

## ARTIGO ORIGINAL

# Preenchimentos bioestimulantes e indução de vias inflamatórias: uma investigação pré-clínica da resposta de macrófagos à hidroxilapatita de cálcio e ao ácido poli-L láctico

Doutor Bartosch Nowag<sup>1</sup> | Daniela Schäfer<sup>1</sup> | Thomas Hengl PhD<sup>1</sup> |  
Niamh Corduff MBBS, FRACS<sup>2</sup> | Kate Goldie MD<sup>3</sup>

<sup>1</sup>P&D, Merz Aesthetics GmbH, Frankfurt am Main, Alemanha

<sup>2</sup>Consultório particular, Geelong, Victoria, Austrália

<sup>3</sup>European Medical Aesthetics Ltd, Londres, Reino Unido

## Correspondência

Bartosch Nowag, P&D, Merz Aesthetics GmbH, Frankfurt am Main, Alemanha. E-mail: [bartosch.nowag@merz.de](mailto:bartosch.nowag@merz.de)

## Informações de financiamento

Merz Aesthetics GmbH, Frankfurt am Main, Alemanha

## Abstrato

**Introdução:** A resposta inicial dos macrófagos às substâncias bioestimulantes é fundamental na determinação do comportamento subsequente dos fibroblastos e na organização do colágeno recém-sintetizado. Embora estudos histológicos sugiram que o preenchimento de hidroxilapatita de cálcio (CaHA) inicia uma resposta de cura regenerativa com deposição de colágeno e elastina semelhante ao tecido natural e saudável, em vez de uma resposta inflamatória com fibrose, a atividade relativa dos macrófagos estimulados por CaHA, bem como esta atividade comparado ao induzido por outros preenchedores bioestimulantes, não foi explorado. O objetivo do estudo é caracterizar a resposta in vitro de macrófagos a dois preenchedores bioestimulantes, CaHA e PLLA (ácido poli-L láctico), e avaliar seu potencial inflamatório.

**Métodos:** Macrófagos humanos primários foram incubados com duas diluições (1:50 e 1:100) de CaHA ou PLLA comercialmente disponível. Após 24 h de incubação, um array de inflamação foi utilizado para rastrear a expressão de 40 citocinas, liberadas por macrófagos. ELISA foi usado para confirmar os resultados da matriz.

**Resultados:** Quatro citocinas foram significativamente reguladas positivamente em macrófagos M1 incubados com PLLA em comparação com controles não estimulados e CaHA: CCL1 ( $p < 0,001$ ), TNFR1 ( $p < 0,01$ ), MIP-1 $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) e IL-8 ( $p < 0,001$ ). Em macrófagos M2, MIP-1 $\alpha$  ( $p < 0,01$ ) e MIP-1 $\beta$  ( $p < 0,01$ ) foram significativamente regulados positivamente pelo PLLA em comparação com CaHA e controles não estimulados.

**Conclusão:** Juntas, estas descobertas indicam que o modo de ação do CaHA é uma resposta não inflamatória, enquanto o PLLA inicia a expressão de várias citocinas conhecidas por desempenharem um papel na inflamação. Nosso estudo apoia o conceito de que esses dois preenchedores "bioestimulantes" seguem caminhos distintos e devem ser considerados individualmente no que diz respeito ao mecanismo de ação.

## PALAVRAS-CHAVE

CaHA, hidroxilapatita de cálcio, preenchimento dérmico, ácido poli-L-láctico, regenerativo

Este é um artigo de acesso aberto nos termos do [atribuições criativas comuns](#) Licença, que permite o uso, distribuição e reprodução em qualquer meio, desde que a obra original seja devidamente citada.

© 2023 Merz Aesthetics e os autores. *Revista de Dermatologia Cosmética* publicado pela Wiley Periodicals LLC.

## 1 | INTRODUÇÃO

A hidroxilapatita de cálcio (CaHA, Radiesse®; Merz North America, Raleigh, NC) é um enchimento bioestimulatório biocompatível, biodegradável e reabsorvível que consiste em microesferas de hidroxilapatita de cálcio (CaHA) (25–45 µm de diâmetro) suspensas em um transportador de gel de carboximetilcelulose aquoso a 70%. As indicações aprovadas incluem rugas faciais moderadas a graves, como sulcos nasolabiais e linhas de marionete; aumentando a plenitude das bochechas e outros contornos faciais; melhorando o volume nas mãos; e melhoria do contorno da mandíbula.<sup>1–4</sup>No entanto, o CaHA é frequentemente usado off-label para revolumização de outras áreas do rosto e do corpo e também é usado na forma diluída para endurecer a pele.<sup>1,3,5</sup>Embora fisicamente distintos,<sup>6</sup>na clínica, o CaHA é frequentemente considerado junto com o ácido poli-L-láctico (PLLA; Sculptra®, [Galderma, Lausanne, Suíça]) como uma opção para revolumização baseada em bioestimulação.

CaHA e PLLA diferem em vários aspectos. Primeiro, os dois enchimentos são mecanicamente distintos. O preenchimento de CaHA fornece reposição imediata de volume por meio do gel transportador de carboximetilcelulose, que é posteriormente substituído ao longo do tempo por colágeno nativo induzido pelas microesferas de CaHA.<sup>7</sup>Essa neocolagênese mantém o volume fornecido inicialmente pelo gel carreador, além de melhorar a qualidade e espessura da pele.<sup>8,9</sup>Em contraste, o PLLA cria volume exclusivamente através da promoção de uma resposta inflamatória subclínica de corpo estranho, que promove a síntese de colágeno que se torna aparente como volume ao longo de vários meses.<sup>10</sup>Para o PLLA, os aumentos de volume observados imediatamente após a injeção estão relacionados ao inchaço e à suspensão de micropartículas e diminuem dentro de algumas horas a alguns dias.<sup>6</sup>

