

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Sumaya Takan Bordalo

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE 1,4 BUTANODIOL DIGLICIDIL
ÉTER ASSOCIADO OU NÃO A ÁCIDO HIALURÔNICO EM
FIBROBLASTOS HUMANOS.**

São Paulo

2024

Sumaya Takan Bordalo

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE 1,4 BUTANODIOL DIGLICIDIL
ÉTER ASSOCIADO OU NÃO A ÁCIDO HIALURÔNICO EM
FIBROBLASTOS HUMANOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Senso da Universidade Santo Amaro - UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Gonçalves.

São Paulo

2024

B724a Bordalo, Sumaya Takan.
Avaliação da citotoxicidade em fibroblastos de 1,4 butanodiol diglicidil éter associado ou não a ácido hialurônico. / Sumaya Takan Bordalo. - São Paulo, 2023.
40 p. : il., color.
Orientadora: Profª. Dra. Flávia Gonçalves.

Dissertação (Mestrado em Implantodontia) - Universidade Santo Amaro, 2023.
Bibliografia incluída.

1. 1,4Butanodiol Diglicidil éter. 2. Ácido hialurônico. 3. Citotoxicidade.
I. Gonçalves, Flávia. orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

CDD 617.6

Elaboradora pela Bibliotecária: Milena Braz Martins CRB-8/9974

Sumaya Takan Bordalo

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE 1,4 BUTANODIOL DIGLICIDIL
ÉTER ASSOCIADO OU NÃO A ÁCIDO HIALURÔNICO EM
FIBROBLASTOS HUMANOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Gonçalves.

São Paulo, 5 de fevereiro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Flávia Gonçalves

Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk

Prof^a. Dr^a. Susana Morimoto

CONCEITO FINAL

Dedico aos meus filhos que estiveram sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando a ingressar no Mestrado.

Em especial, as minhas Tias Sandra e Cristina que nunca duvidaram da minha capacidade em realizar os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar comigo em todos os momentos, me guiando e protegendo.

Agradeço ao Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk, Professor Livre Docente em Implantodontia da UNISA por todo o aprendizado durante esses 2 anos em um Mestrado excepcional.

Agradeço ao Professor Dr. Caio Roman Torres que me incentivou a ingressar no Mestrado da UNISA.

A minha orientadora, Professora Dra. Flávia Gonçalves que foi fundamental para a conclusão desta dissertação, na orientação dos experimentos em laboratório e na correção deste trabalho com extrema dedicação e paciência.

A Professora Dra. Débora Pallos, ao Professor Dr. William Brandt, a Professora Dra. Fabiana Martins, a Professora Dra. Yeon Jung, a Professora Dra. Luana Campos, a Professora Dra. Márcia Tanaka, a Professora Dra. Heloísa Marão e ao Professor Dr. Gustavo Momesso, que foram muito importantes no ganho e aprimoramento de todo conhecimento adquirido nesta pós-graduação.

A Professora Dra. Angélica Castro Pimentel pelo carinho e dedicação nas aulas e orientações dos artigos publicados e que incentivou a publicação do meu primeiro livro sobre Fios de PDO.

A Professora Dra. Letícia Cristina Boaro, pela prévia orientação desta dissertação e que deixará saudades.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos de essencial ajuda acadêmica.

A Sra. Thaís Reis Machado, coordenadora dos Laboratórios Multidisciplinares da Universidade Santo Amaro, por viabilizar o uso da infraestrutura para execução deste estudo.

A todos os funcionários da Instituição que sempre nos ajudaram e acolheram com presteza e dedicação.

Em especial, a todos os amigos (as), colegas que fiz durante o curso, que estiveram presentes durante essa jornada na Universidade e que levarei comigo dentro do coração.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

(Carl G. Jung)

RESUMO

Introdução: A meia-vida do ácido hialurônico (AH) na pele é de apenas alguns dias, por isso a reticulação com 1,4 butanodiol diglicidil éter (BDDE) é empregada para estabilizá-lo. Porém, se especula que o BDDE possa ser tóxico e causar reações de hipersensibilidade. **Objetivo:** avaliar a citotoxicidade sobre fibroblastos humanos de diferentes concentrações de BDDE associados ou não ao ácido hialurônico. **Metodologia:** fibroblastos gengivais humanos foram isolados e adicionados na concentração de 1×10^4 células por poço em placas de 96 poços. Para a análise da citotoxicidade, foram preparadas 13 amostras: um grupo controle positivo de meio de cultura fresco apenas, um grupo controle com meio de cultura fresco e 20% de hidrogel de ácido hialurônico não reticulado sem BDDE e um grupo controle negativo em meio de cultura fresco com 20% metanol. Nos 10 grupos experimentais, metade foi feita com 20% de hidrogel de ácido hialurônico não reticulado associado com BDDE em concentrações de: 1, 2, 20, 70 e 100 ppm em relação ao hidrogel de ácido hialurônico, em meio de cultura. A outra metade, foi composta pela mesma quantidade de BDDE, solubilizado apenas em meio de cultivo, o que resultou em concentrações de 0,2, 0,4, 4, 14 e 20 ppm na solução. A citotoxicidade foi mensurada por ensaio MTT em 24 h e 7 dias. A viabilidade celular foi calculada em relação ao grupo controle positivo, sendo que a viabilidade menor que 70% foi considerada tóxica. **Resultados:** os 10 grupos experimentais não se mostraram citotóxicos, em 24 horas de cultivo. Entretanto, em 7 dias, foram citotóxicas as concentrações de 14 e 20 ppm de BDDE sem ácido hialurônico e as concentrações de 70 e 100 ppm de BDDE associadas ao ácido hialurônico. **Conclusão:** conclui-se que o BDDE associado ou não ao ácido hialurônico, não se mostrou citotóxico em curto prazo (24 h), nas concentrações avaliadas. Porém, foi citotóxico em 7 dias nas 2 concentrações mais elevadas, estando associado ou não ao ácido hialurônico.

Palavras-chave: 1,4 butanodiol diglicidil éter. ácido hialurônico. preenchedores dérmicos. citotoxicidade.

ABSTRACT

Introduction: The half-life of hyaluronic acid (HA) in the skin is only a few days, so cross-linking with 1,4 butanediol diglycidyl ether (BDDE) is employed to stabilize it. However, it is speculated that BDDE may be toxic and cause hypersensitivity reactions.

Objective: evaluate the cytotoxicity on human fibroblasts of different concentrations of BDDE associated or not with hyaluronic acid. **Methodology:** human gingival fibroblasts were isolated and added at a concentration of 1×10^4 cells per well in 96-well plates. For cytotoxicity analysis, 13 samples were prepared: a positive control group with fresh culture medium only, a control group with fresh culture medium and 20% non-cross-linked hyaluronic acid hydrogel without BDDE and a negative control group in culture medium. Fresh culture with 20% methanol. In the 10 experimental groups, half were made with 20% non-crosslinked hyaluronic acid hydrogel associated with BDDE at concentrations of: 1, 2, 20, 70 and 100 ppm in relation to the hyaluronic acid hydrogel, in culture medium. The other half was composed of the same amount of BDDE, solubilized only in the culture medium, which resulted in concentrations of 0.2, 0.4, 4, 14 and 20 ppm in the solution. Cytotoxicity was measured by MTT assay at 24 h and 7 days. Cell viability was calculated in relation to the positive control group, with viability lower than 70% being considered toxic. **Results:** the 10 experimental groups did not prove to be cytotoxic after 24 hours of cultivation. However, within 7 days, concentrations of 14 and 20 ppm of BDDE without hyaluronic acid and concentrations of 70 and 100 ppm of BDDE associated with hyaluronic acid were cytotoxic. **Conclusion:** it is concluded that BDDE, associated or not with hyaluronic acid, did not prove to be cytotoxic within 24 hours, at the concentrations evaluated. However, it was cytotoxic within 7 days at the 2 highest concentrations, with or without associated with hyaluronic acid.

Keywords: 1,4 butanediol diglycidyl ether. hyaluronic acid. dermal fillers. cytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura Molecular do ácido hialurônico.	14
Figura 2 - Processo de Reticulação do ácido hialurônico.	16
Figura 3 - BDPE e seus derivados.	17
Figura 4 - Grupos de Amostras.	23
Figura 5 - Disposição das amostras na placa de cultivo celular. Para cada condição experimental foram feitas 3 amostras, que foram mensuradas por 2 vezes. Na placa isolada em azul, o controle negativo com meio de cultura, fibroblastos e metanol a 20%.	23
Figura 6 - Citotoxicidade em 24 h.	25
Figura 7 - Citotoxicidade em 7 dias.	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	ácido hialurônico
BDDE	1,4 butanodiol diglicidil éter
BDPE	1,4-butanodiol di-(propan-2,3-diolil) éter
CO₂	Dióxido de carbono
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DVS	Divinil sulfona
EDC	Carbodiimida
ETIP	Edema Tardio Intermitente e Persistente
FDA	Food and Drug Administration
GA	Glutaraldeído
IgE	Imonoglobulina E
ISO	International Organization for Standardization
MEC	Matriz extra celular
mg	Miligrama
ml	Mililitro
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo)
PEGDE	Polietilenoglicol diglicidil éter
PBS	Solução Tampão Fosfato Salino
ppm	Partes por milhão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Ácido Hialurônico	15
2.2 Agentes Reticulantes	15
2.3 Efeitos Adversos do Preenchimento de ácido hialurônico	17
2.4 Citotoxicidade do BDDE	18
2.5 Mutagenicidade e Carcinogenicidade do BDDE	19
3 OBJETIVO	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Isolamento Celular	22
4.2 Grupos Experimentais.....	22
4.3 Ensaio de Citotoxicidade	24
4.4 Análise Estatística.....	24
5 RESULTADOS.....	25
6 DISCUSSÃO.....	27
7 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	35
ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP	37

1 INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) é um polímero de glicosaminoglicano aniônico linear não sulfatado e de alto peso molecular, com uma unidade de repetição alternada de ácido D-glucurônico e N-acetil-D-glucosamina (Figura 1).¹ É um importante componente da matriz extracelular em tecidos conjuntivos, epiteliais e neuronais do corpo.² O primeiro produto preenchedor a base de ácido hialurônico foi aprovado nos Estados Unidos pela FDA (Food and Drug Administration) em 2003.³ Segundo a Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica Estética (ISAPS), é a substância de preenchimento mais utilizada no mercado mundial, com um aumento significativo de 30,3% de procedimentos com ácido hialurônico realizados nos últimos quatro anos.

