

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

APLICAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÓNICO E O PAPEL DA HIALURONIDASE NA SUA REVERSÃO

Trabalho submetido por
CATARINA ROQUETE DE ANDRADE
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

junho de 2023

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

APLICAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÓNICO E O PAPEL DA HIALURONIDASE NA SUA REVERSÃO

Trabalho submetido por
CATARINA ROQUETE DE ANDRADE
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Profª. Doutora Inês Carpinteiro

e coorientado por
Prof. Doutor Jorge Caldeira

junho de 2023

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Doutora Inês Carpinteiro e ao meu coorientador, Jorge Caldeira, pela dedicação e profissionalismo na elaboração deste projeto final.

Ao meu maior aliado Tiago que sempre me apoiou, motivou e acreditou em mim, todos os dias ao longo destes 5 anos. Obrigado pelo apoio incondicional e por apoiar esta minha decisão.

Ao meu querido Sebastião por fazeres os meus dias felizes.

À minha família pela confiança e por estarem sempre presentes.

Aos meus amigos pela motivação e alegria.

RESUMO

O ácido hialurónico (AH) é um um glicosaminoglicano (GAG) não sulfatado de elevada massa molecular. Está presente em diversas estruturas do corpo humano como a matriz extracelular, cartilagem, corpo vítreo do olho, fáscias e cordão umbilical.

No âmbito da medicina, o ácido hialurónico tem aplicabilidade em vários campos como na oftalmologia, na ortopedia, na oncologia, no tratamento de processos inflamatórios, na cicatrização após procedimentos cirúrgicos, em dermatologia e cada vez mais com diversas utilidades em medicina dentária.

Dada a sua crescente utilização, especialmente na harmonização facial como material de preenchimento, e os efeitos adversos que podem ocorrer surge a importância da reversão dos efeitos do ácido hialurónico.

A hialuronidase (HYAL) é uma enzima que degrada o ácido hialurónico e neste sentido vai prevenir complicações, como o uso inadequado das injeções de ácido hialurónico, corrigir a volumização excessiva ou sobrecorreção.

Esta monografia pretende realizar uma revisão narrativa sobre a genética e o papel do ácido hialurónico, correlacionando com as vantagens e desvantagens da utilização da enzima hialuronidase na reversão do mesmo.

Palavras-chave: “hyaluronic acid”, “applications”, “complications”, “hyaluronidase”.

ABSTRACT

Hyaluronic acid is a nonsulfated glycosaminoglycan with a high molecular weight. It is present in various structures of the human body such as the extracellular matrix, cartilage, vitreous body of the eye, fascia and umbilical cord.

Within the scope of medicine, hyaluronic acid has applicability in various fields such as ophthalmology, orthopedics, oncology, inflammatory processes treatment, healing process after surgical procedures, in dermatology and increasingly with diverse uses in dentistry.

Given its growing use, especially in facial harmonization as a filling material, and the adverse effects that may occur, the importance of reversing the effects of hyaluronic acid arises.

Hyaluronidase is an enzyme that degrades hyaluronic acid and in this sense will prevent complications, such as the inappropriate use of hyaluronic acid injections, correcting excessive volumization or overcorrection.

This monography aims to make a narrative review on the genetics and role of hyaluronic acid, correlating it with the advantages and disadvantages of the use of hyaluronidase in its reversal.

Keywords: “hyaluronic acid”, “applications”, “complications”, “hyaluronidase”.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	13
DESENVOLVIMENTO	15
1. ÁCIDO HIALURÓNICO	15
1.1 Contexto Histórico.....	15
1.2 Estrutura química.....	16
1.3 Propriedades	18
1.4 Função e Mecanismo	19
1.5 Síntese.....	21
1.6 Degradação	21
1.7 Aplicações clínicas	23
1.7.1 Artrologia.....	23
1.7.2 Dermatologia cosmética	25
1.7.3 Cicatrização de feridas	26
1.7.4 Agente transportador de fármacos.....	27
1.7.5 Medicina Dentária.....	28
1.7.6 Oftalmologia	29
1.8 Contraindicações e efeitos adversos.....	30
2 HIALURONIDASE.....	31
2.1 Contexto Histórico.....	31
2.2 Mecanismo de ação	31

2.3	Tipos e funções.....	32
2.4	Interações medicamentosas	35
2.5	Aplicações clínicas	36
2.6	Hialuronidase na reversão do Ácido Hialurónico	37
2.7	Efeitos adversos e complicações	40
2.8	Consentimento e Legislação.....	41
CONCLUSÃO.....		43
BIBLIOGRAFIA		47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do AH, formada pela repetição de unidades dissacarídicas de N-acetil-glucosamina e ácido glucorónico (A) e representação dos grupos funcionais hidrofóbicos e hidrofílicos, evidenciados a azul e amarelo, respetivamente, e as pontes de hidrogénio representada por linhas verdes tracejadas (B).

Figura 2 – Cascatas de sinalização do AH através de recetores como o CD44.

Figura 3 – Esquema das principais etapas do AH desde sua síntese até sua degradação.

Figura 4 – Aplicações médicas, farmacêuticas, cosméticas do AH e os seus derivados.

Figura 5 – Ação da HYAL como coadjuvante dos anestésicos locais. (A-C) A eficácia da infiltração da anestesia local é limitada pela densidade da matriz extracelular que limita a rápida dispersão do fármaco no tecido. (D-F) A HYAL é administrada juntamente com o anestésico local promovendo a dispersão mais rápida do fármaco ao funcionar como um “fator de expansão”.

Figura 6 – Efeito de degradação da HYAL sobre os preenchedores de AH. A injeção de HYAL resulta numa rápida degradação da complexa rede de preenchedores de AH em fragmentos.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades das Hialuronidasas.

LISTA DE ABREVIATURAS:

AH – Ácido hialurónico (ou hialuronano)

ATM – Articulação Temporomandibular

CD44 - Recetor de superfície celular do ácido hialurónico

FDA – Food and Drug Administration

GAG – Glicosaminoglicano

GPI - Glicofosfatidilinositol

HAS – Hialuronano sintetase

HYAL – Hialuronidase

IgE – Imunoglobulinas tipo E

IGF-1 - Fatores de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IL-1 β - Interleucina 1 Beta

RHAMM - Recetor de mobilidade mediada do ácido hialurónico

rHuPH20 - Hialuronidase humana recombinante

ROS - Espécies reativas de oxigénio

SPAM1 ou PH-20 – Molécula de adesão do esperma 1

TLR4 - Recetor do tipo Toll 4 (Toll-like receptors 4)

TNF- α – Fator de necrose tumoral α (*Tumor necrosis factor α*)

UI - unidades HYAL por frasco

INTRODUÇÃO

O AH é um GAG não sulfatado de elevada massa molecular. Encontra-se na matriz extracelular e é abundante na cartilagem, pele, humor vítreo, cordão umbilical e fluido sinovial (Kobayashi *et al.*, 2020; Vasvani *et al.*, 2019).

Desempenha diversas funções na transmissão de sinais, regulação da adesão celular, motilidade, crescimento e diferenciação (Dicker *et al.*, 2014).

Ao ligar-se aos recetores da superfície celular ativa cascatas de sinalização intracelular regulando, assim, a homeostase dos tecidos, o crescimento e sobrevivência celular, rearranjo do citoesqueleto e a migração celular (Dicker *et al.*, 2014).

Dadas as suas propriedades de biocompatibilidade, lubrificação e viscoelasticidade é amplamente utilizado em diversas áreas como a oftalmologia, no tratamento da osteoartrite e dermatologia cosmética (Bayer, 2020).

Em virtude das suas características anti-inflamatórias, antiproliferativas, antiangiogénicas e imunossupressoras (Dovedy *et al.*, 2020; Fronza *et al.*, 2014), tem vindo a surgir um interesse crescente do uso do AH noutras áreas da Medicina, como, cicatrização de feridas, Medicina Dentária e como veículo de transportes de fármacos (Valachová & Soltés, 2021).

O tamanho do AH é um dos principais determinantes de sua atividade especialmente na regulação do equilíbrio entre a sua síntese e degradação. É através de enzimas transmembranares e das HYAL que o metabolismo dinâmico do AH é mediado (Kobayashi *et al.*, 2020).

Apesar do seu perfil de segurança, o AH comporta alguns efeitos adversos. Com a crescente popularidade do seu uso, especialmente como material de preenchimento, surgiu proporcionalmente um aumento da necessidade de reversibilidade do efeito deste produto (Jung, 2020).

A HYAL é a enzima capaz de dissolver o AH. Há mais de 60 anos que tem sido usada em variadas aplicações médicas, como por exemplo, para aumentar a absorção dos fármacos nos tecidos ou para reduzir danos tecidulares (Weber *et al.*, 2019).

As reações alérgicas são um efeito secundário comum da HYAL, porém, a maioria das reações são locais (Jung, 2020).

Por esta razão ao realizar-se procedimentos com o AH torna-se imprescindível o conhecimento do uso da HYAL na terapêutica, analisando as suas características, aplicações terapêuticas, administração e cuidados a ter (Jung, 2020).

Esta monografia é uma revisão narrativa sobre a versatilidade do uso do AH com o objetivo de averiguar as suas propriedades, funções e aplicações clínicas correlacionando com o modo de ação molecular e celular da aplicação clínica da HYAL na sua reversão.

DESENVOLVIMENTO

1. ÁCIDO HIALURÓNICO

1.1.Contexto Histórico

A primeira referência do ácido hialurónico data de 1880 pelo cientista francês Portes, onde observou que a mucina do corpo vítreo era distinta de outros mucóides presentes na córnea e na cartilagem (Fallacara *et al.*, 2018).

Em 1934, Karl Meyer e John Palmer isolaram pela primeira vez um polissacarídeo do corpo vítreo do olho bovino contendo um aminoaçúcar e um ácido urónico (Abatangelo *et al.*, 2020). Chamaram-no de ácido hialurónico proveniente de “hialóide” (vítreo) e “ácido urónico” (Fallacara *et al.*, 2018; Girish & Kemparaju, 2007).

Durante as décadas de 1930 e 1950 o AH foi também isolado do cordão umbilical humano, crista de galos e estreptococos (Fallacara *et al.*, 2018).

As propriedades físico-químicas do AH foram amplamente estudadas a partir da década de 1940 e sua estrutura foi resolvida em 1954 por Meyer e Weissmann. Gradualmente, surgiu um interesse na sua produção e desenvolvimento em diversas aplicações clínicas. Desta forma, os processos de extração de tecidos animais foram progressivamente otimizados, no entanto, ainda comportavam várias dificuldades no processo de purificação por contaminação (Fallacara *et al.*, 2018).

Foi apenas em 1970 que a estrutura do AH foi descrita, pela primeira vez, por Torvard Laurent (Abatangelo *et al.*, 2020).

Em 1979, Balazs desenvolveu um método eficiente de extração e purificação dos polímeros do cordão umbilical e crista de galos, permitindo, desta forma, a base para produção industrial de AH. Adicionalmente, propôs o uso do termo “hialuronano” como alternativa a “ácido hialurónico” uma vez que, em pH fisiológico, os grupos carboxílicos da molécula são dissociados e atraem catiões, como o Na^+ (Fallacara *et al.*, 2018).

No início dos anos 1980, o AH foi amplamente investigado como matéria-prima no desenvolvimento de lentes intraoculares para implantes. Foi também considerado

benéfico para o tratamento de articulações e cicatrização de feridas (Fallacara *et al.*, 2018).

1.2.Estrutura Química

O AH é um polímero natural não ramificado pertencente ao grupo dos heteropolissacarídeos denominados GAGs que se encontram difundidos nos tecidos epitelial, conjuntivo e nervoso (Fallacara *et al.*, 2018; Wight, 2017).

Todos os GAGs são caracterizados pela mesma estrutura básica que consiste em unidades repetidas de dissacarídeos (N-acetil-galactosamina ou N-acetil-glucosamina) e um açúcar urónico (ácido glucurónico, ácido idurónico ou galactose) (Fallacara *et al.*, 2018; Ucm *et al.*, 2022; Wight, 2017). Inclui-se também neste grupo outros compostos comumente conhecidos como, o sulfato de condroitina, sulfato de queratano, heparina, sulfato de heparina, e sulfato de dermatan (Salwowska *et al.*, 2016).