Além disso, CaHA e PLLA são quimicamente distintos e levam à neocolagênese através de diferentes vias. As vias imunológicas são determinadas logo após a injeção e envolvem o recrutamento diferencial de células imunes. Imediatamente após a injeção, o material é circundado por sangue de vasos lesionados, lipídios, açúcares, íons e proteínas (por exemplo, albumina, fibrinogênio, fibronectina, vitronectina e gamaglobulinas), que são adsorvidos na superfície da partícula em poucos minutos. Mesmo nesta fase muito inicial, as diferentes propriedades superficiais do CaHA e do PLLA provavelmente levam à ligação de coleções distintas de proteínas extracelulares e a uma divergência de vias que levam à neocolagênese.<sup>11</sup>As partículas de CaHA funcionam como uma estrutura para apoiar a função dos fibroblastos residentes e induzir caminhos para múltiplos aspectos da regeneração da matriz extracelular (ECM), tais como síntese de HA, angiogênese e organização de colágeno, elastina e proteoglicanos.<sup>12</sup>Além disso, estudos histológicos sugerem infiltração mínima de células inflamatórias, levando potencialmente à restauração da estrutura e função normais da pele.<sup>13–15</sup>

A resposta tecidual do PLLA parece ser de natureza mais inflamatória, e a adsorção de proteínas é seguida por infiltração de neutrófilos e macrófagos do Dia 2 ao Dia 10 após a injeção. Por volta de 1 mês, mastócitos, macrófagos mononucleares, células de corpo estranho e linfócitos cercam as micropartículas de PLLA e, como resultado dessa reação de corpo estranho, as partículas de PLLA são encapsuladas por colágeno tipo III mais imaturo e menos organizado, enquanto mais organizado e colágeno tipo maduro I não é encontrado próximo às partículas de PLLA ou ao infiltrado celular circundante e é observado apenas na periferia das reações granulomatosas.<sup>6,11,16</sup>Esses diferenciais

as respostas das células imunes e os padrões distintos de neocolagênese sugerem modos de ação distintos que provavelmente ocorrem através da divergência precoce das vias de resposta dos tecidos.

A atividade dos macrófagos dita o comportamento dos fibroblastos e é crítica para o recrutamento de células imunes e as cascatas de sinalização que suportam a migração e atividade dos fibroblastos, proliferação, diferenciação e/ou vias profibróticas.<sup>17</sup>Neste estudo, a atividade dos macrófagos M1 e M2 e o perfil de expressão de citocinas induzido por CaHA e PLLA foram examinados nos esforços para compreender melhor a resposta dos macrófagos a estes materiais.

## 2 | MÉTODOS

### 2.1 | Preenchimentos e controles

CaHA (Radiesse®, Merz North America, Raleigh, NC, EUA) e PLLA (Sculptra®, Galderma, Lausanne, Suíça) foram adquiridos e testados em ensaios de microfagos humanos em microplacas de cultura de 96 poços. Lipopolissacarídeo (LPS) 100 ng/mL de *Escherichia coli* interleucina-4 recombinante humana (IL-4) 20 ng/mL foram incluídos como controles para as populações de macrófagos M1 e M2, respectivamente. O Meio de Geração de Macrófagos M1 DXF foi usado para cultivar macrófagos M1, e o Meio de Geração de Macrófagos M2 DXF foi usado para cultivar macrófagos M2 (Promocell, Heidelberg, Alemanha).

### 2.2 | Cultura de células

M1 (macrófagos M1 de doador único hMDM-GM-CSF(-)-c [Promocell, Heidelberg, Alemanha]) e M2 (macrófagos M2 de doador único hMDM-GM-CSF(-)-c [Promocell, Heidelberg, Alemanha]) foram descongelados e deixados recuperar por 20min em meio frio. As células foram centrifugadas a 350×g durante 15 minutos à temperatura ambiente e o sedimento celular foi ressuspenso no meio apropriado. As contagens de células foram ajustadas para 100.000 células/cm<sup>2</sup> para macrófagos M1 e 200.000 células/cm<sup>2</sup> para macrófagos M2. As células foram incubadas durante a noite numa placa de 96 poços a 37°C. O meio de cultura celular foi trocado e reduzido de 150µL/poço para 50µL/poço. Às 24 horas após o plaqueamento inicial, 100 µL de meio contendo enchimento diluído com meio (1:50 e 1:100 Radiesse; 1:50 e 1:100 Sculptra) ou volumes correspondentes de meio sozinho foram transferidos para poços de ensaio para atingir um volume de ensaio final de 150µL/poço.

### 2.3 | Análise do sobrenadante

As células foram expostas ao enchimento por 24 horas. Os sobrenadantes foram reunidos e o volume normalizado para levar em conta os efeitos de evaporação entre poços e depois congelados a -80°C até a análise. As amostras foram centrifugadas a 10.000×g por 10 minutos e examinados para 40 citocinas humanas usando o RayBio® Human Inflammation Array GS3 (RayBiotech, Peachtree Corners, GA) de acordo com o protocolo do fabricante. Devido à capacidade mínima desses produtos de preenchimento iniciarem uma liberação significativa de citocinas

em comparação com substâncias inflamatórias estabelecidas, os níveis de liberação de citocinas observados foram baixos. Por esta razão, nos resultados das amostras onde foi observada uma tendência a partir da matriz de triagem, ELISA quantitativo foi utilizado para confirmar a presença ou ausência de significância (IL-8 [Abcam ab214030], MIP-1 $\alpha$  [Abcam ab214569] e MIP-1 $\beta$  [Abcam ab100597]). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA unidirecional com teste de comparações múltiplas de Turkey, com variância combinada única. Todas as experiências foram realizadas pelo menos em triplicado.