Existem dois processos de produção do polímero de ácido hialurônico em quantidades comerciais: pela extração de fontes aviárias (cristas de galinha), ou de origem bacteriana por fermentação sintética de *Staphylococcus equinus*.⁴ A maioria dos preenchedores é derivada de ácido hialurônico bacteriano devido ao seu potencial alergênico e imunogênico reduzido.⁵

O ácido hialurônico é biocompatível, biodegradável e hidrofílico, o que lhe permite a retenção de excesso de água.⁶ Porém, quando não reticulado ou não modificado, é rapidamente eliminado do local injetado, resultando em um efeito de preenchimento limitado a menos de uma semana^{3,7}, visto que enzimas como a hialuronidase e os radicais livres presentes naturalmente na pele têm a capacidade de degradá-lo rapidamente. Esses polímeros possuem uma meia-vida de 24 a 48 horas nos tecidos, sofrem diluição aquosa e, posteriormente, no fígado, são degradados por reações enzimáticas e hidrolíticas, resultando em água e dióxido de carbono.⁸

Para contornar a rápida degradação do ácido hialurônico, os fabricantes de preenchedores utilizam reticulantes como o 1,4 butanodiol diglicidil éter (BDDE), que aumenta significativamente a estabilidade e a duração do preenchimento dérmico,⁹ chegando a uma longevidade de seis a vinte e quatro meses após a injeção.⁹ O grau de reticulação permite aumentar a rigidez do gel de ácido hialurônico, influenciando muito as características físicas e reológicas do material.¹⁰ Entretanto, a reticulação das cadeias de ácido hialurônico pode levar à presença de BDDE não reagido, ou residual, no produto final, que em quantidades excessivas podem ser tóxicos para as células.¹¹

Especula-se que o BDDE residual possa ser um dos responsáveis por reações de hipersensibilidade após preenchimentos dérmicos com ácido hialurônico.¹² As reações de hipersensibilidade podem ser classificadas como agudas ou tardias, dependendo do tempo de início.¹³ As reações de hipersensibilidade aguda ocorrem dentro de minutos ou horas após as injeções devido a uma resposta imune mediada por imunoglobulina E (IgE) ao preenchedor dérmico.¹⁴ Podem se manifestar como angioedema e reações anafiláticas ocorrendo após exposição inicial, ou repetida.¹⁵ As reações de hipersensibilidade tardia são caracterizadas por endurecimento, eritema e edema, sendo mediadas por linfócitos T em vez de anticorpos. Elas ocorrem tipicamente 48–72 horas após a injeção, mas podem ser observadas até várias semanas após o preenchimento, podendo persistir por muitos meses. Quando isto ocorre, estas reações são chamadas de ETIP (Edema Tardio Intermitente e Persistente).¹⁵ As características do ETIP são reações inflamatórias crônicas colonizadas por bactérias, granulomas, nódulos e abscessos.¹⁵

Embora a etiologia da hipersensibilidade tardia em relação aos preenchedores de ácido hialurônico não seja completamente compreendida, os fatores de influência sugeridos incluem: infecções e traumas anteriores; aspectos relativos à técnica de injeção, como volume do preenchedor, tratamentos repetidos e implantação intramuscular; diferentes propriedades do material, como concentração de ácido hialurônico, características das suas partículas (por tamanho, superfície e carga), grau de reticulação, BDDE residual, e impurezas dos processos de reticulação e biofermentação.¹⁶⁻¹⁸ Com base em dados pré-clínicos, é aconselhável não modificar tanto a molécula de ácido hialurônico que ela não seja mais reconhecida como tal, portanto levando às reações de corpo estranho pelo organismo.¹⁹

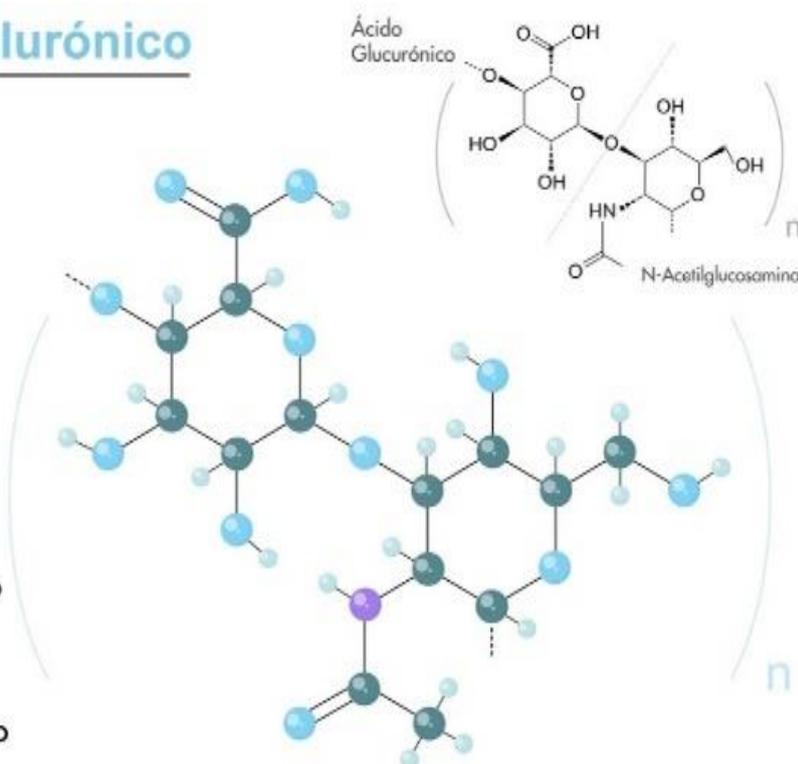
Na literatura, não existem dados de mensuração do BDDE residual dos produtos de preenchimento disponíveis no mercado, e os fabricantes não fornecem nem dados da concentração total de agente reticulante adicionada ao produto, nem o grau de reticulação e nem a concentração de BDDE residual, nos manuais e bulas desses materiais. Dado o exposto, é importante avaliar a toxicidade potencial dos reticulantes ao nível celular, pois eles podem existir como um resíduo não reticulado ou um subproduto após a biodegradação do preenchedor.

Figura 1 - Estrutura Molecular do ácido hialurônico.

Ácido hialurônico

Fórmula molecular:
 $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$

● N Nitrógeno
 ● C Carbono
 ● O Oxígeno
 ● H Hidrógeno



Fonte: <https://magazine.x115.it/es/x115/acido-hialuronico/>

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico é um polímero de alto peso molecular com muitas aplicações na medicina humana.²⁰ Naturalmente, o ácido hialurônico é encontrado na pele humana, na matriz extracelular (MEC), no humor vítreo e no líquido sinovial de articulações.²¹ Suas propriedades biológicas permitiram que ele fosse utilizado em diferentes aplicações biomédicas, como cicatrização de feridas, osteoartrite²² e preenchimentos faciais.²³

No entanto, o ácido hialurônico nativo tem aplicações muito limitadas por não permanecer no corpo humano por períodos prolongados devido às suas pobres propriedades mecânicas (viscoelasticidade e coesividade)²² e rápida biodegradação.⁸ Portanto, os hidrogéis de ácido hialurônico foram desenvolvidos para aumentar a longevidade do polímero no tecido e corrigir as deficiências do contorno na pele.²⁴

Os hidrogéis de ácido hialurônico para preenchimento, têm como forma de apresentação, seringas de plástico ou vidro em volumes variados de 1 ml, 1,2 ml ou 2 ml. Podem ser transportados e armazenados em temperatura ambiente por até 2 anos.⁹ São projetados com diferentes tecnologias de fabricação,²⁵ sendo que o grau de reticulação, a estrutura da rede tridimensional,²⁶ a concentração de ácido hialurônico,¹⁷ os níveis de coesividade²⁷ e as propriedades reológicas²⁸ variam conforme as marcas comerciais dos preenchedores.¹²