O AH difere por não ser sintetizado no aparelho de Golgi, sendo produzido na face interna da membrana plasmática sem qualquer ligação covalente a um núcleo de proteína (Girish & Kemparaju, 2007; Salwowska *et al.*, 2016).

Pode atingir um peso molecular muito elevado até 10^8 Da ao invés dos outros GAGs que apresentam um tamanho menor ($<5 \times 10^4$ Da, geralmente $1,5-2 \times 10^4$ Da) (Fallacara *et al.*, 2018; Heldin *et al.*, 2018).

A sua estrutura primária é uma cadeia linear contendo unidades repetidas de dissacarídeos unidas por ligações β -1,4-glicosídicas. Cada dissacarídeo consiste em N-acetil-D-glucosamina e ácido D-glucurónico unidos por ligações β 1,3-glicosídicas conforme ilustrado na Figura 1 (Garantziotis & Savanis, 2019; Kobayashi *et al.*, 2020; Wight, 2017).

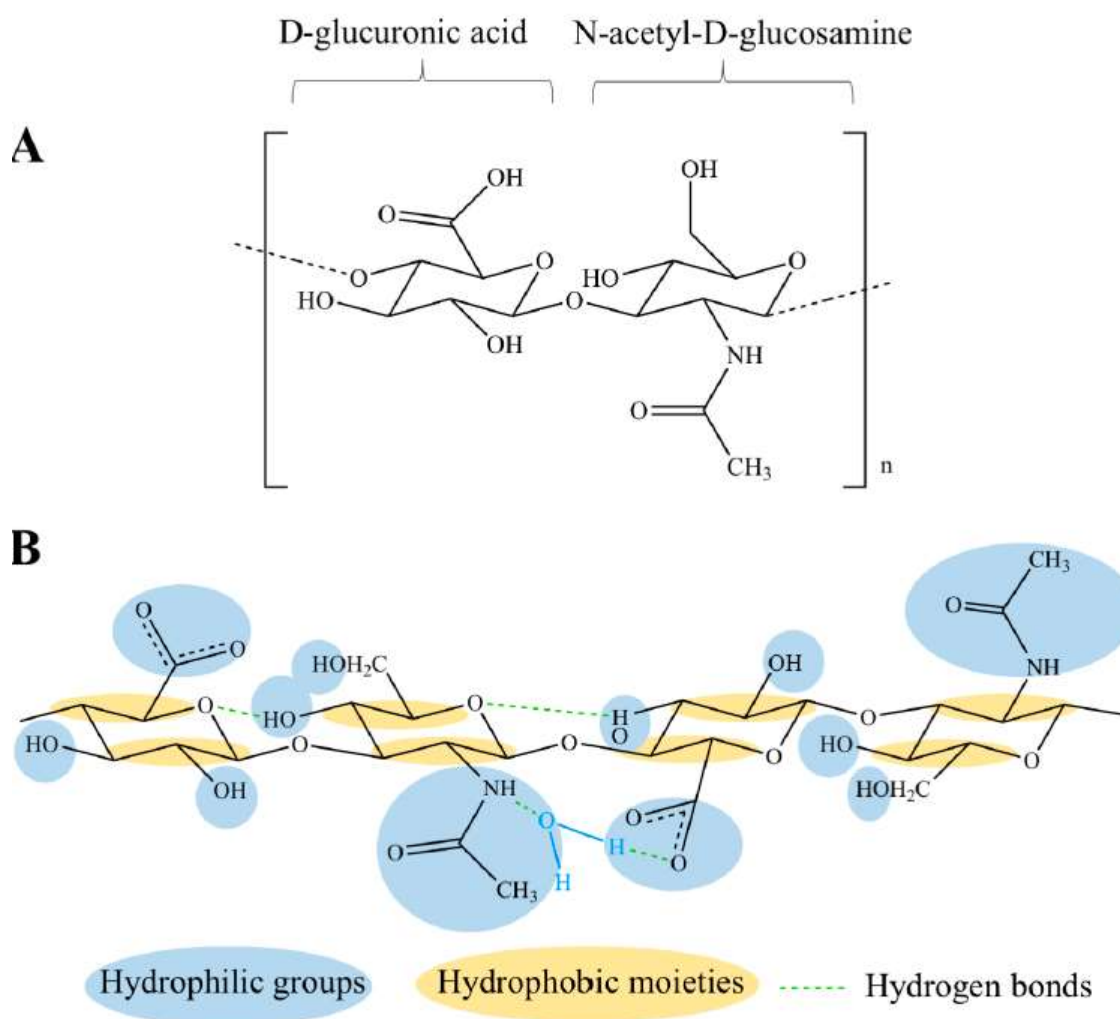


Figura 1 – Estrutura química do AH, formada pela repetição de unidades dissacarídicas de N-acetil-glucosamina e ácido glucurônico.(A) e representação dos grupos funcionais hidrofóbicos e hidrofílicos, evidenciados a azul e amarelo, respetivamente, e as pontes de hidrogénio representada por linhas verdes tracejadas (B). Adaptado de Fallacara *et al.*, 2018

Quando ambos os monossacarídeos estão na configuração β forma-se uma estrutura energeticamente estável, uma vez que cada grupo funcional (hidroxilo, carboxilo, acetamida, carbono anomérico) encontram-se na posição equatorial favorável. Por outro lado, cada átomo de hidrogénio ocupa a posição axial menos energeticamente favorável. Assim, a rotação livre do AH em redor das ligações glicosídicas é limitada, resultando numa conformação de grupos CH (hidrofóbicos) com grupos polares ligados através de pontes de hidrogénio (ver Figura 1) (Fallacara *et al.*, 2018; Kobayashi *et al.*, 2020).

Em pH neutro, a molécula apresenta uma carga negativa e no organismo apresenta-se sob a forma de sal (hialuronato de sódio), uma vez que os grupos éster (COO^-) do AH ligam-se aos iões de sódio (Na^+) (Joy *et al.*, 2018).

Adicionalmente, o AH é altamente sensível a alterações de pH, ou seja, em ambientes ácidos e alcalinos ocorre um equilíbrio crítico entre forças repulsivas e atrativas e quando o pH é inferior a 4 ou superior a 11, o AH é degradado por hidrólise (Maleki *et al.*, 2018).

1.3. Propriedades

Podemos encontrar o ácido hialurónico em humanos, animais (como coelhos, bovinos, galos), bactérias (como *Streptococcus equi*, *Streptococcus zooepidermicus*, *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, *Pasteurella multocida*), algas (como a *Chlorella sp.*), leveduras (como *Cryptococcus neoformans*) e moluscos. Por outro lado, não se encontra em fungos, insetos ou plantas (Fallacara *et al.*, 2018; Snetkov *et al.*, 2020).

Apesar da sua diversidade de origem, o AH é geralmente obtido do humor vítreo bovino, cristas de galo, pele de tubarões e cordões umbilicais humanos (Xu *et al.*, 2012).

No entanto, também o podemos encontrar noutros tecidos como a pele, válvulas cardíacas, pulmões, bainhas de tendões, aorta e próstata (Valachová & Soltés, 2021).

A quantidade de AH presente nos adultos é cerca de 15 g num adulto de 70 Kg. Aproximadamente 50% do AH total reside na pele, tanto na derme como na epiderme. O humor vítreo do olho e o cordão umbilical contêm quantidades de AH de 0,1 mg/ml e 4 mg/ml, respetivamente. O seu *turnover* é rápido, cerca de 5 g/dia sendo regulado por síntese e degradação enzimática (Fallacara *et al.*, 2018; Volpi *et al.*, 2009).

É amplamente aplicado nas áreas da biomédica, alimentação, saúde e cosmética (de Oliveira *et al.*, 2016).

As principais características do AH são: alta higroscopicidade; natureza viscoelástica; alta biocompatibilidade; não imunogenicidade e não gera substâncias tóxicas quando é degradado (Bohaumilitzky *et al.*, 2017; de Oliveira *et al.*, 2016; Snetkov *et al.*, 2020).

Devido ao seu tamanho macromolecular, higroscopicidade e viscoelasticidade, o AH é capaz de ligar fortemente 15 moléculas de água por unidade de dissacarídeo e modular a hidratação tecidual, dando-lhe a propriedade de ser um lubrificante extracelular e amortecedor de choques. As suas propriedades viscoelásticas são diminuídas quando a degradação aumenta ou a síntese desta molécula é reduzida (Snetkov *et al.*, 2020).

É, também, altamente solúvel em meio aquoso, especialmente em pH baixo. Em concentrações mais altas, o AH forma géis reticulados (Hintze *et al.*, 2022; Ucm *et al.*, 2022).

É considerado uma molécula sem imunogenicidade na forma purificada, o que se traduz num baixo potencial de reação alérgica devido à baixa especificidade antigénica e biocompatibilidade (Salwowska *et al.*, 2016).

1.4. Função e Mecanismo

O AH possui propriedades anti-inflamatórias, antiproliferativas, antiangiogénicas e imunossupressoras (Dovedytis *et al.*, 2020; Wight, 2017).

Além de manter a homeostase, modula a proliferação e diferenciação celular, e participa noutros processos biológicos importantes, por exemplo, regeneração tecidual, cicatrização de feridas, integridade epitelial, embriogénese, distribuição de proteínas plasmáticas e na estruturação da matriz (Dicker *et al.*, 2014; Valachová & Soltés, 2021).

O tamanho do AH é um dos principais determinantes de sua atividade. O Ácido hialurónico de elevado peso molecular, em doses iguais ou superiores a 1 mg/ml inibe a quimiotaxia de células inflamatórias, fagocitose, libertação da elastase e o aumento rápido da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) durante a fagocitose (Garantziotis & Savanis, 2019).

Por outro lado, em concentrações e pesos moleculares mais baixos, promove a maturação de monócitos em macrófagos através da produção de IGF-1 e IL-1 β e estimula a síntese de proteínas de choque térmico (Garantziotis & Savanis, 2019; Salwowska *et al.*, 2016).

Tem também um papel importante na ativação da transdução de sinal intracelular ao interagir com os recetores da superfície, permitindo a proliferação celular, adesão e

migração, todos os quais envolvidos na morfogênese e cicatrização de feridas. Ao ligar-se ao recetor CD44, uma glicoproteína transmembranar tipo I, participa em diversos processos fisiológicos e patológicos, ativando cascatas de sinalização conforme ilustrado na Figura 2. Tais interações permitem a expressão de genes relacionados com o crescimento e sobrevivência celular, modulam alterações de conformação do citoesqueleto e aumentam a mobilidade celular (Kobayashi *et al.*, 2020; Petrey & de la Motte, 2014).

