DA PESQUISA

	Página
Figura 1 Procedimento de sedação inalatória.....	8
Figura 2 Procedimento de aplicação do material.....	9
Figura 3 Procedimento de osteotomia.....	11
Figura 4 Local da secção realizada no bloco anatômico (seta amarela) de sentido longitudinal e direção vestibulo-lingual, originando duas peças, as quais foram posicionadas lado a lado e então emblocadas em parafina.....	12
Figura 5 Representação do software ImageJ, utilizado para marcação de pontos para avaliação quantitativa da área e do perímetro em corte histológico sob objetiva de 10x.....	14

ARTIGO

Figure 1 Histopathological analysis of hyaluronic acid group in 10x magnification.....	33
Figure 2 Histopathological analysis of hyaluronic acid group in 40x magnification.....	34

RESULTADOS

Figura 6	Aspecto histológico da papila interdentária do animal utilizado como controle negativo. Objetiva de 10x e barra de escala 100µm.....	37
Figura 7	Análise histopatológica dos animais do grupo solução salina (GSS) sob objetiva de 10x.....	39
Figura 8	Análise histopatológica dos animais do grupo ácido hialurônico (GAH) sob objetiva de 10x.....	44
Figura 9	Análise histopatológica dos animais do grupo ácido hialurônico (GAH) sob objetiva de 40x.....	45

LISTA DE GRÁFICOS**ARTIGO**

Graphic 1	Linear Dispersion of variable area over time.....	35
Graphic 2	Linear Dispersion of variable perimeter over time.....	36

RESULTADOS

Gráfico 1	Gráfico de dispersão linear da variável área em relação ao tempo.....	49
Gráfico 2	Gráfico de dispersão linear da variável perímetro em relação ao tempo.....	49

LISTA DE TABELAS

DELINEAMENTO DA PESQUISA

Tabela 1	Divisão da amostra entre os grupos GAH e GSS de acordo com o tempo de experimento.....	7
-----------------	--	---

ARTIGO

Table 1	ANOVA with Bonferroni post-test for variables (area and perimeter) compared to time groups and Pearson correlation test for the association of the variables over time.....	35
----------------	---	----

RESULTADOS

Tabela 2	Teste Anova com pós-teste Bonferroni para a variável área em relação aos grupos de tempo.....	46
Tabela 3	Teste Anova com pós-teste Bonferroni para a variável perímetro em relação aos grupos de tempo.....	47
Tabela 4	Teste Anova com pós-teste Bonferroni para as variáveis área e	

perímetro em relação aos grupos de tempo e o Teste de Correlação de Pearson para a associação das variáveis em relação ao tempo	48
---	----

ÍNDICE

	Página
1	INTRODUÇÃO..... 1
2	PROPOSIÇÃO..... 5
3	DELINEAMENTO DA PESQUISA..... 6
3.1	AMOSTRA..... 6
3.2	MATERIAL UTILIZADO..... 7
3.3	PROCEDIMENTO DE APLICAÇÃO DO MATERIAL..... 8
3.4	EUTANÁSIA..... 10
3.5	PREPARO HISTOTÉCNICO DAS PEÇAS ANATÔMICAS..... 10
3.5.1	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA..... 13
3.5.2	AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE ÁREA E PERÍMETRO..... 13
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 14
4	DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA 16
	ARTIGO 1: FIGUEIREDO, L.M.; ALMEIDA, F.; MORAIS, L.S.; ARAÚJO, M.T.S. Histological aspects of interdental papilla of rat after filling with hyaluronic acid gel. A ser submetido à Dental Materials..... 16
5	RESULTADOS..... 37
5.1	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA..... 37
5.1.1	GRUPO GAH0..... 40

5.1.2	GRUPO GAH1.....	40
5.1.3	GRUPO GAH3.....	41
5.1.4	GRUPO GAH5.....	41
5.1.5	GRUPO GAH6.....	42
5.1.6	GRUPO GAH7.....	43
5.2	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	46
6	DISCUSSÃO.....	50
7	CONCLUSÃO.....	57
8	RECOMENDAÇÕES	59
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
10	ANEXOS	63

1 INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) pertence a um grupo de polissacarídeos, chamado glicosaminoglicanos, os quais são polímeros de cadeias longas, não ramificadas, que tem como base unidades dissacarídeas repetidas. O AH é tipicamente encontrado no tecido conjuntivo de vertebrados e tem a condroitina como provável precursor (Robert, L 2015).

Em 1841, Henle fez a primeira descrição conhecida do material, denominado então de “Grundsubstanz”. Porém, apenas em 1934, Meyer e Palmer isolaram um polissacarídeo ácido a partir do humor vítreo do olho da vaca (Dicker *et al.*, 2014). Sua estrutura foi determinada na década de 1950 por Meyer e colaboradores, sendo descrito como um biopolissacarídeo, de alto peso molecular, constituído por unidades repetidas de ácido d-glucurônico e N-acetil-D-glucosamina (Fraser *et al.*, 1997; Lapcık L Jr And *et al.*, 1998; Dicker *et al.*, 2014). A palavra grega “hyaloid”, correspondente à estrutura anatômica do humor vítreo do olho, acrescido à presença do ácido urônico na estrutura do AH, serviram como base para a denominação ácido hialurônico (Chong *et al.*, 2005; Tsepilov e Beloded, 2015).

O AH é componente natural do corpo humano, compreendendo uma quantidade aproximada de 15g em um homem adulto (Kablik *et al.*, 2009). Sua síntese é realizada na matriz extracelular de diversos tecidos, onde, devido a sua capacidade de se ligar a água, apresenta funções como lubrificação,

preenchimento de espaços e absorção de impacto (Bansal *et al.*, 2010). Grande parte do ácido hialurônico natural é encontrado na derme, onde age como substância fundamental de sua composição, controlando a hidratação da pele e concedendo aparência de jovialidade. Notável quantidade de AH é encontrada nos olhos e está presente também nas articulações, no fluido sinovial, nas cartilagens e no tecido conjuntivo. Outra parcela está presente no cordão umbilical, onde tem a função de proteger os vasos sanguíneos da compressão causada pelo crescimento e desenvolvimento do feto. Também é encontrado no sêmen, protegendo os espermatozoides em sua trajetória através do útero. Pequenas quantidades de AH podem ser encontradas naturalmente nos pulmões, nos rins, no cérebro e na corrente sanguínea (Fraser *et al.*, 1997; Kablik *et al.*, 2009; Dicker *et al.*, 2014; Robert, 2015). Na cavidade oral, está presente na saliva e no periodonto, apresentando-se em maiores quantidades na gengiva e no ligamento periodontal do que no osso alveolar.

Além das diversas fontes fisiológicas para obtenção do ácido hialurônico, é possível isolá-lo também à partir de algumas espécies de bactérias (*Streptococcus zooepidemicus*), da crista do galo, do cordão umbilical humano e do humor vítreo do olho da vaca (John e Price, 2009).

Quando utilizado terapeuticamente em seu estado natural, apresenta propriedades biomecânicas pobres, permanecendo no tecido apenas alguns dias antes de sofrer degradação enzimática pelos fibroblastos. Para permitir seu uso terapêutico com duração prolongada, é importante que ocorram modificações químicas em suas moléculas, que irão receber ligações cruzadas (*cross-linking*) entre as grandes cadeias poliméricas. Estas ligações acontecem com mais frequência em dois grupos funcionais da molécula: grupo carboxil e grupo hidroxil.

Este recurso permite que o AH mantenha a rigidez conformacional e retenha água. Os cross-linkers mais comumente utilizados são a divinilsufona e o diglicidil éter (Kablik *et al.*, 2009). Desde a década de 1990, o uso do gel de ácido hialurônico com propriedades enriquecidas pelas ligações cruzadas, principalmente com 1,4-butanediol diglicidil éter, vem crescendo (La Gatta *et al.*, 2016). Quanto maior a quantidade dessas ligações cruzadas, menor será o segmento entre as mesmas e maior será a força necessária para defletir esses segmentos, aumentando assim, a rigidez ou dureza do gel e conseqüentemente sua longevidade (Kablik *et al.*, 2009; Bansal *et al.*, 2010).

Numerosas funções biológicas do AH foram identificadas e o uso terapêutico do gel já é estabelecido na Medicina. É empregado em cirurgias oftálmicas, na Ortopedia e na Reumatologia, onde promove melhoria na lubrificação dos olhos, das articulações e atua no tratamento de processos inflamatórios. Na Dermatologia é utilizado como material de preenchimento de rugas e linhas de expressão, tendo tempo médio de duração de 4 a 12 meses, a depender da composição do gel e da área de aplicação (John e Price, 2009). Também está relacionado com o reparo tecidual, pois estimula a proliferação e a migração celular, a angiogênese, a re-epitelização e a proliferação de queratinócitos basais, reduzindo a formação de cicatrizes, além de ser apontado como um bom veículo para administração de outras drogas (Collins e Birkinshaw, 2008).

No âmbito da Odontologia, seu uso ainda é recente e limitado. Ensaios clínicos conduzidos desde a década de 1990, demonstraram que o uso tópico do gel de ácido hialurônico promove efeitos anti-inflamatório e antibacteriano no tratamento da gengivite e periodontite. Desde então, numerosas pesquisas

surgiram para avaliar esses efeitos (Pistorius *et al.*, 2005; Bansal *et al.*, 2010; Gontiya e Galgali, 2012).

Recentemente, o gel de AH vem sendo sugerido para uso terapêutico no preenchimento da papila interdentária, em pacientes que apresentam triângulos negros na zona estética (Becker *et al.*, 2010; Awartani e Tatakis, 2015). Esses defeitos podem surgir por perda óssea decorrente de periodontite, trauma, em áreas adjacentes a implantes e também após correção ortodôntica de apinhamentos dentários severos, principalmente em pacientes que apresentam dentes com coroas em formato triangular (Mcguire e Scheyer, 2007; Ziahosseini *et al.*, 2014). O fechamento dos triângulos negros através do preenchimento da papila interdentária com gel de ácido hialurônico parece ser uma alternativa conservadora às técnicas cirúrgicas tradicionais, que são, na maioria dos casos, invasivas e com resultados imprevisíveis, as quais requerem confecção de retalhos cirúrgicos, enxertos de tecido conjuntivo e até utilização de membranas absorvíveis (Mansouri *et al.*, 2013).

Apesar da publicação de artigos de casos clínicos com a utilização do gel de AH para tal efeito na papila interdentária (Becker *et al.*, 2010; Awartani e Tatakis, 2015) não existem relatos do comportamento histológico do tecido gengival após a aplicação do gel de AH, se há indução de perda óssea local, reação inflamatória tecidual ou morte celular, e do tempo de duração dos efeitos do produto.

Com base nessas observações, parece relevante pesquisar os aspectos histológicos da papila interdentária após preenchimento com gel de ácido hialurônico, utilizando o gel do AH inicialmente em modelo animal, para assim indicar seu uso seguro em humanos.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Avaliar por meio de análise histopatológica descritiva, aspectos microscópicos do tecido gengival de ratos após preenchimento com gel de ácido hialurônico, caracterizando eventos como:

2.1.1 presença de infiltrado inflamatório;

2.1.2 vascularização;

2.1.3 atividade fagocitária;.

2.1.4 presença de necrose e

2.1.5 material residual;

2.2 Avaliar, por meio de histomorfometria, a influência do tempo na área e no perímetro ocupados pelo gel do ácido hialurônico no tecido gengival de ratos.

3 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Nesta pesquisa, utilizou-se o método experimental *in vivo*. O estudo foi desenvolvido obedecendo às recomendações éticas e legais especificadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) em 2007. O projeto foi submetido à Comissão de Ética com Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e aprovado sob o número de protocolo 017/15.

3.1 AMOSTRA

Foram utilizados 43 ratos de laboratório (*Rattus norvegicus*), roedor da família *Muridae* e da variedade genética *Wistar*, com idade aproximada de 90 dias e massa corporal de 300 a 350 g. Apenas ratos machos foram incluídos na amostra, visando eliminar a variação hormonal associada às fêmeas.

Os animais foram divididos em 2 grupos: grupo ácido hialurônico (GAH), composto por 30 animais, o qual foi utilizado como grupo experimental; e grupo solução salina (GSS), composto por 12 animais, o qual foi utilizado como grupo controle positivo. Cada grupo foi subdividido em 6 grupos, composto por 5 animais em cada grupo ácido hialurônico e por 2 animais em cada grupo solução salina. Os grupos diferiram entre si pelos intervalos de tempo transcorridos desde a aplicação do material até o momento da eutanásia, estabelecidos em 0 dias (imediato), 1 dia, 3 dias, 5 dias, 6 dias e 7 dias (Tabela 1, página 7).

Tabela 1 Divisão da amostra entre os grupos GAH e GSS de acordo com o tempo de experimento

Amostra (n)	GSS	GAH	TEMPO
	2	5	0 dias (imediate)
2	5	1 dia	
2	5	3 dias	
2	5	5 dias	
2	5	6 dias	
2	5	7 dias	

Com o objetivo de avaliar as características histológicas normais do tecido gengival, um animal foi utilizado como controle negativo, no qual não foi injetado gel de ácido hialurônico nem solução salina.

Durante o período experimental, os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Faculdade de Medicina da UFRJ. Foram acomodados em gaiolas específicas para a criação de ratos e mantidos em condições controladas de temperatura (22 °C). A luminosidade foi controlada, com fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, permitindo um ciclo metabólico correto. Ração apropriada e água foram disponibilizadas *ad libitum*.

3.2 MATERIAL UTILIZADO

O material utilizado para aplicação no grupo ácido hialurônico (GAH), foi o gel de ácido hialurônico estabilizado, de origem não animal, concentração de 23 mg/ml e marca comercial Rennova Fill® (Innovapharma, Pinouet House, Union Street, Jersey, UK). As moléculas do AH que compõem Rennova Fill® são estabilizadas através da adição de 1,4-butanediol diglicidil éter.

No grupo solução salina (GSS) foi utilizada solução salina, contendo 0,9% em massa de NaCl em água destilada.

3.3 PROCEDIMENTO DE APLICAÇÃO DO MATERIAL

Os animais foram sedados através da utilização de uma caixa de indução conectada a um vaporizador universal administrando Isoflurano 1-2% (Instituto Biochimico Ind. Farm. LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A sedação inalatória foi o método selecionado, por apresentar rápida indução e recuperação, além de permitir melhor controle do plano anestésico. Após a anestesia confirmada, através de reflexo podal negativo, os animais foram retirados da caixa e mantidos anestesiados mediante o uso de máscara (Figura 1).