2.2 Agentes Reticulantes

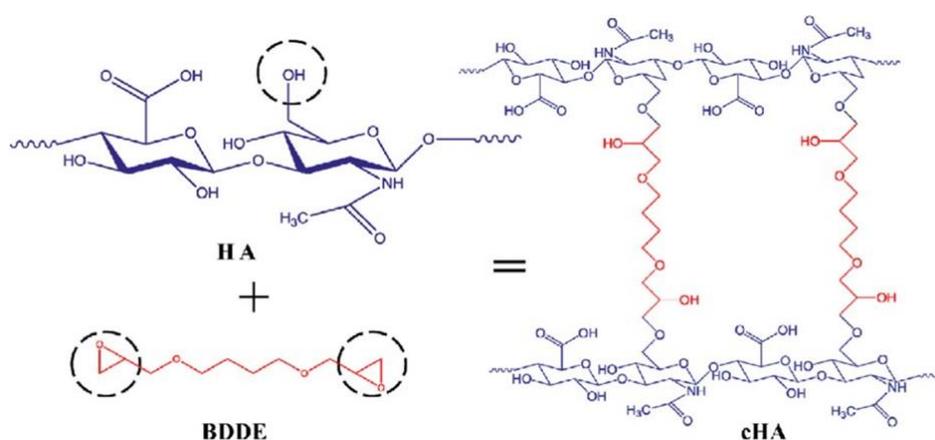
Estudos relataram que os principais reticulantes empregados em preenchimentos dérmicos de ácido hialurônico utilizados comercialmente são: 1,4 butanodiol diglicidil éter (BDDE),^{29,30} divinil sulfona (DVS),^{2,29} polietilenoglicol diglicidil éter (PEGDE),³⁰ 1-etil-3-(dimetilaminopropil),³¹ carbodiimida (EDC),³² 1,2,7,8-diepoxi octano³³ e glutaraldeído (GA).³⁴ Eles reagem com os grupos hidroxila nas cadeias de ácido hialurônico, retardando a drenagem e a degradação do hidrogel injetado na pele.²⁹

O BDDE é o agente reticulante mais utilizado em preenchimentos dérmicos do mercado devido às suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, estabilidade e segurança, fornecendo ligações covalentes irreversíveis entre as cadeias de ácido hialurônico⁹ (Figura 2). Os grupos epóxidos presentes nas duas extremidades

da molécula de BDDE reagem, preferencialmente, com os grupos nucleófilos do ácido hialurônico, formando uma ligação éter, um composto conhecido como 1,4 butanodiol di-(propan-2,3-diolil) éter (BDPE) e seus derivados ⁹ (Figura 3). A primeira porção do BDDE reage apenas com água, formando BDPE livre. A segunda porção reage com água em uma extremidade e com ácido hialurônico na outra, formando BDPE monoligado. Uma terceira porção reage com ácido hialurônico em ambas as extremidades, produzindo BDPE duplamente ligado, resultando nas ligações cruzadas encontradas nos hidrogéis de ácido hialurônico. Quando parte do BDDE não reage nem com ácido hialurônico e nem com água, se forma BDDE residual. O BDDE residual, o BDPE livre e o BDPE monoligado não são úteis para estabilizar o preenchimento de ácido hialurônico, aumentando a quantidade de BDDE na reação sem nenhum efeito funcional. ⁹

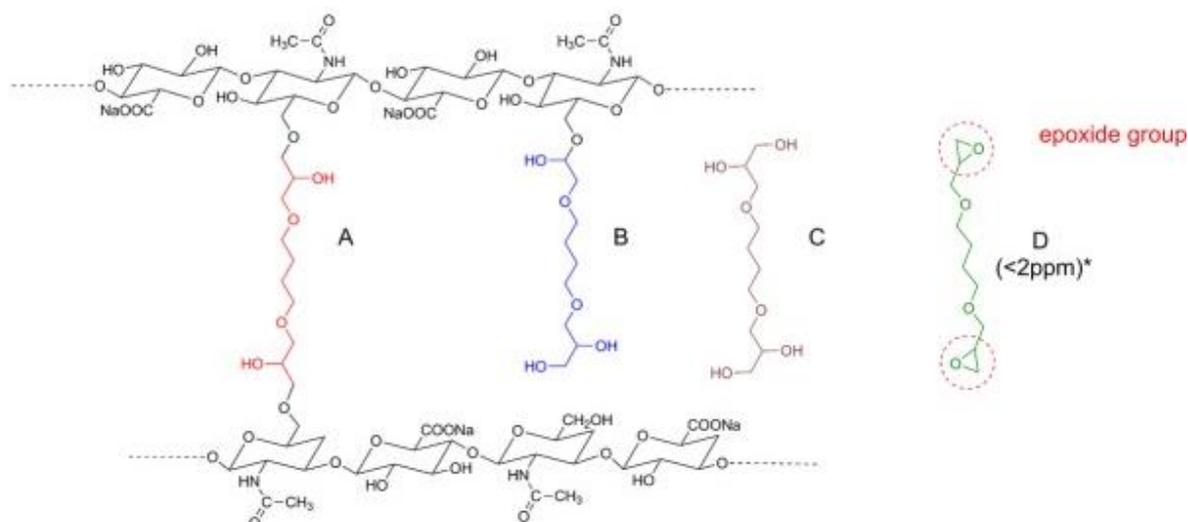
Nos hidrogéis reticulados com BDDE, a quantidade total de reticulante e o grau de reticulação influenciam diretamente as propriedades do hidrogel, como solubilidade, viscosidade, estabilidade entre outras características do polissacarídeo. ³⁵ Em um estudo onde se comparou o BDDE com a divinil sulfona como agente de reticulação, observou-se menor toxicidade do BDDE, por criar uma rede tridimensional mais estável. ³⁶ Os autores Jeong et al. (2020) ³⁰ relataram que o PEGDE é mais seguro por ter menos efeitos citotóxicos do que o BDDE como agente reticulador.

Figura 2 - Processo de Reticulação do ácido hialurônico.



Fonte: Zhang JN, Chen BZ, Ashfaq M, Zhang XP, Guo XD. Development of a BDDE-crosslinked hyaluronic acid based microneedles patch as a dermal filler for anti-ageing treatment. *J Ind Eng Chem.* 2018 Sep;65:363- 369.

Figura 3 - BDPE e seus derivados.



Fonte: De Boulle K, Glogau R, Kono T, Nathan M, Tezel A, Roca-Martinez J, et al. A review of the metabolism of 1,4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers. **Dermatol Surg.** 2013 Dec;39(12):1758-1766.

2.3 Efeitos Adversos do Preenchimento de ácido hialurônico

Tratamentos faciais com preenchimentos dérmicos ocasionalmente dão origem a efeitos adversos, podendo ser temporários, como vermelhidão da pele, ou de longo prazo, como endurecimento do tecido.¹⁰ Parece haver uma relação entre a vida útil do preenchedor e o risco dessas reações.¹⁰ A vida útil dos preenchedores à base de ácido hialurônico depende da presença e quantidade de agentes de reticulação, como BDDE.¹⁰

Altos graus de reticulação com BDDE, associados às cadeias curtas de ácido hialurônico, poderiam influenciar o desenvolvimento de reações tardias, enquanto níveis mais baixos de reticulação oferecem perfis de eficácia e segurança.³⁸ Clark (2007)³⁹ afirmou que quaisquer reações alérgicas ou efeitos colaterais produzidos por preenchimentos à base de ácido hialurônico seriam causadas pelo BDDE. O estudo teorizou que a manipulação do ácido hialurônico por meio de reticulação poderia resultar em uma reação de corpo estranho em humanos.

Kenne et al. (2013)²³ relataram que quando o hidrogel de ácido hialurônico é formado por reação com BDDE, alguns elementos dissacarídeos no polímero são substituídos por resíduos de 1,4 butanodiol di-(propan-2,3-diolil) éter (BDPE) e a

enzima hialuronidase enfrenta um substrato parcialmente irreconhecível. O que pode levar às reações de hipersensibilidade.

Porém, Abduljabbar & Basendwh (2016)⁴⁰ observaram em estudo clínico realizado em pacientes que haviam sido submetidos ao preenchimento com ácido hialurônico, que nenhum dos adventos adversos mais graves, como hipersensibilidade, reações inflamatórias de início tardio (granulomas), infecções ou comprometimentos vasculares, foram, de fato, comprovados que estavam relacionados com traços residuais do agente reticulador do ácido hialurônico.

Smith & Cockerham (2011)⁴¹ argumentaram que causas hipotéticas de hipersensibilidade ao preenchedor de ácido hialurônico incluem respostas imunes inflamatórias direcionadas contra anestésicos incluídos na formulação e/ou contra produtos de degradação de ácido hialurônico reticulado liberado ao longo do tempo.

2.4 Citotoxicidade do BDDE

Estudos apontaram que o reticulante BDDE, pode levar à citotoxicidade e efeitos adversos nos tecidos locais.^{39,42} Ou seja, após a reação com o ácido hialurônico, o BDDE que não reagiu ao processo de reticulação pode permanecer no produto, principalmente nos casos em que são injetados um grande volume de preenchedor.² Ao analisarem a citotoxicidade do ácido hialurônico reticulado com BDDE em concentrações de: 0,5, 1, 5 e 10 ppm através do ensaio MTT, observaram que o preenchedor de ácido hialurônico reticulado com 10 ppm de BDDE diminuiu a viabilidade em 24 h de fibroblastos de prepúcio humanos em 67%.

Jeong et al. (2020)³⁰ compararam a citotoxicidade dos reticulantes BDDE e PEGDE (polietilenoglicol diglicidil éter), em queratinócitos e fibroblastos dérmicos humanos e observaram que em baixas concentrações (0 – 25 ppm) não houve citotoxicidade nem alterações celulares no modelo de cultura adotado, porém em concentrações maiores, foram observadas diversas alterações celulares: [1] a viabilidade celular de fibroblastos foi menor quando tratados com BDDE entre 100-1000 ppm, e com PEGDE 500-1000 ppm indicando citotoxicidade; [2] a integridade da membrana celular foi rompida quando expostas a 100 ppm BDDE e alterações na morfologia celular foram observadas; [3] houve aumento significativo do nível de estresse oxidativo em fibroblastos expostos a 10, 50 ou 100 ppm BDDE; [4] nas células tratadas com 50 e 100

ppm BDDE foram observadas disfunções mitocondriais e níveis mais altos de citocinas. A taxa de quebra do reticulante e sua liberação no ambiente circundante podem ter impacto na cultura celular.³⁰ Concluíram que o BDDE é mais citotóxico que o PEGDE.