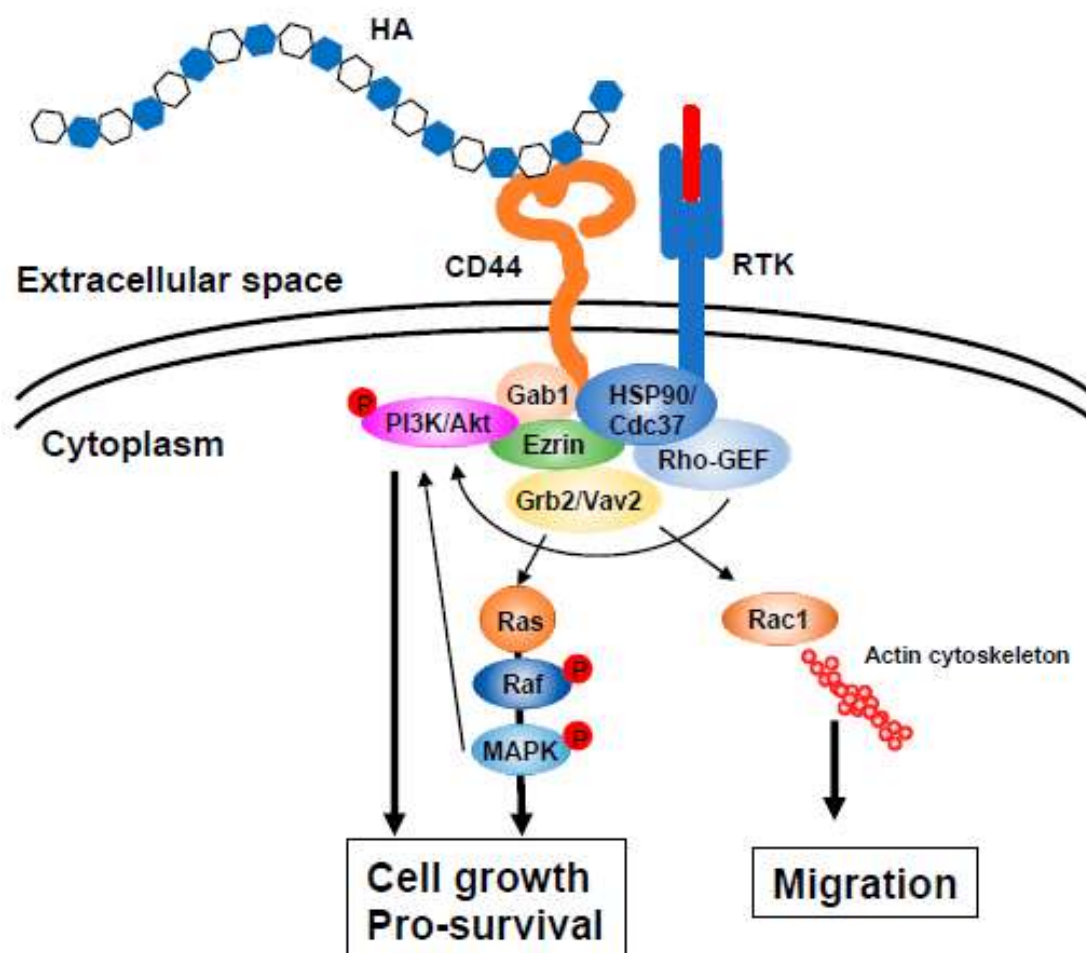


Figura 2 – Cascatas de sinalização do AH através de recetores como o CD44. Adaptado de Kobayashi *et al.*, 2020.

1.5. Síntese

O ácido hialurónico é o único GAG que não é sintetizado no complexo de Golgi (Abatangelo *et al.*, 2020).

Existem três enzimas transmembranares que são responsáveis pela sua síntese - HAS 1, HAS 2 e HAS 3. Encontram-se localizadas na membrana celular com a sua extremidade ativa voltada para o interior da célula (Abatangelo *et al.*, 2020; Hintze *et al.*, 2022).

É no lado interno da membrana plasmática que ocorre a polimerização do AH, onde vão sendo adicionados, alternadamente, os monómeros UDP-GlcA e UDPGlcNAc à extremidade redutora do polímero em crescimento. À medida que a polimerização ocorre, a extremidade não redutora da cadeia de açúcar é translocada para o espaço extracelular através de um poro na estrutura das HAS (Hintze *et al.*, 2022).

Embora estas três enzimas compartilham uma identidade estrutural de cerca de 55-70%, elas diferem em termos da sua capacidade de sintetizar o AH (Dicker *et al.*, 2014).

HAS 1 tem uma taxa de síntese de AH inferior aos da HAS 2 e HAS 3. Enquanto HAS 1 e HAS 2 são capazes de produzir AH de elevado peso molecular (até 2.000 kDa), HAS 3 produz AH de baixo peso molecular (100–1.000 kDa) (Dicker *et al.*, 2014).

O equilíbrio entre síntese e degradação de AH tem um papel fundamental na quantidade da molécula, no peso molecular e, consequentemente, nas suas propriedades (Abatangelo *et al.*, 2020).

1.6. Degradação

A degradação do AH pode ocorrer através de dois mecanismos: via enzimática mediada por HYAL ou através de espécies reativas de oxigénio (ROS), conforme ilustrado na Figura 3 (Fallacara *et al.*, 2018; Salwowska *et al.*, 2016).

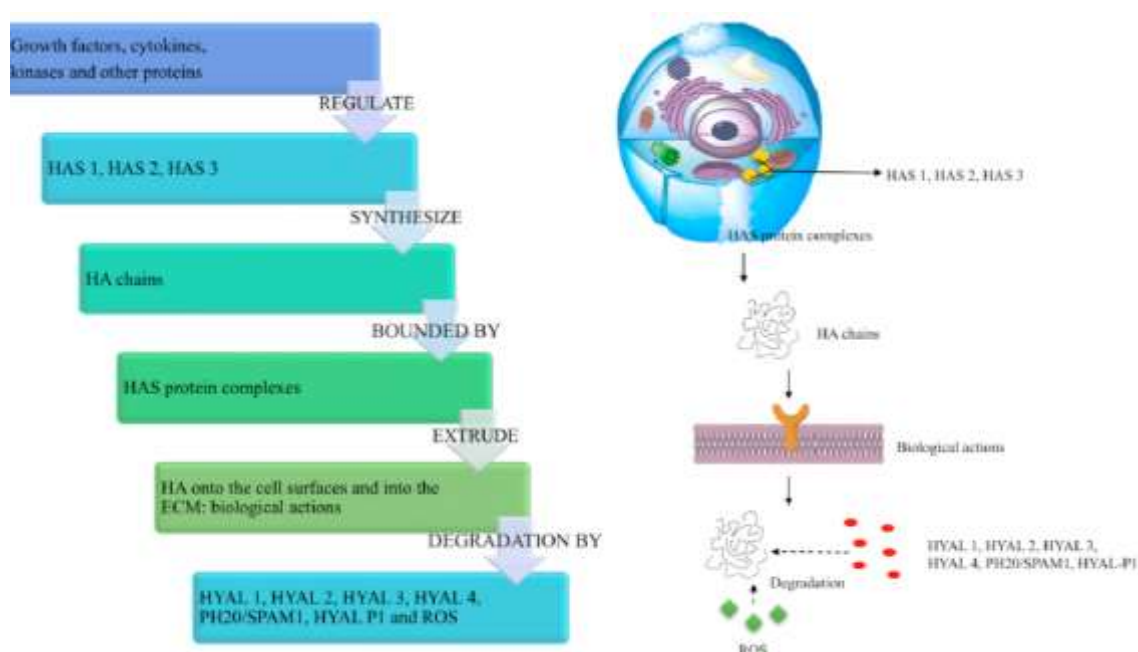


Figura 3 – Esquema das principais etapas do AH desde sua síntese até sua degradação. Adaptado de Fallacara *et al.*, 2018.

HYAL e ROS degradam, localmente, aproximadamente 30% dos 15g de AH presentes no corpo humano. Os restantes 70% são catabolizados de forma sistêmica, isto é, o AH é maioritariamente transportado pela linfa para os gânglios linfáticos, onde vai ser degradado pelas células endoteliais dos vasos linfáticos. Adicionalmente, uma pequena parte do AH é transportada para a corrente sanguínea e degradado pelas células endoteliais do fígado (Erickson & Stern, 2012; Heldin *et al.*, 2018).

As HYAL desempenham um papel fundamental na regulação do metabolismo do AH. Estas enzimas apesar de degradarem predominantemente o AH também participam no processo de degradação do sulfato de condroitina e condroitina. Classificam-se como endoglicosidases e clivam as ligações β -1,4-glicosídicas do AH (Fallacara *et al.*, 2018; Stern & Jedrzej, 2006).

Na generalidade identificam-se seis tipos de HYAL, no entanto, são as HYAL1 e HYAL2 as mais predominantes. A primeira é uma enzima que se associa a lisossomas degradando o AH em tetrassacarídeos e a segunda degrada o AH de elevado peso molecular em produtos de 20 kDa (Hintze *et al.*, 2022).

1.7. Aplicações clínicas

Dadas as suas propriedades e o seu perfil de segurança, o AH é utilizado em diversas áreas, tais como, a área de Medicina, Farmacêutica, Cosméticas e Medicina Dentária conforme ilustrado na Figura 4 (Fallacara *et al.*, 2018).

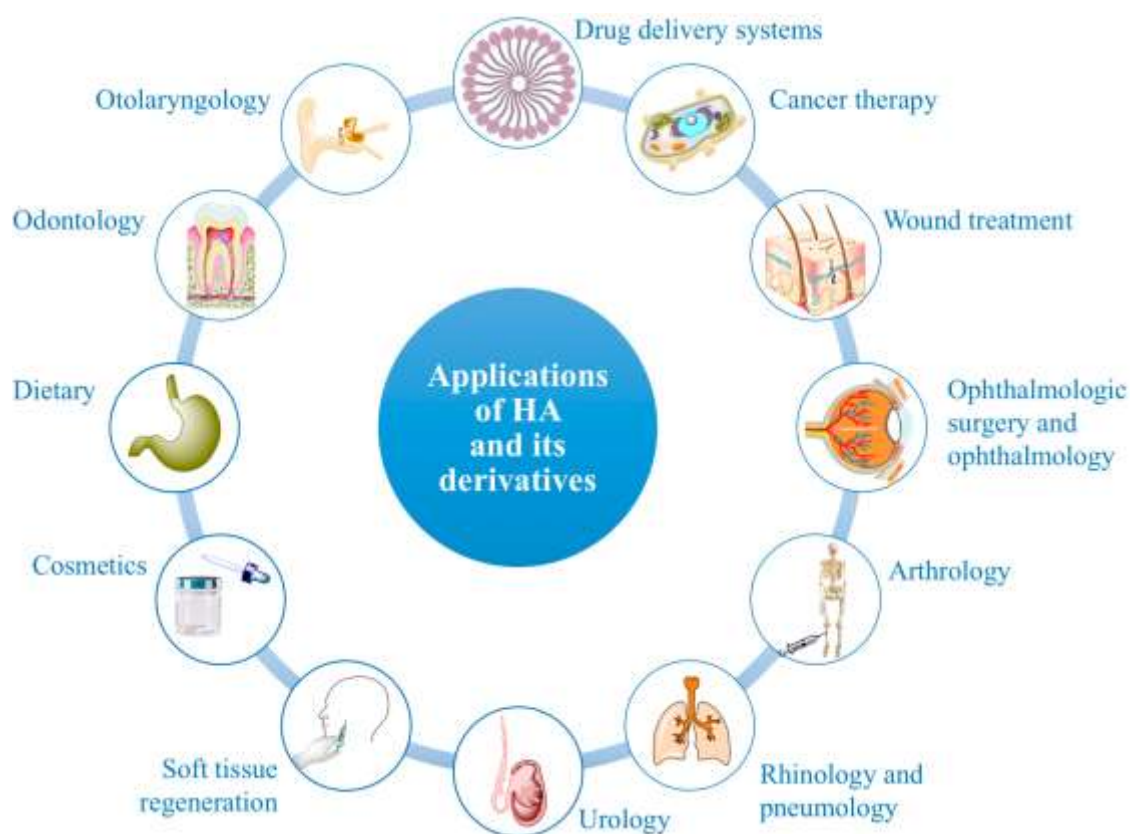


Figura 4 – Aplicações médicas, farmacêuticas, cosméticas do AH e os seus derivados. Adaptado de Fallacara *et al.*, 2018.

1.7.1. Artrologia

O AH é um dos principais agentes lubrificantes do líquido sinovial articular devido à sua viscoelasticidade, uma vez que, absorve impactos mecânicos, minimiza a fricção e evita o atrito entre as extremidades ósseas (Fallacara *et al.*, 2018; Tamer, 2013).

Também pode exibir atividades anti-inflamatórias, participa na síntese de proteoglicanos, atua como barreira contra substâncias catabólicas na superfície da cartilagem e inibe a produção de enzimas que degradam a cartilagem através da sua ligação ao receptor CD44 (Mustonen *et al.*, 2021).

Quando ocorre uma diminuição da síntese e um aumento da degradação de AH e, consequentemente, um *stress* oxidativo elevado, a concentração de AH presente no líquido sinovial diminui, podendo suceder distúrbios como artrite reumatoide e osteoartrite (Fallacara *et al.*, 2018).