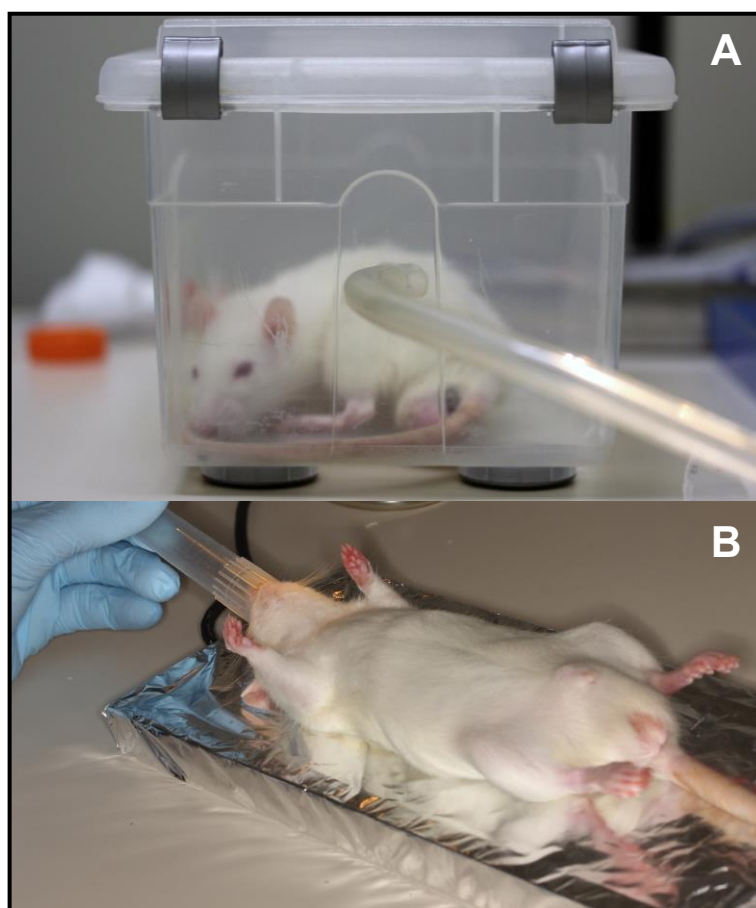


Figura 1 Procedimento de sedação inalatória. **A)** Animal na caixa de indução e **B)** Manutenção da anestesia mediante o uso de máscara.

A execução do procedimento foi realizada, através da aplicação de 0,02ml do gel de ácido hialurônico, no grupo GAH, sendo a mesma quantidade (0,02ml)

de solução salina aplicada ao grupo GSS. O local selecionado para o experimento foi o tecido gengival dos animais, na região correspondente à papila interdentária superior vestibular (Figura 2). A região de papila interdentária inferior foi excluída do experimento, após avaliação em estudo piloto, por apresentar constituição tecidual distinta em relação ao tecido gengival superior, apresentando-se mais delgada.



Figura 2 Procedimento de aplicação do material. **A)** Região de tecido gengival selecionada para a aplicação do material representado pela seta amarela; **B)** Momento da aplicação do material.

Para a aplicação do gel de ácido hialurônico e da solução salina, foram utilizadas seringas BD Ultrafine™ descartáveis, com capacidade para 30 unidades, a qual apresenta escala de graduação de $\frac{1}{2}$ em $\frac{1}{2}$ unidades,

registrando com precisão, doses pares, ímpares e de meia unidade, acopladas a agulhas de 6 mm de comprimento e calibre de 0,25 mm (31G). No momento da aplicação, a quantidade do gel de ácido hialurônico a ser utilizada nos animais do grupo GAH, era retirada de sua seringa original e depositada em uma das seringas descartáveis, para que o material fosse aplicado a cada animal, sem que houvesse contaminação. O mesmo procedimento foi realizado para a aplicação da solução salina nos animais do grupo GSS.

Após o procedimento, os animais de cada grupo foram acomodados nas gaiolas com a devida identificação, composta pelo nome do grupo, data de realização do experimento e quantidade de animais, impedindo que animais do grupo GSS e do grupo GAH fossem acondicionados em uma mesma gaiola.

3.4 EUTANÁSIA

Decorridos os intervalos de tempo de cada grupo, procedeu-se à eutanásia dos animais por meio da administração, via intraperitoneal, de 150 mg/kg de Ketamina® (União Química Farmacêutica Nacional S/A – Brasil) e 250 mg/kg de Xylazina® (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda – Brasil). Para a confirmação da morte, foi usado método físico de decapitação, através da utilização de guilhotina para roedores (Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

3.5 PREPARO HISTOTÉCNICO DAS PEÇAS ANATÔMICAS

Após a decapitação de cada animal, foi feita a dissecação e osteotomia da região da maxila abrangendo a área correspondente aos incisivos e a papila interdentária. As margens laterais do local da secção eram adjacentes à superfície distal de cada incisivo superior. A margem superior do bloco

compreendeu todo o tecido gengival correspondente à papila interdentária. A margem posterior foi definida em 3 mm a partir da superfície vestibular da papila interdentária (Figura 3). Para realização da osteotomia foi utilizado disco flexível diamantado monoface (KG Sorensen, Medical Burs Ind. e Com. de Pontas e Brocas Cirúrgicas Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) montado em micromotor de baixa rotação (Beltec LB100), sob irrigação constante com soro fisiológico.

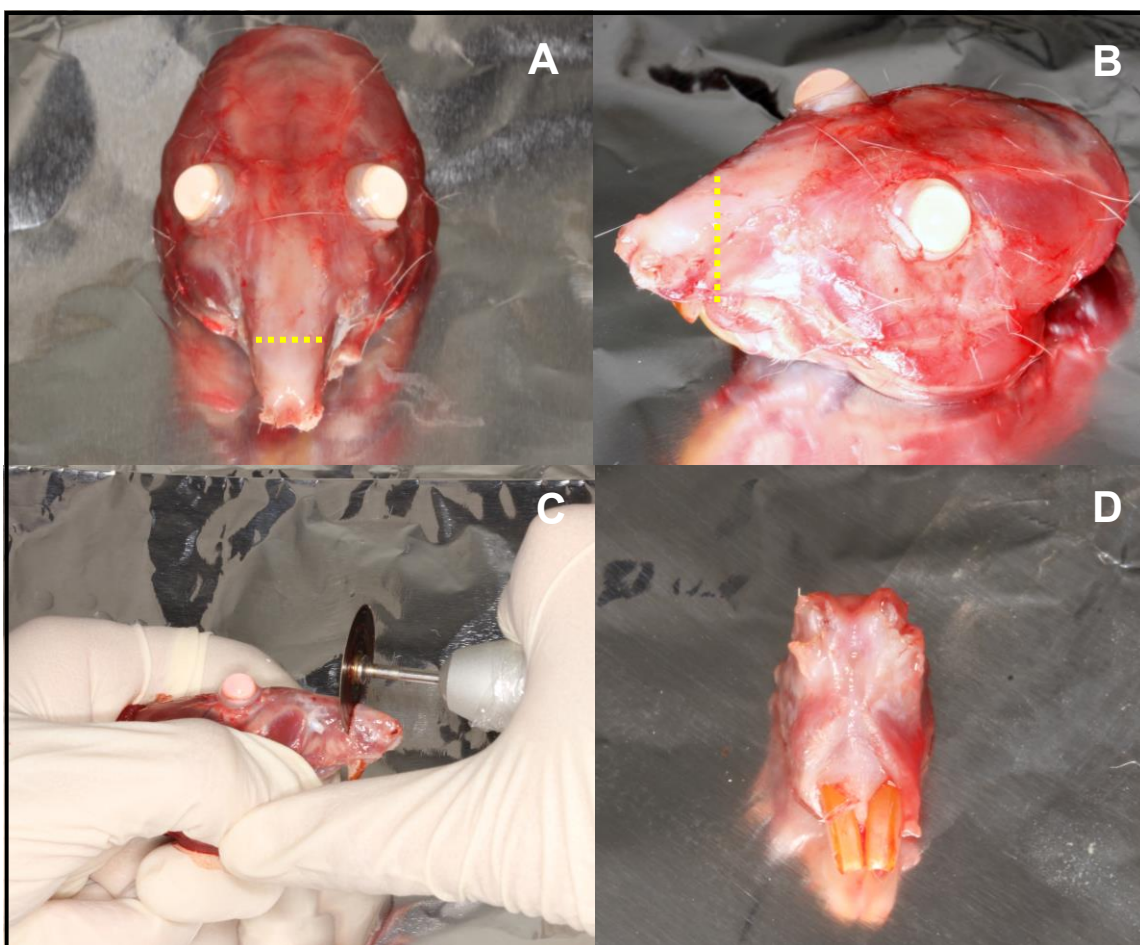


Figura 3 Procedimento de osteotomia. A) Ponto de corte da osteotomia indicado pela linha pontilhada amarela **B)** Ponto de corte da osteotomia indicado pela linha pontilhada amarela em vista lateral **C)** Osteotomia envolvendo incisivos superiores e papila interdentária; **D)** Bloco removido, observa-se a preservação da região da papila interdentária.

Os blocos foram mantidos em solução fixadora de formol tamponado a 10% (pH 7,0), à temperatura ambiente, por 24 horas. Em seguida, as peças foram submetidas à descalcificação por solução de Anna Morse (Citrato de Sódio a 20% e Ácido Fórmico a 50%), durante 15 dias. Verificada a descalcificação, por

método de punção com agulha, as peças passaram por processamento histotécnico, desidratadas em concentrações crescentes de etanol de 60% a 100% e cada espécime foi seccionado no sentido longitudinal vestibulo-lingual no centro da papila interdentária (Figura 4), originando duas peças, as quais foram posicionadas lado a lado e em seguida foram emblocadas em parafina.



Figura 4 Local da secção realizada no bloco anatômico (linha pontilhada amarela), de sentido longitudinal e direção vestibulo-lingual, originando duas peças, as quais foram posicionadas lado a lado e então emblocadas em parafina.

Posteriormente foram realizados cortes histológicos, com espessura aproximada de $4\mu\text{m}$ e a montagem das lâminas foi realizada de maneira que cada uma constasse de 3 cortes histológicos de cada animal, sendo escolhidos os três primeiros cortes realizados. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE), analisadas em microscópio de luz Axioskop 2 plus (Carl Zeiss Light Microscopy – Gottingen, Germany). As áreas selecionadas de cada lâmina foram fotografadas através da câmera Axiocam MRC® (Carl Zeiss Light Microscopy – Gottingen, Germany) acoplada ao microscópio, utilizando-se lentes de aumento de 10x e 40x.

As fotografias foram utilizadas para avaliação qualitativa do tecido gengival e para avaliação quantitativa da área e do perímetro ocupados pelo gel de AH e pela solução salina no tecido gengival.

3.5.1 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Foram obtidas 126 imagens com objetivas de 10x e 40x, as quais foram utilizadas para análise histopatológica, através da descrição de aspectos microscópicos do tecido gengival dos animais após o preenchimento com gel de ácido hialurônico e solução salina, compreendendo aspectos de reação inflamatória, neovascularização, atividade fagocitária, necrose e material residual.

3.5.2 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE ÁREA E PERÍMETRO

Foi obtida uma imagem de cada corte histológico com objetiva de 10x, totalizando 3 fotografias por cada animal, as quais foram destinadas para análise histomorfométrica, através da mensuração da área e do perímetro ocupado pelo gel de AH e pela solução salina no tecido gengival. A média obtida a partir dos 3 valores de cada animal foi utilizada para as análises estatísticas. A obtenção desses valores foi realizada através do software Image J versão 1.50b (software de domínio público desenvolvido pelo National Institutes of Health - Bethesda, Maryland, USA) (Figura 5, página 14). O procedimento foi repetido com 10 dias de intervalo, obtendo-se ICC de 0,942.

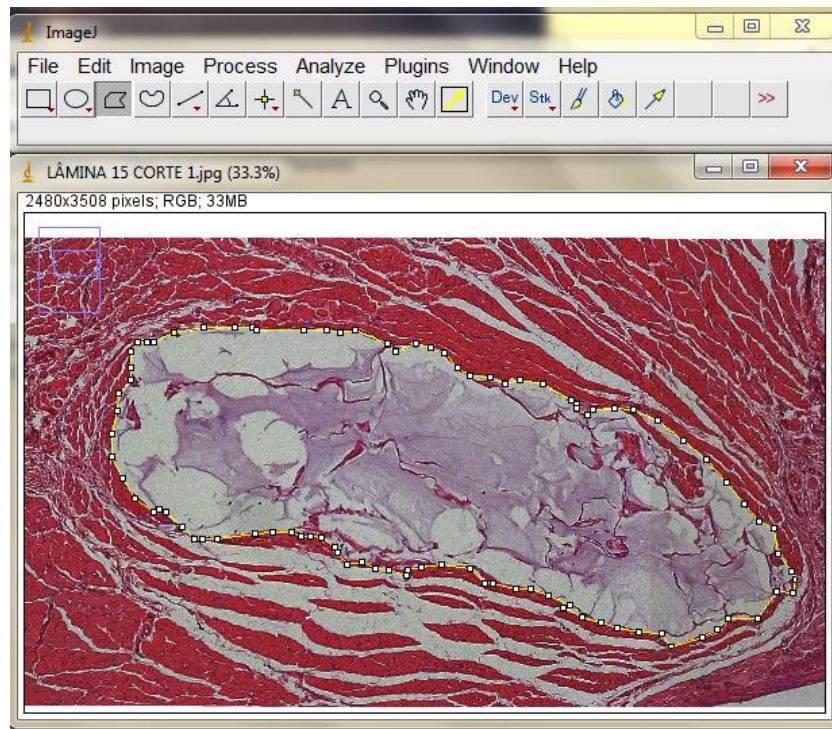


Figura 5 Representação do software ImageJ, utilizado para marcação de pontos para avaliação quantitativa da área e do perímetro em corte histológico sob objetiva de 10x.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram processados através do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Science* versão 20.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA), com nível de significância de 5%. A verificação da normalidade e da homogeneidade foi realizada por meio do teste de Shapiro-Wilk e do teste de Levene, respectivamente.

Como a amostra apresentou distribuição normal, foi utilizado teste paramétrico ANOVA, tendo como sujeito o tempo do experimento, e como variáveis a área e o perímetro, com o objetivo de avaliar a possível alteração da área e do perímetro ocupado pelo gel de ácido hialurônico no tecido gengival do rato, com o decorrer do tempo do experimento. O pós teste de Bonferroni foi

realizado para identificar entre quais grupos a diferença apresentou-se significativa.

Análise de correlação, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson, foi realizada a fim de avaliar a influência do tempo na diminuição do espaço ocupado pelo gel de AH no tecido gengival do animal.

4 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

ARTIGO 1

HISTOLOGICAL ASPECTS OF INTERDENTAL PAPILLA OF RAT AFTER FILLING WITH HYALURONIC ACID GEL.