Lee et al. (2020)⁴³ relataram que o nível de toxicidade, LD₅₀, do BDDE é de 1,130 mg/kg, determinado de acordo com administração oral em camundongos. Isso significa que, em média, metade dos animais expostos a essa dose específica de BDDE morreria como resultado da exposição aguda. Entretanto, a dose utilizada para sensibilização da pele não é conhecida. Em um preenchimento com alta reticulação, acredita-se que o conteúdo de BDDE adicionado à reação seja elevado e possa causar reações alérgicas, como inchaço imediato ou tardio.⁴³ Quando a técnica de reticulação não é suficiente, a quantidade de BDDE residual aumentaria ainda mais, o que pode também causar hipersensibilidade da pele. Desta forma, o processo de reticulação tem que ser suficiente para alcançar persistência prolongada do preenchedor, evitando complicações desnecessárias.^{2,9}

Foram utilizados dados de toxicidade crônica e subcrônica (de acordo com ISO 10993-11) para determinar a dose segura de produtos Juvederm® (Allergan®) em animais. A partir deste estudo, a dose anual equivalente humana foi determinada como sendo igual a 20 ml por cada 60 kg de peso corporal (conforme as Diretrizes ISO 10993-17 e as orientações da FDA: estimando a dose inicial máxima segura em ensaios clínicos iniciais para a terapêutica em adultos saudáveis).⁹

No entanto, vale ressaltar que a citotoxicidade pode variar entre diferentes tipos de células humanas, dependendo da concentração de BDDE, do tempo de exposição ao material, além do seu metabolismo e eliminação.³⁰

2.5 Mutagenicidade e Carcinogenicidade do BDDE

Conforme Foureman et al. (1994),⁴⁴ o BDDE é facilmente biodegradável, embora uma ação mutagênica (que se acredita ser o resultado da natureza reativa dos grupos epóxidos) tenha sido detectada em Drosófilas. Para Tezel & Fredrickson (2008),³ a potencial ação mutagênica do BDDE é devido à quantidade de moléculas de BDDE não ligadas ao preenchedor de ácido hialurônico que deve ser mantida em níveis determinados.

Segundo Faivre et al. (2021),⁴⁵ o limite residual de BDDE inferior a 2 ppm foi inicialmente estabelecido como parte da análise toxicológica dos produtos Restylane® (Galderma®), que levou em consideração o risco mínimo de câncer para pacientes submetidos ao preenchimento conforme o uso pretendido do produto. Essa lógica foi posteriormente adotada pela Food and Drug Administration (FDA) e a especificação de BDDE residual abaixo de 2 ppm que equivale a <0,002 mg de BDDE em 1 ml de gel de ácido hialurônico foi estendida a todos os preenchimentos de ácido hialurônico comercializados, para um risco mínimo de câncer.⁴⁶

Para Xue et al. (2020),⁴⁷ o gel de AH reticulado com BDDE induziu alterações na morfologia celular e diminuiu a viabilidade celular em fibroblastos de camundongos a uma concentração de 0,5 mg/ml, apresentando certa toxicidade biológica e potencial carcinogênico. Concluíram que os resíduos deste reticulador devem ser investigados. Para Ciba-Geigy Corporation⁴⁸ um efeito carcinogênico definitivo com BDDE, não foi observado em camundongos quando foram expostos por via inalatória a 15 mg/l por 4 horas diárias durante 14 dias.

3 OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa *in vitro* foi avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações de BDDE (1,4 butanodiol diglicidil éter), usados em associação ou não com o ácido hialurônico, após 1 ou 7 dias de contato com fibroblastos humanos. A hipótese nula deste estudo é que não há diferença na viabilidade celular em função da concentração de BDDE, indicando a atoxicidade do material nos diferentes tempos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolamento Celular

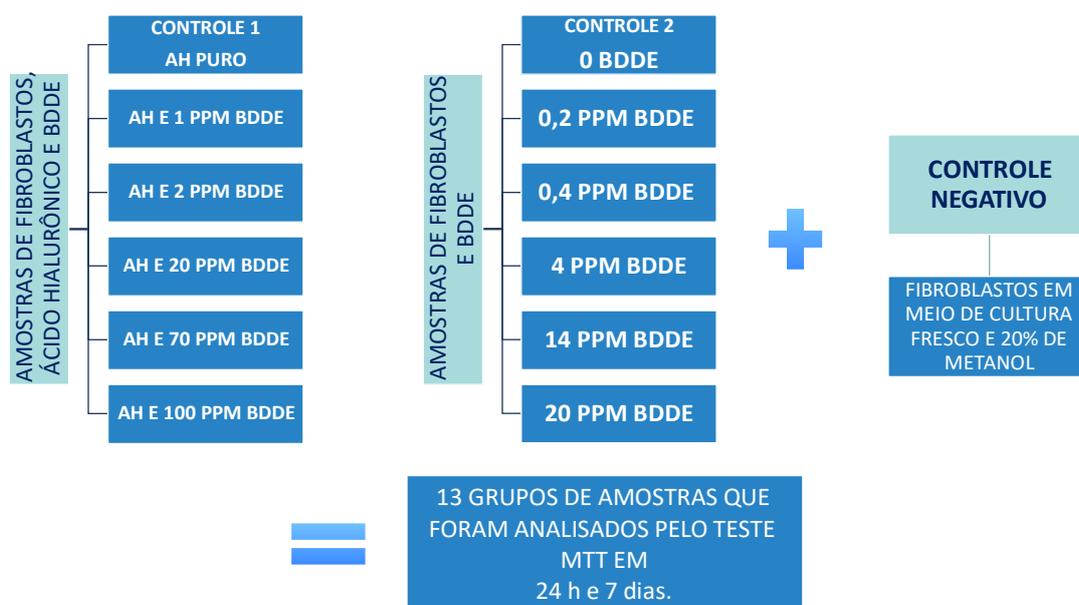
O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Santo Amaro (**CAAE:** 74717523.5.0000.0081). Fibroblastos gengivais humanos foram isolados, pela técnica do explante, a partir de tecido gengival removido para reabertura de implante e coletado mediante Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do paciente (TCLE). Brevemente, o tecido foi cortado em pequenos fragmentos e cultivados em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com alta glicose (Vitrocell® / Embriolife, Campinas, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell® / Embriolife) e 1% de solução antibiótica-antimicótica. As células foram mantidas em estufa de CO₂ a 37° C e o meio foi trocado a cada 3 dias. À medida que a células migravam do tecido para a placa de cultura, elas eram transferidas para garrafas de cultivo com o uso de enzima tripsina (Vitrocell® / Embriolife). As células foram expandidas até atingirem 90% de confluência para serem então utilizadas no experimento.

4.2 Grupos Experimentais

Para a análise da citotoxicidade, foram preparadas 13 amostras (Figura 4). Sendo destes: um grupo controle positivo com meio de cultura fresco apenas, um grupo controle com meio de cultura fresco e 20% de hidrogel de ácido hialurônico não reticulado sem BDDE e um grupo controle negativo em meio de cultura fresco com 20% metanol, conhecidamente citotóxico. Nos 10 grupos experimentais, metade foi feita com 20% de hidrogel de ácido hialurônico não reticulado (Toskani®/ Mesoesthetic®, Barcelona, Espanha) associado com BDDE em concentrações de: 1, 2, 20, 70 e 100 ppm em relação ao ácido hialurônico, em meio de cultura. A outra metade foi composta pela mesma quantidade de BDDE, solubilizado apenas em meio de cultivo, o que resultou em concentrações de 0,2, 0,4, 4, 14 e 20 ppm na solução, ou seja, 1/5 do número indicado da concentração anterior.

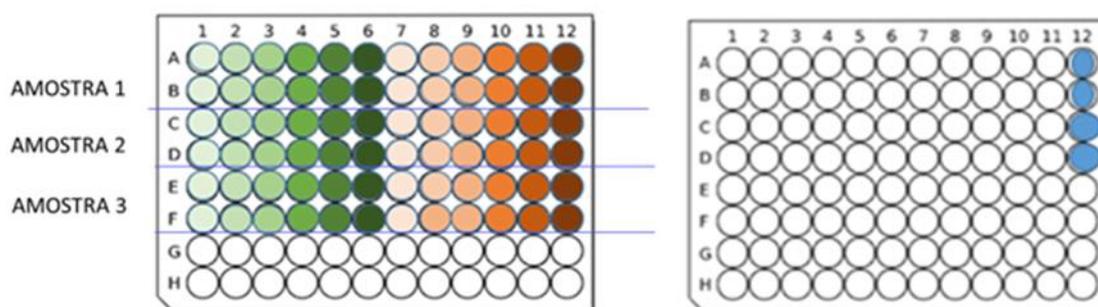
A Figura 5 mostra a disposição das amostras na placa de cultivo celular, indicando que para cada condição experimental foram feitas 3 amostras, que, por sua vez, foram mensuradas por duas vezes. O controle negativo foi realizado em uma placa isolada, para evitar que o vapor de metanol interferisse na viabilidade celular dos demais grupos.

Figura 4 - Grupos de Amostras.



Fonte: a autora

Figura 5 - Disposição das amostras na placa de cultivo celular. Para cada condição experimental foram feitas 3 amostras, que foram mensuradas por 2 vezes. Na placa isolada em azul, o controle negativo com meio de cultura, fibroblastos e metanol a 20%.