A osteoartrite é uma doença articular degenerativa que afeta muitas articulações, especialmente, nos joelhos, mãos e ATM. Esta doença é caracterizada por alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares, levando ao amolecimento, fibrilação, ulceração, perda de cartilagem articular, inflamação sinovial, esclerose do osso subcondral, dor e rigidez da articulação afetada, formação de osteófitos e quistos subcondrais (Soltés *et al.*, 2006; Valachová & Soltés, 2021).

Ao contrário da osteoartrite, a artrite reumatoide é classificada como uma doença inflamatória sistêmica, na qual a dor de uma ou mais articulações é geralmente acompanhada por alterações degenerativas noutros órgãos, como pulmões, coração e vasos sanguíneos. Nas fases agudas, os neutrófilos acumulam-se no fluido sinovial e alteram a homeostase oxidativa e os seus produtos, especialmente as ROS, podem causar a destruição das estruturas articulares. Os tecidos danificados são considerados estranhos e, posteriormente, ocorrem reações autoimunes que provocam o agravamento da doença (Mustonen *et al.*, 2021; Valachová & Soltés, 2021).

A viscosuplementação representa uma abordagem terapêutica eficaz no tratamento e na progressão destas doenças. Injeções intra-articulares de AH de elevado peso molecular permitem maximizar o efeito tópico e a redução da dor, bem como a minimização dos efeitos adversos sistêmicos (Bowman *et al.*, 2018; Fallacara *et al.*, 2018).

Para além disto, a administração de injeções intra-articulares de AH tem, também, efeitos modificadores como: promoção da cicatrização e reparo da cartilagem; manutenção da vitalidade dos condrócitos (diminuição da apoptose); inibição da destruição de condrócitos; estimulação da síntese dos componentes da matriz da cartilagem articular, tais como, o colagénio, proteoglicanos, hialaderinas; estimulação do crescimento e metabolismo dos condrócitos; e inibição da expressão e atividade de enzimas como as metaloproteinases (Valachová & Soltés, 2021).

1.7.2. Dermatologia cosmética

Outra característica do AH é que confere um aspeto liso à pele. Com o envelhecimento, a sua produção diminui, resultando na desidratação e perda de elasticidade da pele, contribuindo para o aparecimento de rugas (de oliveira *et al.*, 2016).

O AH mantém o volume dérmico e viscoelasticidade, cerca de 50% do AH encontra-se na pele. Já na derme o AH tem uma meia-vida de, aproximadamente, 1 dia e na epiderme cerca de 2 – 3 h (Bohaumilitzky *et al.*, 2017; Žádníková *et al.*, 2022). Por esta razão, torna-se necessária a sua reticulação para estabilizar as moléculas de AH nos tecidos e interagir com outras proteínas da matriz, tais como, o colagénio (Valachová & Soltés, 2021).

O grau de reticulação, concentração e tamanho da partícula afetam as propriedades viscoelásticas e prolongam a meia-vida dos preenchedores de AH. Isto significa que o fabricante pode adaptar os preenchedores de AH para atender a diferentes tipos de tratamentos estéticos (Kapoor *et al.*, 2021; Kim & Sykes, 2011).

As injeções de gel de AH têm sido frequentemente usados em tratamentos faciais para o aumento das partes moles, hidratação e/ou preenchimento de rugas e correção de defeitos (Valachová & Soltés., 2021).

Estes procedimentos devem ser repetidos em intervalos de semanas ou meses. Embora o AH apresente um perfil de segurança elevado, podem ocorrer alguns efeitos adversos, os quais desaparecem quando o produto é degradado (Lipko-Godlewska *et al.*, 2021).

No tratamento não cirúrgico com preenchedores dérmicos injetáveis de AH não é necessário a realização de teste cutâneo de pré-injeção uma vez que é um agente biodegradável (Andre, 2004; Valachová & Soltés, 2021).

As injeções de preenchimento com AH são a segunda medicina estética mais realizada no mundo, logo após as injeções de toxina botulínica (Lipko-Godlewska *et al.*, 2021).

1.7.3. Cicatrização de feridas

Existem cinco fases de cicatrização de feridas na pele - homeostase, inflamação, proliferação, remodelação e granulação (Valachová & Soltés., 2021).

Durante os estádios iniciais da cicatrização, o AH serve como uma estrutura temporária devido ao seu elevado tamanho molecular. A sua estrutura permite a difusão de nutrientes e resíduos no local da lesão e afeta diretamente a proliferação e migração dos queratinócitos (Fronza *et al.*, 2014; Valachová & Soltés., 2021).

Durante o processo de cicatrização, o recetor CD44 desempenha um papel muito importante na participação no processo de degradação do AH e no recrutamento de fibroblastos na área da ferida. Outro recetor conhecido, o RHAMM, ajuda na resposta de cicatrização. O RHAMM, juntamente com as proteínas do citoesqueleto, ativam várias proteínas quinases que estimulam o movimento celular (Petrey & de la Motte, 2014; Valachová & Soltés, 2021).

Na fase inicial da cicatrização de feridas, ou seja, na homeostase, o AH de elevado peso molecular (~2000 kDa) acumula-se na matriz extracelular ligando-se ao fibrinogénio para formar um coágulo (Valachová & Soltés, 2021).

De seguida, na fase inflamatória, o AH de elevado peso molecular é fragmentado em AH de baixo peso molecular (80-800 kDa) através da enzima HYAL (Valachová & Soltés, 2021).

O AH de baixo peso molecular liga-se à citocina TNF- α e ao recetor TLR4 estimulando a IL-6 e IL1. Desta forma, vai induzir a resposta inflamatória, estimular a angiogénese e recrutar células fibrogénicas (Petrey & de la Motte, 2014; Valachová & Soltés, 2021).

Uma das principais funções do AH é a regulação das células inflamatórias e dos fibroblastos iniciando respostas importantes para a migração celular, síntese de citocinas pró-inflamatórias e fagocitose de microrganismos (Fallacara *et al.*, 2018).

1.7.4. Agente transportador de fármacos

Conforme vimos anteriormente, destacam-se como propriedades do AH a biocompatibilidade, biodegradabilidade, elevada viscoelasticidade, e a capacidade de se combinar com o recetor CD44 (Huang & Huang, 2018).

O recetor CD44 é expresso numa variedade de células como na superfície das células epiteliais, hematopoiéticas e neuronais, é no entanto, nas células tumorais que é sobreexpresso, sendo identificado como um alvo potencial na terapia do cancro, e o AH, o seu principal ligando, reconhecido como uma ferramenta poderosa para desenvolver terapias direcionadas (Fallacara *et al.*, 2018).

Além disto, alguns dos grupos funcionais do AH, como o hidroxilo, o carboxilo e o N-acetil podem sofrer modificação química. Desta forma, o AH e os seus derivados podem atuar como veículos de transporte de fármacos contribuindo para uma melhoria do perfil farmacocinético, aumento da distribuição e metabolismo (Huang & Huang, 2018).

Após a conjugação do AH pelo recetor CD44, todos estes derivados são hidrolisados por enzimas intracelulares libertando os fármacos no interior das células cancerígenas (Fallacara *et al.*, 2018).

A libertação lenta do fármaco do veículo de transporte permite a que o mesmo permaneça no tecido tumoral numa concentração mais elevada e diminua a concentração plasmática do fármaco (Huang & Huang, 2018).

O AH e os seus derivados têm sido amplamente utilizados em vários sistemas de transporte de fármacos, como por exemplo, agentes de transportes de nanopartículas, gel e genes (Burdick & Prestwich, 2011; Dovedytis *et al.*, 2020; Huang & Huang, 2018).

Uma variedade de princípios ativos podem ser conjugados com o AH para aplicação tópica ou uso sistémico. Por exemplo, pode ser conjugado com peptídeos antidiabéticos, como a exendina-4, apresentando uma meia-vida e um efeito hipoglicemiante prolongado e uma melhoria da atividade insulínica quando em comparação com a exendina-4 livre em diabéticos tipo 2. No entanto, dada a sua curta meia-vida no sangue, a maioria dos conjugados do AH foram desenvolvidos para uso local, isto é, intraarticular, intratumoral, subcutâneo, intravesical e intraperitoneal, em vez

de administração sistêmica. Por exemplo, alguns fármacos anti-inflamatórios, incluindo a hidrocortisona, prednisona, prednisolona e dexametasona, foram conjugados com o AH para a terapia intra-articular de artrite (Fallacara *et al.*, 2018).

O AH também pode ser conjugado com fosfolípidos para desenvolver lipossomas modificados na superfície. Os lipossomas modificados com AH parecem ser transportadores promissores, pois permitem aumentar a estabilidade dos fármacos na corrente sanguínea, prolongar a meia-vida, reduzir a toxicidade, aumentar a permeabilidade tecidual, sustentar a distribuição prolongada e melhorar os efeitos terapêuticos (Abatangelo *et al.*, 2020; Fallacara *et al.*, 2018).

1.7.5. Medicina Dentária

Na área da Medicina Dentária, o AH desempenha um papel multifuncional e fundamental na fisiologia da cavidade oral sendo utilizado em diversas especialidades. É utilizado como biomaterial, uma vez que é o único com a mesma estrutura química em todas as espécies e tecidos. É também utilizado como adjuvante na reparação tecidual e processos traumáticos, no tratamento de gengivite, recessões, bolsas periodontais e é usado como componente de enxertos e implantes (Casale *et al.*, 2016; Sanchez *et al.*, 2017; Valachová & Soltés, 2021).

Além disso, o AH pode atuar como uma barreira estável contra a penetração de vírus e bactérias evitando a contaminação de feridas cirúrgicas por agentes patogênicos e reduzindo o risco de infecções pós-operatórias. Desta forma, promovem uma regeneração mais previsível (Valachová & Soltés, 2021).

No âmbito da Periodontologia, Cirurgia Oral e Implantologia, o AH é utilizado em diversos tratamentos como:

- Regeneração da papila;
- Para revestir o implante dentário promovendo a osteointegração;
- Tratamento de úlceras orais;
- Tratamento de estomatite e irritações causadas por próteses fixas e removíveis;
- Após destartarização e alisamento radicular em periodontites;
- Tratamentos de gengivite e peri-implantite;

- Tratamentos não cirúrgicos de recessão gengival;
- Como enxerto em cirurgias de elevação do seio maxilar, preservação do alvéolo e procedimentos de regeneração promovendo um maior crescimento ósseo, distribuição uniforme e aumento da densidade do novo osso gerado;

(Al-Khateeb & Olszewska-Czyz, 2020; Casale *et al.*, 2016; Valachová & Soltés, 2021).

1.7.6. Oftalmologia

O AH é um componente natural do olho humano, encontra-se no corpo vítreo, glândula lacrimal, epitélio da córnea e fluido lacrimal (Fallacara *et al.*, 2018).

É frequentemente utilizado como lubrificante devido às suas propriedades viscoelásticas. Reduz a irritação, hidrata o olho, e repõe as deficiências de hialuronato de sódio no filme lacrimal (Fallacara *et al.*, 2018; Salwowska *et al.*, 2016).

O AH é o principal composto das gotas oftálmicas. Para além de ser biocompatível, permite a estabilização do filme lacrimal, redução do atrito durante o piscar de olhos e a prevenção de substâncias nocivas se colarem nos olhos, sendo um componente importante para tratar doenças como o síndrome do olho seco e aumentar o conforto no uso de lentes de contacto (Fallacara *et al.*, 2018; Litwiniuk *et al.*, 2016; Valachová & Soltés, 2021).

Adicionalmente, o AH desempenha um papel importante cicatrização pós-cirúrgica, uma vez que, permite a estabilização do filme lacrimal e a diminuição do tempo de cicatrização. Por outro lado, tem também um risco reduzido de aderências, reduz a formação de radicais livres e permite a normalização da pressão intra-ocular (Salwowska *et al.*, 2016).

É amplamente utilizado durante operações do segmento anterior do olho, como a trabeculectomia, em procedimentos de remoção de cataratas, em tratamentos de glaucoma, em cirurgia refrativa e cirurgia plástica da córnea (Salwowska *et al.*, 2016; Valachová & Soltés, 2021).

1.8. Contraindicações e efeitos adversos

Os efeitos adversos mais comuns associados ao preenchimento com AH são dor, edema, eritema, hematoma e prurido. Geralmente não duram mais de sete dias (Haneke, 2015; Walker *et al.*, 2021).