Figueiredo, L.M.; Almeida, F.; Morais, L.S.; Araújo, M.T.S

Artigo a ser submetido à Dental Materials (**ISSN:** 0109-5641)

ABSTRACT

Introduction: The purpose of this study was to investigate the initial histological effects of hyaluronic acid gel in the interdental papilla of rat model, so its use may be indicated in human. **Methods:** Forty-three male Wistar rats were randomly divided into 2 groups, the hyaluronic acid group (GAH) and the saline solution group (GSS). GAH group had 6 groups with 5 animals each and the GSS group had 6 groups with 2 animals each. One animal was designed to negative control. The GAH group received an injection of 0,02ml of hyaluronic acid gel (23mg/ml) in the upper buccal interdental papilla and the GSS group received 0,02ml of normal saline solution 0,9%. The groups differed by evaluation time: 0 days (immediately), 1 day, 3 days, 5 days, 6 days and 7 days. Histological slides were designated to

histopathological analysis, describing events like: inflammatory reaction, vascularization, phagocytic activity, necrosis, and residual material, and to histomorphometry, to measure area and perimeter occupied by the hyaluronic acid gel in the gingival tissue. **Results:** There was intense inflammatory reaction 1 day after injection of the gel, which decreased in intensity in the following evaluation periods, behavior similar to neovascularization. Thin capsule formation occurred involving the material from the third day evaluation. No necrosis was observed. Residual material took shape and variable size within the tissue. The variable area showed no significant difference between the periods of experiment ($p = .265$). Conversely perimeter values for GAH 6 and GAH 7 groups differ significantly ($p = .044$) from the values recorded in the initial periods of experiment. The Pearson's correlation between area and time showed a weak negative association ($r = .461$). The correlation between perimeter and time showed a moderate negative association ($r = .585$). **Conclusions:** it was observed that HA gel caused acute inflammatory reaction of short duration, increased local vascularization, capsule formation involving the material was observed, but necrotic areas were not identified.

KEY WORDS: Hyaluronic acid; interdental papilla; Histology; gingival aspects.

INTRODUCTION

Growing demand for smile aesthetic improvement requires constantly updated professionals, researches in order to develop new biomaterials, as well as, new applications for the existing ones.

Hyaluronic acid (HA) is a natural biopolymer present in the human body, found in the umbilical cord, eyes, joint fluid and dermis¹. Its commercial use is well established and routinely employed for medical issues, such as ophthalmic surgeries, orthopedics and rheumatology. The HA main use concerning aesthetics is for soft tissue augmentation, wrinkle filling, and softening expression lines².

Hyaluronic acid has been recently adapted for dental purposes, literature reports its therapeutic application as an adjunct for periodontal diseases treatment^{3; 4; 5}, and more recently as interdental gingival papilla filling material, representing an alternative to gingival defects correction, such as black triangles^{6; 7}. These gingival defects are caused by several factors, including bone loss adjacent to implants or due to periodontitis, trauma and after orthodontic correction of severe dental crowding. Black triangles are difficult to solve, as they require invasive techniques which presents unpredictable results⁸.

HA use as a free gingival tissue filling, in order to aesthetically correct black triangles, has been reported in humans, although, information about its biological behavior in gingival tissue is scarce. This study aimed to investigate and describe histological effects of hyaluronic acid gel in contact with interdental papilla of rats, so its use may be assured in human.

MATERIALS AND METHODS

Forty-three male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing approximately 300 g each, were experimental animals of choice for this study. Rats were placed into standard cages (five per cage) under controlled temperature (22 °C) and light cycles of 12-hour light and 12-hour dark. They were fed with solids and had free access to purified water. This research was approved by Ethics Commission on Animal Use in Scientific Research at the Health Center of the Federal University of Rio de Janeiro. Rats did not develop systemic complications and remained healthy during the entire experimental period.

Rats were randomly divided into two groups: hyaluronic acid group (GAH) was the experimental group, and saline solution group (GSS) was the positive control group. GAH group was subdivided into 6 groups with 5 animals each, and the GSS group was subdivided into 6 groups with 2 animals each. Groups were evaluated after previously set numbers of days: 0 days (immediately), 1 day, 3 days, 5 days, 6 days and 7 days. In order to evaluate normal histological characteristics of the tissue, one animal was used as negative control group, and was not injected with hyaluronic acid gel, neither saline solution.

Rats were sedated with Isoflurane 1-2%, and had their upper vestibular interdental papilla injected with 0,02 ml of Rennova Fill® 23 mg/ml (Innovapharma, Pinouet House, Union Street, Jersey, UK). Hyaluronic acid molecules in Rennova Fill® are non-animal origin and stabilized by adding 1,4-butanediol diglycidyl ether. GSS rats received 0,02ml saline solution 0,9% injected in their upper vestibular interdental papilla. Injections were performed using 0.3 mL syringe and 31 G needle.

After each subgroup evaluation in the predetermined period of time, animals proceeded to euthanasia through intraperitoneal injection of 150mg/kg Ketamine® (União Química Farmacêutica Nacional S/A - Brazil) and 250mg/kg Xylazine® (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda - Brazil). In order to confirm deaths, a physical method of decapitation by mini guillotine for rodents was used (Insight™, Ribeirão Preto, SP, Brazil).

Maxillary tissue sections comprising upper central incisors and interdental papilla were then dissected and osteotomized. Sections were fixed in 10% neutral buffered formalin during 24 hours, and decalcified in Anna Morse's solution (Sodium citrate + 20% Formic acid 50%) during 15 days. Each segment was cut in the middle of interdental papilla origin two parts, which were positioned side by side and then embedded in paraffin and cut into longitudinal tissue sections of 4 µm-thick, from vestibular to lingual direction, followed by H&E staining.

The images of each tissue section were captured using x10 and x40 magnification. Images under x40 magnification were used for histopathological analysis, describing microscopic aspects of rat's gingival tissue after hyaluronic acid injection and saline solution injection, characterizing events such as inflammatory reaction, vascularization, phagocytic activity, necrosis, and residual material.

One image of each histological section were obtained at 10X magnification, totaling 3 photos per animal, were designed for histomorphometry in order to evaluate area and perimeter, and to compare groups. Mean rates for the three measurements of each animal were used for statistical analysis. These values were obtained using Image J software version 1.50b (public domain software developed by the National Institutes of Health - Bethesda, Maryland, USA). This

procedure was repeated after 10 days, and Intraclass correlation coefficient (ICC) was 0.942. Histological slides randomly numbered were analyzed by a single blind examiner.

Statistical tests were performed using SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) considering a 5% significance level. An analysis of variance (ANOVA), with time as a subject, and area and perimeter as variables was used.

Normality and homogeneity analysis were performed through Shapiro-Wilk test and Levene test, respectively. Correlation analysis was obtained via Pearson's Correlation Coefficient in order to evaluate the relationship between experiment duration and area occupied by injected material, thus, influence of time on the quantity of material present in the tissue could be estimated. Strong linear association was indicated by $r \geq 0.80$ ($P \leq 0.01$), moderate association by $0.56 \leq r < 0.80$ ($P \leq 0.05$), and weak association by $r < 0.56$ ($P > 0.05$).

RESULTS

No animal died during studying period and no postoperative systemic complications were observed, therefore, animals remained healthy throughout experiment. There were no signs of allergic reaction and no tumors were detected at the injection site or surrounding tissues.

Histopathological analysis

Negative control group, used to describe normal characteristics of rats' interdental papillae, exhibited parakeratinized stratified squamous epithelium invaded by small projections of connective tissue.

Saline solution group animals had no histological abnormalities when compared to animals of negative control group. Saline solution was uniquely identified in the tissue from groups GSS0 and GSS1.

Hyaluronic acid gel was presented as a basophilic material in all groups; it was stained purple and assumed different forms and sizes in the tissue. HA Gel was deposited at the muscle layer below connective tissue and parallel to the muscle fibers in most animals. Material migration within the tissue was not identified in any group.

GAH0

There were no cells indicating inflammatory reaction in any histological section in this group of animals, and no changes were observed in local vasculature or phagocytic activity. Edema or necrotic areas were not present. Analysis were conducted immediately after hyaluronic acid gel injection, and it might explain tissue's response due to insufficient time in order to occur inflammatory chemical mediator's release (Figures 1 and 2) .

GAH 1

Histological sections exhibited a large number of cells with hyperchromatic and lobed nuclei, suggesting presence of intense inflammatory infiltrate, composed by neutrophils and eosinophils surrounding the entire periphery of hyaluronic acid gel and connective tissue region (Figures 1B and 2B). Structural characteristics of cells observed in the slides suggested the presence of neutrophils and eosinophils, because these are cells found in acute inflammatory response. Edema between muscle fibers was observed, resulting from fluid and plasma proteins exudation during acute inflammation.

Compared to control group, blood vessels number increased, particularly at the periphery of the injected material, suggesting neovascularization and increased blood flow, responsible for inflammatory cells supply.

Phagocytic activity was not observed, and there was no capsule formation involving the residual material. No necrosis area was identified.

GAH 3

Acute inflammatory infiltrate was also observed in this group animals, although, intensity was lower compared to GAH 1, due to inflammatory cells location mostly on the periphery of injected material, and less in adjacent areas (Figures 1C and 2C).

Vascularization remained increased, and new blood vessels were observed at the periphery of remaining AH gel. Edema was still present and no necrotic area was found (Figure 2C).

A thin capsule composed by fusiform cells (possibly fibroblasts), involving hyaluronic acid gel was visualized in slides of GAH3's animals. As the experiment progressed, this capsule became more evident, although, it remained thin.

GAH 5

Mixed inflammatory infiltrate was observed, suggesting the presence of neutrophils and cells which nuclei occupied almost the entire cytoplasm, probably lymphocytes, but showing lower intensity compared to GAH 1 (Figures 1D and 2D). Quantity of these cells diminished with time, suggesting chronicity or reduction of inflammatory process. Large cells with eosinophilic nuclei were observed, probably macrophages, indicating the beginning of phagocytic activity.

When compared to GAH 1 group, which had most histological variance, GAH 5 did not present vascularity augmentation, although, adjacent

microcirculation remained active. Edema was diminished in this group and no necrosis areas were identified. Capsule surrounding hyaluronic acid gel was more evident, which might be result of better cellular organization.

GAH 6

Differently from other animals, one subject of this group presented hyaluronic acid gel deposited on connective tissue layer, instead of muscle tissue layer.

Inflammatory infiltrate was observed, probably composed by lymphocytes and macrophages, although, amount was diminished compared to GAH 1. Blood vessels' quantity and arrangement did not vary from previous groups, but microcirculation on hyaluronic acid gel periphery remained active. Edema and necrosis were not detected in this group (Figures 1E and 2E).

Capsule involving hyaluronic acid gel was more distinct and thicker when compared to other experimental groups. A greater number of fusiform cells were found in the capsule and adjacent to it, probably fibroblasts (Figures 1E and 2E).

All animals of this group presented tissue projections towards the injected material, as well as, connective tissue invading muscle tissue and involving most or the entire residual gel. It suggests the proliferation of fibroblast and, possibly, collagen, named desmoplastic reaction or connective tissue production (Figure 2E).

GAH 7

Inflammatory cells infiltrate was observed, probably lymphocytes, although, intensity was decreased when compared to GAH 1 (Figures 1F and 2F). Cells similar to macrophages were increased when compared to previous groups, suggesting phagocytic activity. Necrosis or edema were not identified.

Presence of tissue projections involving all or most residual gel could also be observed in this group. Between connective tissue projections and hyaluronic acid gel, there was a capsule composed by fusiform cells, probably fibroblasts, involving the material, also described in previous experimental groups.

Volume and pressure exerted by the material on interdental papilla might induce bone resorption of alveolar crest, but no evidence was found among samples, possibly due to the distance between deposit site and bone.

Histomorphometric analysis

Variable area showed no statistically significant differences throughout experiment ($p = 0.265$). Perimeter values for GAH 6 and GAH 7 groups differed significantly ($p = 0.044$) from values recorded for GAH 0 and GAH 1, suggesting breakage and degradation of injected material (Table 1).

Pearson's correlation between area and time had weak negative association ($r = 0.461$), i.e., area's value tended to slightly decrease over time. Correlation between perimeter and time had moderate negative association ($r = 0.585$) (Table 1). i.e., perimeter's value tended to moderately decrease over time (Figures 1 and 2).

DISCUSSION

In dentistry, experimental studies reported the successful application of the hyaluronic acid gel for decades, since the use as treatment for temporomandibular joint osteoarthritis⁹, wound healing improvement after tooth extraction¹⁰ and as scaffold for cells during pulp regeneration¹¹.

Numerous studies have emerged describing the application on patients with periodontal disease. In a systematic review, Bertl and colleagues (2015), found

moderate positive effect of HA as an adjunct of periodontal disease treatment, due to its capacity to activate and neutralize inflammatory reactions properties, moreover, HA presented bacteriostatic, healing and anti-edematous effects, especially through topical administration^{3; 4; 5}.

There was no evidence of systemic complications, allergic processes or death during the execution of this study, demonstrating high biocompatibility of HA gel, as described in the literature ^{7; 12; 13; 14; 15; 16}.

In order to evaluate initial reactions of rat's interdental papilla after HA gel injection, time intervals defined for this study were the smallest possible, so that no tissue change were neglected.

HA gel injection followed manufacturer's instructions and it was in accordance with methodology described in the literature; 0.02 mL HA gel was injected using a 0.3ml syringe¹⁶. Hyaluronic acid gel used was Rennova Fill® 23mg / ml, which concentration is considered tolerable by rats¹⁴. Material of choice was non-animal origin and its molecules were stabilized by addition of 1,4-butanediol diglycidyl ether, this modification is found in most HA based dermal fillers¹⁷.

Area occupied by HA gel decreased during the study, although, it was not statically significant. The same situation was observed by Huh and colleagues in their study in 2015. Authors used the same animal model and similar methodology to compare, clinically and histologically, submucosal oral tissue behavior after injecting four substances, including HA.

Present study found acute inflammatory reaction in the first evaluation day after HA gel application, and posterior reduction of acute infiltrate over studying time. A previous study evaluated HA gel injection in rats' tongues, and observed

moderate and severe acute inflammatory reaction seven days after application, characterized by presence of polymorphonuclear infiltrate¹⁴, different from that this study observed. Possibly, the reaction might have been classified as severe by this authors, due the impossibility to compare findings within shorter periods of time during experiment. The present study was able to evaluate initial tissue reactions, since first hours after injection, when acute inflammatory reaction was firstly detected. Analysis concluded that inflammation lessen in the seventh day compared to the initial evaluation. Thus, when compared to the seventh day, the shortest evaluation period implemented by the mentioned study, inflammatory reaction diminished.

Inflammatory reaction decreased during the experimental periods of this study, classified as mild at seven day of experiment. This results were similar to that found by Perazzo and colleagues (2007), who evaluated inflammatory reaction to hyaluronic acid in animal model, analyzing rabbits' vocal folds muscles after hyaluronic acid injection. They observed an acute inflammatory process, classified as mild for a seven days evaluation period. Previous reports corroborate with this study results, identifying reduction of inflammatory reaction over time^{13; 15; 16}.