Fonte: a autora

4.3 Ensaios de Citotoxicidade

Conforme as diretrizes ISO 10993-5, em uma placa de cultura de 96 poços, foram adicionados fibroblastos humanos na passagem 5, na concentração de 1×10^4 células/poço. Após 24h em meio DMEM com alta glicose (Vitrocell® Embriolife), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell® Embriolife) e 1% de solução antibiótica-antimicótica, o meio foi removido, as células foram lavadas duas vezes com PBS (tampão fosfato salino) e as amostras de cada material, bem como dos grupos controles, foram adicionados sobre as células.

A cada 3 dias, metade do meio de cultura de cada poço foi substituída por amostras do mesmo grupo experimental. A citotoxicidade foi analisada após 1 e 7 dias, quando as células foram lavadas com PBS e foi adicionada uma solução composta por 80% de DMEM (sem soro) e 20% de solução de 3-(4,5 dimetiltiazol-2yl) - difeniltetrazolimbromídeo (MTT) em PBS a 5 mg/ml^{-1} . Após 3 horas na estufa, a solução foi removida, os cristais formados foram solubilizados em álcool isopropílico e a absorbância da solução foi mensurada em espectrofotômetro em 560 nm. As células em meio de cultura fresco foram utilizadas como controle positivo de viabilidade celular e as células em meio de cultura e 20% metanol foram utilizadas como controle negativo de viabilidade celular. A média de absorbância do grupo controle foi de 100% de viabilidade celular e a citotoxicidade dos demais grupos foi expressa em percentual relativo ao grupo controle. Quando a viabilidade celular é maior que 70%, o material é considerado não tóxico e quando menor que 70% é considerado tóxico.

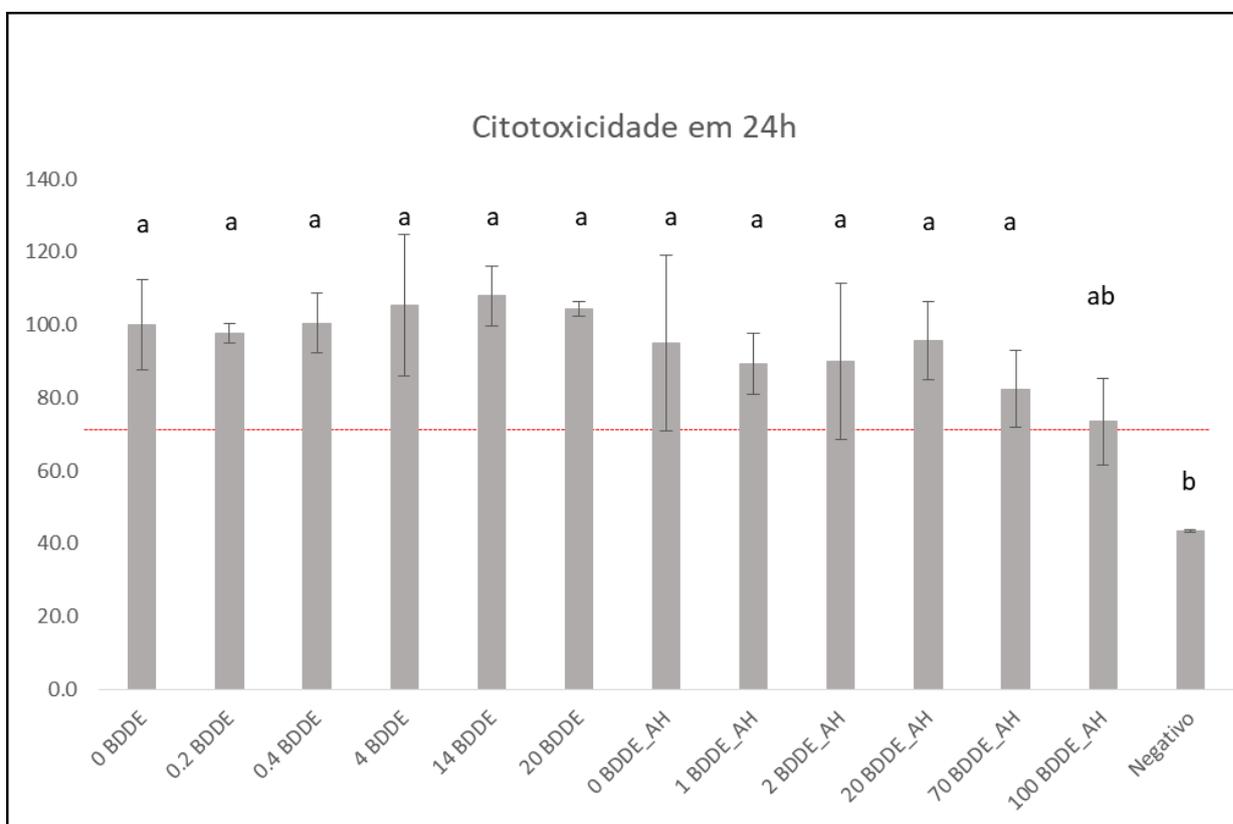
4.4 Análise Estatística

Os dados foram avaliados quanto à normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Teste de Levene) e os dados foram submetidos a ANOVA de fator único e Teste de Tukey para cada um dos tempos de análise, com nível global de significância de 95% ($\alpha=0,05$).

5 RESULTADOS

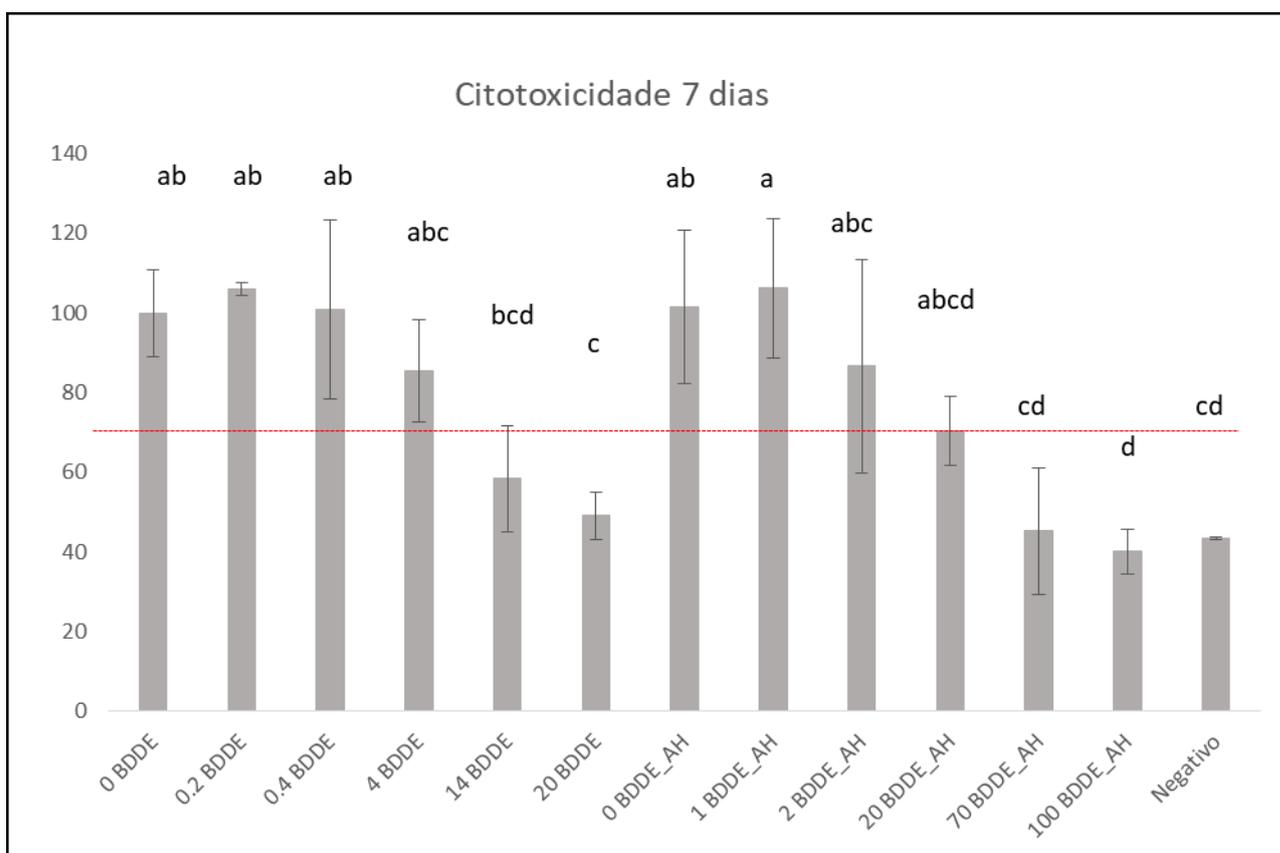
A viabilidade celular em 24 h (Figura 6) foi superior a 70% para todos os grupos avaliados, exceto o controle negativo, indicando que não houve nenhum grupo experimental tóxico. Já a viabilidade celular em 7 dias (Figura 7) indicou a citotoxicidade (viabilidade menor que 70%) dos grupos sem ácido hialurônico e com 14 e 20 ppm de BDDE em meio de cultura, e diferença estatística entre o grupo de 20 ppm e seu respectivo controle positivo. Também foram observadas citotoxicidade dos grupos com 20% de ácido hialurônico e BDDE nas concentrações de 70 e 100 ppm de BDDE, bem como diferenças estatísticas significantes destes para os seus respectivos controles positivos (com ou sem ácido hialurônico e sem BDDE) e semelhança estatística com o controle negativo.

Figura 6 - Citotoxicidade em 24 h.



Fonte: a autora

Figura 7 - Citotoxicidade em 7 dias.