Por outro lado, podem ocorrer efeitos adversos raros como infecções, necrose por oclusão vascular e ativação do herpes labial (Walker *et al.*, 2021).

Os efeitos adversos das injeções intra-articulares de AH são geralmente leves e autolimitados, sendo que são as reações ou irritação no local da injeção as mais comuns (DeLorenzi, 2014; Walker *et al.*, 2021).

As contraindicações da utilização do AH são as seguintes:

- Crianças, gestantes e lactantes;
 - Pacientes com historial de doenças autoimunes;
 - Pacientes com cancro;
 - Pacientes submetidos a tratamentos imunoterápicos;
 - Paciente que apresente tendência para desenvolver cicatrizes hipertróficas;
 - Pacientes com herpes ativo;
 - Pacientes com historial de reação alérgica grave ou anafilaxia ao AH;
 - Alergia ao AH ou a qualquer um dos componentes da formulação.
 - Injeção em locais diferentes dos locais recomendados pelo fabricante;
 - Infecções ou doenças de pele nas proximidades do local da injeção;
- (Walker *et al.*, 2021).

2. *HYALURONIDASE*

2.1.Contexto Histórico

A HYAL é uma enzima que degrada o AH tendo sido descoberta inicialmente em bactérias. Em 1929, Duran-Reynal descobriu um “fator de expansão” em cadeias de *Streptococcus* (Etesse *et al.*, 2009).

Mais tarde, em 1934 Meyer observou a HYAL através de extrações do humor vítreo. Nesta época, as HYAL eram difíceis de purificar devido às suas concentrações extremamente baixas e devido à sua atividade enzimática que era muito difícil de medir. Portanto, foram necessários mais 75 anos até que novas técnicas científicas estivessem disponíveis para permitir o estudo mais detalhado da HYAL (Sharma & Lahiri, 2021).

Em 1949 Atikson propôs o uso da HYAL como coadjuvante para a anestesia retrobulbar (Etesse *et al.*, 2009; Sharma & Lahiri, 2021). Rapidamente a HYAL se tornou no *gold standard* para a anestesia locoregional em Oftalmologia (Etesse *et al.*, 2009).

Atualmente sabe-se que a família das HYAL estão amplamente distribuídas na natureza e foram encontradas em muitas classes, incluindo insetos, cobras, peixes e mamíferos (Weber *et al.*, 2019).

A utilização da HYAL tem diversas aplicações, como coadjuvante para aumentar a biodisponibilidade de fármacos, na terapia de extravasamentos, em diversas áreas como cirurgia, imunologia e oftalmologia, sendo a reversão e correção de complicações associadas aos preenchedores dérmicos de AH o *gold standard* de aplicação desta enzima (Jung, 2020; Olaiya *et al.*, 2022; Weber *et al.*, 2019).

2.2.Mecanismo de ação

As HYAL são endo- β -N-acetil-hexosaminidases que hidrolisam, predominante, o AH, catalisam a transglicosilação e têm uma capacidade limitada em degradar o sulfato de condroitina (Lv *et al.*, 2015).

Conforme visto anteriormente, o AH é um GAG e um dos principais componentes da matriz extracelular. A sua estrutura contém unidades repetidas dos dissacarídeos N-

acetil-D-glucosamina e ácido D-glucurônico unidos por ligações β -1,4-glicosídicas e β 1,3-glicosídicas (Jung, 2020; Papakonstantinou *et al.*, 2012).

As HYAL ao funcionarem como endoglicosidases vão quebrar estas ligações glicosídicas decompondo o AH em monossacarídeos. Ao induzirem a despolimerização do AH provocam múltiplos efeitos nos tecidos: reduzem a alta viscosidade e capacidade lubrificante do AH, atuam como um “fator de expansão” facilitando a difusão de vários substâncias injetadas por via subcutânea (Cavallini *et al.*, 2013).

Adicionalmente, é visível o papel das HYAL ao induzirem efeitos fisiológicos e patológicos pela sua participação em processos de angiogênese, embriogênese, cicatrização de feridas e na biologia tumoral (Bohaumilitzky *et al.*, 2017; Fronza *et al.*, 2014; Weber *et al.*, 2019).

Assim, o uso terapêutico das HYAL apresenta diferentes modos de ação, sejam eles, a degradação direcionada do AH para manipular características estruturais dos tecido, degradação direcionada do AH para alterar as propriedades de difusão no tecido ou para reduzir o comprimentos de cadeia do AH, a fim de induzir efeitos metabólicos (Weber *et al.*, 2019).

2.3. Tipos e Funções

A HYAL está presente tanto em órgãos (testículos, baço, pele, olhos, fígado, rins útero e placenta) como em fluidos corporais (lágrimas, sangue e sémen) (Jung, 2020).

Existem seis tipos de HYAL – HYAL 1, HYAL 2, HYAL 3, HYAL 4, PH20 e HYALP1, conforme ilustrado na tabela 1. No entanto, são as HYAL1, HYAL2 e PH20 de maior relevância a nível funcional (Buhren *et al.*, 2016; Papakonstantinou *et al.*, 2012).

Type	Expressed sites	Molecular weight	Optima pH	Substrate	Product	Reference
Hyal-1	Widely expressed, (plasma) intracellular	435AA	3.0-4.5	HA Ch/CS	—	18
Hyal-2	Widely expressed, extracellular	452AA	6.0-7.0	HA (Only high molecular weight HA)	20kDa oligosaccharides	19, 20
Hyal-3	Testis, bone marrow, weak expression in other organs	45.0-56.0kDa	—	HA	—	21
Hyal-4	Restricted to placenta, skeletal muscle, testis	54.0kDa (481AA)	5.0	Ch	—	5, 22
HYALP1	All organs, an expressed pseudogene	—	—	—	—	5
PH-20	Testis extracellular	80.0-97.0 kDa 30-59kDa	4.0, 7.0	HA Ch/CS	—	23, 24

Tabela 1 – Propriedades das Hialuronidasas. Adaptado de Lv *et al.*, 2015

O primeiro grupo, constituído pelos genes HYAL1, HYAL2 e HYAL3, localiza-se na posição 21.3 no cromossoma 3p21.3. O segundo grupo, constituído pelos genes HYAL4, PH-20 e HYALP1, localiza-se no cromossoma 7q31.3 (Weber *et al.*, 2019).

A HYAL1 está presente em órgãos como o fígado, rim, baço e coração bem como no soro e na urina. Atua como a principal hialuronidase por desempenhar funções importantes no catabolismo do AH na matriz extracelular. É capaz de degradar o AH de qualquer dimensão dando origem, sobretudo, a tetrassacarídeos e é ativada em pH ácido. Além disso, está associada a diversas doenças tumorais, distúrbios no armazenamento lisossómico e cicatrização de feridas (Lv *et al.*, 2015; Weber *et al.*, 2019).

A HYAL2 exerce uma atividade enzimática mais fraca que a HYAL1 e PH20 (Jung, 2020). Podemos encontrá-la na maior parte dos tecidos, exceto no cérebro. Localiza-se nos lisossomas mas também pode estar ligada à superfície da membrana vascular como um glicofosfatidilinositol (GPI). HYAL2 é ativada em pH ácido e degrada o AH de elevado peso molecular. Tem uma função biológica distinta, pode estimular a angiogénese o que facilita o crescimento de tumores sólidos (Lv *et al.*, 2015; Weber *et al.*, 2019).

Relativamente à HYAL3 o seu papel é desconhecido. Podemos encontrá-la nos testículos e medula óssea (Jung, 2020). HYAL3 também é expressa no cérebro ao contrário da HYAL1 e HYAL2 (Lv *et al.*, 2015).

Ao contrário das outras HYAL, a HYAL4 é uma condroitinase sem qualquer atividade sobre o AH. Pode ser encontrada na placenta e músculo-esquelético (Weber *et al.*, 2019).

A PH-20, também designada por SPAM1, exerce a atividade biológica mais forte, sendo encontrada em elevadas concentrações nos testículos estando localizada no interior da membrana acrossômica dos espermatozoides. Participa na degradação do AH durante a fertilização permitindo ao espermatozoide penetrar uma camada rica em AH que envolve o óvulo. Pode ser ativada a pH 5-8 (Buhren *et al.*, 2016; Jung, 2020).

O HYALP1 é um pseudogene, sendo transcrito, mas não dando origem a uma proteína funcional (Lv *et al.*, 2015).

As HYAL podem ser categorizadas de duas formas: pelo seu mecanismo de ação ou pelo seu pH (Cavallini *et al.*, 2013).

Através do seu mecanismo de ação classificam-se em três grupos:

- As endo- β -N-acetil-hexosaminidases que degradam as ligações β -1,4-glicosídicas do AH produzindo tetrassacarídeos. Atuam sobre o AH, condroitina, sulfato de condroitina e sulfato de dermatan. Podem ser encontradas em espermatozoides de mamíferos e lisossomas, bem como, no veneno de cobras e répteis, insetos;
- As endo- β -D-glucoronidases que degradam as ligações β -1,3-glicosídicas do AH produzindo pentassacarídeos e hexassacarídeos. Estas enzimas degradam somente o AH. Podem ser encontradas nas glândulas salivares de sanguessugas e parasitas;
- As carboxilases do AH que, ao contrário das outras HYAL, não envolvem reações de hidrólise, em alternativa, produzem um dissacarídeo insaturado através de reações de β -eliminação nas ligações β -1,4-glicosídicas. Podem ser encontradas em diversos microorganismos como *Clostridium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, e *Streptomyces*; (Cavallini *et al.*, 2013; Lv *et al.*, 2015).

Por outro lado, podem ser agrupadas em dois grupos de acordo com a sua atividade do pH:

- As HYAL ácidas que são ativadas num pH entre 3 e 4;
 - As HYAL neutras que são ativadas num pH entre 5 e 8;
- (Cavallini *et al.*, 2013; Lv *et al.*, 2015).

2.4. Interações medicamentosas

Ao ser injetado no corpo, a atividade da HYAL diminui ao longo do tempo devido à difusão, diluição e desativação. Sabe-se que a meia-vida da HYAL no plasma, quando injetada por via intravenosa em humanos, é de 2 a 3 minutos. As razões para uma meia-vida tão curta no plasma humano deve-se à presença de inúmeros inibidores da HYAL no plasma e ao seu metabolismo nos rins e fígado (Jung, 2020).

A HYAL no corpo é afetada por vários fármacos. As interações mais comuns ocorrem com a furosemida, benzodiazepínicos, fenitoína, dopamina e agonistas α -adrenérgicos. Os antagonistas da HYAL incluem agentes anti-inflamatórios (por exemplo, indometacina, dexametasona e salicilatos), compostos à base de plantas (por exemplo, flavonoides e antioxidantes), anti-histamínicos, estabilizadores de mastócitos, heparina e vitamina C que parecem tornar os tecidos parcialmente resistentes à ação enzimática da HYAL (Cavallini *et al.*, 2013).

Meios de contraste radiográficos também reduzem a atividade da HYAL (Cavallini *et al.*, 2013).

Por outro lado, os níveis dos inibidores da HYAL podem aumentar dependendo da condição física de um indivíduo. Em casos de queimaduras, septicemia e choque, os níveis dos inibidores da HYAL aumentam para prevenir o colapso circulatório, reduzindo a taxa de renovação do AH (Jung, 2020).

2.5. Aplicações clínicas

Inicialmente, a HYAL foi utilizada para aumentar a cinética de difusão de fármacos aplicados intra ou subcutaneamente devido ao seu efeito potenciador de difusão em venenos de cobra (Cavallini *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2019).