### 3 | RESULTADOS

#### 3.1 | Macrófagos M1

Nenhuma das 40 citocinas testadas na triagem mostrou expressão aumentada em macrófagos M1 após incubação com CaHA em comparação com os controles não estimulados. No entanto, as culturas de M1

macrófagos incubados com PLLA demonstraram níveis significativamente mais elevados de quatro citocinas em comparação com o controle não estimulado e diluições de CaHA (figura 1): ligante 1 de quimiocina (motivo CC) (CCL1), receptor II do fator de necrose tumoral solúvel (TNFR2) e proteína alfa inflamatória de macrófagos (MIP-1 $\alpha$ ) (figura 1). A significância para MIP-1 $\alpha$  foi confirmada via ELISA, e as tendências para interleucina 8 (IL-8) observadas no ensaio de triagem foram avaliadas com ELISA e mostraram-se significativas.

Os níveis médios de CCL1 nos macrófagos M1 após incubação com diluições de PLLA de 1:50 (31.880 unidades médias de fluorescência [MFU]) e 1:100 (27.550 MFU) foram significativamente maiores do que os níveis detectados após incubação com diluições de CaHA de 1:50 (10.255 MFU) e 1:100 (8.373 MFU) ( $p < 0,001$  e  $p < 0,001$ , respectivamente; figura 1). A atividade do TNFR2, medida indiretamente através dos níveis de TNFR2, foi significativamente maior após a incubação com diluição de PLLA de 1:50 (12.832 MFU) do que após incubação com diluições de CaHA de 1:50 (4.877 MFU) e 1:100 (4.008 MFU) ( $p < 0,01$  e  $p < 0,01$ , respectivamente). Níveis de MIP-1 $\alpha$

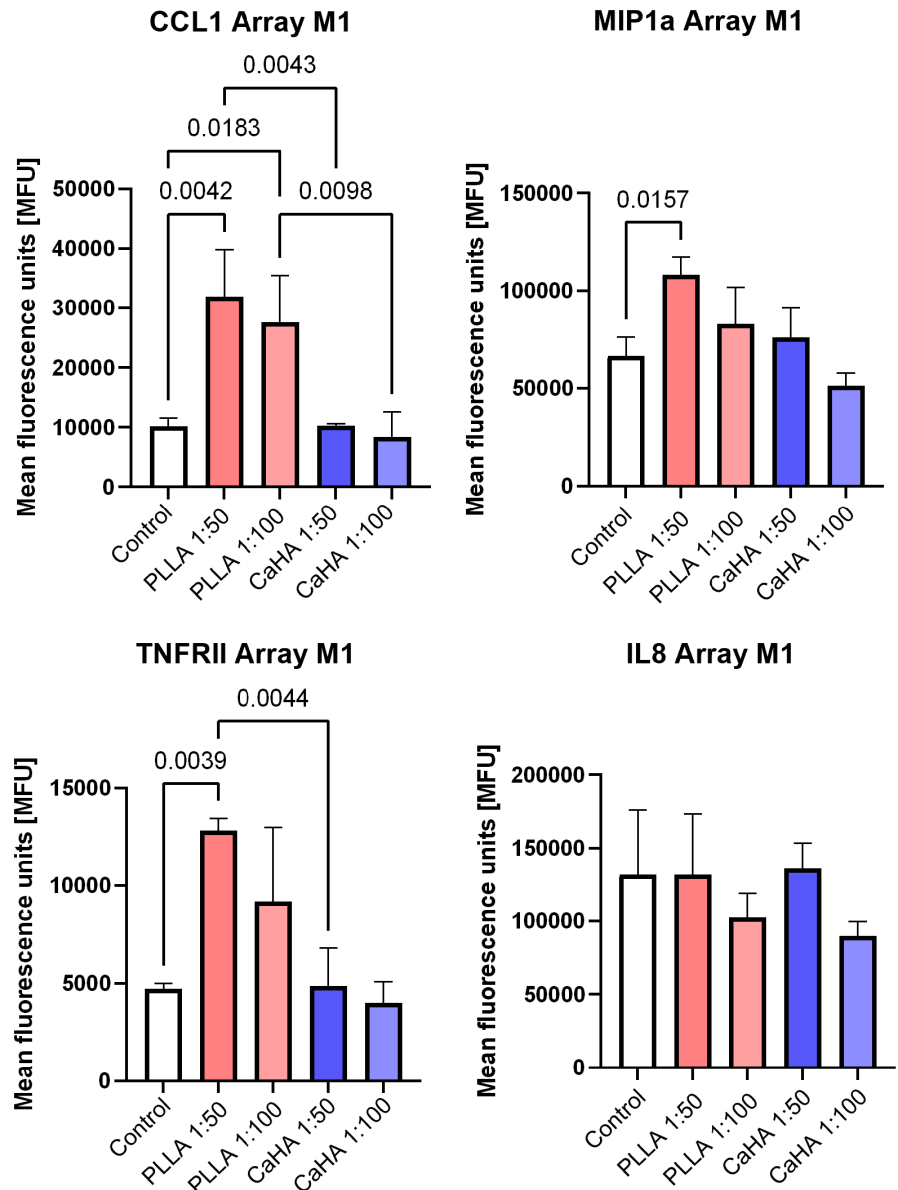
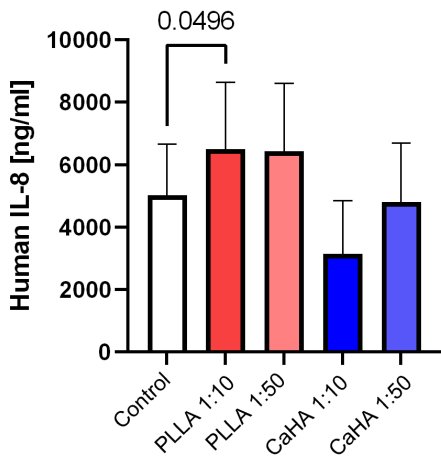
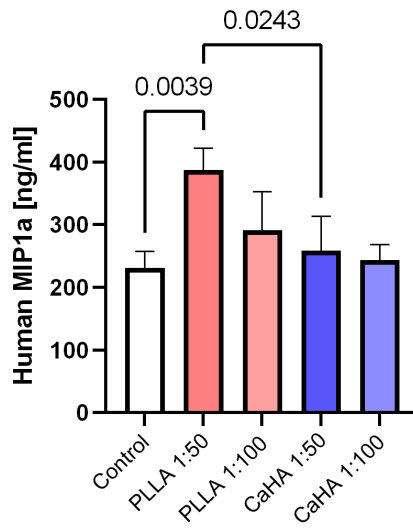