Fonte: a autora

6 DISCUSSÃO

A hipótese nula do estudo, que diferentes concentrações de BDDE associadas ou não a ácido hialurônico, de não apresentarem diferenças quanto a viabilidade celular foi rejeitada, pois embora em 24 h não houve diferenças estatísticas entre os grupos experimentais e os controles positivos, em 7 dias, as duas maiores concentrações de BDDE, associadas ou não a ácido hialurônico foram tóxicas.

O ácido hialurônico é um material biocompatível, natural, encontrado na nossa pele, desempenhando um papel crucial na hidratação e na manutenção da sua elasticidade.²¹ Está presente também: nas cartilagens, no líquido sinovial, ajudando a lubrificar as articulações e a reduzir o atrito;²¹ no humor vítreo, uma substância gelatinosa no interior dos olhos e em diversos tecidos conjuntivos do corpo fornecendo suporte e estrutura.²¹ Portanto, era de se esperar que o grupo controle, onde 20% de hidrogel de ácido hialurônico não reticulado foi solubilizado em meio de cultura, se apresentasse não citotóxico em 24 h e 7 dias. O que de fato foi confirmado no presente estudo, validando nossa metodologia, em consonância com outros estudos,^{6, 9, 49} e indicando que na concentração de 20% é possível manter a viabilidade celular, sem escassez de nutrientes para o seu desenvolvimento.

A agência regulatória americana, Food and Drug Administration (FDA), recomenda que o nível residual de BDDE não reagente seja inferior a menos de 2 ppm para ser seguro. Isso equivaleria a <0,002 mg de BDDE em 1 ml de gel de ácido hialurônico.⁹ De fato, no presente estudo, esta concentração não se mostrou citotóxica na leitura de 24 h e 7 dias, nos grupos em que o BDDE foi diluído em meio de cultura sem associação de ácido hialurônico, sendo a dose citotóxica, cerca de 35 vezes superior ao limite, indicando a segurança da manutenção dentro dos limites regulatórios.

Quando o BDDE está associado ao ácido hialurônico, espera-se que reajam entre si e nem todo BDDE adicionado se torna residual,⁹ portanto, não é possível fazer esta comparação entre os grupos com BDDE associados ao ácido hialurônico. Ainda não encontramos na literatura estudos que, de fato, consigam quantificar a concentração de BDDE residual em hidrogéis reticulados de ácido hialurônico, o que limita a comparação entre as diferentes marcas e o controle dos materiais comerciais.

No presente estudo, embora nenhuma das concentrações foram citotóxicas em 24 h, as concentrações de 14 e 20 ppm de BDDE em meio de cultura não associados ao ácido hialurônico e de 70 e 100 ppm associados ao ácido hialurônico foram citotóxicas em 7 dias, indicando uma citotoxicidade tardia. Muitos estudos especulam que as reações de hipersensibilidade tardia observadas clinicamente após o preenchimento com ácido hialurônico seriam oriundas da alta concentração de reticulante associado a cadeias curtas de ácido hialurônico, ^{38,50} resultando em altas concentrações de BDDE não reticulado. Os dados deste estudo corroboram tais hipóteses, embora estudos controlados *in vivo* sejam necessários para estabelecer esta relação de causa e efeito apropriadamente.

O estudo do autor Boeckel (2011)⁴⁹ avaliou a citotoxicidade do ácido hialurônico como veículo no composto celular autógeno para enxertia óssea com 20% de hidrogel de ácido hialurônico reticulado Teosyal® (a concentração de BDDE não foi informada pelo fabricante) em meio de cultura e células da linhagem pré-osteoblástica de camundongos denominadas OFCOL II. O teste MTT foi realizado 48 horas após a adição do ácido hialurônico em meio de cultura e células. A viabilidade celular média foi de 72%, concluindo que o produto não apresentou citotoxicidade sobre as células analisadas, corroborando os resultados do presente estudo.

O atual estudo também corrobora os resultados de Jeong et al. (2020),³⁰ no qual apenas BDDE em meio de cultura não induziu respostas celulares tóxicas em fibroblastos quando em baixas concentrações (0 – 25 ppm), mas foi citotóxico em concentração de 100 ppm após 7 dias de cultivo.

Entretanto, enfatizo que alguns autores como Choi et al. (2015)² observaram que o preenchedor de ácido hialurônico reticulado com 10 ppm de BDDE já diminui a viabilidade celular em 24 horas, possivelmente por se tratar de outra linhagem celular, ou seja, fibroblastos de prepúcio humanos, e por ser avaliado em outra proporção de ácido hialurônico em meio de cultura, dado não informado no estudo.

Este é um estudo laboratorial que nos permite compreender a citotoxicidade dose dependente do BDDE associado ou não ao hidrogel de ácido hialurônico, entretanto cabe destacar que tais dados não podem ser levados diretamente para a prática clínica. Mais estudos *in vitro* e *in vivo* se fazem necessários, pois por se trabalhar com ácido

hialurônico não reticulado comercial, outros componentes associados à formulação do produto podem interferir nos resultados. E, visto ter-se adicionado o BDDE, mas não ter analisado a reticulação obtida, não se tem a quantificação da concentração de BDDE residual que possa estar causando citotoxicidade. Além disso, a citotoxicidade pode também estar associada ao volume de hidrogel adicionado,² à viscosidade ³⁵ e taxa de degradação do mesmo,³⁰ bem como ao tipo celular analisado. ³⁰

7 CONCLUSÃO

Podemos concluir que o BDDE associado ou não ao ácido hialurônico, não se mostrou citotóxico em 24 horas, nas concentrações avaliadas. Porém, foi citotóxico na concentração de 14 e 20 ppm do grupo apenas com BDDE e nas concentrações de 70 e 100 ppm no grupo com BDDE e ácido hialurônico, após 7 dias.

REFERÊNCIAS

1. Wang Y, Cai L, Nugraha B, Gao Y, Leo HL. Current hydrogel solutions for repairing and regeneration of complex tissues. **Curr Med Chem**. 2014;21(22):2480-2496.
2. Choi SC, Yoo MA, Lee SY, Lee HJ, Son DH, Jung J, et al. Modulation of biomechanical properties of hyaluronic acid hydrogels by crosslinking agents. **J Biomed Mater Res A**. 2015 Sep;103(9):3072-3080.
3. Tezel A, Fredrickson GH. The science of hyaluronic acid dermal fillers. **J Cosmet Laser Ther**. 2008 Mar;10(1):35-42.
4. Sze JH, Brownlie JC, Love CA. Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. **3 Biotech**. 2016 Jun;6(1):67-75.
5. Gold MH. Use of hyaluronic acid fillers for the treatment of the aging face. **Clin Interv Aging**. 2007;2(3):369-376.
6. Allemann IB, Baumann L. Hyaluronic acid gel (Juvéderm) preparations in the treatment of facial wrinkles and folds. **Clin Interv Aging**. 2008;3(4):629-34.
7. Matarasso SL. Understanding and using hyaluronic acid. **Aesthet Surg J**. 2004 Aug;24(4):361-364.
8. Monheit GD, Coleman KM. Hyaluronic acid fillers. **Dermatol Ther**. 2006 Jun;19(3):141-150.
9. De Boulle K, Glogau R, Kono T, Nathan M, Tezel A, Roca-Martinez J, et al. A review of the metabolism of 1,4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers. **Dermatol Surg**. 2013 Dec;39(12):1758-1766.
10. Keizers PJ, Vanhee C, Van Den Elzen EW, Jong WH, Venhuis BJ, Hodemaekers H, et al. A high crosslinking grade of hyaluronic acid found in a dermal filler causing adverse effects. **J Pharm Biomed Anal**. 2018 Sep;159:173-178.
11. Hennink WE, Van Nostrum CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. **Adv Drug Deliv Rev**. 2002 Jan;54(1):13-36.
12. Kim J, Sykes JM. Hyaluronic acid fillers: history and overview. **Facial Plast Surg**. 2011 Dec;27(6):523-528.
13. Rzany B, DeLorenzi C. Understanding, avoiding, and managing severe filler complications. **Plast Reconstr Surg**. 2015 Nov;136 (Suppl 5):196S-203S.
14. Lowe NJ, Maxwell CA, Patnaik R. Adverse reactions to dermal fillers: review. **Dermatol Surg**. 2005 Nov;31:1616-1625.
15. Alijotas-Reig J, Fernández-Figueras MT, Puig L. Late-onset inflammatory adverse reactions related to soft tissue filler injections. **Clin Rev Allergy Immunol**. 2013 Aug;45(1):97-108.