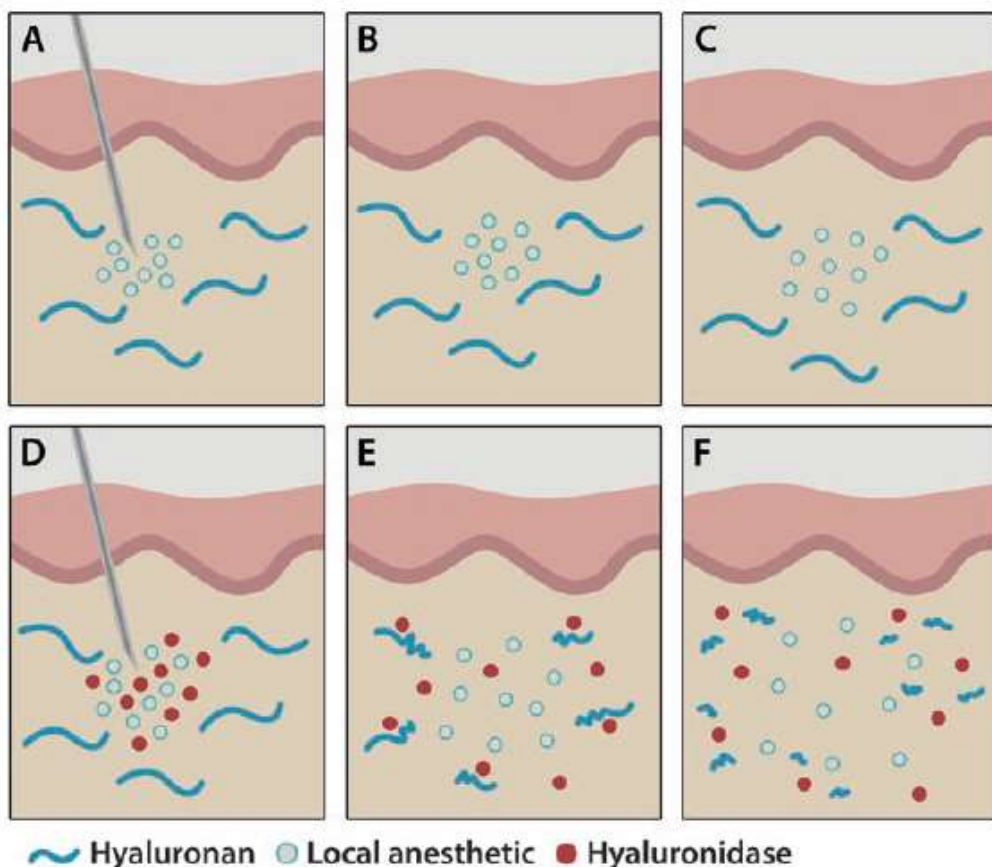


Figura 5 – Ação da HYAL como coadjuvante dos anestésicos locais. (A-C) A eficácia da infiltração da anestesia local é limitada pela densidade da matriz extracelular que limita a rápida dispersão do fármaco no tecido. (D-F) A HYAL é administrada juntamente com o anestésico local promovendo a dispersão mais rápida do fármaco ao funcionar como um “fator de expansão”. Adaptado de Weber *et al.*, 2019.

A eficácia dos fármacos aplicados por via intracutânea é limitada devido à biodisponibilidade do princípio ativo. A HYAL é capaz de promover a difusão dos fármacos na matriz extracelular aumentando a permeabilidade dos vasos sanguíneos conforme ilustrado na Figura 5 (Weber *et al.*, 2019).

Neste sentido, a aplicação simultânea da HYAL com anestésicos locais permite aumentar, significativamente, a eficácia da anestesia nos primeiros minutos após a injeção

bem como, elevar a segurança do procedimento. Ao diminuir a viscosidade da matriz extracelular, a HYAL facilita a difusão do agente anestésico (Lv *et al.*, 2015; Weber *et al.*, 2019).

O uso da HYAL como coadjuvante de anestésicos locais tem aplicação em diversos campos como, oftalmologia, medicina dentária, ortopedia, entre outros (Lv *et al.*, 2015; Weber *et al.*, 2019).

Em oftalmologia, é utilizada para a anestesia peribulbar e retrobulbar (Lv *et al.*, 2015; Silverstein, 2012).

Para além do uso da HYAL para anestesia local, surge também o uso da hialuronidase humana recombinante (rHuPH20) na aplicação subcutânea de insulina, morfina, antibióticos, anticorpos monoclonais e imunoglobulinas (Weber *et al.*, 2019).

A HYAL permite também evitar danos causados por extravasamento durante terapia intravenosa reduzindo a concentração das substâncias. A extensão do dano dependerá sempre da concentração da substância administrada, sendo que, este tipo de lesões são frequentes em terapias com quimioterapia (Cavallini *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2019).

Porém, é em Cirurgia Plástica e Dermatologia, que a HYAL tem sido frequentemente usada para dissolver o AH injetável eliminando sobrecorreções, prevenir complicações de isquemia e na cicatrização pós-operatória (Cavallini *et al.*, 2013).

2.6. Hialuronidase na reversão do Ácido Hialurónico

Conforme visto anteriormente, é no âmbito da harmonização facial em Cirurgia Plástica e Dermatologia que a HYAL tem sido amplamente utilizada (Weber *et al.*, 2019).

As alterações na pele estão entre os sinais mais visíveis de envelhecimento. À medida que envelhecemos, diminui o conteúdo de AH na nossa pele devido a fatores extrínsecos (exposição ao sol, ao fumo, consumo de álcool ou a má nutrição) e intrínsecos (mudanças hormonais, atividade dos fibroblastos). Estas alterações degenerativas afetam não só o AH, mas também, outros componentes da matriz extracelular como a elastina e o colagénio resultando numa perda de volume, de hidratação, de elasticidade e tornando

a pele mais flácida e com rugas (Olaiya *et al.*, 2022; Papakonstantinou *et al.*, 2012; Weber *et al.*, 2019; Zhang & Duan, 2018).

Hoje em dia, a aplicação de preenchedores dérmicos à base de AH são considerados o *gold standard* para tratamentos não cirúrgicos minimamente invasivos. No âmbito da harmonização facial, o AH é injetado nos sulcos da pele e rugas mais profundas para remodelar a pele. Se realizado corretamente, o AH injetável é seguro e pode atuar de forma sinérgica com outros procedimentos estéticos minimamente invasivos (Buhren *et al.*, 2016; Weber *et al.*, 2019).

Uma das principais vantagens dos preenchedores dérmicos à base de AH é a disponibilidade de um antídoto específico, a HYAL, que permite reverter complicações resultantes das injeções de preenchimento, uma vez que, consegue degradar efetivamente o AH conforme ilustrado na Figura 6 (Buhren *et al.*, 2016; Lacoste *et al.*, 2016).

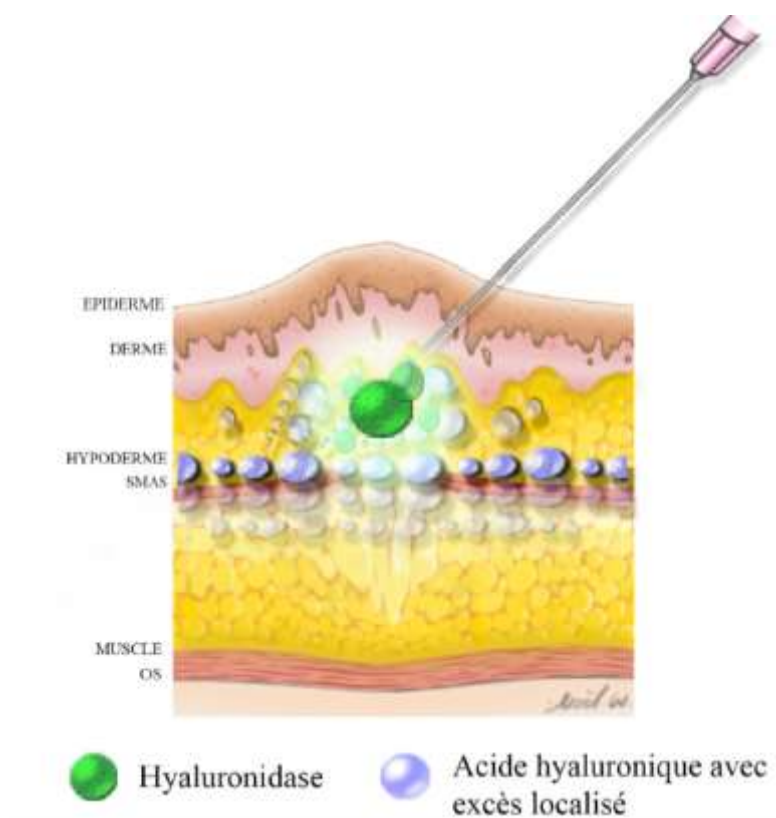


Figura 6 – Efeito de degradação da HYAL sobre os preenchedores de AH. A injeção de HYAL resulta numa rápida degradação da complexa rede de preenchedores de AH em fragmentos. Adaptado de Lacoste *et al.*, 2016.

Algumas das complicações que podem ocorrer com os preenchedores de AH são dor, edema, hematomas, sobrecorreção, efeito Tyndall (descoloração azulada causada pela injeção muito superficial de AH), edema da pálpebra inferior após aumento lacrimal, granulomas, infecções, necrose por oclusão vascular (Buhren *et al.*, 2016; DeLorenzi, 2013; Haneke, 2015; Park *et al.*, 2011).

Para que a HYAL dissolva um preenchedor de AH, tem de ter a capacidade de aceder às ligações intramoleculares do AH. Este acesso depende da quantidade de ligações cruzadas entre as moléculas de AH e da concentração de AH. Quanto maior a reticulação, mais dificuldade terá a HYAL em aceder aos locais de ligação dos preenchedores de AH. Por este motivo, quanto mais os preenchedores de AH são reticulados maior será o tempo de dissolução pela HYAL. Adicionalmente, quanto maior a concentração de AH, mais lentamente será dissolvido pela HYAL (Jung, 2020; Rao *et al.*, 2014).

A administração de HYAL deve ser precisa e limitada à área afetada. No entanto, antes de se iniciar o tratamento com a HYAL, a área afetada deve ser avaliada com ultrassom a fim de perceber a profundidade, quantidade e extensão do AH injetado (Cavallini *et al.*, 2013).

No tratamento de uma sobrecorreção com AH, reações inflamatórias ou aplicações superficiais, a HYAL deve ser administrada na pele e tecido subcutâneo por infiltração direta da massa visível ou palpável de AH (Cohen *et al.*, 2015; King *et al.*, 2018).

Recomenda-se massajar para misturar a enzima com o AH promovendo a degradação do preenchimento. Nos casos de obstrução vascular por AH, deve-se administrar a HYAL diretamente no vaso ocluído (Cohen *et al.*, 2015; King *et al.*, 2018).

Para diluir 0,1 mL de 20 mg/mL de AH são necessários 5 Ul de HYAL (King *et al.*, 2018). A quantidade a administrar dependerá da região, extensão e do tipo de AH, por exemplo, preenchedores com concentrações mais elevadas de AH exigem maior quantidade de HYAL (Cavallini *et al.*, 2013).

Por norma, recomenda-se a administração de 10-20 Ul no tratamento de cada área. Doses superiores a 200 Ul por tratamento devem ser evitadas (Cavallini *et al.*, 2013).

A aplicação precoce da HYAL nas primeiras 4 horas após os tratamentos revelam ser eficazes na prevenção de necrose (Buhren *et al.*, 2016; Cavallini *et al.*, 2013).

Aplicação tardia da HYAL (mais de 24 horas após a injeção de AH) não se mostrou eficaz em evitar a necrose da pele. No entanto, o seu uso pode reduzir o tamanho da área necrótica e melhorar o processo de cicatrização (Buhren *et al.*, 2016; Cavallini *et al.*, 2013).

Por norma, observam-se resultados após 48h e a administração pode ser repetida em intervalos de 48h ou mais. A necessidade adicional de tratamento dependerá da indicação, riscos e benefícios, efeitos adversos dos tratamentos e satisfação do doente e do profissional (Buhren *et al.*, 2016; King *et al.*, 2018).

2.7.Efeitos adversos e complicações

No geral, a HYAL aparenta ser segura e eficaz numa variedade de campos como a cirurgia plástica e outros (Sharma & Lahiri, 2021).

Os efeitos adversos são pouco comuns aquando da administração da HYAL, no entanto, podem ocorrer reações alérgicas dependendo do local da injeção (Cavallini *et al.*, 2013).