Present study found peripheral vascularization increase one day after injecting HA in interdental papilla, although, it was not quantified. These findings match to the results obtained by Moure et al (2012), who compared histological behavior of rats' tongues after hyaluronic acid and polymethylmethacrylate injections over time. After seven days, researchers observed a statistically significant increase of blood vessels number in the group that received HA applications¹⁵.

Three days after injection of hyaluronic acid gel, was observed formation of a thin capsule around the material in this study, firstly found and described on the third day of evaluation but remained present in GAH5, GAH6 e GAH7. Elzayat et al (2008) injected an association of Dextranomer (Dx) and HA subcutaneously in rats' abdomen, and found similar capsule formation.

Literature does not report oral tissue's necrosis after hyaluronic acid injection in animal samples, confirming this study findings¹⁸.

Residual material was described in the present study as basophilic, stained purple and disposed in varied shapes and sizes inside muscle tissue. Loureiro Borghetti and colleagues (2012) also reported that characteristics.

This study did not observed abscesses formation and ulcerated lesions on any time of experiment. Although, other studies ^{14; 15} confirm these finding occurrence among animals, especially at seven day of evaluation.

Despite the small number of literature reports concerning biological behavior of gingival tissue after hyaluronic acid gel injection, some studies describe its use to fill interdental papilla in humans. Becker and colleagues (2010) evaluated 14 interdental papillae previously injected with HA gel and obtained approximately 94% success rate, treatment results duration varied from 6 to 25 months.

Mansouri and colleagues (2013) evaluated 21 interdental papillae and results confirmed 50% aesthetic improvement in 43% of papillae during 6 months. Awartani and colleagues (2015) affirmed that complete filling of papillae is unusual, complete filling occurred in less than 20% of cases evaluated. Their results defined 50% aesthetic improvement in 47% of interdental papillae. This

authors recommend this technique as an alternative to invasive treatments for gingival defects correction, especially on aesthetic areas.

Although not significant, there was a decrease in the area occupied by the HA gel in this study, according to the literature, where Huh et al (2015) also observed continuous decrease in the area occupied by the material. The authors used the same animal model and similar methodology to compare clinically and histologically the behavior of submucosal oral tissue after filling with 4 substances including the AH.

The perimeter occupied by AH gel on rat's gingival tissue has significantly decreased among the groups of this research. It was not found in the literature any previous study evaluating perimeter change occupied by gel.

Saline solution injected on animals of GSS groups showed an accelerated absorption, since by the third day of evaluation was no longer found saline solution in gingival tissue of rats, demonstrating a faster degradation when compared to the AH gel. According to the findings of Huh et al. (2015), which also makes comparisons between the AH gel and saline solution in the gingival tissue of rats, at four weeks there was no evidence of saline solution in animals. Another finding of this author corroborates with the findings in this study, were no histological abnormalities was found in rats of GSS groups.

The animal model used for the development of this research was chosen, among other reasons, due to experimental work in rats claiming to be a correlation of these animals with humans, characterized by a matching 30-day life of man for each day of rat's life.

CONCLUSION

It was observed that there was a significant decrease in the perimeter occupied by the hyaluronic acid gel with the evolution of the study period, suggesting the process of breaking and material degradation. It was observed that HA gel caused acute inflammatory reaction of short duration, increased local vascularization, capsule formation involving the material, but necrotic areas were not identified.

REFERENCES

- 1 FRASER, J. R.; LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. **J Intern Med**, v. 242, n. 1, p. 27-33, Jul 1997. ISSN 0954-6820. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9260563> >.
- 2 ROBERT, L. Hyaluronan, a truly "youthful" polysaccharide. Its medical applications. **Pathol Biol (Paris)**, v. 63, n. 1, p. 32-34, Feb 2015. ISSN 1768-3114. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25182691> >.
- 3 PISTORIUS, A. et al. The clinical application of hyaluronic acid in gingivitis therapy. **Quintessence Int**, v. 36, n. 7-8, p. 531-8, 2005 Jul-Aug 2005. ISSN 0033-6572. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15999421> >.
- 4 BANSAL, J.; KEDIGE, S. D.; ANAND, S. Hyaluronic acid: a promising mediator for periodontal regeneration. **Indian J Dent Res**, v. 21, n. 4, p. 575-8, 2010 Oct-Dec 2010. ISSN 1998-3603. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21187628> >.
- 5 GONTIYA, G.; GALGALI, S. R. Effect of hyaluronan on periodontitis: A clinical and histological study. **J Indian Soc Periodontol**, v. 16, n. 2, p. 184-92, Apr 2012. ISSN 0975-1580. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23055583> >.
- 6 BECKER, W. et al. Minimally invasive treatment for papillae deficiencies in the esthetic zone: a pilot study. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 12, n. 1, p. 1-8, Mar 2010. ISSN 1708-8208. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19843105> >.

- 7 AWARTANI, F. A.; TATAKIS, D. N. Interdental papilla loss: treatment by hyaluronic acid gel injection: a case series. **Clin Oral Investig**, Nov 2015. ISSN 1436-3771. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26613740> >.
- 8 ZIAHOSSEINI, P.; HUSSAIN, F.; MILLAR, B. J. Management of gingival black triangles. **Br Dent J**, v. 217, n. 10, p. 559-63, Nov 2014. ISSN 1476-5373. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25415009> >.
- 9 TRIANTAFFILIDOU, K.; VENETIS, G.; BIKA, O. Efficacy of hyaluronic acid injections in patients with osteoarthritis of the temporomandibular joint. A comparative study. **J Craniofac Surg**, v. 24, n. 6, p. 2006-9, Nov 2013. ISSN 1536-3732. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24220392> >.
- 10 MENDES, R. M. et al. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. **Arch Oral Biol**, v. 53, n. 12, p. 1155-62, Dec 2008. ISSN 1879-1506. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18692778> >.
- 11 INUYAMA, Y. et al. Effects of hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 92, n. 1, p. 120-8, Jan 2010. ISSN 1552-4981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19802830> >.
- 12 MONHEIT, G. D.; COLEMAN, K. M. Hyaluronic acid fillers. **Dermatol Ther**, v. 19, n. 3, p. 141-50, 2006 May-Jun 2006. ISSN 1396-0296. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16784513> >.
- 13 ELZAYAT, E. A. et al. Volume changes and histological response to injected dextranomer/hyaluronic acid copolymer (Zuidex) and collagen (Contigen) in rats. **Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct**, v. 19, n. 2, p. 247-52, Feb 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17639343> >.
- 14 LOUREIRO BORGHETTI, R. et al. Clinical and histologic evaluation of effects of hyaluronic acid in rat tongue. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 113, n. 4, p. 488-94, Apr 2012. ISSN 2212-4411. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22676930> >.
- 15 MOURE, S. P. et al. Clinical and pathological characteristics of polymethylmethacrylate and hyaluronic acid in the rat tongue. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 41, n. 10, p. 1296-303, Oct 2012. ISSN 1399-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22571863> >.
- 16 HUH, J. B. et al. Effects of PMMA and Cross-Linked Dextran Filler for Soft Tissue Augmentation in Rats. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 12, p. 28523-33, 2015. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26633376> >.

- 17 LA GATTA, A. et al. Hyaluronan dermal fillers via crosslinking with 1,4-butandiol diglycidyl ether: Exploitation of heterogeneous reaction conditions. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 104, n. 1, p. 9-18, Jan 2016. ISSN 1552-4981. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25611588> >.
- 18 PERAZZO, P. S. et al. A study of the histological behavior of a rabbit vocal fold after a hyaluronic acid injection. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 73, n. 2, p. 171-8, 2007 Mar-Apr 2007. ISSN 1808-8694. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17589724> >.

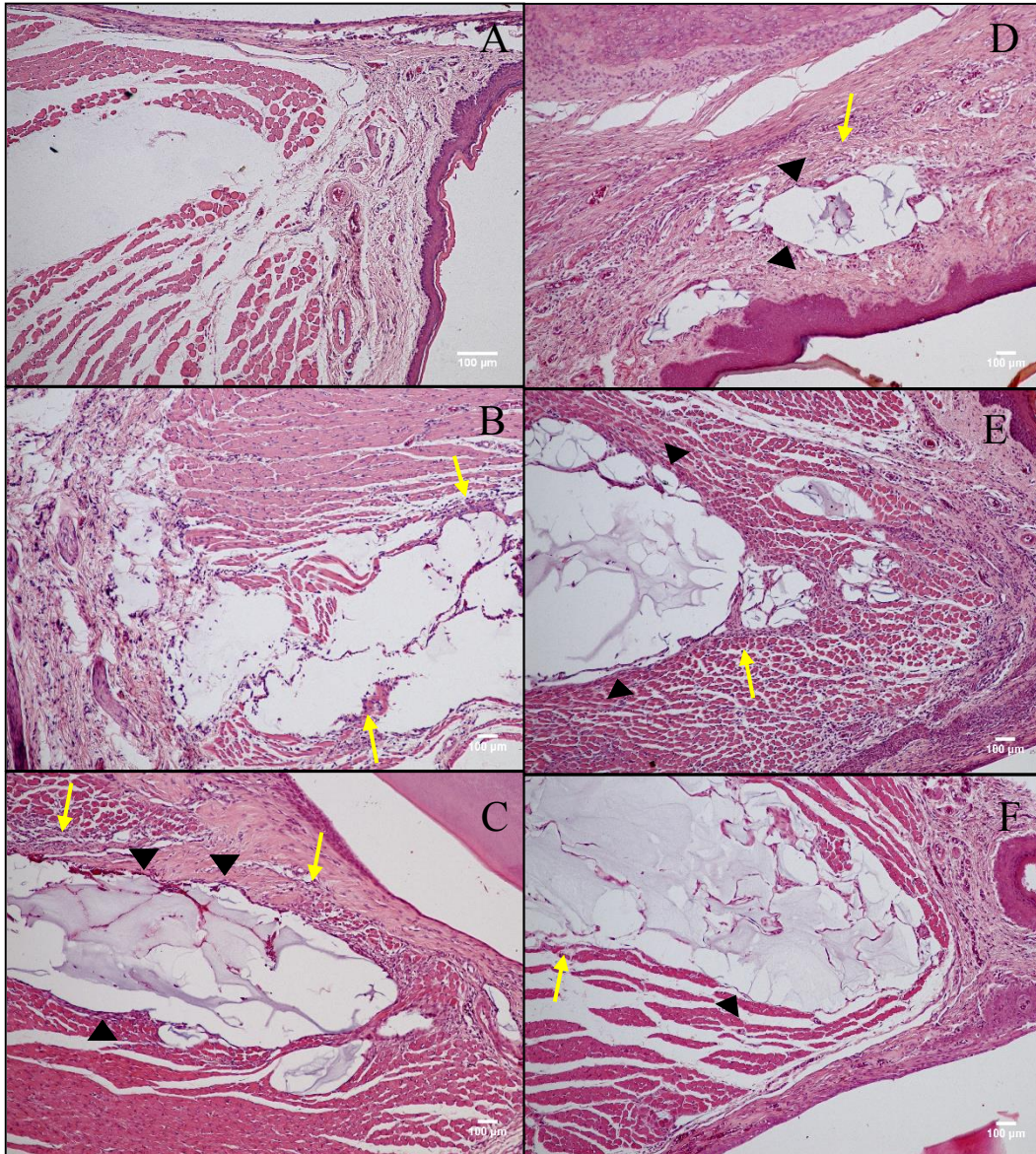


Figure 1 Histopathological analysis. **A)** Group GAH 0 showing no inflammatory reaction; **B)** Group GAH 1 showing acute inflammatory reaction (yellow arrow); **C)** Group GAH 3 showing acute inflammatory reaction (yellow arrow) and formation of a thin capsule (black arrowhead); **D)** Group GAH 5 showing inflammatory response (yellow arrow) and the presence of a thin capsule (black arrowhead) ; **E)** Group GAH 6 showing slighter inflammatory response (yellow arrow), the capsule presents larger (black arrowhead) and desmoplastic reaction is detected; **F)** Group GAH 7 showing slighter inflammatory response (yellow arrow) and the capsule presents larger (black arrowhead) . 10x Magnification and scale bar 100um.