16. Alijotas-Reig J, Fernández-Figueras MT, Puig L. Inflammatory, immune-mediated adverse reactions related to soft tissue dermal fillers. **Semin Arthritis Rheum.** 2013 Oct;43(2):241-258.
17. Romagnoli M, Belmontesi M. Hyaluronic acid-based fillers: theory and practice. **Clin Dermatol.** 2008 Apr;26(2):123-159.
18. Bentkover SH. The biology of facial fillers. **Facial Plast Surg.** 2009 May;25(2):73-85.
19. Edsman K, Nord LI, Ohrlund A, Lärkner H, Kenne AH. Gel properties of hyaluronic acid dermal fillers. **Dermatol Surg.** 2012 Jul;38: 1170-1179.
20. Šimkovic I, Hricov M, Šoltés L, Mendichi R, Cosentino C. Preparation of watersoluble/insoluble derivatives of hyaluronic acid by cross-linking with epichlorohydrin in aqueous NaOH/NH₄OH solution. **Carbohydr Polym.** 2000; 41: 9-14.
21. Schanté C, Zuber G, Herlin C, Vandamme T. Synthesis of N-alanyl-hyaluronamide with high degree of substitution for enhanced resistance to hyaluronidase mediated digestion. **Carbohydr Polym.** 2011; 86:747-752.
22. Liu L, Liu D, Wang M, Du G, Chen J. Preparation and characterization of spongelike composites by cross-linking hyaluronic acid and carboxymethyl cellulose sodium with adipicdi hydrazide. **European Polymer Journal.** 2007;43(6):2672-2681.
23. Kenne L, Gohil S, Nilsson EM, Karlsson A, Ericsson D, Helander Kenne A, et al. Modification and cross-linking parameters in hyaluronic acid hydrogels--definitions and analytical methods. **Carbohydr Polym.** 2013;91(1):410-418.
24. Manna F, Dentini M, Desideri P, De Pità O, Mortilla E, Maras B. Comparative chemical evaluation of two commercially available derivatives of hyaluronic acid (hylaform from rooster combs and restylane from streptococcus) used for soft tissue augmentation. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** 1999 Nov;13(3):183-92.
25. Micheels P, Sarazin D, Tran C, Salomon D. Effect of Different Crosslinking Technologies on Hyaluronic Acid Behavior: A Visual and Microscopic Study of Seven Hyaluronic Acid Gels. **J Drugs Dermatol.** 2016 May;15(5):600-606.
26. Mondon K, Dadras M, Tillier J, Gavard Molliard S. Influence of the macro- and/or microstructure of cross-linked hyaluronic acid hydrogels on the release of two model drugs. **J Glycobiol.** 2016;5:119.
27. Sundaram H, Rohrich RJ, Liew S, Sattler G, Talarico S, Trévidic P, Molliard SG. Cohesivity of Hyaluronic Acid Fillers: Development and Clinical Implications of a Novel Assay, Pilot Validation with a Five-Point Grading Scale, and Evaluation of Six U.S. Food and Drug Administration-Approved Fillers. **Plast Reconstr Surg.** 2015 Oct;136(4):678-686.

28. Molliard SG, Albert S, Mondon K. Key importance of compression properties in the biophysical characteristics of hyaluronic acid soft-tissue fillers. **J Mech Behav Biomed Mater.** 2016 Aug;61:290-298.
29. Yang B, Guo X, Zang H, Liu J. Determination of modification degree in BDDE-modified hyaluronic acid hydrogel by SEC/MS. **Carbohydr Polym.** 2015 Oct;131:233-239.
30. Jeong CH, Kim DH, Yune JH, Kwon HC, Shin D, Sohn H, et al. In vitro toxicity assessment of crosslinking agents used in hyaluronic acid dermal filler. **Toxicol In Vitro.** 2020 Feb;70:105034.
31. Horkay F, Hecht AM, Geisseler E. Similarities between polyelectrolyte gels and biopolymer solutions. **J Polym Sci Pol Phys.** 2006;44:3679-3686.
32. Hwang HD, Cho HJ, Balakrishnan P, Chung CW, Yoon IS, Oh YK, et al. Cross-linked hyaluronic acid-based flexible cell delivery system: application for chondrogenic differentiation. **Colloids Surf B Biointerfaces.** 2012 Mar;91:106-13.
33. Kim HJ, Kim KK, Park IK, Choi BS, Kim JH, Kim MS. Hybrid scaffolds composed of hyaluronic acid and collagen for cartilage regeneration. **Tissue Eng Regen Med.** 2012; 9:57-62.
34. Segura T, Anderson BC, Chung PH, Webber RE, Shull KR, Shea LD. Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern. **Biomaterials.** 2005;26(4):359-71.
35. Wende FJ, Gohil S, Mojarradi H, Gerfaud T, Nord LI, Karlsson A, et al. Determination of substitution positions in hyaluronic acid hydrogels using NMR and MS based methods. **Carbohydr Polym.** 2016 Jan;136:1348-1357.
36. Agerup B, Berg P, Akermark C. Non-animal stabilized hyaluronic acid: a new formulation for the treatment of osteoarthritis. **BioDrugs.** 2005;19(1):23-30.
37. Zhang JN, Chen BZ, Ashfaq M, Zhang XP, Guo XD. Development of a BDDE-crosslinked hyaluronic acid based microneedles patch as a dermal filler for anti-ageing treatment. **J Ind Eng Chem.** 2018 Sep;65:363- 369.
38. Rzany B, Converset-Viethel S, Hartmann M, Larrouy J, Ribé N, Sito G, et al. Efficacy and safety of 3 new resilient hyaluronic acid fillers, crosslinked with decreased BDDE, for the treatment of dynamic wrinkles: results of an 18-month, randomized controlled trial versus already available comparators. **Dermatol Surg.** 2019 Oct;45(10):1304-1314.
39. Clark CP. Animal-based hyaluronic acid fillers: scientific and technical considerations. **Plast Reconstr Surg.** 2007 Nov;120(Suppl 6):27S-32S.
40. Abduljabbar MH, Basendwh MA. Complications of hyaluronic acid fillers and their managements. **J Dermatol Surg.** 2016;20(2):100-106.

41. Smith L, Cockerham K. Hyaluronic acid dermal fillers: can adjunctive lidocaine improve patient satisfaction without decreasing efficacy or duration? **Patient Prefer Adherence**. 2011 Mar;5:133-139.
42. Al-Sibani M, Al-Harrasi A, Neubert RH. Study of the effect of mixing approach on cross-linking efficiency of hyaluronic acid-based hydrogel cross-linked with 1,4-butanediol diglycidyl ether. **Eur J Pharm Sci**. 2016;91:131-137.
43. Lee W, Hwang SG, Oh W, Kim CY, Lee JL, Yang EJ. Practical guidelines for hyaluronic acid soft-tissue filler use in facial rejuvenation. **Dermatol Surg**. 2020 Jan;46(1):41-49.
44. Foureman P, Mason JM, Valencia R, Zimmering S. Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. IX. Results of 50 coded compounds tested for the National Toxicology Program. **Environ Mol Mutagen**. 1994;23(1):51-63.
45. Faivre J, Pigweh AI, Iehl J, Maffert P, Goekjian P, Bourdon F. Crosslinking hyaluronic acid soft-tissue fillers: current status and perspectives from an industrial point of view. **Expert Rev Med Devices**. 2021 Dec;18(12):1175-1187.
46. Medicis Aesthetic Holding Incorporation. Documento original que trata do limite de BDDE em 2 ppm considerado seguro para o preenchimento de ácido hialurônico. [internet]; 2005 [acesso em 2024 jan 05]. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf4/P040024b.pdf
47. Xue Y, Chen H, Xu C, Yu D, Xu H, Hu Y. Synthesis of hyaluronic acid hydrogels by crosslinking the mixture of high-molecular-weight hyaluronic acid and low-molecular-weight hyaluronic acid with 1,4-butanediol diglycidyl ether. **RSC Adv**. 2020 Feb;10(12):7206-7213.
48. Ciba-Geigy Corporation. Cutaneous Carcinogenicity Study with Mice on the Diglycidyl Ether of 1,4-butanediol with Attachments and Cover Letter. [internet]. USA; 1987 [acesso em 2023 abr 28]. Disponível em: <https://ntrl.ntis.gov/NTRL/dashboard/searchResults/titleDetail/OTS0513957.xhtml>
49. Boeckel DG. Ensaio de citotoxicidade do ácido hialurônico como veículo no composto celular autógeno para enxertia óssea. [Dissertação]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2011.
50. Arron ST, Neuhaus IM. Persistent delayed-type hypersensitivity reaction to injectable non-animal-stabilized hyaluronic acid. **J Cosmet Dermatol**. 2007 Sep;6(3):167-171.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PROTÓCOLO: MENSURAÇÃO DA TOXICIDADE DO BDDE (1,4 BUTANODIOL DIGLICIDIL ÉTER) EM DIFERENTES MARCAS COMERCIAIS DE ÁCIDO HIALURÔNICO.

Estes esclarecimentos estão sendo apresentados para solicitar sua participação livre e voluntária, no projeto “mensuração da toxicidade do BDDE (1,4 butanodiol diglicidil éter) em diferentes marcas comerciais de ácido hialurônico.” do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Santo Amaro - UNISA, que será realizado pelos pesquisadores Profa. Dra. Letícia Boaro e Sumaya Takan Bordalo.

Justificativa: Este estudo se faz necessário pois quando utilizamos preenchedores dérmicos a base de ácido hialurônico, o BDDE residual promove reações de hipersensibilidade no organismo. Por isso precisamos mensurar a toxicidade do BDDE em células humanas para evitar reações agudas e tardias. Neste estudo avaliamos a citotoxicidade de materiais de preenchimento dérmico com potencial para células a partir de tecido gengival doado pelo participante. Este termo de compromisso livre e esclarecido (TCLE) irá autorizar o uso do tecido gengival para a coleta de células-tronco, bem como o uso dessas células coletadas para esta pesquisa.

Objetivos: analisar materiais e a citotoxicidade, para observar o quanto as células sobrevivem e crescem neste material bem como para avaliar as concentrações tóxicas do BDDE.

Procedimentos: Participarão da pesquisa apenas pacientes que tenham indicação para reabertura de implante dental. Entretanto, cabe lembrar, que a necessidade cirúrgica é independente da realização dessa pesquisa. Após a reabertura do implante, o tecido gengival doado será levado ao laboratório, as células que estão na superfície do dente serão retiradas, cultivadas para aumentar em número e introduzidas no material desenvolvido para ver o quanto crescem e o quanto sobrevivem neste material. Não necessitando, portanto, nenhuma ação do paciente, além da doação do dente, que seria descartado após a sua remoção, para o desenvolvimento da pesquisa.