De acordo com a literatura, são as reações locais as mais comuns com uma incidência de 0,05% a 0,69%. Os principais sintomas incluem edema, eritema, dor e prurido. Sintomas como urticária e angioedemema também apresentam uma incidência baixa (menos de 0,1%) (Cavallini *et al.*, 2013; Dunn *et al.*, 2010; Lacoste *et al.*, 2016).

Quando a dose administrada por via intravenosa de HYAL é superior a 100 000 UI existe probabilidade de ocorrerem reações alérgicas. Por outro lado, se a dose for superior a 200 000 UI, a probabilidade de reações alérgicas é de 31,3% (Jung, 2020).

Na sua maioria, as reações alérgicas da HYAL são consideradas reações de hipersensibilidade imediatas (Tipo I – mediadas por IgE). Este tipo de reações manifestam-se como angioedemas, após 1 a 2 horas da administração, sem resposta a antibiótico. Neste casos, a aplicação de corticosteroides e a toma de anti-histamínicos podem diminuir os efeitos (Cavallini *et al.*, Etesse *et al.*, 2009; 2013; Jung, 2020; Kim *et al.*, 2015).

No entanto, também podem ocorrer reações hipersensibilidade tardias (Tipo IV – mediadas por células T). Este tipo de reações podem ocorrer mesmo após 24 horas (Cavallini *et al.*, 2013; Jung, 2020; Kim *et al.*, 2015).

A HYAL tem a capacidade de aumentar a permeabilidade capilar o que pode piorar, potencialmente, os sintomas acima mencionados. Desta forma, torna-se importante realizar um teste cutâneo 72 horas antes da aplicação da HYAL. Por norma o teste é realizado com a aplicação de 3 UI de HYAL (Jung, 2020; Lacoste *et al.*, 2016).

Geralmente, não existe ligação entre o histórico de alergias do paciente e a resposta à HYAL. Contudo, dependendo da origem da HYAL, a injeção da HYAL deve ser evitada em pacientes alérgicos a picadas de abelha e a colagénio de origem bovina (Jung, 2020; Lacoste *et al.*, 2016).

2.8.Consentimento e Legislação

A prescrição da HYAL deve ter em conta dois aspetos – disponibilidade dos fármacos e a sua utilização *off-label* (Cavallini *et al.*, 2013; Stafford, 2008).

Nos EUA, as HYAL são regulamentadas pela FDA tendo sido aprovadas para as seguintes aplicações clínicas:

- Terapia coadjuvante na administração de fármacos injetáveis;
 - Técnica de hipodermoclise;
 - Como coadjuvante em urografia subcutânea para aumentar a reabsorção de agentes de contraste radiopacos;
- (Cavallini *et al.*, 2013; Stafford, 2008).

Na Europa, as HYAL estão categorizadas para:

- Terapia coadjuvante na administração subcutânea de fármacos;
 - Aumento da penetração de um anestésico local;
 - Promoção da reabsorção do meio de contraste em urologia;
 - Promoção da reabsorção de hematomas subcutâneos
- (Cavallini *et al.*, 2013).

Embora a HYAL não esteja regulamentada para a reversão de preenchedores de AH ou na redução de edema e lise de aderências no tratamento de dor crónica, a sua prescrição *off-label* é permitida. (Etesse *et al.*, 2009; King *et al.*, 2018).

Deve ser obtido o consentimento informado do paciente e as prescrições relacionadas (especificando a indicação) devem ser registadas no processo do paciente (Cavallini *et al.*, 2013).

CONCLUSÃO

Esta monografia pretende uma melhor compreensão sobre a versatilidade do uso do AH correlacionando com o modo de ação molecular e celular da aplicação clínica da HYAL na sua reversão.

O AH é um polissacarídeo abundante da matriz extracelular e encontra-se envolvido em inúmeros processos fisiológicos e patológicos.

Em virtude das suas propriedades exclusivas de viscoelasticidade, biocompatibilidade, lubrificação e propriedades não imunogenicidade tem imensas aplicações na área da Oftalmologia, Medicina Dentária, como agente transportador de fármacos, Dermatologia cosmética, Ortopedia, entre outros.

Percebemos que o AH pode ser extraído de diversas fontes com pesos moleculares diferentes, o que possibilita a sua utilização como base em variados produtos.

Desempenha um papel fundamental no corpo humano na regulação de processos biológicos de sinalização, adesão celular, motilidade, crescimento e diferenciação. Por este motivo, a sua produção excessiva e rotatividade resulta em diversas patologias e doenças hereditárias.

Ao ligar-se ao recetor CD44 ativa as cascatas de sinalização intracelular que estão envolvidas em processos da morfogénese e cicatrização de feridas, regulando a atividade das células inflamatórias e dos fibroblastos.

As funções biológicas do AH dependem do seu tamanho molecular, das proteínas de ligação e de sua distribuição nos tecidos.

A biossíntese do AH, a renovação tecidual e homeostase são coordenados por três enzimas transmembranares (HAS1, HAS2 e HAS3) e várias HYAL. Na sua síntese são produzidos polímeros de diversas dimensões e conformações. A sua degradação é realizada através de dois mecanismos - a degradação enzimática, por reações de hidrólise realizadas pelas HYAL e as reações de oxidação-redução realizadas por espécies reativas de oxigénio (ROS).

Na área da Medicina Dentária, é utilizado como biomaterial e como adjuvante na reparação tecidual e processos traumáticos, no tratamento de gengivite, recessões, bolsas periodontais, peri-implantite e reconstrução da papila interdentária.

Como agente transportador de fármacos desempenha um papel fundamental na Oncologia ao possibilitar que o fármaco permaneça numa concentração mais elevada no interior da célula tumoral. Adicionalmente, tem sido amplamente utilizado em sistemas de transporte de nanopartículas, gel e genes.

Em Oftalmologia, o AH é um componente natural do olho humano e é frequentemente utilizado em produtos oftálmicos, como lubrificante, no tratamento de doenças oftálmicas, na cicatrização pós-cirúrgica e em procedimentos cirúrgicos.

Além disso, é um dos principais agentes lubrificantes do líquido sinovial articular, sendo importante para o tratamento de artrite e osteoartrite. A viscosuplementação representa uma abordagem terapêutica eficaz no tratamento e na progressão destas doenças.

O seu uso na área da Medicina cosmética tem vindo a crescer, especialmente na Harmonização facial como preenchedor dérmico injetável. Ao conferir um aspeto liso à pele, as injeções de gel de AH têm sido frequentemente usados em tratamentos faciais para o aumento das partes moles, hidratação e/ou preenchimento de rugas e correção de defeitos.

Apesar do seu perfil de segurança, comporta alguns efeitos adversos e complicações.

A HYAL são um instrumento eficaz de degradação e reversão do efeito do AH. A partir da década de 1940, a enzima HYAL evoluiu de um “fator de expansão” para aumentar a biodisponibilidade de fármacos, para evitar danos de extravasamentos, e para reverter e corrigir complicações associadas aos preenchedores dérmicos de AH.

Apesar da sua aplicação neste último campo ser *off-label*, é aqui que é considerado o *gold standard* de aplicação desta enzima.

A degradação do AH pela HYAL também é crítica em diversos processos que vão desde a embriogénese até à cicatrização de feridas.

Em conclusão, o AH e as suas aplicações versáteis foram extensivamente explorados nos últimos anos e continuam a ser objeto de extensa revisão. Embora o conhecimento existente sobre o AH seja vasto, ainda há muito a aprender sobre este GAG. Por último, dada a crescente utilização da HYAL, torna-se cada vez mais fulcral o conhecimento clínico sobre esta enzima relativamente ao seu mecanismo de ação, metabolismo e efeitos adversos. São necessários mais estudos prospetivos para compreender melhor o mecanismo de reversão da HYAL sobre o AH, bem como, a definição de protocolos de aplicação da HYAL.

BIBLIOGRAFIA

- Abatangelo, G., Vindigni, V., Avruscio, G., Pandis, L., & Brun, P. (2020). Hyaluronic Acid: Redefining Its Role. *Cells*, 9(7), 1–19. <https://doi.org/10.3390/cells9071743>
- Al-Khateeb, R. & Olszewska-Czyz, I. (2020). Biological molecules in dental applications: hyaluronic acid as a companion biomaterial for diverse dental applications. *Heliyon*. 6(4), e03722. <https://doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03722>.
- Andre, P. (2004). Hyaluronic acid and its use as a "rejuvenation" agent in cosmetic dermatology. *Semin Cutan Med Surg*. 23(4), 218-22. <https://doi: 10.1016/j.sder.2004.09.002>.
- Bayer, I.S. (2020). Hyaluronic Acid and Controlled Release: A Review. *Molecules*. 25(11), 2649. <https://doi: 10.3390/molecules25112649>.
- Bohaumilitzky, L., Huber, A.K., Stork, E.M., Wengert, S., Woelfl, F. & Boehm, H. (2017). A Trickster in Disguise: Hyaluronan's Ambivalent Roles in the Matrix. *Front Oncol*. 7, 242. <https://doi: 10.3389/fonc.2017.00242>.
- Bowman, S., Awad, M.E., Hamrick, M.W., Hunter, M. & Fulzele, S. (2018). Recent advances in hyaluronic acid based therapy for osteoarthritis. *Clin Transl Med*. 7(1), 6. <https://doi: 10.1186/s40169-017-0180-3>.
- Buhren, B.A., Schrumpf, H., Hoff, N.P., Bölke, E., Hilton, S. & Gerber, P.A. (2016). Hyaluronidase: from clinical applications to molecular and cellular mechanisms. *Eur J Med Res*. 21, 5. <https://doi: 10.1186/s40001-016-0201-5>.
- Burdick, J.A & Prestwich, G.D. (2011). Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Adv Mater*. 23(12), H41-56. <https://doi: 10.1002/adma.201003963>.
- Casale, M., Moffa, A., Vella, P., Sabatino, L., Capuano, F., Salvinelli, B., Lopez, M.A., Carinci, F. & Salvinelli, F. (2016). Hyaluronic acid: Perspectives in dentistry. A systematic review. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 29(4), 572-582. <https://doi: 10.1177/0394632016652906>.

- Cavallini, M., Gazzola, R., Metalla, M. & Vaienti, L. (2013). The role of hyaluronidase in the treatment of complications from hyaluronic acid dermal fillers. *Aesthet Surg J.* 33(8), 1167-74. [https://doi: 10.1177/1090820X13511970](https://doi.org/10.1177/1090820X13511970).
- Cohen, J.L., Biesman, B.S., Dayan, S.H., DeLorenzi, C., Lambros, V.S., Nestor, M.S., Sadick, N. & Sykes, J. (2015). Treatment of Hyaluronic Acid Filler-Induced Impending Necrosis With Hyaluronidase: Consensus Recommendations. *Aesthet Surg J.* 35(7), 844-9. [https://doi: 10.1093/asj/sjv018](https://doi.org/10.1093/asj/sjv018)
- DeLorenzi, C. (2013). Complications of injectable fillers, part I. *Aesthet Surg J.* 33(4), 561-75. [https://doi: 10.1177/1090820X13484492](https://doi.org/10.1177/1090820X13484492).
- de Oliveira, J.D., Carvalho, L.S., Gomes, A.M., Queiroz, L.R., Magalhães, B.S. & Parachin, N.S. (2016). Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microb Cell Fact.* 15(1), 119. [https://doi: 10.1186/s12934-016-0517-4](https://doi.org/10.1186/s12934-016-0517-4).
- Dicker, K. T., Gurski, L. A., Pradhan-Bhatt, S., Witt, R. L., Farach-Carson, M. C., & Jia, X. (2014). Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 10, Issue 4, pp. 1558–1570). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.019>
- Dovedytis, M., Liu, Z.J. & Bartlett, S. (2020). Hyaluronic acid and its biomedical applications: A review. *Engineered Regeneration.* 2020; 1:102–113. [https://doi: 10.1016/j.engreg.2020.10.001](https://doi.org/10.1016/j.engreg.2020.10.001).
- Dunn, A.L., Heavner, J.E., Racz, G. & Day, M. (2010). Hyaluronidase: a review of approved formulations, indications and off-label use in chronic pain management. *Expert Opin Biol Ther.* 10(1), 127-31. [https://doi: 10.1517/14712590903490382](https://doi.org/10.1517/14712590903490382).
- Erickson, M. & Stern, R. (2012). Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism. *Biochem Res Int.* 893947. [https://doi: 10.1155/2012/893947](https://doi.org/10.1155/2012/893947).
- Etesse, B., Beaudroit, L., Deleuze, M., Nouvellon, E. & Ripart, J. (2009). Hyaluronidase: plaidoyer pour un retour [Hyaluronidase: Here we go again]. *Ann Fr Anesth Reanim.* 28(7-8), 658-65. [https://doi: 10.1016/j.annfar.2009.05.013](https://doi.org/10.1016/j.annfar.2009.05.013).