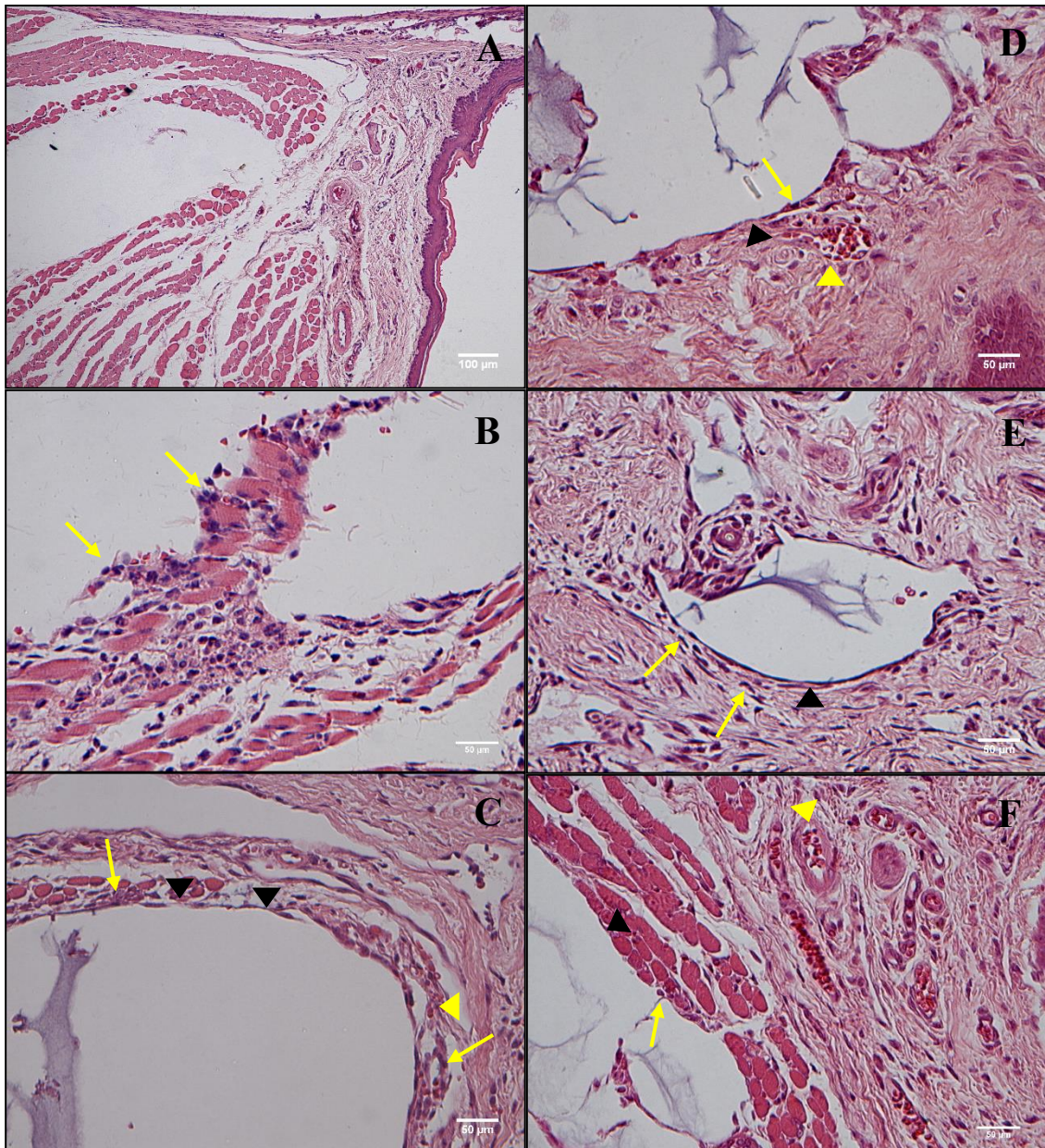
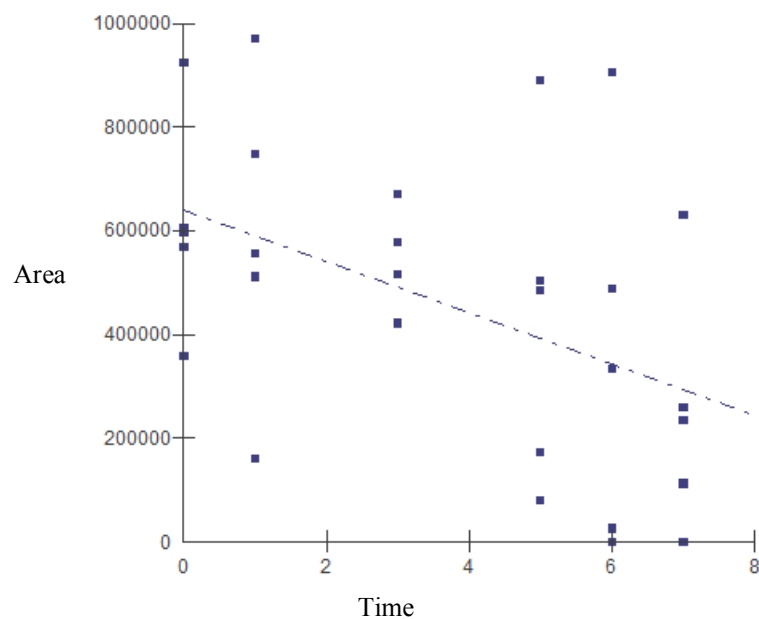


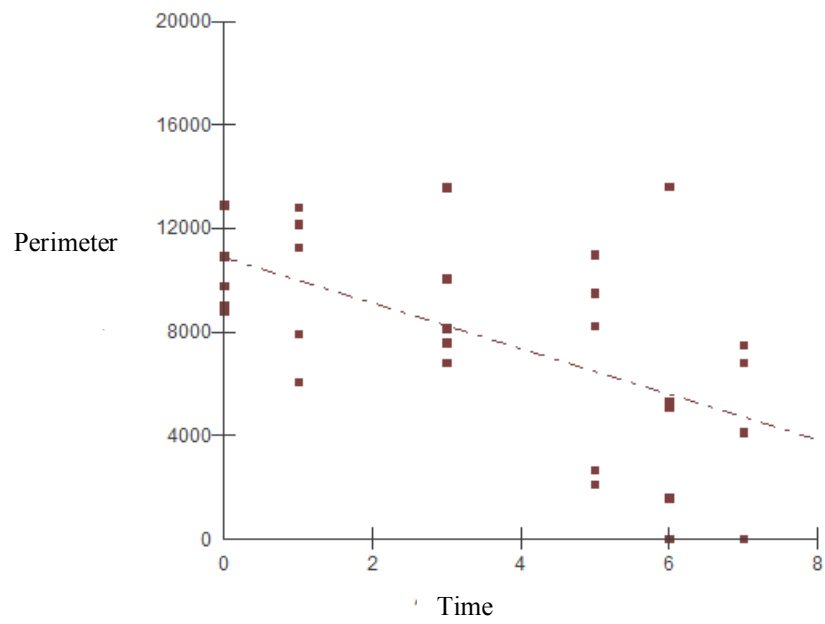
Figure 2: Histopathological analysis. **A)** Group GAH 0 showing no inflammatory reaction; **B)** Group GAH 1 showing acute inflammatory reaction (yellow arrow), with increase in the blood vessels (yellow arrowhead) ; **C)** Group GAH 3 showing acute inflammatory reaction (yellow arrow), increase in the blood vessels (yellow arrowhead) and formation of a thin capsule (black arrowhead); **D)** Group GAH 5 showing inflammatory response (yellow arrow), active microcirculation (yellow arrowhead) and the presence of a thin capsule (black arrowhead); **E)** Group GAH 6 showing slighter inflammatory response (yellow head), microcirculation remains active (yellow arrowhead), the capsule presents larger (black arrowhead) and desmoplastic reaction is detected; **F)** Group GAH 7 showing slighter inflammatory response (yellow arrow), microcirculation remains active (yellow arrowhead) and the capsule presents larger (black arrowhead). 40x Magnification and scale bar 50um

Table 1 ANOVA with Bonferroni post-test for variables (area and perimeter) compared to time groups and Pearson correlation test for the association of the variables over time.

Time	Area	Perimeter
GAH0	611322.30	10282.25
GAH1	589896.70	10037.65
GAH3	522419.23	9232.05
GAH5	427184.70	6703.76
GAH6	351133.23	5118.92*
GAH7	247955.20	4516.01*
p-valor	0.265	0.044
r-valor	-0.461	-0.585



Graphic 1 Linear Dispersion of variable area over time. Note the larger dispersion values in relation to the straight line indicating a slight decrease in the value of the area with increasing time, since the differences were not significant between these values.



Graphic 2 Linear Dispersion of variable perimeter over time. Note lower dispersion of values in relation to the straight line indicating a moderate decrease in the value of perimeter with increasing time, with a significant difference between group GAH 6 and GAH7

5 RESULTADOS

As imagens foram analisadas por um único examinador cego, através da atribuição de números aleatórios às lâminas histológicas. Os animais não desenvolveram nenhuma complicação sistêmica e permaneceram saudáveis durante todo o experimento, não havendo nenhuma morte.

5.1 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

O grupo controle negativo, utilizado para descrição das características normais da papila interdentária do rato, evidenciou a presença de epitélio estratificado pavimentoso paraqueratinizado invadido por pequenas projeções de tecido conjuntivo (Figura 6).

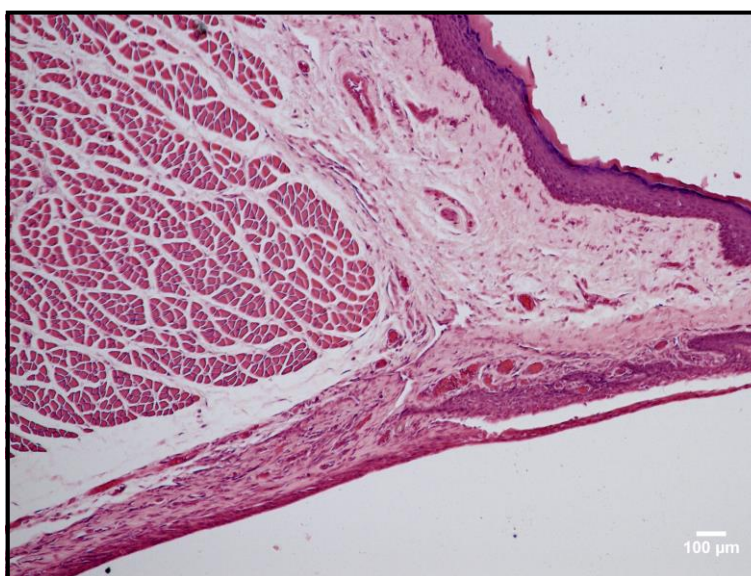


Figura 6 Aspecto histológico da papila interdentária do animal utilizado como controle negativo. Objetiva de 10x e barra de escala 100 μ m.

Os animais do grupo GSS não apresentaram nenhuma anormalidade histológica quando comparados ao animal do grupo controle negativo. Não foi observada reação inflamatória, alteração vascular, presença de necrose ou formação de cápsula relacionada à presença da solução salina no tecido gengival do rato. A solução salina foi identificada apenas no tecido gengival dos animais dos grupos GSS0 e GSS1, e já não foi observada nos demais grupos avaliados, sugerindo que a degradação da solução ocorre de maneira acelerada (Figura 7, página 39).

Em todos os grupos GAH, o gel de AH apresentou-se como um material basofílico, corado em roxo e assumindo formas e tamanho diversos no tecido gengival (Figuras 8 e 9, Páginas 44 e 45). Foi observado que o gel se depositou, em quase todos os animais, na camada muscular, imediatamente abaixo do tecido conjuntivo, paralelamente às fibras musculares. Não foi identificada a migração do material dentro do tecido gengival em nenhum grupo avaliado.

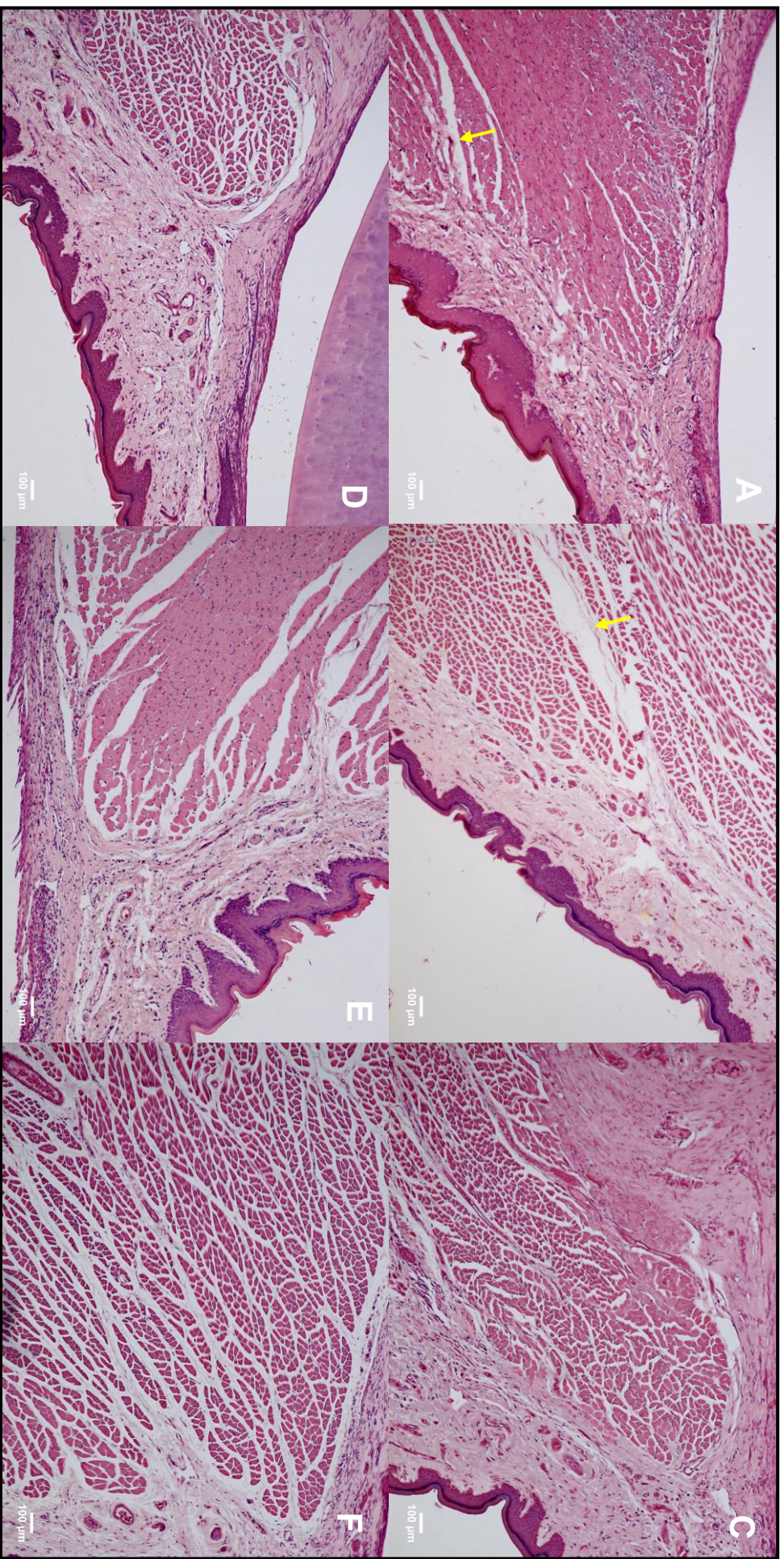


Figura 7 Análise histopatológica dos animais do grupo solução salina (**GSS**) **A)** Grupo GSS0, nota-se a presença da solução salina (seta amarela); **B)** Grupo GSS1, nota-se a presença da solução salina (seta amarela); **C)** Grupo GSS3; **D)** Grupo GSS5; **E)** Grupo GSS6 e **F)** Grupo GSS7. Sob objetiva de 10x e 100µm de barra de escala.

5.1.1 Grupo GAH0

Não foram encontradas células indicando a presença de infiltrado inflamatório em nenhum corte histológico dos animais desse grupo, assim como não foi observada alteração na vascularização local nem atividade fagocitária. Não foi encontrada formação de edema, nem áreas de necrose. Essa resposta ocorreu, possivelmente, devido a análise imediata do material após a injeção do gel, tempo este, insuficiente para a liberação de mediadores químicos desencadeadores do processo inflamatório (Figuras 8A e 9A, páginas 44 e 45).

5.1.2 Grupo GAH1

Neste grupo, os cortes histológicos evidenciaram grande número de células com núcleo hipercrômico e lobulado (insinuando tratar-se de infiltrado inflamatório de caráter agudo, composto por neutrófilos e eosinófilos) circundando toda a periferia do gel de ácido hialurônico, assim como toda a região de tecido conjuntivo adjacente (Figuras 8B e 9B, páginas 44 e 45). Associado às características estruturais das células observadas nas lâminas, sugere-se neutrófilos e eosinófilos por se tratarem de células presentes na resposta inflamatória aguda. Notou-se a formação de edema entre as fibras musculares, decorrente da exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas, característico de inflamação aguda.