FIGURA 1 Níveis de citocinas em macrófagos M1 após 24 h de incubação com CaHA ou PLLA identificados com a matriz de inflamação humana.

**IL8 ELISA M1**

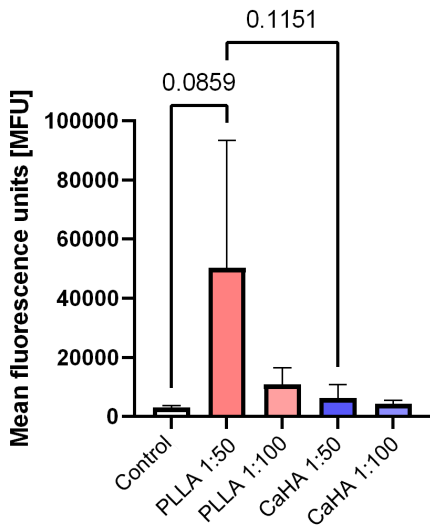


**MIP1a ELISA M1**

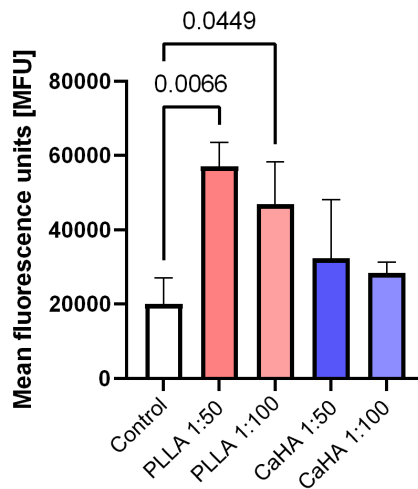


**FIGURA 2** Níveis de citocinas em macrófagos M1 após 24 h de incubação com CaHA ou PLLA confirmados com ELISA.

**MIP1a Array M2**

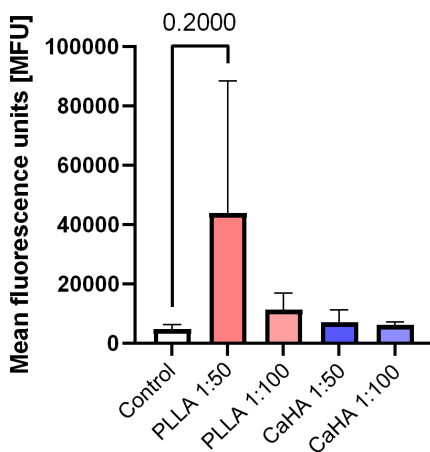


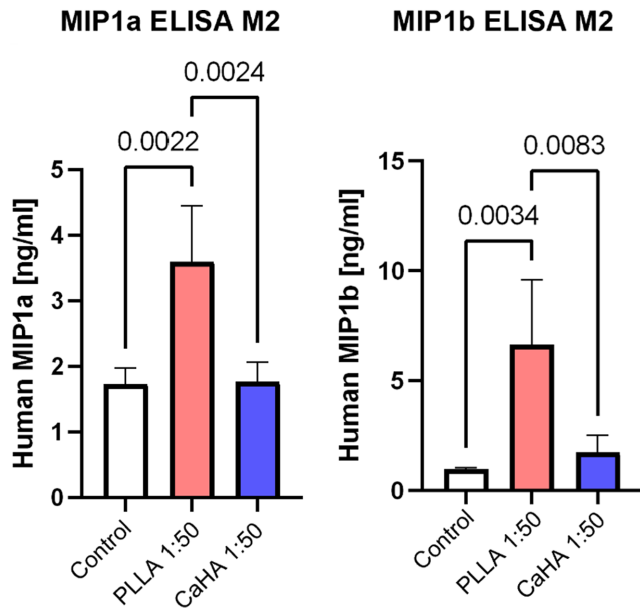
**MIP1b Array M2**



**FIGURA 3** Níveis de citocinas MIP-1α e MIP-1β em macrófagos M2 após 24 h de incubação com CaHA ou PLLA identificados com a matriz de inflamação humana.

**IL8 Array M2**





**FIGURA 4** Níveis de citocinas em macrófagos M2 após 24 h incubação com CaHA ou PLLA confirmada com ELISA.

após incubação com diluição de PLLA 1:50 (50172 MFU) foram significativamente maiores que o controle. Isto foi confirmado via ELISA, que mostrou uma diferença significativa na expressão entre CaHA 1:50 e PLLA 1:50 (258,7 ng/mL e 387,7 ng/mL) (Figura 2). Os níveis de IL-8 após incubação com diluição de PLLA de 1:50 (6.430 ng/mL) também foram significativamente maiores do que os níveis detectados após incubação com diluições de CaHA de 1:50 (4.805 ng/mL) e 1:10 (3.149 ng/mL). ;  $p < 0,001$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).