Riscos e desconfortos: os procedimentos apresentam risco considerado mínimo, relacionado ao desconforto do procedimento cirúrgico da reabertura do implante. Entretanto cabe lembrar que a necessidade cirúrgica e a realização da cirurgia em si são independentes da realização da pesquisa. Não haverá risco ou desconforto ao paciente devido à coleta das células. Já que as células, só serão retiradas do tecido gengival após a remoção do mesmo ser concluída e o paciente liberado. As células serão usadas exclusivamente nesse projeto de pesquisa e após o término do projeto serão descartadas, não serão doadas ou usadas em outras pesquisas.

Caso sinta qualquer tipo de constrangimento ou desconforto deverá informar imediatamente aos pesquisadores.

Benefícios: este trabalho não trará benefício ou malefício direto ao paciente participante. Entretanto, trará benefícios indireto, pois é um estudo experimental que permite o avanço científico sobre a quantidade ideal de BDDE nos preenchedores dérmicos que são utilizados diariamente e poderão ser melhorados auxiliando a melhorar as tecnologias de reticulação de tais materiais preenchedores evitando riscos à saúde.

É garantido o acesso, em qualquer etapa do estudo, aos profissionais responsáveis pela pesquisa para **esclarecimento de eventuais dúvidas ou informações** sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores. O pesquisador responsável é Profa. Dra. Letícia Cristina Boaro, que pode ser encontrada no endereço Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340, Jardim das Imbuías, São Paulo SP / UNISA – Campus I, telefone 11-99855-1096. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UNISA) – Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340, Jardim das Imbuías, SP – Tel.: 2141-8687.

É **garantida sua liberdade da retirada de consentimento** a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de qualquer benefício que você tenha obtido junto à Instituição, antes, durante ou após o período deste estudo. As informações obtidas pelos pesquisadores serão analisadas em conjunto com as de outros participantes, **não sendo divulgada a identificação** de nenhum deles.

Não há **despesas pessoais** para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há **compensação financeira** relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente relacionado aos procedimentos deste estudo (nexo causal comprovado), a qualquer tempo, fica **assegurado ao participante o respeito a seus direitos legais**, bem como procurar obter **indenizações** por danos eventuais.

Uma via deste Termo de Consentimento ficará em seu poder.

São Paulo, 23/08/2023

Profa. Dra. Letícia Cristina Boaro

Se você concordar em participar desta pesquisa assinie no espaço determinado abaixo e coloque seu nome e o nº de seu documento de identificação.

Nome: (do participante):

Doc. Identificação:

Ass:

Declaro (amos) que obtive (mos) de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante (ou do representante legal deste participante) para a participação neste estudo, conforme preconiza a Resolução CNS 466, de 12 de dezembro de 2012, IV.3 a 6.

Assinatura do pesquisador responsável pelo estudo

Data / /

ATENÇÃO: As páginas sem as assinaturas devem conter rubrica de todos os participantes e devem ser numeradas. Todas as assinaturas devem estar na mesma página. O endereço e contato dos pesquisadores e do CEP devem constar em todas as páginas; **propomos o rodapé.** Res. 466/12.IV.d.

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Mensuração da Toxicidade do BDDE 1,4 (Butanodiol diglicidil éter) em diferentes marcas comerciais de ácido hialurônico

Pesquisador: Leticia Cristina Cidreira Boaro

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 74717523.5.0000.0081

Instituição Proponente: OBRAS SOCIAIS E EDUCACIONAIS DE LUZ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.572.098

Apresentação do Projeto:

A modulação das propriedades mecânicas e de biocompatibilidade do ácido hialurônico (AH) é de grande importância para suas aplicações em biomateriais. Como a meia-vida do AH na pele é de apenas alguns dias, a reticulação com os grupos epóxidos de 1,4 butanodiol diglicidil éter (BDDE) é empregada para estabilizar a matriz do AH. Realizaremos um estudo in vitro com amostras de cultivo de células humanas para avaliar o ácido hialurônico reticulado comparando 5 tecnologias de fabricação e mais 4 comparações com ácido hialurônico não reticulado onde será acrescentado o BDDE em concentrações de 1%, 2,5%, 5% e sem BDDE, totalizando 9 grupos experimentais. Objetivo: avaliar a toxicidade do BDDE em preenchedores faciais à base de ácido hialurônico. Embora se especule que o BDDE residual esteja associado às reações hipersensibilidade e ETIP (Edema Tardio Intermitente e Persistente) ainda não fizeram estudos relacionando a toxicidade de BDDE e intercorrências.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Constatar a toxicidade do BDDE em preenchedores dérmicos a base de ácido hialurônico.

Endereço: Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340

Bairro: Jardim das Imbuías

CEP: 02.450-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2141-8687

E-mail: pesquisaunisa@unisa.br

UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA



Continuação do Parecer: 6.572.098

Objetivo Secundário:

Constatar a concentração em que o BDDE se torna um agente tóxico nos preenchedores dérmicos para evitar reações de hipersensibilidade e intercorrências.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

os procedimentos apresentam risco considerado mínimo, relacionado ao desconforto do procedimento cirúrgico da reabertura do implante.

Entretanto cabe lembrar que a necessidade cirúrgica e a realização da cirurgia em si são independentes da realização da pesquisa. Não haverá

risco ou desconforto ao paciente devido à coleta das células. Já que as células, só serão retiradas do tecido gengival após a remoção do mesmo ser

concluída e o paciente liberado. As células serão usadas exclusivamente nesse projeto de pesquisa e após o término do projeto serão descartadas,

não serão doadas ou usadas em outras pesquisas. Caso sinta qualquer tipo de constrangimento ou desconforto deverá informar imediatamente aos pesquisadores.

Benefícios:

Este trabalho não trará benefício ou malefício direto ao paciente participante. Entretanto, trará benefícios indiretos, pois é um estudo experimental

que permite o avanço científico sobre a quantidade ideal de BDDE nos preenchedores dérmicos que são utilizados diariamente e poderão ser

melhorados auxiliando a aperfeiçoar as tecnologias de reticulação de tais materiais preenchedores, evitando assim, riscos à saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pacientes oriundos da clínica de implantodontia do INEPO (Instituto Nacional de Ensino e Pesquisas Odontológicas) serão convidados a participar

desta pesquisa doando parte do seu tecido gengival, que usualmente é removido como parte da terapia de reabilitação sobre implantes. O tecido

gengival será removido para reabertura de implante e coletado mediante Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do paciente (TCLE). Cabe

Endereço: Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340

Bairro: Jardim das Imbuías

CEP: 02.450-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2141-8687

E-mail: pesquisaunisa@unisa.br

UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA



Continuação do Parecer: 6.572.098

lembrar que este tecido seria removido independentemente da realização desta pesquisa, como parte do tratamento, e seria descartado. O tecido será transportado para o laboratório em frascos com meio de cultivo e células de fibroblastos humanos serão isoladas pela técnica do explante (essa técnica envolve o isolamento de pequenos fragmentos de tecido e o cultivo desses fragmentos em um meio de cultura apropriado para permitir o crescimento e a expansão das células presentes nesses explantes) e cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com alta glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica. As células serão mantidas em estufa de CO₂ a 37o C e o meio será trocado a cada 3 dias. A citotoxicidade dos materiais será avaliada utilizando o teste MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl) - difeniltetrazolimbromídeo), dada pela incorporação dos materiais avaliados ao meio clonogênico em contato com a célula, (n=3). O ensaio MTT será realizado no 1,3,e,7 dias. O 1,4 butadiol diglicidil éter (BDDE) será colocado em concentrações de 1%, 2,5%, 5% e sem BDDE para avaliar a toxicidade das concentrações nas células cultivadas. Estas serão comparadas a 5 tecnologias de ácido hialurônico já reticuladas com BDDE de fábrica, em outros grupos experimentais de cultura de células. Totalizando 9 grupos experimentais que serão analisados pelo teste MTT. Terá um grupo controle positivo com fibroblastos em meio de cultura fresco. E um grupo controle negativo com fibroblastos em meio de cultura fresco e metanol a 20%.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Pendência atendida:

- Metodologia: atendida com a descrição do local de amostra direcionado para INEPO (Instituto Nacional de Ensino e Pesquisas Odontológicas)

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340

Bairro: Jardim das Imbuías

CEP: 02.450-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2141-8687

E-mail: pesquisaunisa@unisa.br

UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA



Continuação do Parecer: 6.572.098

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2200545.pdf	27/11/2023 13:24:32		Aceito
Outros	Lattes_flavia.pdf	27/11/2023 13:18:42	Flávia Gonçalves	Aceito
Outros	Lattes_Sumaya.pdf	27/11/2023 13:18:18	Flávia Gonçalves	Aceito
Outros	LAttes_leticia_boaro.pdf	27/11/2023 13:17:45	Flávia Gonçalves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoSumaya_modificado.pdf	27/11/2023 13:06:19	Flávia Gonçalves	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_inepo_Assinada.pdf	27/11/2023 11:39:27	Flávia Gonçalves	Aceito
Folha de Rosto	rosto.pdf	10/10/2023 16:18:06	SUMAYA TAKAN BORDALO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	URC.pdf	13/09/2023 16:01:06	SUMAYA TAKAN BORDALO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	12/09/2023 11:32:02	SUMAYA TAKAN BORDALO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 12 de Dezembro de 2023

Assinado por:
Ana Paula Ribeiro
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340

Bairro: Jardim das Imbuías

CEP: 02.450-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2141-8687

E-mail: pesquisaunisa@unisa.br