Quando comparada com o grupo GSS (Figura 7, página 39), observou-se aumento quantitativo nos vasos sanguíneos da região da papila interdentária dos animais, particularmente na periferia do material injetado, sugerindo neovascularização e aumento do fluxo sanguíneo, promovendo o aporte das células inflamatórias (Figura 9B, página 45).

Não foi observada atividade fagocitária, não houve formação de cápsula envolvendo o material residual e não foram identificadas áreas de necrose.

5.1.3 Grupo GAH3

Neste grupo, foi observada presença de infiltrado inflamatório ainda de caráter agudo, porém apresentando intensidade moderada, quando comparado ao grupo GAH 1, devido às células inflamatórias estarem localizadas mais na periferia do material injetado e menos nos tecidos adjacentes (Figuras 8C e 9C, páginas 44 e 45).

Notou-se que a vascularização se manteve aumentada, com novos vasos observados na periferia do gel remanescente, assim como o edema ainda estava presente. Nenhuma área de necrose foi encontrada (Figura 9C, página 45).

Neste grupo, verificou-se o surgimento de uma delgada cápsula envolvendo todo o gel de ácido hialurônico, foi possível observar a presença de células fusiformes nesta cápsula, sugerindo tratar-se de fibroblastos. À medida que o tempo do experimento evoluiu, essa cápsula ficou mais evidente, porém manteve-se delgada (Figuras 8C e 9C, páginas 44 e 45).

5.1.4 Grupo GAH 5

Foi observado, mais nitidamente, a presença da cápsula envolvendo o gel de AH, sugerindo melhor organização celular (Figura 9D, página 45).

Notou-se infiltrado inflamatório misto, insinuando tratar-se de neutrófilos e células evidenciando núcleo ocupando quase todo o citoplasma, sugerindo a presença de linfócitos, porém em intensidade moderada, quando comparado ao observado no GAH 1. Devido a quantidade dessas células apresentar-se diminuída, sugere-se cronificação ou abrandamento do processo inflamatório. Foram observadas células de maior diâmetro com núcleo eosinófilo, sugerindo

tratar-se de macrófagos, insinuando o início da atividade fagocitária (Figuras 8D e 9D, páginas 44 e 45).

Quando comparado ao grupo GAH 1, o qual apresentou as maiores alterações histológicas dentre todos os grupos observados, os animais do grupo GAH 5 não demonstraram aumento na vascularização, porém a microcirculação adjacente ao material injetado permaneceu ativa (Figura 9D, página 45). A presença do edema foi menor nos animais deste grupo e não houve identificação de pontos de necrose.

5.1.5 Grupo GAH6

Em um animal deste grupo, foi observado que, ao contrário dos demais animais do experimento, o gel de ácido hialurônico depositou-se na camada de tecido conjuntivo e não na camada de tecido muscular.

A cápsula observada envolvendo o gel do ácido hialurônico desde o grupo GAH 3, apresentou-se mais nítida e menos delgada neste grupo, quando comparada ao observado nos demais grupos do experimento. Notou-se em maior quantidade as células fusiformes, sugestivas de fibroblastos na cápsula formada e adjacente a ela (Figuras 8E e 9E, páginas 44 e 45).

Foi observado em todos os animais desse grupo a presença de projeções de tecido conjuntivo em direção ao material injetado, assim como, havia tecido conjuntivo invadindo o tecido muscular e envolvendo grande parte ou todo o gel residual, o que sugere que houve indução da proliferação de fibroblastos e possivelmente de colágeno, ao que se chama de reação desmoplásica, ou seja, a produção de tecido conjuntivo (Figuras 8E e 9E, páginas 44 e 45).

Foi observada a presença de infiltrado inflamatório, sugerindo-se ser composto por linfócitos e macrófagos, porém apresentando-se, como no grupo

anterior, em menor intensidade do que o observado no grupo GAH 1 (Figuras 8E e 9E, páginas 44 e 45). A quantidade e disposição dos vasos sanguíneos não apresentou alteração em relação os grupos descritos anteriormente, porém a microcirculação da periferia do gel de AH permaneceu ativa (Figura 9E, página 45). Edema e necrose não foram observados nos animais deste grupo.

5.1.6 Grupo GAH7

Foi observado infiltrado inflamatório de caráter crônico, sugerindo-se tratar de linfócitos, porém em menor intensidade do que o descrito para o grupo GAH 1. Notou-se a presença de células sugestivas de macrófagos em maior quantidade, quando comparado aos grupos anteriores, sugerindo atividade fagocitária (Figuras 8F e 9F, páginas 44 e 45). Não foi identificada área de necrose ou edema.

Assim como no grupo anterior, foi observada a presença de projeções de tecido conjuntivo envolvendo todo ou grande parte do gel residual. Entre as projeções de tecido conjuntivo e o gel de AH, foi possível observar a cápsula envolvendo o material, contendo células fusiformes sugestiva de fibroblastos, como já descrito para alguns grupos experimentais anteriores (Figuras 8E e 9E, páginas 44 e 45).

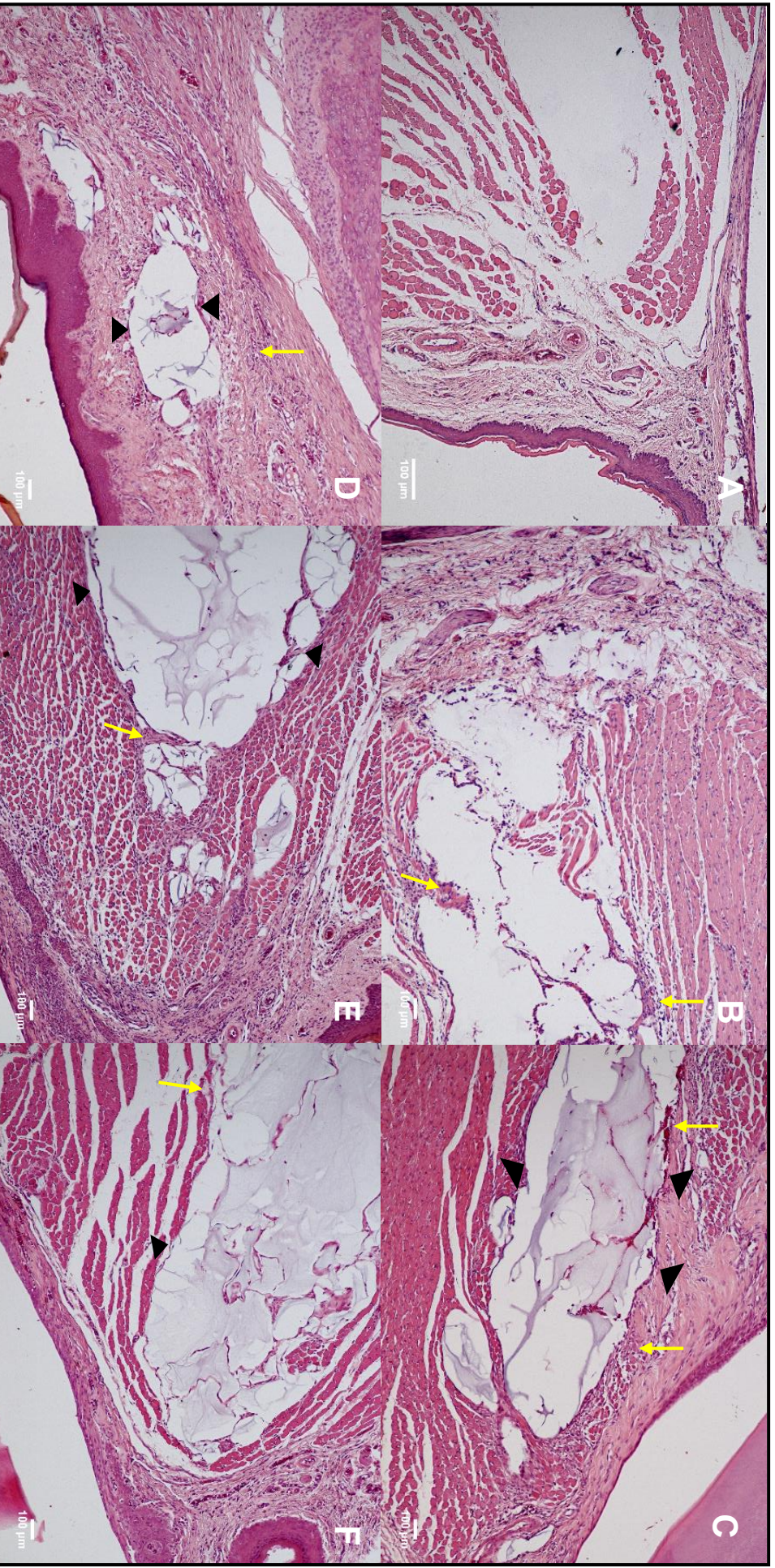


Figura 8 Análise histopatológica. **A)** Grupo GAH 0 não mostrando nenhuma reação inflamatória. **B)** Grupo GAH 1, mostrando reação inflamatória aguda (seta amarela). **C)** Grupo GAH 3 mostrando reação inflamatória aguda (seta amarela) e formação de uma cápsula fina (seta preta). **D)** Grupo GAH 5 mostrando resposta inflamatória (seta amarela) e a presença de uma cápsula fina (seta preta). **E)** Grupo GAH 6 mostrando resposta inflamatória mais leve (seta amarela), a cápsula apresenta-se mais evidente (seta preta) e reação desmoplásica é detectada. **F)** Grupo GAH 7 exibindo resposta inflamatória (seta amarela) mais leve e a cápsula apresenta-se mais evidente (seta preta). Objetiva de 10x e 100µm barra de escala.

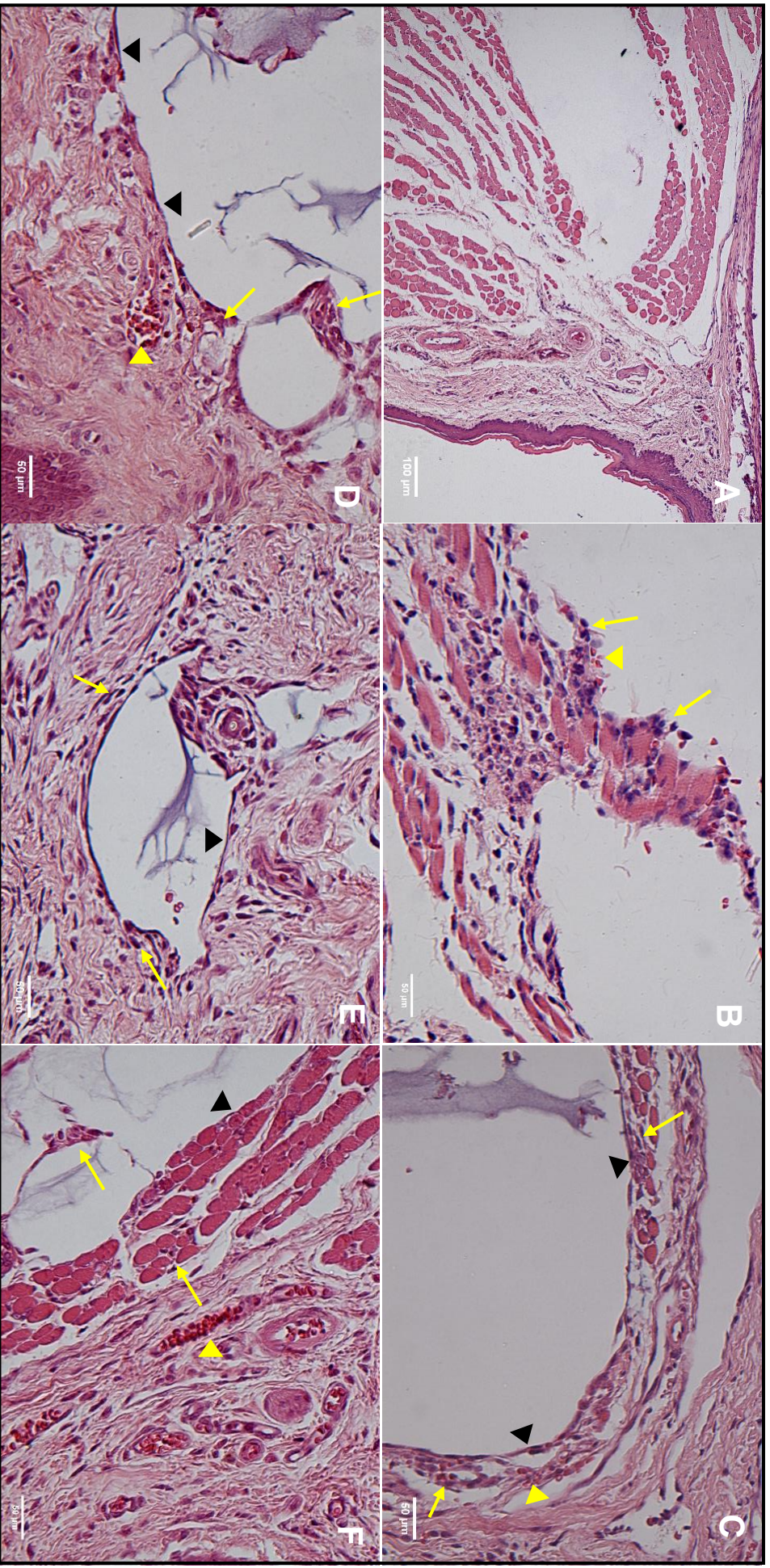


Figura 10. Análise histopatológica. **A)** Grupo GAH 0 não mostrando nenhuma reação inflamatória; **B)** Grupo GAH 1, mostrando reação inflamatória aguda (seta amarela), com aumento nos vasos sanguíneos (cabeça de seta amarela); **C)** Grupo GAH 3 mostrando reação inflamatória aguda (seta amarela), aumento dos vasos sanguíneos (cabeça de seta amarela) e formação de uma cápsula fina (seta preta); **D)** Grupo GAH 5 mostrando resposta inflamatória (seta amarela), microcirculação ativa (cabeça de seta amarela) e a presença de uma cápsula fina (seta preta); **E)** Grupo GAH 6 mostrando resposta inflamatória mais leve (seta amarela), microcirculação permanece ativa (cabeça de seta amarela), a cápsula apresenta-se mais evidente (seta preta) e reação desmoplásica é detectada; **F)** Grupo GAH 7 exibindo resposta inflamatória (seta amarela), microcirculação permanece ativo (cabeça de seta amarela) e a cápsula apresenta-se mais evidente (seta preta). Objetiva de 40x e 50µm barra de escala.

5.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

A variável área não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos com a variação do tempo (Tabela 2).

Tabela 2 Teste Anova com pós-teste Bonferroni para a variável área em relação aos grupos de tempo.