### 3.2 | Macrófagos M2

Semelhante aos resultados com os macrófagos M1, nenhuma das 40 citocinas na triagem mostrou expressão aumentada após incubação de macrófagos M2 com CaHA em comparação com o controle não estimulado. No entanto, o MIP-1 $\beta$  apresentou expressão significativamente elevada após incubação de macrófagos M2 com PLLA (Figura 3). Níveis elevados de MIP-1 $\beta$  e MIP-1 $\alpha$  foram confirmados por ELISA (Figura 4). A IL-8 foi elevada para PLLA 1:50 em comparação com CaHA 1:50 e controles, mas isso não alcançou significância estatística no ensaio de triagem.

Os níveis médios de MIP-1 $\alpha$  após incubação com diluição de PLLA de 1:50 (3,6 ng/mL) foram significativamente maiores do que após incubação com diluição de CaHA de 1:50 (1,7 ng/mL). Os níveis de MIP-1 $\beta$  após incubação com diluição de PLLA de 1:50 (6,648 ng/mL) foram significativamente maiores do que após incubação com diluição de CaHA de 1:50 (1,746 ng/mL).

## 4 | DISCUSSÃO

As citocinas e quimiocinas compreendem um grande grupo de proteínas que coordenam a resposta imunológica em todo o corpo. M1

os macrófagos podem fagocitar células mortas e bactérias, mas também secretam proteínas que promovem a deposição de colágeno, a angiogênese, a formação de tecido de granulação, a reepitelização e a ativação de outras células do sistema imunológico. Estudos anteriores descobriram que a estimulação in vitro com IFN- $\gamma$  e LPS de macrófagos M1 induz um perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6.<sup>18,19</sup> Em contraste, os macrófagos M2 respondem produzindo níveis mais baixos de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-18 e TNF- $\alpha$ , e níveis mais elevados de citocinas anti-inflamatórias TGF- $\beta$  e IL-10, o que sugere uma atividade mais regenerativa. papel no processo de cura.<sup>18</sup>

Neste estudo pré-clínico, nenhuma das 40 citocinas testadas apresentou expressão significativamente aumentada em macrófagos M1 ou M2 quando incubadas com CaHA além daquela exibida pelo controle negativo. Em contraste, quando estimuladas por PLLA, 4 citocinas apresentaram elevações significativas em macrófagos M1 e 2 em macrófagos M2. Estes resultados sugerem um baixo potencial inflamatório para CaHA em comparação com PLLA, o que é consistente com pesquisas anteriores que não conseguiram identificar uma resposta inflamatória à matriz do gel CaHA.<sup>14</sup>

Neste estudo, as citocinas aumentaram na cultura celular com macrófagos M1 ou M2 suplementados com PLLA, mas não CaHA foram sTNFR2, CCL1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e IL-8. Cada uma dessas citocinas tem um papel direto na inflamação. O sTNFR2 é clivado após a ativação do TNFR1 e, portanto, atua como um substituto para a medição da atividade do receptor.<sup>20</sup> O TNFR1 é um dos receptores do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), uma proteína sinalizadora essencial no sistema imunológico inato e adaptativo que desempenha um papel crítico na regulação positiva e negativa da atividade regulatória das células T (Treg). As evidências sugerem que o TNFR1 contribui para a modulação imunológica através da ativação celular e do recrutamento e proliferação de células imunológicas.<sup>21-27</sup> CCL1 é uma quimiocina produzida por monócitos/macrófagos ativadas, linfócitos T e células endoteliais que é principalmente um quimioatraente para monócitos/macrófagos, linfócitos e neutrófilos.<sup>28-32</sup> Acredita-se que desempenhe um papel importante nos processos inflamatórios,<sup>33</sup> e dados os resultados dos experimentos neste estudo, o PLLA pode induzir a expressão de CCL1 por ativação de macrófagos. MIP-1 $\alpha$  (também conhecido como CCL3) é uma quimiocina quimiotática inflamatória conhecida por ser secretada por macrófagos que recruta células inflamatórias, promove a cicatrização de feridas e mantém a resposta imune efetora. As células que liberam MIP-1 $\alpha$  estão aumentadas nos locais de inflamação e ajudam a recrutar macrófagos, linfócitos e eosinófilos.<sup>34,35</sup> Assim como o MIP-1 $\alpha$ , o MIP-1 $\beta$  (também conhecido como CCL4) é uma quimiocina quimiotática que promove a inflamação através do uso de um receptor compartilhado, o CCR5. O CCR5 é expresso em macrófagos, células dendríticas e células T auxiliares 1 ativadas, resultando no recrutamento de monócitos/macrófagos, células natural killer e populações de células T.<sup>34,36-38</sup> A IL-8 é amplamente utilizada como marcador diagnóstico para condições inflamatórias traumáticas e é conhecida por contribuir para a progressão tumoral.<sup>39-41</sup> Sabe-se que a IL-8 contribui para a indução de quimiotaxia por neutrófilos, linfócitos, monócitos e macrófagos.<sup>42,43</sup>

Tomados em conjunto, estes marcadores sugerem um perfil inflamatório aumentado para o PLLA, bem como uma ausência consistente de atividade inflamatória para o CaHA. Esta resposta inflamatória diferencial apoia a nossa compreensão atual do mecanismo de

ação seguindo vias diferentes daquelas do PLLA, proporcionando um ambiente que conduz à regeneração dos elementos arquitetônicos organizados da matriz extracelular, em vez do encapsulamento e deposição de colágeno do tipo fibroplasia que é observado na resposta de corpo estranho ao PLLA.<sup>6,15,44</sup> Existem várias hipóteses de trabalho para explicar o modo de ação aparentemente único do CaHA que diverge da resposta a corpo estranho do PLLA e de outras formulações bioestimulantes. Entre essas hipóteses estão publicados modelos de CaHA atuando como um sumidouro de cálcio utilizando quimioatração para regular positivamente os fibroblastos,<sup>45,46</sup> e neocolagênese por meio de interações diretas entre fibroblastos e microesferas de CaHA.<sup>47,48</sup> Nosso conhecimento atual indica que existem vias e interações imunológicas complexas em jogo em todas as formulações bioestimulantes que são exclusivas de cada uma, conforme apoiado por este estudo *in vitro*. É provável que as várias vias resultem em resultados diferentes, alterando, por exemplo, as proporções dos tipos de colágeno e outros elementos da matriz extracelular, como a elastina e os glucosaminoglicanos, o que acabará por influenciar a estrutura e função da pele e dos tecidos moles. É claro que as vias e resultados imunológicos também terão alguma variação *in vivo*, dependendo da genética, do envelhecimento e do possível meio patológico em que ocorrem.