- Fallacara, A., Baldini, E., Manfredini, S. & Vertuani, S. (2018). Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers (Basel)*, 10(7), 701. <https://doi:10.3390/polym10070701>.
- Fronza, M., Caetano, G.F., Leite, M.N., Bitencourt, C.S., Paula-Silva, F.W., Andrade, T.A., Frade, M.A., Merfort, I. & Faccioli, L.H. (2014). Hyaluronidase modulates inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing. *PLoS One*. 9(11), e112297. <https://doi:10.1371/journal.pone.0112297>.
- Garantziotis, S. & Savani, R.C. (2019). Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context. *Matrix Biology*. 78-79, 1-10. <https://doi:10.1016/j.matbio.2019.02.002>.
- Girish, K.S. & Kemparaju, K. (2007). The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci*. 80(21), 1921-43. <https://doi:10.1016/j.lfs.2007.02.037>.
- Haneke, E. (2015). Managing Complications of Fillers: Rare and Not-So-Rare. *J Cutan Aesthet Surg*. 8(4), 198-210. <https://doi:10.4103/0974-2077.172191>.
- Heldin, P., Lin, C.Y., Kolliopoulos, C., Chen, Y.H. & Skandalis, S.S. (2018). Regulation of hyaluronan biosynthesis and clinical impact of excessive hyaluronan production. *Matrix Biology*. 78-79, 100-117. <https://doi:10.1016/j.matbio.2018.01.017>.
- Hintze, V., Schnabelrauch, M. & Rother, S. (2022). Chemical Modification of Hyaluronan and Their Biomedical Applications. *Front Chem*. 10, 830671. <https://doi:10.3389/fchem.2022.830671>.
- Huang, G. & Huang H. (2018). Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery. *Drug Deliv*. 25(1), 766-772. <https://doi:10.1080/10717544.2018.1450910>.
- Jung, H. (2020). Hyaluronidase: An overview of its properties, applications, and side effects. *Arch Plast Surg*. 47(4), 297-300. <https://doi:10.5999/aps.2020.00752>.

- Joy, R. A., Vikkath, N., & Ariyannur, P. S. (2018). Metabolism and mechanisms of action of hyaluronan in human biology. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*. 33(1), 15–32. <https://doi.org/10.1515/dmpt-2017-0031>
- Kapoor, K.M., Saputra, D.I., Porter, C.E., Colucci, L., Stone, C., Brenninkmeijer, E.E.A., Sloane, J., Sayed, K., Winaya, K.K. & Bertossi, D. (2021). Treating Aging Changes of Facial Anatomical Layers with Hyaluronic Acid Fillers. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 14, 1105-1118. <https://doi: 10.2147/CCID.S294812>.
- Kim, J.E. & Sykes, J.M. (2011). Hyaluronic acid fillers: history and overview. *Facial Plast Surg*. 27(6), 523-8. <https://doi: 10.1055/s-0031-1298785>.
- Kim, M.S., Youn, S., Na, C.H. & Shin, B.S. (2015). Allergic reaction to hyaluronidase use after hyaluronic acid filler injection. *J Cosmet Laser Ther*. 17(5), 283-5. <https://doi: 10.3109/14764172.2015.1007069>.
- King, M., Convery, C. & Davies, E. (2018). This month's guideline: The Use of Hyaluronidase in Aesthetic Practice (v2.4). *J Clin Aesthet Dermatol*. 11(6), E61-E68.
- Kobayashi, T., Chanmee, T. & Itano, N. (2020). Hyaluronan: Metabolism and Function. *Biomolecules*. 10(11), 1525. <https://doi: 10.3390/biom10111525>. PMID: 33171800; PMCID: PMC7695009.
- Lacoste, C., Hersant, B., Bosc, R., Noel, W. & Meningaud, J.P. (2016). Utilisation de la hyaluronidase pour la correction des injections d'acide hyaluronique en médecine esthétique [Use of hyaluronidase to correct hyaluronic acid injections in aesthetic medicine]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale*. 117(2), 96-100. <https://doi: 10.1016/j.revsto.2016.01.016>.
- Lipko-Godlewska, S., Bolanča, Ž., Kalinová, L., Kermen, I., Onisak, B., Papp, I., Rebrov, M. & Valančienė, G. (2021). Whole-Face Approach with Hyaluronic Acid Fillers. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 14, 169-178. <https://doi: 10.2147/CCID.S292501>.
- Litwiniuk, M., Krejner, A., Speyrer, M.S., Gauto, A.R. & Grzela, T. (2016). Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. *Wounds*. 28(3), 78-88.

- Lv, S.H., Rong, S.F., Cai, B.G., Guan, S.M. & Li, Q.Q. (2015). Property and current clinical applications of mammal hyaluronidase. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 19(20), 3968-76.
- Maleki, A., Kjøniksen, A.L. & Nystrom, B. (2018). Effect of pH on the behavior of hyaluronic acid in dilute and semidilute aqueous solutions. *Macromol. Symp.* 274, 131–140.
- Mustonen, A.M., Capra, J., Rilla, K., Lehenkari, P., Oikari, S., Kääriäinen, T., Joukainen, A., Kröger, H., Paakkonen, T., Matilainen, J. & Nieminen, P. (2021). Characterization of hyaluronan-coated extracellular vesicles in synovial fluid of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 22(1), 247. [https://doi: 10.1186/s12891-021-04115-w](https://doi.org/10.1186/s12891-021-04115-w).
- Olaiya, O.R., Forbes, D., Humphrey, S., Beleznyay, K., Mosher, M. & Carruthers, J. (2022). Hyaluronidase for Treating Complications Related to HA Fillers: A National Plastic Surgeon Survey. *Plast Surg (Oakv).* 30(3), 233-237. [https://doi: 10.1177/22925503211019618](https://doi.org/10.1177/22925503211019618).
- Papakonstantinou, E., Roth, M. & Karakiulakis, G. (2012). Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermatoendocrinol.* 4(3), 253-8. [https://doi: 10.4161/derm.21923](https://doi.org/10.4161/derm.21923).
- Park, T.H., Seo, S.W., Kim, J.K. & Chang, C.H. (2011). Clinical experience with hyaluronic acid-filler complications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 64(7), 892-6. [https://doi: 10.1016/j.bjps.2011.01.008](https://doi.org/10.1016/j.bjps.2011.01.008).
- Petrey, A.C. & de la Motte, C.A. (2014). Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Front Immunol.* 5, 101. [https://doi: 10.3389/fimmu.2014.00101](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00101).
- Rao, V., Chi, S. & Woodward, J. (2014). Reversing facial fillers: interactions between hyaluronidase and commercially available hyaluronic-acid based fillers. *J Drugs Dermatol.* 13(9), 1053-6.
- Salwowska, N.M., Bebenek, K.A., Źądło, D.A. & Wcisło-Dziadecka, D.L. (2016). Physiochemical properties and application of hyaluronic acid: a systematic review. *J Cosmet Dermatol.* 15(4), 520-526. [https://doi: 10.1111/jocd.12237](https://doi.org/10.1111/jocd.12237)

- Sanchez, D.C., Ocampo, B.R.Y. & Chirino, C.A.E. (2017). Use of hyaluronic acid as an alternative for reconstruction of interdental papilla. *Rev. Odontol. Mex.* 21, 199–207.
- Sharma, D.S.C. & Lahiri, M.A. (2021). Use of hyaluronidase in plastic surgery: A review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 74(7), 1610-1614. [https://doi: 10.1016/j.bjps.2021.03.125](https://doi.org/10.1016/j.bjps.2021.03.125).
- Silverstein, A.M., Greenbaum, S. & Stern, R. (2012). Hyaluronidase in ophthalmology. *J Applied Res.* 12, 1-13.
- Snetkov, P., Zakharova, K., Morozkina, S., Olekhovich, R. & Uspenskaya, M. (2020). Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. *Polymers (Basel)*. 12(8), 1800. [https://doi: 10.3390/polym12081800](https://doi.org/10.3390/polym12081800).
- Soltés, L., Mendichi, R., Kogan, G., Schiller, J., Stankovska, M. & Arnhold, J. (2006). Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan. *Biomacromolecules*. 7(3), 659-68. [https://doi: 10.1021/bm050867v](https://doi.org/10.1021/bm050867v).
- Stafford, R.S. (2008). Regulating off-label drug use--rethinking the role of the FDA. *N Engl J Med.* 358(14), 1427-9. [https://doi: 10.1056/NEJMp0802107](https://doi.org/10.1056/NEJMp0802107).
- Stern, R. & Jedrzejewski, M.J. (2006). Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev.* 106(3), 818-39. [https://doi: 10.1021/cr050247k](https://doi.org/10.1021/cr050247k).
- Tamer, T.M. (2013). Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdiscip Toxicol.* 6(3), 111-25. [https://doi: 10.2478/intox-2013-0019](https://doi.org/10.2478/intox-2013-0019).
- Ucm, R., Aem, M., Lhb, Z., Kumar, V., Taherzadeh, M.J., Garlapati, V.K. & Chandel, A.K. (2022). Comprehensive review on biotechnological production of hyaluronic acid: status, innovation, market and applications. *Bioengineered.* 13(4), 9645-9661. [https://doi: 10.1080/21655979.2022.2057760](https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2057760).
- Valachová, K. & Šoltés, L. (2021). Hyaluronan as a Prominent Biomolecule with Numerous Applications in Medicine. *Int J Mol Sci.* 22(13), 7077. [https://doi: 10.3390/ijms22137077](https://doi.org/10.3390/ijms22137077).

- Vasvani, S., Kulkarni, P. & Rawtani, D. (2020). Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies. *Int J Biol Macromol.* 151, 1012-1029. [https://doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.066](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.066).
- Volpi, N., Schiller, J., Stern, R. & Soltés, L. (2009). Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Curr Med Chem.* 16(14), 1718-45. [https://doi: 10.2174/092986709788186138](https://doi.org/10.2174/092986709788186138).
- Walker, K., Basehore, B. M., Goyal, A., Bansal, P., & Zito, P. M. (2021). Hyaluronic Acid. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Weber, G.C., Buhren, B.A., Schrumpf, H., Wohlrab, J. & Gerber, P.A. (2019). Clinical Applications of Hyaluronidase. *Adv Exp Med Biol.* 1148, 255-277. [https://doi: 10.1007/978-981-13-7709-9_12](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7709-9_12).
- Wight, T.N. (2017). Provisional matrix: A role for versican and hyaluronan. *Matrix Biology.* 60-61, 38-56. [https://doi: 10.1016/j.matbio.2016.12.001](https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.12.001).
- Xu, X., Jha, A.K., Harrington, D.A., Farach-Carson, M.C. & Jia, X. (2012). Hyaluronic Acid-Based Hydrogels: from a Natural Polysaccharide to Complex Networks. *Soft Matter.* 8(12), 3280-3294. [https://doi: 10.1039/C2SM06463D](https://doi.org/10.1039/C2SM06463D).
- Žádníková, P., Šínová, R., Pavlík, V., Šimek, M., Šafránková, B., Hermannová, M., Nešporová, K. & Velebný, V. (2022). The Degradation of Hyaluronan in the Skin. *Biomolecules.* 12(2), 251. [https://doi: 10.3390/biom12020251](https://doi.org/10.3390/biom12020251).
- Zhang, S. & Duan, E. (2018). Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. *Cell Transplant.* 27(5), 729-738. [https://doi: 10.1177/0963689717725755](https://doi.org/10.1177/0963689717725755).