(I) TEMPO	(J) TEMPO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0 dias	1 dias	21425,60478	171281,49705	1,000	-508164,9944	551016,2039
	3 dias	88903,07192	171281,49705	,995	-440687,5272	618493,6711
	5 dias	184137,60429	171281,49705	,886	-345452,9949	713728,2035
	6 dias	260189,06777	171281,49705	,656	-269401,5314	789779,6669
	7 dias	363367,09856	171281,49705	,310	-166223,5006	892957,6977
1 dias	0 dias	-21425,60478	171281,49705	1,000	-551016,2039	508164,9944
	3 dias	67477,46714	171281,49705	,999	-462113,1320	597068,0663
	5 dias	162711,99951	171281,49705	,929	-366878,5997	692302,5987
	6 dias	238763,46299	171281,49705	,730	-290827,1362	768354,0622
	7 dias	341941,49378	171281,49705	,373	-187649,1054	871532,0929
3 dias	0 dias	-88903,07192	171281,49705	,995	-618493,6711	440687,5272
	1 dias	-67477,46714	171281,49705	,999	-597068,0663	462113,1320
	5 dias	95234,53237	171281,49705	,993	-434356,0668	624825,1315
	6 dias	171285,99585	171281,49705	,913	-358304,6033	700876,5950
	7 dias	274464,02664	171281,49705	,605	-255126,5725	804054,6258
5 dias	0 dias	-184137,60429	171281,49705	,886	-713728,2035	345452,9949
	1 dias	-162711,99951	171281,49705	,929	-692302,5987	366878,5997
	3 dias	-95234,53237	171281,49705	,993	-624825,1315	434356,0668
	6 dias	76051,46348	171281,49705	,998	-453539,1357	605642,0626
	7 dias	179229,49427	171281,49705	,897	-350361,1049	708820,0934
6 dias	0 dias	-260189,06777	171281,49705	,656	-789779,6669	269401,5314
	1 dias	-238763,46299	171281,49705	,730	-768354,0622	290827,1362
	3 dias	-171285,99585	171281,49705	,913	-700876,5950	358304,6033
	5 dias	-76051,46348	171281,49705	,998	-605642,0626	453539,1357
	7 dias	103178,03079	171281,49705	,990	-426412,5684	632768,6300
7 dias	0 dias	-363367,09856	171281,49705	,310	-892957,6977	166223,5006
	1 dias	-341941,49378	171281,49705	,373	-871532,0929	187649,1054
	3 dias	-274464,02664	171281,49705	,605	-804054,6258	255126,5725
	5 dias	-179229,49427	171281,49705	,897	-708820,0934	350361,1049
	6 dias	-103178,03079	171281,49705	,990	-632768,6300	426412,5684

A variável perímetro apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos com a variação do tempo (Tabela 3).

Tabela 3 Teste Anova com pós-teste Bonferroni para a variável perímetro em relação aos grupos de tempo.

(I) TEMPO	(J) TEMPO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0 dias	1 dia	244,59207	2181,02444	,912	-4256,8211	4746,0053
	3 dias	1050,19913	2181,02444	,635	-3451,2141	5551,6123
	5 dias	3578,49000	2181,02444	,114	-922,9232	8079,9032
	6 dias	5163,32437*	2181,02444	,026	661,9112	9664,7376
	7 dias	5766,23327*	2181,02444	,014	1264,8201	10267,6465
1 dia	0 dias	-244,59207	2181,02444	,912	-4746,0053	4256,8211
	3 dias	805,60707	2181,02444	,715	-3695,8061	5307,0203
	5 dias	3333,89793	2181,02444	,139	-1167,5153	7835,3111
	6 dias	4918,73230*	2181,02444	,034	417,3191	9420,1455
	7 dias	5521,64120*	2181,02444	,018	1020,2280	10023,0544
3 dias	0 dias	-1050,19913	2181,02444	,635	-5551,6123	3451,2141
	1 dia	-805,60707	2181,02444	,715	-5307,0203	3695,8061
	5 dias	2528,29087	2181,02444	,258	-1973,1223	7029,7041
	6 dias	4113,12523	2181,02444	,071	-388,2880	8614,5384
	7 dias	4716,03413*	2181,02444	,041	214,6209	9217,4473
5 dias	0 dias	-3578,49000	2181,02444	,114	-8079,9032	922,9232
	1 dia	-3333,89793	2181,02444	,139	-7835,3111	1167,5153
	3 dias	-2528,29087	2181,02444	,258	-7029,7041	1973,1223
	6 dias	1584,83437	2181,02444	,474	-2916,5788	6086,2476
	7 dias	2187,74327	2181,02444	,326	-2313,6699	6689,1565
6 dias	0 dias	-5163,32437*	2181,02444	,026	-9664,7376	-661,9112
	1 dia	-4918,73230*	2181,02444	,034	-9420,1455	-417,3191
	3 dias	-4113,12523	2181,02444	,071	-8614,5384	388,2880
	5 dias	-1584,83437	2181,02444	,474	-6086,2476	2916,5788
	7 dias	602,90890	2181,02444	,785	-3898,5043	5104,3221
7 dias	0 dias	-5766,23327*	2181,02444	,014	-10267,6465	-1264,8201
	1 dia	-5521,64120*	2181,02444	,018	-10023,0544	-1020,2280
	3 dias	-4716,03413*	2181,02444	,041	-9217,4473	-214,6209
	5 dias	-2187,74327	2181,02444	,326	-6689,1565	2313,6699
	6 dias	-602,90890	2181,02444	,785	-5104,3221	3898,5043

Em análises múltiplas 2x2, os valores do perímetro para os grupos de tempo GAH 6 e GAH 7 diferem significativamente dos valores registrados nos grupos de tempo iniciais (GAH 0 e GAH 1 (Tabela 4).

Tabela 4 Teste Anova com pós-teste Bonferroni para as variáveis área e perímetro em relação aos grupos de tempo e o Teste de Correlação de Pearson para a associação das variáveis em relação ao tempo.

Tempo	Área	Perímetro
GAH 0	611322.30	10282.25
GAH 1	589896.70	10037.65
GAH 3	522419.23	9232.05
GAH 5	427184.70	6703.76
GAH 6	351133.23	5118.92*
GAH 7	247955.20	4516.01*
p-valor	0.265	0.044
r-valor	-0.461	-0.585

As análises de correlação foram classificadas de acordo com os seguintes parâmetros: forte associação entre variáveis foi definida com $r \geq 0,8$ ($P \leq 0,01$), associação moderada com $0,56 \leq r < 0,8$ ($P \leq 0,05$), e fraca associação com $r < 0,56$ ($P > 0,05$).

A correlação encontrada entre área e tempo apresentou uma fraca associação negativa, isto é, o valor da área tende a fracamente diminuir com o passar do tempo (Gráfico 1, página 48).

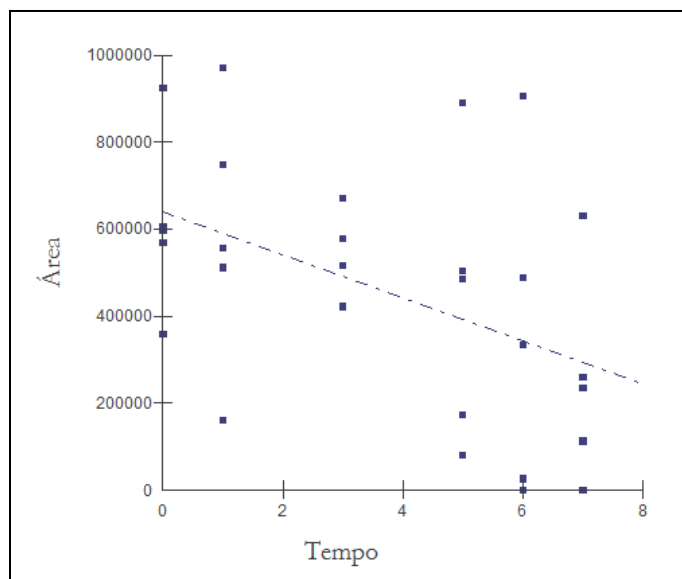


Gráfico 1 Gráfico de dispersão linear da variável área em relação ao tempo. Note maior dispersão dos valores em relação à reta ao indicar uma leve diminuição do valor da área com o aumento do tempo, uma vez que as diferenças não foram significativas entre esses valores.

A correlação entre perímetro e tempo apresentou uma moderada associação negativa, isto é, o valor do perímetro tende a moderadamente diminuir com o aumento do tempo (Gráfico 2).

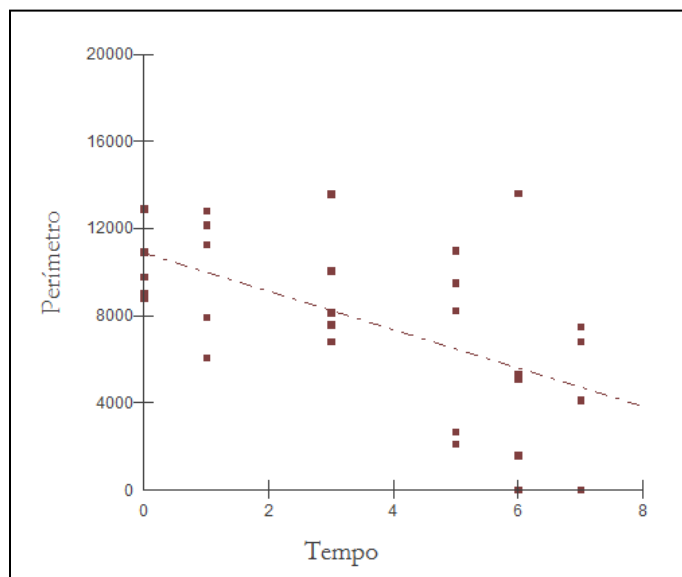


Gráfico 2: Gráfico de dispersão linear da variável perímetro em relação ao tempo. Note menor dispersão dos valores em relação à reta ao indicar uma moderada diminuição do valor do perímetro com o aumento do tempo com diferença significativa para os grupos GAH 6 e GAH7.

6 DISCUSSÃO

A crescente busca pela melhora estética do sorriso exige constante atualização dos profissionais da área, pesquisas para o desenvolvimento de novos biomateriais e descobertas de novas aplicações para os materiais já existentes.

O potencial da técnica de preenchimento na Dermatologia, é descrito desde 1893, quando Neuber transplantou gordura do braço para regiões da face. Nas décadas de 1960, 1970 e 1980, popularizou-se a utilização da parafina e do silicone para preenchimento de deformidades faciais, porém, efeitos adversos descontinuaram seu uso. Desde então diversos materiais de preenchimento foram surgindo no mercado, dentre eles o ácido hialurônico, que apesar de muito difundido na Medicina, ainda tem seus efeitos no tecido gengival, pouco estudados (Fernandez e Mackley, 2006).

Na Odontologia, apesar da publicação no Diário Oficial da União normatizando o uso do AH em março de 2014, estudos relatam a aplicação experimental exitosa do gel de ácido hialurônico há décadas, desde o tratamento de pacientes com osteoartrite da articulação temporomandibular (Triantafyllidou *et al.*, 2013), ao aprimoramento no reparo alveolar após extração (Mendes *et al.*, 2008) e ao uso como scaffold para células odontoblásticas destinadas à regeneração pulpar (Inuyama *et al.*, 2010).

Numerosas pesquisas surgiram descrevendo a aplicação do AH em pacientes com doenças periodontais. Em uma revisão sistemática, Bertl e colaboradores (2015), encontraram efeito positivo moderado em favor do uso do AH como adjuvante no tratamento de doença periodontal. Isso se deve principalmente à sua administração tópica, devido às suas propriedades ativadora e neutralizadora de reações inflamatórias, bacteriostática, cicatrizadora e anti-edematosa (Pistorius *et al.*, 2005; Bansal *et al.*, 2010; Gontiya e Galgali, 2012).

No presente estudo, nenhum animal apresentou complicações sistêmicas, desenvolvimento de processos alérgicos ou morreu, demonstrando a alta biocompatibilidade do material utilizado (Monheit e Coleman, 2006; Elzayat *et al.*, 2008; Loureiro Borghetti *et al.*, 2012; Moure *et al.*, 2012; Awartani e Tatakis, 2015; Huh *et al.*, 2015).

Com o objetivo de avaliar as reações iniciais do tecido gengival do rato após o preenchimento com gel de AH, os intervalos de tempo determinados para esse estudo foram os menores e mais sequenciais possíveis, para que nenhuma alteração tecidual fosse negligenciada.

A aplicação do material foi realizada seguindo as instruções do fabricante e de acordo com metodologia descrita, a quantidade de material injetado foi de 0,02ml, utilizando seringa 0,3ml (Huh *et al.*, 2015). O gel de ácido hialurônico utilizado foi o Rennova Fill® 23mg/ml, concentração essa considerada tolerável pelos rato (Loureiro Borghetti *et al.*, 2012). O material escolhido, é de origem não animal e tem suas moléculas estabilizadas através da adição de 1,4-butanediol diglicidil éter, modificação essa, presente na maioria dos preenchedores dérmicos à base de AH (La Gatta *et al.*, 2016).

No presente estudo foi observada reação inflamatória aguda já no primeiro dia após a aplicação do gel de AH, intensidade essa que se mostrou abrandada ao sétimo dia de avaliação. Em estudo prévio avaliando a aplicação do gel de AH na língua de ratos, foi encontrada reação inflamatória de caráter agudo moderada e severa, 7 dias após aplicação do material, caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear. (Loureiro Borghetti *et al.*, 2012). Achado este, discordante ao encontrado no presente estudo. Possivelmente, a reação foi classificada pelos autores como severa, pela impossibilidade em comparar esse achado com tempos mais curtos de experimento, oportunidade esta que o presente estudo obteve, ao avaliar as reações teciduais iniciais apresentadas pelo animal, desde as primeiras horas até o sétimo dia, tempo avaliado no estudo supracitado. Outro fator que pode ter contribuído para a discordância nos resultados, pode ser atribuído à diferença no local de aplicação entre o presente estudo e os achados de Loureiro Borghetti (2012).

O abrandamento da intensidade da reação inflamatória com o decorrer do tempo, após a aplicação do gel de AH, encontrado no presente estudo, é relatado previamente na literatura (Elzayat *et al.*, 2008; Moure *et al.*, 2012; Huh *et al.*, 2015). Sugerindo que, a reduzida inflamação encontrada no sétimo dia do presente estudo, possivelmente suavizar-se-ia progressivamente se o experimento tivesse maior duração.

Corroborando com o presente estudo e avaliando reação inflamatória ao ácido hialurônico em modelo animal, Perazzo e colaboradores em 2007, ao analisar a musculatura da prega vocal de coelhos após preenchimento com gel de AH, não encontrou processo inflamatório agudo, classificando a reação como leve para o período de avaliação de sete dias.