O presente estudo revelou uma resposta diferencial a esses preenchimentos por macrófagos M1 e M2 e oferece evidências de que uma reação inflamatória de corpo estranho está amplamente ausente para CaHA, embora existam vários marcadores inflamatórios expressos por macrófagos estimulados por PLLA. A diferenciação dos preenchimentos com base na atividade das células imunes e subsequente atividade dos fibroblastos pode ter importantes implicações clínicas. Especialmente à medida que os usos dos preenchimentos bioestimulantes se expandem para incluir o tratamento de uma área mais ampla para endurecimento da pele e são usados em múltiplas áreas do corpo, é importante compreender a natureza da deposição de colágeno induzida pelos tratamentos disponíveis e explorar o impacto dessas diferenças. Sobre os resultados clínicos em estudos futuros. Esta fascinante área de pesquisa requer mais estudos para elucidar esses caminhos e fornecer os dados que permitirão aos médicos selecionar intervenções adequadas, adaptadas a cada paciente.

## 5 | CONCLUSÃO

Os níveis de citocinas em macrófagos humanos M1 e M2 após incubação com CaHA foram semelhantes aos controles, indicando que o CaHA tem potencial não inflamatório. Juntamente com estudos histológicos anteriores que indicam que o CaHA não inicia uma resposta inflamatória, este estudo fornece evidências adicionais para apoiar a hipótese de que o modo de ação do CaHA segue uma via mais regenerativa e o PLLA segue uma resposta de corpo estranho mais inflamatória.

## CONTRIBUIÇÕES DO AUTOR

Concepção e desenho do estudo: Bartosch Nowag, Thomas Hengl e Daniela Schäfer; coleta de dados: Bartosch Nowag e Daniela Schäfer; análise e interpretação dos resultados: Bartosch Nowag,

Thomas Hengl, Daniela Schäfer, Niamh Corduff e Kate Goldie; revisão/edição do rascunho do manuscrito: Bartosch Nowag, Thomas Hengl, Daniela Schäfer, Niamh Corduff e Kate Goldie. Todos os autores revisaram os resultados e aprovaram a versão final do manuscrito.

## AGRADECIMENTOS

A assistência na redação médica foi fornecida por Ginny Vachon, PhD, e Cecelia Wall da Principal Medvantage, LLC, Atlanta, Geórgia, sob a direção dos autores. O financiamento para este apoio foi fornecido pela Merz Aesthetics.

## INFORMAÇÕES DE FINANCIAMENTO

O financiamento para esta pesquisa foi fornecido pela Merz Aesthetics.

## DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Este estudo foi financiado pela Merz Aesthetics, GmbH, Frankfurt am Main, Alemanha. B. Nowag, Dr. T. Hengl e D. Schaefer são funcionários da Merz Aesthetics. K. Goldie foram consultores e/ou palestrantes da Merz Aesthetics. Os autores não relatam outros possíveis conflitos de interesse para este trabalho.

## DECLARAÇÃO DE ABILIDADE DE AVALIAÇÃO DE DADOS

Os dados que apoiam as conclusões deste estudo estão disponíveis no autor correspondente mediante solicitação razoável.

## DECLARAÇÃO DE ÉTICA

Nenhum sujeito humano ou animal foi utilizado neste estudo.

## REFERÊNCIAS

- Goldie K, Peeters W, Alghoul M, et al. Diretrizes de consenso global para a injeção de hidroxilapatita de cálcio diluída e hiperdiluída para endurecimento da pele. *Dermatol Surg*. 2018;44 Suplemento 1:S32-S41. doi:10.1097/DSS.0000000000001685
- Graivier MH, Bass LS, Busso M, Jasin ME, Narins RS, Tzikas TL. Hidroxilapatita de cálcio (Radiesse) para correção da região média e inferior da face: recomendações consensuais. *Plast Reconstrução Cirúrgica*. 2007;120:555-66S. doi:10.1097/01.prs.0000285109.34527.b9
- Lorenc ZP, Black JM, Cheung JS, et al. Endurecimento da pele com CaHA hiperdiluído: práticas de diluição e orientações práticas para a prática clínica. *Esteta Surg J*. 2022;42:NP29-NP37. doi:10.1093/asj/sjab269
- Radiesse [Instruções de uso]. Merz América do Norte, Inc.; 2020.
- Yutskovskaya YA, Kogan EA. Melhoria da neocolagênese e das propriedades mecânicas da pele após injeção de hidroxilapatita de cálcio diluída no pescoço e decote: um estudo piloto. *J Drogas Dermatol*. 2017;16:68-74.
- Fitzgerald R, Bass LM, Goldberg DJ, Graivier MH, Lorenc ZP. Características físico-químicas do ácido poli-L-láctico (PLLA). *Esteta Surg J*. 2018;38:S13-S17. doi:10.1093/asj/sjy012
- Kadouch JA. Hidroxilapatita de cálcio: uma revisão sobre segurança e complicações. *J Cosmet Dermatol*. 2017;16:152-161. doi:10.1111/jocd.12326
- Silvers SL, Eviatar JA, Echavez MI, Pappas AL. Estudo prospectivo, aberto, de 18 meses de hidroxilapatita de cálcio (Radiesse) para aumento de tecidos moles faciais em pacientes com lipoatrofia associada ao vírus da imunodeficiência humana: durabilidade de um ano. *Plast Reconstrução Cirúrgica*. 2006;118:345-45S. doi:10.1097/01.prs.0000234847.36020.52



9. Tzikas TL. Um resumo dos resultados de 52 meses usando hidroxilapatita de cálcio para aumento de tecidos moles faciais. *Dermatol Surg.* 2008;34 Suplemento 1:S9-S15. doi:10.1111/j.1524-4725.2008.34237.x
10. Vleggaar D, Fitzgerald R, Lorenc ZP. Composição e mecanismo de ação do ácido poli-L-láctico no aumento de tecidos moles. *J Drogas Dermatol.* 2014;13:s29-s31.
11. Stein P, Vitavska O, Kind P, Hoppe W, Wiczorek H, Schürer NY. A base biológica para o aumento induzido pelo ácido poli-L-láctico. *J Dermatol Sci.* 2015;78:26-33. doi:10.1016/j.jdermsci.2015.01.012
12. Zerbinati N, Calligaro A. Tratamento com hidroxilapatita de cálcio da pele humana: evidência de renovação de colágeno por meio de coloração com picosírius red e microscopia circularmente polarizada. *Clin Cosmetol Invest Dermatol.* 2018;11:29-35. doi:10.2147/CCID.S143015
13. Berlim AL, Hussain M, Goldberg DJ. Preenchimento de hidroxilapatita de cálcio para rejuvenescimento facial: análise histológica e imunohistoquímica. *Dermatol Surg.* 2008;34 Suplemento 1:S64-S67. doi:10.1111/j.1524-4725.2008.34245.x
14. Yutskovskaya Y, Kogan E, Leshunov E. Um estudo histomorfológico randomizado, de face dividida, comparando uma hidroxilapatita de cálcio volumétrica e um preenchimento dérmico à base de ácido hialurônico. *J Drogas Dermatol.* 2014;13:1047-1052.
15. Zerbinati N, D'Este E, Parodi PC, Calligaro A. Evidências microscópicas e ultraestruturais na pele humana após tratamento com preenchimento de hidroxilapatita de cálcio. *Arch Dermatol Res.* 2017;309:389-396. doi:10.1007/s00403-017-1734-3
16. Gogolewski S, Jovanovic M, Perren SM, Dillon JG, Hughes MK. Resposta tecidual e degradação in vivo de polihidroxiácidos selecionados: polilactídeos (PLA), poli(3-hidroxi-butilato) (PHB) e poli(3-hidroxi-butilato-co-3-hidroxi-valerato) (PHB/VA). *J Biomed Mater Res.* 1993;27:1135-1148. doi:10.1002/jbm.820270904
17. Canção E, Ouyang N, Hörbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS. Influência de macrófagos ativadas alternativa e classicamente nas atividades fibrogênicas de fibroblastos humanos. *Imunol Celular.* 2000;204:19-28. doi:10.1006/cimm.2000.1687
18. Ferrante CJ, Leibovich SJ. Regulação da polarização de macrófagos e cicatrização de feridas. *Tratamento de feridas Adv (New Rochelle).* 2012;1:10-16. doi:10.1089/ferida.2011.0307
19. Krzyszczyk P, Schloss R, Palmer A, Berthiaume F. O papel dos macrófagos na cicatrização de feridas agudas e crônicas e intervenções para promover fenótipos pró-cicatrização de feridas. *Fisio Frontal.* 2018;9:419. doi:10.3389/fphys.2018.00419
20. Paccalet A, Crola da Silva C, Mechtaouff L, et al. Os receptores séricos solúveis do fator de necrose tumoral 1 e 2 são marcadores de prognóstico precoce após infarto do miocárdio com elevação do segmento ST. *Frente Farmacol.* 2021;12:656928. doi:10.3389/fphar.2021.656928
21. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, et al. Fenótipo, localização e mecanismo de supressão de tímocitos humanos CD4(+)/CD25(+). *J Exp Med.* 2002;196:379-387. doi:10.1084/jem.20020110
22. Chen X, Baumel M, Mannel DN, Howard OM, Oppenheim JJ. A interação do TNF com o receptor de TNF tipo 2 promove a expansão e a função das células T reguladoras CD4+CD25+ de camundongo. *J Immunol.* 2007;179:154-161. doi:10.4049/jimmunol.179.1.154
23. Chen X, Oppenheim JJ. TNF-alfa: um ativador de células T reguladoras CD4+FoxP3+TNFR2+. *Curr Dir Autoimune.* 2010;11:119-134. doi:10.1159/000289201
24. Chen X, Wu X, Zhou Q, Howard OMZ, Netea MG, Oppenheim JJ. O TNFR2 é crítico para a estabilização do fenótipo de células T reguladoras CD4+Foxp3+ no ambiente inflamatório. *J Immunol.* 2013;190:1076-1084. doi:10.4049/jimmunol.1202659
25. Grinberg-Bleyer Y, Saadoun D, Baeyens A, et al. As células T patogênicas têm um efeito protetor paradoxal no diabetes autoimune murino, aumentando os Tregs. *J Clin Invest.* 2010;120:4558-4568. doi:10.1172/JCI42945
26. Nagar M, Jacob-Hirsch J, Vernitsky H, et al. O TNF ativa um programa celular regulado por NFkappaB em células T reguladoras de CD45RA humanas que modula sua função supressora. *J Immunol.* 2010;184:3570-3581. doi:10.4049/jimmunol.0902070
27. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Necrose regulada: a rede em expansão de vias de morte celular não apoptóticas. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15:135-147. doi:10.1038/nrm3737
28. Wilson SD, Burd PR, Billings PR, Martin CA, Dorf ME. A expressão e regulação de um gene potencial de linfocina (TCA3) em clones de células T CD4 e CD8. *J Immunol.* 1988;141:1563-1570.
29. Miller MD, Kragel MS. A citocina humana I-309 é um quimioatratante de monócitos. *Proc Natl Acad Sci EUA.* 1992;89:2950-2954. doi:10.1073/pnas.89.7.2950
30. Luo Y, D'Amore PA, Dorf ME. A beta-quimiocina TCA3 liga-se e ativa células musculares lisas vasculares de ratos. *J Immunol.* 1996;157:2143-2148.
31. Tiffany HL, Lautens LL, Gao JL, et al. Identificação de CCR8: um monócito humano e receptor do timo para a quimiocina CC I-309. *J Exp Med.* 1997;186:165-170. doi:10.1084/jem.186.1.165
32. Rollins BJ. Quimiocinas. *Sangue.* 1997;90:909-928.
33. Kishi H, Sato M, Shibata Y, et al. Papel do ligante-1 do motivo CC da quimiocina em inflamações pulmonares agudas e crônicas. *Springerplus.* 2016;5:1241. doi:10.1186/s40064-016-2904-z
34. Dorner BG, Scheffold A, Rolph MS, et al. MIP-1alfa, MIP-1beta, RANTES e ATAC/linfotactina funcionam junto com IFNgama como citocinas tipo 1. *Proc Natl Acad Sci EUA.* 2002;99:6181-6186. doi:10.1073/pnas.092141999
35. Bhavsar I, Miller CS, Al-Sabbagh M. Proteína inflamatória 1 alfa de macrófagos (MIP-1 alfa)/CCL3: como biomarcador. *Métodos Gerais Biomarker Res Appl.* 2015;1:223-249.
36. Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ. Migração preferencial de células T CD4+ e CD8+ ativadas em resposta a MIP-1 alfa e MIP-1 beta. *Ciência.* 1993;260:355-358. doi:10.1126/ciência.7682337
37. Uguccioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, Dewald B, Baggiolini M. Ações das citocinas quimiotáticas MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alfa e MIP-1 beta em monócitos humanos. *Eur J Immunol.* 1995;25:64-68. doi:10.1002/eji.1830250113
38. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, et al. União Internacional de Farmacologia. XXII. Nomenclatura para receptores de quimiocinas. *Farmacol Rev.* 2000;52:145-176.
39. Longo X, Ye Y, Zhang L, et al. IL-8, um novo mensageiro para interligar inflamação e EMT tumoral através de vias autócrinas e parácrinas (revisão). *Int J Oncol.* 2016;48:5-12. doi:10.3892/ijo.2015.3234
40. Livadioti O, Kotanidou A, Psarra A, et al. Expressão de neutrófilos CD64 e IL-8 sérica: marcadores precoces sensíveis de gravidade e resultado na sepse. *Citocina.* 2006;36:283-290. doi:10.1016/j.cyto.2007.02.007
41. Kraft R, Herndon DN, Finnerty CC, Cox RA, Song J, Jeschke MG. Valor preditivo de IL-8 para sepse e infecções graves após queimadura: um estudo clínico. *Choque.* 2015;43:222-227. doi:10.1097/SHK.0000000000000294
42. Briukhovetska D, Dörr J, Endres S, Libby P, Dinarello CA, Kobold S. Interleucinas no câncer: da biologia à terapia. *Nat Rev Câncer.* 2021;21:481-499. doi:10.1038/s41568-021-00363-z
43. Bernhard S, Hug S, Stratmann AEP, et al. A interleucina 8 provoca rápidas mudanças fisiológicas nos neutrófilos que são alteradas por condições inflamatórias. *J Imunidade Inata.* 2021;13:225-241. doi:10.1159/000514885
44. Vleggaar D. Correção volumétrica facial com ácido polilático injetável. *Dermatol Surg.* 2005;31:1511-1517; discussão 1517-1518. doi:10.2310/6350.2005.31236
45. Lansdown AB. Cálcio: um potencial regulador central na cicatrização de feridas na pele. *Regeneração de reparo de feridas.* 2002;10:271-285. doi:10.1046/j.1524-475x.2002.10502.x