No presente estudo foi observada alteração na vascularização adjacente ao local de injeção do gel do AH. Apesar de não quantificado, o aumento da vascularização periférica teve início observado um dia após a aplicação do gel. Achado este em concordância com estudo prévio comparando o comportamento histológico da língua de ratos após injeção com ácido hialurônico e polimetilmetacrilato, onde nos primeiros 7 dias, foi observado aumento estatisticamente significativo no número de vasos sanguíneos no grupo que recebeu aplicação de AH (Moure *et al.*, 2012).

À partir do terceiro dia de avaliação do presente estudo, após preenchimento com gel do AH, delgada cápsula envolvendo todo o gel foi observada. Estudo prévio avaliando a aplicação de uma combinação de Dextranomer (Dx) com AH subcutâneamente em região abdominal de ratos, encontrou a formação de fina cápsula ao redor do material (Elzayat *et al.*, 2008), achado semelhante ao encontrado no presente estudo.

Não foi observada nenhuma área de necrose no tecido adjacente ao local de deposição do gel do AH no presente estudo. Achado este, em conformidade com a literatura, onde não foi encontrado relato de necrose dos tecidos orais, após preenchimento com gel do ácido hialurônico quando utilizado em modelo animal (Perazzo *et al.*, 2007).

As características apresentadas pelo material no presente estudo, concordam com os achados de Loureiro Borghetti e col., onde o gel do AH mostrou-se de forma e tamanho variável, com caráter basofílico, corado em roxo e disposto interiormente ao tecido muscular.

A ausência de formação de abscesso em decorrência da presença do gel de AH no tecido gengival dos animais deste estudo, discorda de relatos encontrados

em estudos prévios. Onde houve não só a formação de abscesso, como surgiram lesões ulceradas no sétimo dia de avaliação (Moure *et al.*, 2012); (Loureiro Borghetti *et al.*, 2012),

Apesar de não significativa, houve diminuição da área ocupada pelo gel de AH no presente estudo, concordando com a literatura, onde Huh e colaboradores (2015) também observaram diminuição contínua na área ocupada pelo material. Os autores utilizaram o mesmo modelo animal e metodologia similar, para comparar clinicamente e histologicamente o comportamento do tecido oral submucoso após preenchimento com 4 substâncias, dentre elas o AH. O perímetro ocupado pelo gel de AH no tecido gengival do rato apresentou diminuição significativa entre os grupos desta pesquisa. Não foi encontrado na literatura nenhum estudo prévio avaliando alteração de perímetro ocupado pelo gel.

Esses dois resultados quantitativos sugerem que o gel do AH sofre degradação lenta, constante e que há mudança no seu posicionamento dentro do tecido gengival, indicando uma alteração de forma do gel, com o decorrer do tempo.

A solução salina injetada nos animais dos grupos GSS apresentou uma absorção acelerada, visto que ao terceiro dia de avaliação já não foi encontrada a solução salina no tecido gengival de ratos, demonstrando uma degradação mais rápida, quando comparado ao gel do AH. De acordo com os achados de Huh e col. (2015), o qual também fez comparações entre o gel de AH e a solução salina no tecido gengival de ratos, em quatro semanas não havia mais evidência da presença de solução salina nos animais. Outros achados desse autor corroboram

com o encontrado neste estudo, onde não foram observadas anormalidades histológicas nos animais dos grupos GSS.

Apesar do reduzido número de relatos na literatura sobre o comportamento histológico do tecido gengival após preenchimento com gel de ácido hialurônico, algumas pesquisas descrevem o uso do gel de AH em humanos para preenchimento da papila gengival interdentária, onde Becker e colaboradores em 2010 avaliando 14 papilas interdentárias, encontrou aproximadamente 94% de sucesso no preenchimento com gel do AH, com duração média de 6 a 25 meses.

Mansouri e colaboradores em 2013 avaliaram 21 papilas, encontraram que 43% dos sítios apresentaram 50% de melhora estética nos primeiros 6 meses. Awartani e colaboradores em 2015 descreveram que o preenchimento completo da papila é um achado incomum, menos de 20% dos casos avaliados, e que os resultados se apresentaram diversificados, nos quais, 47% dos sítios apresentaram 50% de melhora estética da papila interdentária. Os autores supracitados recomendam a técnica como alternativa, principalmente na região estética, aos tratamentos invasivos.

Utilizando outra forma de preencher a papila interdentária, a literatura relata a possibilidade do tratamento de triângulos negros, através da injeção de fibroblastos autólogos associada a procedimento cirúrgico prévio, induzindo reação inflamatória aguda para teoricamente permitir o emprego de maior volume de células possível. Esta alternativa foi considerada segura e eficaz, porém extremamente sensível à técnica (Mcguire e Scheyer, 2007).

O modelo animal utilizado para o desenvolvimento dessa pesquisa, foi escolhido, dentre outras razões, devido à trabalhos experimentais em ratos afirmarem existir uma correlação destes animais com os humanos, caracterizada

por uma correspondência de 30 dias de vida do homem para cada dia de vida do rato (Andreollo *et al.*, 2012). Baseado nisto e com o objetivo de decidir os tempos a serem avaliados no presente estudo, foi realizado projeto piloto prévio utilizando dois animais com tempo de experimento de 21 e 30 dias, respectivamente. Os cortes histológicos correspondentes a esses animais não apresentavam o gel de ácido hialurônico em seu tecido, indicando que há evolução na degradação do material com o decorrer do tempo.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, conclui-se:

7.1 Através da análise histopatológica:

7.1.1 Observou-se presença de infiltrado inflamatório de caráter agudo à partir do grupo GAH 1, sugerindo tratar-se de neutrófilos e eosinófilos. Essa reação foi diminuindo de intensidade, tornando-se leve nos grupos GAH 6 e GAH 7, sugerindo-se ser composta de linfócitos e macrófagos.

7.1.2 Ocorreu aumento na vascularização periférica à partir do grupo GAH 1. Com o progresso do tempo do experimento foi observada que a microcirculação periférica manteve-se ativa, pela presença de vasos congestos nos cortes histológicos.

7.1.3 Foi detectada a formação de fina cápsula envolvendo o gel de ácido hialurônico à partir do grupo GAH 3. Conforme o progresso do tempo do experimento, essa cápsula tornou-se mais evidente. Foi observada a presença de macrófagos e células fusiformes, sugestivas de fibroblastos e a proliferação de tecido conjuntivo em direção ao gel de AH à partir do grupo GAH 6, indicando início de atividade fagocitária.

7.1.4 Não foi identificada área de necrose em nenhum dos grupos avaliados nesta pesquisa.

7.1.5 O material residual apresentou-se de formas e tamanhos variados para os diferentes períodos de tempo avaliados, porém quase todos os grupos

apresentaram o gel do AH depositado na camada de tecido muscular e dispostos paralelamente em relação às fibras musculares.

7.2 Através da análise histomorfométrica foi verificada diminuição na área ocupada pelo gel do ácido hialurônico conforme o progresso no tempo do experimento, porém esta diferença não se revelou estatisticamente significativa, sugerindo que o material apresenta lenta degradação durante o período de tempo avaliado. Diferenças estatisticamente significativas no perímetro ocupado pelo gel com o progresso no tempo do experimento foram encontradas, sugerindo que há modificação na conformação do material dentro do tecido, acompanhando a lenta redução da área. Fraca correlação entre área e tempo de experimento foi observada e moderada correlação entre perímetro e tempo de experimento foi observada.

8 RECOMENDAÇÕES

Futuras pesquisas devem avaliar os efeitos histológicos do gel de ácido hialurônico no preenchimento da papila interdentária por um período maior de tempo em modelo animal, além da utilização de outros métodos de avaliação como a imunohistoquímica para quantificação de alterações celulares e vasculares do tecido. Além disso, sugere-se a confecção de defeitos gengivais na zona estética, para posterior preenchimento com gel de AH para análise de aumento volumétrico visível, durabilidade dos efeitos e recidiva, em modelo animal.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREOLLO, N. A. et al. Rat's age versus human's age: what is the relationship? **Arq Bras Cir Dig**, v. 25, n. 1, p. 49-51, 2012 Jan-Mar 2012. ISSN 2317-6326. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22569979> >.

AWARTANI, F. A.; TATAKIS, D. N. Interdental papilla loss: treatment by hyaluronic acid gel injection: a case series. **Clin Oral Investig**, Nov 2015. ISSN 1436-3771. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26613740> >.

BANSAL, J.; KEDIGE, S. D.; ANAND, S. Hyaluronic acid: a promising mediator for periodontal regeneration. **Indian J Dent Res**, v. 21, n. 4, p. 575-8, 2010 Oct-Dec 2010. ISSN 1998-3603. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21187628> >.

BECKER, W. et al. Minimally invasive treatment for papillae deficiencies in the esthetic zone: a pilot study. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 12, n. 1, p. 1-8, Mar 2010. ISSN 1708-8208. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19843105> >.

CHONG, B. F. et al. Microbial hyaluronic acid production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 66, n. 4, p. 341-51, Jan 2005. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15599518> >.

COLLINS, M. N.; BIRKINSHAW, C. Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. **J Mater Sci Mater Med**, v. 19, n. 11, p. 3335-43, Nov 2008. ISSN 0957-4530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18528637> >.

DICKER, K. T. et al. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions. **Acta Biomater**, v. 10, n. 4, p. 1558-70, Apr 2014. ISSN 1878-7568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24361428> >.

ELZAYAT, E. A. et al. Volume changes and histological response to injected dextranomer/hyaluronic acid copolymer (Zuidex) and collagen (Contigen) in rats. **Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct**, v. 19, n. 2, p. 247-52, Feb 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17639343> >.

FERNANDEZ, E. M.; MACKLEY, C. L. Soft tissue augmentation: a review. **J Drugs Dermatol**, v. 5, n. 7, p. 630-41, 2006 Jul-Aug 2006. ISSN 1545-9616. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16865868> >.

FRASER, J. R.; LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. **J Intern Med**, v. 242, n. 1, p. 27-33, Jul 1997. ISSN 0954-6820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9260563> >.

GONTIYA, G.; GALGALI, S. R. Effect of hyaluronan on periodontitis: A clinical and histological study. **J Indian Soc Periodontol**, v. 16, n. 2, p. 184-92, Apr 2012. ISSN 0975-1580. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23055583> >.

HUH, J. B. et al. Effects of PMMA and Cross-Linked Dextran Filler for Soft Tissue Augmentation in Rats. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 12, p. 28523-33, 2015. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26633376> >.

INUYAMA, Y. et al. Effects of hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 92, n. 1, p. 120-8, Jan 2010. ISSN 1552-4981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19802830> >.

JOHN, H. E.; PRICE, R. D. Perspectives in the selection of hyaluronic acid fillers for facial wrinkles and aging skin. **Patient Prefer Adherence**, v. 3, p. 225-30, 2009. ISSN 1177-889X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19936165> >.

KABLIK, J. et al. Comparative physical properties of hyaluronic acid dermal fillers. **Dermatol Surg**, v. 35 Suppl 1, p. 302-12, Feb 2009. ISSN 1524-4725. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19207319> >.

LA GATTA, A. et al. Hyaluronan dermal fillers via crosslinking with 1,4-butanediol diglycidyl ether: Exploitation of heterogeneous reaction conditions. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 104, n. 1, p. 9-18, Jan 2016. ISSN 1552-4981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25611588> >.

LAPCÍK L JR AND et al. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. **Chem Rev**, v. 98, n. 8, p. 2663-2684, Dec 1998. ISSN 1520-6890. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11848975> >.

LOUREIRO BORGHETTI, R. et al. Clinical and histologic evaluation of effects of hyaluronic acid in rat tongue. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 113, n. 4, p. 488-94, Apr 2012. ISSN 2212-4411. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22676930> >.

MCGUIRE, M. K.; SCHEYER, E. T. A randomized, double-blind, placebo-controlled study to determine the safety and efficacy of cultured and expanded autologous fibroblast injections for the treatment of interdental papillary insufficiency associated with the papilla priming procedure. **J Periodontol**, v. 78, n. 1, p. 4-17, Jan 2007. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17199533> >.

MENDES, R. M. et al. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. **Arch Oral Biol**, v. 53, n. 12, p. 1155-62, Dec 2008. ISSN 1879-1506. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18692778> >.

MONHEIT, G. D.; COLEMAN, K. M. Hyaluronic acid fillers. **Dermatol Ther**, v. 19, n. 3, p. 141-50, 2006 May-Jun 2006. ISSN 1396-0296. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16784513> >.

MOURE, S. P. et al. Clinical and pathological characteristics of polymethylmethacrylate and hyaluronic acid in the rat tongue. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 41, n. 10, p. 1296-303, Oct 2012. ISSN 1399-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22571863> >.

PERAZZO, P. S. et al. A study of the histological behavior of a rabbit vocal fold after a hyaluronic acid injection. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 73, n. 2, p. 171-8, 2007 Mar-Apr 2007. ISSN 1808-8694. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17589724> >.

PISTORIUS, A. et al. The clinical application of hyaluronic acid in gingivitis therapy. **Quintessence Int**, v. 36, n. 7-8, p. 531-8, 2005 Jul-Aug 2005. ISSN 0033-6572. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15999421> >.

ROBERT, L. Hyaluronan, a truly "youthful" polysaccharide. Its medical applications. **Pathol Biol (Paris)**, v. 63, n. 1, p. 32-34, Feb 2015. ISSN 1768-3114. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25182691> >.

TRIANTAFFILIDOU, K.; VENETIS, G.; BIKA, O. Efficacy of hyaluronic acid injections in patients with osteoarthritis of the temporomandibular joint. A comparative study. **J Craniofac Surg**, v. 24, n. 6, p. 2006-9, Nov 2013. ISSN 1536-3732. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24220392> >.

TSEPILOV, R. N.; BELODED, A. V. Hyaluronic Acid - an "Old" Molecule with "New" Functions: Biosynthesis and Depolymerization of Hyaluronic Acid in Bacteria and Vertebrate Tissues Including during Carcinogenesis. **Biochemistry (Mosc)**, v. 80, n. 9, p. 1093-108, Sep 2015. ISSN 1608-3040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26555463> >.

ZIAHOSSEINI, P.; HUSSAIN, F.; MILLAR, B. J. Management of gingival black triangles. **Br Dent J**, v. 217, n. 10, p. 559-63, Nov 2014. ISSN 1476-5373. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25415009> >.

10 ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 12 de maio de 2015

Prezada Professora Mônica Tirre Souza de Araújo

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sobre o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: “Aspectos Histológicos da Papila Interdentária de Ratos Após Preenchimento com Ácido Hialurônico.”, protocolo nº 017/15, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais 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), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia 15/04/2015.

Vigência do Projeto	Até 12/05/2016
Espécie/linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	35 animais
Peso/idade	300 / 12 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério de Produção de Roedores do Instituto de Ciências Biomédicas do CCS, UFRJ - bloco k, 1º andar sala 1.