46. Oumama Draoui J v L, Peeters WJ, Siebenga P. *Preenchimentos de tecidos moles com hidroxilapatita de cálcio: técnicas de tratamento especializadas* (ed Jani van Loghem) cap. 1. Imprensa CRC; 2021.
47. Courderot-Masuyer C, Robin S, Tauzin H, Humbert P. Avaliação dos efeitos lifting e antirrugas do preenchimento de hidroxilapatita de cálcio. Quantificação in vitro das forças contráteis de rugas humanas e fibroblastos de idade normal tratados com hidroxilapatita de cálcio. *J Cosmet Dermatol.* 2016;15:260-268. doi:10.1111/jocd.12215
48. Nowag B, Casabona G, Kippenberger S, Zoller N, Hengl T. Microesferas de hidroxilapatita de cálcio ativam fibroblastos através do contato direto para estimular a neocolagênese. *J Cosmet Dermatol.* 2023;22:426-432. doi:10.1111/jocd.15521

**Como citar este artigo:** Nowag B, Schäfer D, Hengl T, Corduff N, Goldie K. Preenchimentos bioestimulantes e indução de vias inflamatórias: Uma investigação pré-clínica da resposta de macrófagos à hidroxilapatita de cálcio e ácido poli-L láctico. *J Cosmet Dermatol.* 2023;00:1-8. faça: [10.1111/jocd.15928](https://doi.org/10.1111/jocd.15928)